表1 轨迹定量法测定供试样品蚓激酶及其水解产物($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Determination of lumbrukinase and its hydrolysates in four processed earthworms by trace-tracking analysis ($\bar{x}\pm s$)

供试样品	斑点轨迹 /(INT×mm)	峰值 /INT	质量浓度 /(μg·mL⁻¹)	质量分数 /(μg·g⁻¹)
秉氏环毛蚓	29.2±2.74	50.4±2.13	9.47	118.34
日本杜拉蚓	20.0±1.66	37.9±1.36	6.48	81.05
天锡杜拉蚓	17.8±1.22	29.1±1.08	5.77	72.13
参环毛蚓	30.9±2.98	48.0±2.33	10.02	125.23

表2 4品种地龙炮制品中蚓激酶及其水解产物质量分数的LSD检验

Table 2 LSD Test of lumbrukinase and its hydrolysates in four species of processed earthworms

组平均数	参环毛蚓：125.23	秉氏环毛蚓：118.34	日本杜拉蚓：81.05	天锡杜拉蚓：72.13
参环毛蚓：125.23	0	6.89	44.18	53.10
秉氏环毛蚓：118.34	6.89	0	37.29	46.21
日本杜拉蚓：81.05	44.18	37.29	0	8.92
天锡杜拉蚓：72.13	53.10	46.21	8.92	0

3 讨论

应用斑点免疫印迹法对4种地龙炮制品蚓激酶及其水解产物的量的测定结果表明，山东地方品种秉氏环毛蚓炮制品中蚓激酶及其水解产物的量与现行临床应用地龙药材参环毛蚓无显著性差异，理论上，可作为现行地龙药材的替代品。

以现行临床应用的中药材（如水蛭、土鳖虫、全蝎等）为对照，斑点免疫印迹法可对多种中药资源药效品质作平行比较，是一种发现新的现行中药材替代品、扩大中药资源范围的有效手段；对于生药的药效成分已明确、而在炮制中不稳定的这类中药炮制品，可以应用斑点免疫印迹法进行质量检测与控制，并指导临床用药，具有重大实践意义。

参考文献：

[1] 王宗伟，梁秀文，范兴亚. 蚯蚓生物工程技术研究进展[J]. 中草药，2000，31(5)：386-387.

[2] Sambrook J，Fritsch E F，Maniatis T. *Molecular Cloning*：A LaboratoryManual [M]. 2nd ed. New York：Cold SpringHarbor Laboratory Press，1989.

大孔吸附树脂对丁香叶中丁香苦苷的富集工艺研究

刘 欣[1]，高月娟[2]，王建明[2*]，许贵军[2]，薛红梅[2]

（1. 浙江大学药学院，浙江 杭州 310058；2. 黑龙江中医药大学中医药研究院，黑龙江 哈尔滨 150040）

摘 要：目的 研究大孔吸附树脂富集丁香苦苷类成分的工艺条件及参数。**方法** 以丁香苦苷为考察指标，建立HPLC分析方法，通过考察6种大孔吸附树脂对丁香苦苷的吸附分离性能，筛选出AB-8树脂作为分离纯化丁香苦苷类成分的介质，并对AB-8树脂的吸附性能进行研究，考察富集丁香苦苷类成分的最佳工艺条件。**结果** 丁香叶经水提醇沉浓缩后，以AB-8型大孔树脂为吸附剂，4 BV的水洗脱出去杂质后，收集5 BV 50%乙醇洗脱液为最佳工艺条件。**结论** 大孔吸附树脂分离工艺可作为富集丁香苦苷类成分的有效方法，并为丁香叶药材的质量控制和新型给药系统的研究奠定基础。

关键词：富集；丁香叶；丁香苦苷；大孔吸附树脂

中图分类号：R286.1 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)11-1655-05

Enrichment process of syringopicroside in *Folium Syringae Oblatae* with macroporous resin

LIU Xin[1], GAO Yue-juan[2], WANG Jian-ming[2], XU Gui-jun[2], XUE Hong-mei[2]

(1. College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To study the optimal conditions and parameters for the enrichment process of syringopicroside in *Folium Syringae Oblatae* with macroporous resin. **Methods** With the enrichment degree of syringopicroside as an index, the analytical method of HPLC was developed, AB-8 resin was

收稿日期：2007-05-23

基金项目：教育部博士点专项基金资助项目(20060228005)

