

独一味不同提取物工业化提取分离纯化工艺研究

邱建国, 张泉龙, 尉丽力, 李茂星, 贾正平*, 张汝学, 周 珺, 邱宜农, 王春英

兰州军区兰州总医院 药材科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 国家中医药管理局临床中药学重点学科,
甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 应用大孔吸附树脂结合聚酰胺柱色谱法富集分离独一味中黄酮类、苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类及大极性成分(生物碱盐、糖类等), 并实现工业化生产。方法 独一味水提物经聚酰胺和大孔吸附树脂串联及并联方法, 用CCPP系列色谱设备进行分离富集, LM-125型超滤设备超滤纯化, JYT-50 LN多功能动态热回流提取浓缩机组减压干燥, 分别富集得到水洗脱物、70%乙醇洗脱物 I (70%乙醇洗脱聚酰胺柱)、70%乙醇洗脱物 II (70%乙醇洗脱大孔吸附树脂柱)、超滤物; 采用一阶导数紫外分光光度法测定总环烯醚萜苷的量, 采用碱性硝酸铝-亚硝酸钠显色分光光度法测定总黄酮和总苯乙醇苷的量, 采用 HPLC 法测定山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯。结果 采用 70%乙醇为溶媒, 聚酰胺柱采用“上进下出”的进样方式和“上进下出”的洗脱方式, 大孔吸附树脂柱采用“下进上出”的进样方式和“上进下出”的洗脱方式时, 70%乙醇洗脱物 I、70%乙醇洗脱物 II、超滤物的得率分别为 2.43%、20.80%、82.60%。结论 此生产工艺方法及参数可以成功地将实验成果转化为工业化生产。

关键词: 独一味; 黄酮; 苯乙醇苷; 环烯醚萜苷; 分离富集; 工业化生产; 一阶导数紫外分光光度法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)15-2067-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.009

Extraction and purification technology for different extracts from *Lamiophlomis rotata* in industrialization

QIU Jian-guo, ZHANG Quan-long, WEI Li-li, LI Mao-xing, JIA Zheng-ping, ZHANG Ru-xue, ZHOU Jun, QIU Yi-nong, WANG Chun-ying

Clinical Pharmacy Key Discipline of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, PLA, Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China

Abstract: Objective The macroporous adsorptive resin chromatographic column combining with polyamide chromatographic column was used to separate the flavonoides, phenylethanoidglycosides, iridoid glycosides, and high polarity ingredients (such as alkaloid salts and sugars) in industrialization. **Methods** Water extract from *Lamiophlomis rotata* (WELR) was separated and enriched by series and parallel method of polyamide and macroporous adsorptive resins and CCPP serial laminar analysis, and was ultrafiltered by LM-125 ultrafiltration apparatus, then was dried under the reduced pressure by JYT-50 LN multipurpose kinesis back flow extract concentration subassembly. WELR, 70% ethanol solution eluate I (70% ethanol solution eluted polyamide column), 70% ethanol solution eluate II (70% ethanol solution eluting macroporous resin column), and ultrafiltration matter. The total flavonoids and total phenylethanoid glycosides were determined by aluminum nitrate-sodium nitrite UV spectrophotometry. The total iridoid glycosides were determined by the first derivative spectrophotometry. Shanzhiside methylester and 8-O-acetyl shanzhiside methylester were determined and the changes of total iridoid glycosides ingredients were investigated in the different elution requirement by HPLC. **Results** Ethanol (70%) was used as dissolvent. Using the “introduction from superior surface” sample introduction mode and “introduction from superior surface” eluting mode in polyamide chromatographic column, the “introduction from inferior surface” sample introduction mode and “introduction from superior surface” eluting mode in the macroporous adsorptive resin chromatographic

收稿日期: 2013-03-03

基金项目: 国家科技部重大专项 (2008ZXJ09004-XXX); 全军中医药研发推广项目 (2006032001); 甘肃省科技重大专项 (1102FKDA012)

作者简介: 邱建国, 副主任药师, 主要从事高原植物药和新药的研究。Tel: (0931)8994676 13609354193 E-mail: qjianguo@163.com

*通信作者 贾正平, 主任药师, 教授, 博士生导师, 主要从事医院药学专业的研究。Tel: (0931)8994652 E-mail: jiazp166@sina.com

网络出版时间: 2013-07-05 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1544.010.html>

column, yields of 70% ethanol solution eluate I, 70% ethanol solution eluate II, and ultrafiltration matter were 2.43%, 20.80%, and 82.60%, respectively. **Conclusion** This production technology may transform the experimental achievement to industrial production successfully.