作者简介：刘 欣(1974—)，男，黑龙江省哈尔滨市人，讲师，中药学博士生，浙江大学药学院博士后，主要从事中药新型给药系统、药物作用机制研究。Tel：(0571)88208457 E-mail：Liuxinyyll@yahoo.com.cn

*通讯作者 王建明 Tel/Fax：(0451)82196262 E-mail：wangjianming@hljucm.net

selected as the medium for purification of syringopicroside on the basis of comparing six kinds of macroporous resin's adsorption and separation performances, and the optimal conditions of the enrichment process were investigated. **Results** The optimal conditions were that the extract of *Folium Syringae Oblatae* was extracted by water and condensed by alcohol precipitation taking AB-8 resin column as adsorbent, the resin was washed by 4 BV of distilled water to remove impurity and 5 BV of 50% ethanol to elute syringae. **Conclusion** The process is an effective method to enrich syringopicroside and provide a way to research new medicine delivery system.

Key words: *Folium Syringae Oblatae*; enrichment; syringopicroside; macroporous resin

丁香叶为木犀科植物紫丁香 *Syringa oblata* Lindl.、洋丁香 *S. vulgaris* L. 和朝鲜丁香 *S. dilatata* Nakai 的干燥叶，具有广谱抗菌和抗病毒作用，收载于《黑龙江省药品标准》，在东北地区分布广泛，资源丰富。丁香叶制剂炎立消胶囊、片剂收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂，用于治疗急性肠炎、菌痢、上呼吸道感染及急慢性扁桃体炎等感染性疾病，疗效显著。丁香叶的药效物质基础主要为丁香苦苷、3,4 二羟基苯甲酸、3,4 二羟基苯乙醇、酪醇、反式对羟基肉桂酸，对金色葡萄球菌、痢疾杆菌、大肠杆菌及绿脓杆菌均有不同程度的抑制作用[1]。其中以丁香苦苷的量较高，为主要活性成分。由于大孔吸附树脂对中药提取物中苷类、黄酮、生物碱的分离纯化效果较好，并且具有吸附性强、解吸容易、可反复使用等优点[2]，因此本实验采用大孔吸附富树脂柱色谱结合 HPLC 在线检测，对丁香苦苷类成分的富集工艺进行研究。

1 实验材料

Waters 600E－2487 型高效液相色谱仪；Millennium32 色谱工作站数据处理系统；AG135 型电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

丁香叶采自黑龙江中医药大学药圃，经黑龙江中医药大学生药学教研室鉴定为木犀科植物紫丁香 *S. oblata* Lindl. 的干燥叶。丁香苦苷对照品（自制，UV、IR、MS、HNMR 分析确定，经高效液相色谱归一化法计算，质量分数为 98.8%）。所用水为超纯水，甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

AB-8、D-101、X-5、NKA-Ⅱ型大孔吸附树脂（南开大学化工厂），HPD400、HPD500 型大孔吸附树脂（河北沧州宝恩化工有限公司），所用大孔吸附树脂的理化性质见表 1。

表 1 树脂的物理结构参数

Table 1 Characteristic parameter of resins

树脂型号	极性	比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	孔径/nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)
X-5	非极性	500～600	29～30	1.20～1.24
D-101	非极性	500～550	100～110	
AB-8	弱极性	480～520	13～14	0.73～0.77
HPD400	中极性	550	80	
HPD500	极性	500～600	40～50	
NKA-Ⅱ	极性	160～200	14.5～15.5	0.62～0.66

2 方法与结果

2.1 丁香苦苷的 HPLC 法测定

2.1.1 对照品溶液的制备：精密称取丁香苦苷对照品适量，置量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 69.5 μg/mL 的溶液，备用。

2.1.2 检测波长的选择：精密吸取 69.5 μg/mL 丁香苦苷对照品溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，用流动相定容，并以流动相作为参比溶液，在 190～600 nm 进行全波长扫描，结果显示丁香苦苷在 221 nm 处有一最大吸收峰，故选定 221 nm 为检测波长。

2.1.3 色谱条件及系统适应性：Diamonsil (TM) C_{18} 色谱柱（200 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（40∶60）；体积流量：1.0 mL/min；检测波长：221 nm；柱温：25 ℃。在上述色谱条件下，进样量 10 μL，丁香苦苷对照品的保留时间为 22.358 min，理论塔板数以丁香苦苷计算应不低于 2 500，色谱图见图 1。

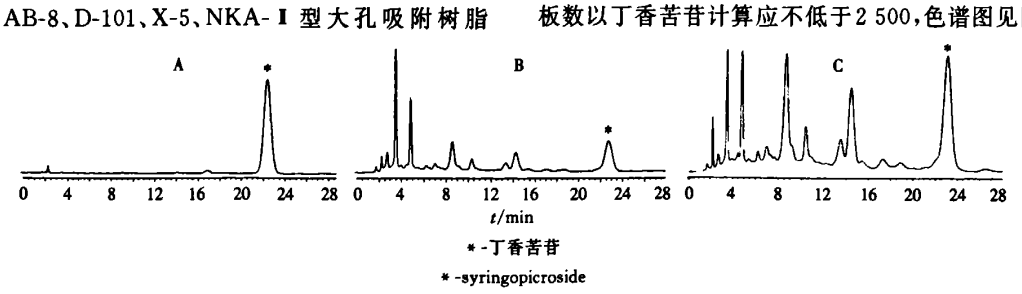

图 1 丁香苦苷对照品（A）、药材（B）和树脂洗脱液（C）的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of syringopicroside reference substance (A), crude drugs (B), and resin eluant (C)

2.1.4 线性关系考察：精密取69.5 μg/mL丁香苦苷对照品溶液2.5、5、10、15、20 μL进样，测定峰面积。以进样质量为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，作图，得一直线，其回归方程为$Y=2.79\times10^6X-8.23\times10^4$，$r=0.999\ 9$。结果表明丁香苦苷在0.173 75～1.39 μg与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验：精密吸取69.5 μg/mL丁香苦苷对照品溶液10 μL，注入高效液相色谱仪，连续测定5次，丁香苦苷峰面积积分值的RSD为1.63%。

2.1.6 重现性试验：精密吸取同一批大孔吸附树脂洗脱液5份，每份1 mL，在上述色谱条件下进样10 μL，测定丁香苦苷峰面积积分值，计算丁香苦苷质量浓度，结果其RSD为2.02%。

2.1.7 稳定性试验：取同一批大孔吸附树脂洗脱液，分别于0、2、4、8、12、24 h各精密吸取10 μL，在上述色谱条件下测定。结果表明，24 h内丁香苦苷峰面积无明显变化，RSD为1.42%。

2.1.8 加样回收率试验：分别精密吸取含丁香苦苷47.63%的70%乙醇洗脱液干浸膏5份，适量，加入丁香苦苷对照品适量，制备供试品溶液，进样测定，计算丁香苦苷的回收率，结果其RSD为2.66 %。

2.2 丁香叶提取液中丁香苦苷的测定：丁香叶适当粉碎，分别加16倍量的水煎煮2 h，加12倍量的水煎煮1 h，滤过，合并滤液，浓缩至含2 g生药/mL，加乙醇至含醇量为70%，醇沉24 h，滤液减压回收至无醇味，加蒸馏水调至含0.5 g生药/mL，作为供试品溶液。精密吸取供试品溶液5mL，加蒸馏水定容于50mL量瓶中，用0.45 μm微孔滤膜滤过，进样10 μL，测定，结果提取液中丁香苦苷的质量浓度为16.4 mg/mL。

2.3 大孔吸附树脂预处理与再生：新树脂用95%乙醇浸泡24 h，充分溶胀，用95%乙醇洗脱，不时检测流出的乙醇液，至流出的乙醇液与蒸馏水按照1∶3混合时不呈白色浑浊，并且流出乙醇液在200～400 nm处，以95%乙醇为空白对照，不产生紫外吸收峰。再用蒸馏水洗至无醇，备用。

再生时树脂先用4 BV的95%乙醇以2 BV/h的流速洗脱，并用蒸馏水以同样流速洗去乙醇；用4 BV的5%HCl溶液浸泡2～4 h，并以2 BV/h的流速通过树脂床，而后用蒸馏水以同样流速洗至pH值中性；再用4 BV的2%NaOH溶液浸泡2～4 h，并以2 BV/h的流速通过树脂床，而后用蒸馏水以同样流速洗至pH值中性。