Key words: *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo; flavonoids; phenylethanoid glycosides; iridoid glycosides; separating and enriching; industrial production; the first derivative spectrophotometry

独一味是藏、蒙、纳西等民族的民间草药，为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的根及全草^[1]。近年来，有关独一味的研究较多，主要集中在独一味单体成分的研究，如黄酮类化合物木犀草素、芹菜素和槲皮素等，环烯醚萜苷类化合物山梔苷甲酯、番木鳖苷、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯等，苯乙醇苷类化合物主要报道有洋丁香苷、连翘酯苷 B 等，此外还含有偏诺皂苷元、 β -谷甾醇等^[2]，但是工业化提取分离独一味成分的报道很少。本课题组采用聚酰胺串联、并联大孔吸附树脂柱色谱法实现独一味中总黄酮、总苯乙醇苷、总环烯醚萜苷及大极性部分（生物碱盐、糖类^[3]）的富集分离，相关工艺流程获得国家发明专利^[4]，为藏药独一味的研究及二次开发打下了良好基础。

本课题组采用多功能回流提取浓缩罐机组代替实验室的圆底烧瓶和冷凝器组装的回流提取装置、旋转蒸发仪等，用 CAPP 系列色谱设备（6 组 2.5 m 长的柱子串联、并联）代替了玻璃色谱柱，且实现了“下进上出”的上样方式，扩大生产 600 多倍。以提高产品的得率和降低成本为目标，对上样方式、上样饱和度、上样体积流量、洗脱体积流量、洗脱方式以及减压浓缩干燥等各个生产环节工艺参数进行了优选，将实验室的工艺参数成功地转化为工业化生产，并达到批量分离富集黄酮类成分、苯乙醇苷类成分及环烯醚萜苷类成分。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），包括 600 型二元梯度泵、996 型二极管阵列紫外检测器；HP 8453 二极管阵列紫外可见分光光度计（美国惠普公司）；SK7200 H 超声波清洗器（上海科导仪器有限公司）；BP210 S 电子天平（Sartorius AG，德国）；CAPP 系列色谱设备（2 500 mm×400 mm，江阴市金确层析设备有限公司）；JYT-50 LN 多功能动态热回流提取浓缩机组（50 L，上海矩源设备有限公司）；LM-125 型超滤设备、CLW-003 型聚砜膜（截留相对分子质量 10 000，北京中旭科源过滤技术有限公司）；大孔吸附树脂（XDA-1，西安蓝晓科技有限公司，批号 20110901）；柱色谱用聚酰胺（14~

30 目，上海化学试剂站分装厂，批号 20110711）。

对照品山梔苷甲酯、8-*O*-乙酰山梔苷甲酯（由本研究室分离纯化并鉴定结构，HPLC 峰面积归一化法测定质量分数为 97.5%），对照品连翘酯苷 B（批号 111811-201001）、芦丁（批号 100080-200707）均购自中国食品药品检定所；无水甲醇、乙醇均为分析纯，水为纯化水，乙腈为色谱纯；独一味水提物（总黄酮以芦丁为对照品，质量分数 \geq 16%；总环烯醚萜苷 \geq 12.86%；山梔苷甲酯和 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯分别不低于 7.75、11.22 mg/g，批号 20111001，甘肃省玛曲县黄河首曲药源开发有限公司）；独一味药材（批号 20110801，甘肃省玛曲县黄河首曲药源开发有限公司）经兰州军区兰州总医院副主任药师李茂星博士鉴定，与《中国药典》2010 年版一部独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 正品相符。