2.4 静态-吸附解吸试验筛选树脂型号：选取经预处理的AB-8、D-101、X-5、NKA-Ⅱ、HPD400、HPD500型大孔吸附树脂，抽滤至不滴水为度。准确称取5 g，置具塞锥形瓶中，加入30 mL丁香叶提取液，恒温振荡器100 r/min，室温条件下振荡24 h，滤过，用适量蒸馏水清洗树脂表面残留液，合并滤液，醋酸乙酯萃取4次(50、50、40、40 mL)，水浴蒸干，残渣用甲醇溶解并定溶于50 mL量瓶中，测定吸附前后供试液中丁香苦苷的质量浓度，计算吸附率。将吸附平衡后的树脂加入30 mL 95%乙醇，恒温振荡器100 r/min，室温条件下振荡24 h，滤过，蒸干，甲醇溶解并定溶于50 mL量瓶中，测定丁香苦苷质量浓度，计算解吸率。结果见表2

$$吸附率=(C_0V_0-C_1V_1)/(C_0V_0)\times100\%$$

$$解吸率=C_2V_2/(C_0V_0-C_1V_1)\times100\%$$

式中C_0为供试品溶液中目标成分的质量浓度，V_0为供试品溶液体积；C_1为流出液中目标成分的质量浓度，V_1为流出液体积；C_2为解吸液中目标成分的质量浓度，V_2为解吸液体积。

表2 不同类型树脂的吸附和解吸

Table 2 Adsorption and desorption of different types of resins

类型	吸附率/%	洗脱率/%
AB-8	95.54	92.47
D-101	91.12	97.14
X-5	90.35	85.59
NKA-Ⅱ	39.86	47.84
HPD400	97.70	82.65
HPD500	95.05	83.28

可见AB-8型大孔吸附树脂的吸附率和解吸率相对较高，结合树脂成本综合考虑，选择AB-8型大孔吸附树脂进行富集工艺研究。

2.5 树脂的吸附性能研究

2.5.1 吸附等温线的制备：准确称取经预处理并抽滤至干的AB-8型大孔吸附树脂5 g置于具塞锥形瓶中，加入40 mL不同质量浓度的丁香叶供试品溶液，100 r/min，分别于25、40、50 ℃条件下恒温振荡24 h，测定吸附前后供试液中丁香苦苷的质量浓度，计算吸附量，绘制吸附等温线，见图3。

$$q=(C_0-C)V/W$$

式中q为吸附量，C_0、C分别为吸附前和吸附平衡后溶液中丁香苦苷的质量浓度；V为吸附液的体积，W为树脂的质量。

随着供试液中丁香苦苷质量浓度的增加，树脂的吸附量逐渐增大，最后趋于饱和吸附值，吸附曲线符合Langmiur吸附等温方程，表明浸提物中丁香苦

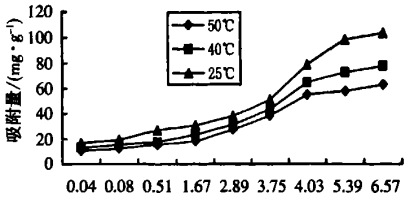

图 3 丁香苦苷的吸附曲线

Fig. 3 Adsorption curve of syringopicroside

苷在AB-8 型树脂上基本呈单分子吸附，有利于在柱色谱过程中扩大吸附量。

随着温度的升高，同一质量浓度下树脂的吸附量降低，表明丁香苦苷在AB-8 型树脂上的吸附过程是放热过程，低温有利于吸附。

2.5.2 盐离子浓度对吸附的影响：由于盐离子的存在，使溶液中的自由水减少，产生盐析作用，丁香苦苷的溶解度降低。溶解度越小，溶质与溶剂之间的相互作用力相对减弱，则被吸附的倾向越大，也就越容易吸附。因此，实验以NaCl 为介质，考察盐离子浓度对丁香苦苷吸附量的影响。准确称取经预处理并抽滤至干的 AB-8 型大孔吸附树脂 5 g，置于具塞锥形瓶中，加入 50 mL 含丁香苦苷 1.64 mg/mL 的供试液，加入 NaCl 调节 NaCl 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 moL/L，恒温振荡 24 h，平衡后测定树脂吸附量。盐离子浓度与吸附量的关系见图 4。

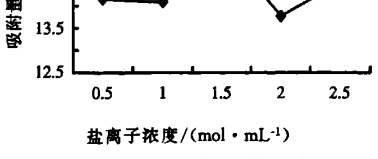

图 4 盐离子对吸附的影响

Fig. 4 Effect of salt ion strength on adsorption

可见适量盐离子的存在，使大孔吸附树脂对丁香苦苷的吸附量有所增加，主要是由于盐析作用使供试液中物质的溶解度下降，吸附平衡向吸附方向偏移。下一步需要对盐离子的种类进行考察。

2.5.3 动态吸附曲线（泄漏曲线）的制备：准确称取预处理并抽滤至干 AB-8 型树脂 15 g，湿法装柱（30 cm×1.3 cm），将含丁香苦苷 4.1 mg/mL 的供试液 300 mL 以 2 BV/h 通过树脂柱，每 5 mL 收集一次，测定流出液中丁香苦苷的质量浓度，绘制动态吸附曲线。将动态饱和吸附的树脂用 95%乙醇洗脱，测定，计算树脂的动态饱和吸附容量，见图 5。可以看出，对应于流出液中丁香苦苷质量浓度是上样液质量浓度的 5%时，15 g AB-8 型树脂可处理 5 倍柱体积的上样液，共吸附 471.5 mg 丁香苦苷，动态饱和吸附量为 31.43 mg/g（相当于 3.84 g 生药/g 树脂）。

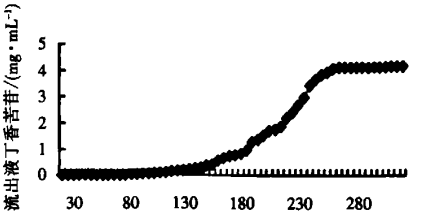

图 5 提取物在 AB-8 树脂上的泄露曲线

Fig. 5 Leakage curve of extract on AB-8 resin

2.6 洗脱剂体积分数的考察：准确称取预处理并抽滤至干 AB-8 型大孔树脂 4 份，每份 15 g，湿法装柱（30 cm×1.3 cm），将含丁香苦苷 4.1 mg/mL 的供试液以 2 BV/h 上样 20 mL，饱和吸附 30 min，先用 4 BV 蒸馏水洗至洗脱液还原糖反应（Molish 反应）为阴性，分别用 5 BV 30%乙醇，5 BV 50%乙醇，5 BV 70%乙醇，5 BV 90%乙醇洗脱，体积流量 1 mL/min，分别收集洗脱液，定容于 250 mL 量瓶中，摇匀。用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，弃去初滤液，取续滤液，测定丁香苦苷质量浓度，计算解吸率。结果见表 3，70%乙醇解吸效果较好，达到了 95%以上，解吸液中丁香苦苷质量浓度较高，所以选择 70%乙醇作为洗脱剂。

表 3 乙醇体积分数对解吸效果的影响

Table 3 Effect of eluate on desorption with different concentration of ethanol

乙醇体积分数/%	丁香苦苷/(mg·mL⁻¹)	解吸率/%
30	0.22	26.83
50	0.76	92.68
70	0.81	98.78
90	0.65	80.24

2.7 洗脱剂用量的考察：称取 AB-8 型大孔吸附树脂 15 g，根据动态吸附曲线确定的上样量，吸附丁香叶提取液，然后用蒸馏水洗去杂质，再用 70%乙醇以 2 BV/h 的体积流量洗脱，25 mL 收集一次流出液。以洗脱液的体积与洗脱液的质量浓度作图，见图 6。可知，洗脱剂用量对解吸过程影响较大，70%乙醇 125 mL（相当于 5 BV）能够将被吸附的丁香苦苷类成分洗脱完全。

2.8 工艺验证：称取 AB-8 型大孔树脂 3 份，每份 15 g，根据动态吸附曲线确定的上样量上样，先用 4 BV 蒸馏水洗去杂质，再用 5 BV 70%乙醇洗脱，收

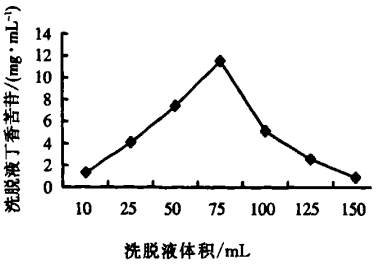

图6 提取物在AB-8树脂上的解吸曲线

Fig. 6 Desorption curve of extract on AB-8 resin

集洗脱液，定容于100 mL量瓶中，测定丁香苦苷的质量浓度。原药液、醇洗脱液分别干燥，称定质量。结果原药液固形物为8.52 g，丁香苦苷质量分数为19.92%；醇洗脱液固形物为2.74 g，丁香苦苷质量分数为47.56%。洗脱率为91.57%，精制程度为238%。