2 方法与结果

2.1 定量测定

2.1.1 总环烯醚萜苷类成分定量测定 采用一阶导数紫外可见分光光度法^[5]。对照品溶液的制备：称取 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯对照品 20 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，蒸馏水溶解并定容，得 200 μ g/mL 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯对照品溶液。校准曲线的制备：分别精密吸取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 于 10 mL 量瓶中，蒸馏水定容，测定吸光度（*A*）值（ $\lambda=252$ nm），以质量浓度为横坐标（*X*）、*A* 值为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得回归方程 $Y=-0.001 X+0.000 2$ ， $r=0.999 7$ ，结果表明 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯在 10~80 μ g/mL 线性关系良好。供试品溶液的制备：分别称取水洗脱物、70%乙醇洗脱物 I、70%乙醇洗脱物 II、超滤物及独一味水提物 0.010 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，纯化水定容，摇匀，定性滤纸滤过，备用。依法测定 *A* 值，计算总环烯醚萜苷的量。

2.1.2 山梔苷甲酯和 8-*O*-乙酰山梔苷甲酯的定量测定^[1,6] 采用 HPLC 法（《中国药典》2010 年版一部附录 VI D）测定。色谱条件与系统适用性试验：C₁₈ 柱（150 mm×4.6 mm，5 μ m，美国 Waters 公司）以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，9%乙腈溶液和

15%乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~11 min, 9%乙腈溶液; 11~24 min, 15%乙腈溶液; 24~31 min, 9%乙腈溶液; 检测波长为 235 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μ L。理论塔板数按山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯峰计算均不低于 1 500。对照品溶液的制备: 分别称取对照品山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯适量, 制成含山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯均为 35 μ g/mL 的混合对照品溶液。供

试品溶液的制备: 分别称取独一味药材 0.5 g、70%乙醇洗脱物 II 细粉 0.06 g, 精密称定, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声提取(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 称定质量, 补足减失的质量, 0.45 μ m 滤膜滤过, 滤液备用。测定方法: 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见图 1。

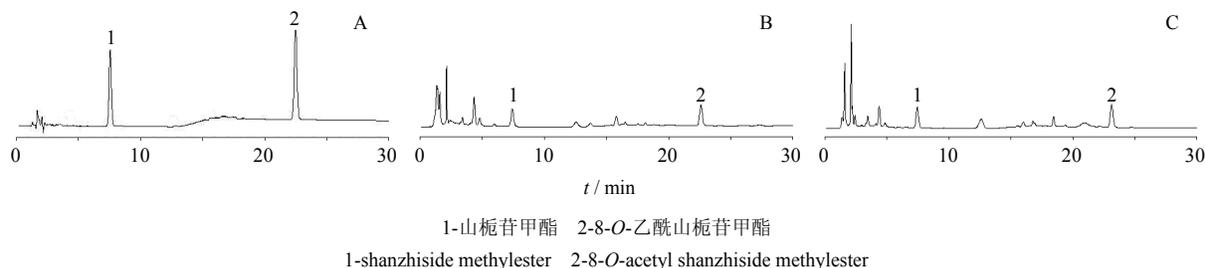


图 1 混合对照品 (A)、独一味对照药材 (B) 及 70%乙醇洗脱物 II (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), reference medicinal material of *L. rotata* (B), and 70% ethanol solution eluate II (C)

2.1.3 碱性硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定总黄酮和总苯乙醇苷^[1] 对照品溶液的制备: 取芦丁对照品 0.02 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 70%乙醇 70 mL, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀, 得 200 μ g/mL 芦丁对照品溶液。线性关系考察: 精密量取芦丁对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 加水至 6 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加氢氧化钠溶液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min; 以相应的溶剂为空白, 采用紫外-可见分光光度法, 在 500 nm 波长处测定 *A* 值, 以 *A* 值为纵坐标 (*Y*), 质量浓度为横坐标 (*X*) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=12.372 X-0.024$, $r=0.999 1$, 表明芦丁在 8~48 μ g/mL 线性关系良好。供试品溶液的制备: 分别

称取水洗脱物、70%乙醇洗脱物 II、超滤物及独一味水提物 0.1 g, 70%乙醇洗脱物 I 0.02 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 70%乙醇 70 mL, 置水浴上微热并时时振摇 30 min, 放冷, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀, 取适量, 离心(转速 4 000 r/min) 10 min, 精密量取上清液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 照线性关系考察项下方法, 自“加水至 6 mL”起, 依法测定 *A* 值, 计算总黄酮和总苯乙醇苷的量, 结果见图 2。