3 讨论

大孔树脂的极性和空间结构是影响吸附性能的重要因素，本实验从生产成本考虑，选取非极性(D-101、X-5)、弱极性(AB-8)、中极性(HPD400)和极性(NKA-Ⅰ、HPD500)4类典型的大孔吸附树脂进行静态吸附-解吸筛选，结果弱极性AB-8型和极性HPD400、HPD500型树脂对丁香苦苷的吸附量较大，这是由于丁香苦苷分子由非极性的环烯醚萜母核和葡萄糖苷链组成，这种分子结构使其总体具有一定的极性和亲水性，有利于弱极性和极性树脂吸附。

体积比表面积是影响树脂吸附量的主要因素，丁香苦苷相对分子质量为494，有利于被孔径较大的树脂吸附，在孔径适合时，树脂的吸附量随比表面积增大。但在某些情况下，吸附作用力过强不利于解吸，如HPD400、HPD500、X-5型树脂的吸附量较大，但解吸率并不突出，不适用于分离。另外，树脂的孔径越大，吸附大分子杂质越多，从而造成树脂的吸附选择性下降，如AB-8和D-101、HPD400、HPD500型树脂的比表面积相近，但由于D-101型树脂的孔径远大于AB-8，因此吸附量有所下降。HPD400、HPD500型树脂由于孔径大，吸附选择性低，而以AB-8解吸液中丁香苦苷量最高。

综上所述，树脂的吸附能力是由极性、比表面积、孔径以及被分离物质的理化性质等综合因素决定。弱极性AB-8型树脂的极性、比表面积和孔径均适合，吸附量大，易于解吸，解吸液中丁香苦苷量最高，采用适宜的工艺条件，可获得最佳生产效果。

参考文献：

[1] 王丹丹，刘盛泉，陈英杰，等. 紫丁香有效成分的研究[J]. 药学学报，1982，17(2)：951-954.

[2] 米靖宇，宋纯清. 大孔吸附树脂在中草药研究的进展[J]. 中成药，2003，23(12)：914-917.

乳块消片HPLC指纹图谱的研究

孙 宁，秦培勇*，谭天伟

(北京化工大学生命科学与技术学院 生物加工过程重点实验室，北京 100029)

摘 要：目的 研究乳块消片的高效液相指纹图谱，为科学评价及有效控制乳块消片的质量提供了有效可靠的方法。**方法** 利用高效液相色谱法测定了10批乳块消片样品，色谱条件为：Kromasil C_{18}色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：0.1%醋酸水溶液(A)-甲醇(B)，梯度洗脱；体积流量：1 mL/min；检测波长：280 nm；柱温：25 ℃；进样量：20 μL。**结果** 精密度、重现性和稳定性试验中各共有峰相对保留时间和相对峰面积RSD均小于3%，所得的色谱图各色谱峰分离较好，基线平整，符合指纹图谱有关规定。**结论** 乳块消片的指纹图特征性及专属性强，可作为全面控制乳块消片质量的依据。

关键词：乳块消片；丹酚酸B；指纹图谱

中图分类号：R286.1 **文献标识码：**A **文章编号：**0253-2670(2008)11-1659-04

乳块消片是由橘叶、丹参、皂角刺、川楝子、地龙和王不留行组成，具有疏肝理气、活血化瘀、消散乳块的作用，临床治疗乳腺增生疗效显著。由于乳块消片药味较多，成分复杂，仅仅测定其中的一个或几个

收稿日期：2008-01-23

基金项目：863项目(2005AA02Z245)；973项目(2007CB714304)；国家自然科学基金资助项目(20636010，20806006)；北京市科技计划项目(D0205004040211)；北京化工大学青年教师基金(QN0616)

作者简介：孙 宁(1982—)，男，吉林省吉林市人，北京化工大学硕士研究生，研究方向为中药制剂。

*通讯作者 秦培勇 Tel：(010)64448962 E-mail：qinqy@mail.buct.edu.cn