2.1.4 UV 法测定总苯乙醇苷类^[7] 对照品溶液的制备: 取连翘酯苷 B 对照品 0.02 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 50%甲醇溶液至刻度, 摇匀, 得 200 μ g/mL 连翘酯苷 B 对照品溶液。线性关系考察: 精密量取连翘酯苷 B 对照品溶液 60、120、240、300、480、540、600 μ L, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 50%甲醇至刻度; 以相应的溶剂为空白, 采用紫外-可见

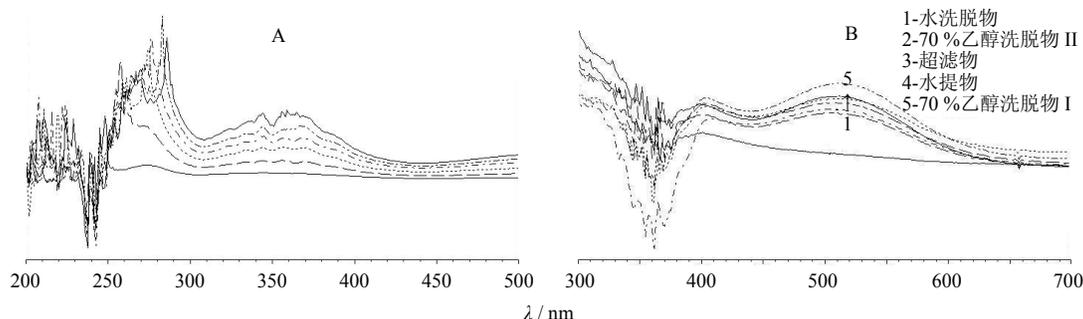


图 2 芦丁 (A) 及独一味不同提取物 (B) UV 色谱图

Fig. 2 UV chromatograms of rutin (A) and different extracts of *L. rotata* (B)

分光光度法, 在 332 nm 波长处测定 A 值, 分别以 A 值为纵坐标 (Y)、质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.049 2 X-0.013 4$, $r=0.999 8$, 表明连翘酯苷 B 在 1.2~12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。供试品溶液的制备: 分别称取水洗脱物、70%乙醇洗脱物 II、超滤物及独一味水提物 0.01 g, 70%乙醇洗脱物 I 0.02 g, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加 50%甲醇溶液 70 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 加 50%甲醇溶液至刻度, 摇匀; 精密吸取 70%乙醇洗脱物 I 溶液 10 mL 置 100 mL 量瓶中, 加 50%甲醇定容至刻度, 摇匀; 分别取上述配制溶液适量, 滤过, 备用, 依法测定 A 值, 计算总苯乙醇苷的量, 结果见图 3。

2.2 独一味水提物的制备

分别称取独一味水提物^[8] (棕色粉末, 总环烯

醚萜苷为 16.49%、总黄酮和总苯乙醇苷为 23.67%, 山柃苷甲酯和 8- O -乙酰山柃苷甲酯的量分别不低于 1.92%、2.02%) 23、40 kg, 加水 220、400 L, 溶解, 备用。

2.3 独一味水提取物进样

将 CCPP 色谱设备中的聚酰胺柱(记为 1 号柱)和大孔吸附树脂柱(记为 2 号柱)串联, 聚酰胺柱(记为 3 号柱)和大孔吸附树脂柱(记为 4 号柱)串联, 聚酰胺柱(记为 5 号柱)和大孔吸附树脂柱(记为 6 号柱)串联, 这 3 组串联柱再并联, 见图 4。

2.3.1 装柱及其前处理 将每根聚酰胺柱装入聚酰胺粉 40 kg, 大孔吸附树脂柱装入大孔吸附树脂 100 kg, 自来水冲洗至大孔吸附树脂水流出液澄清, 再用 95%乙醇冲洗至流出液与水 (1:5) 混合无白色浑浊; 最后用自来水冲洗至无乙醇味, 备用。

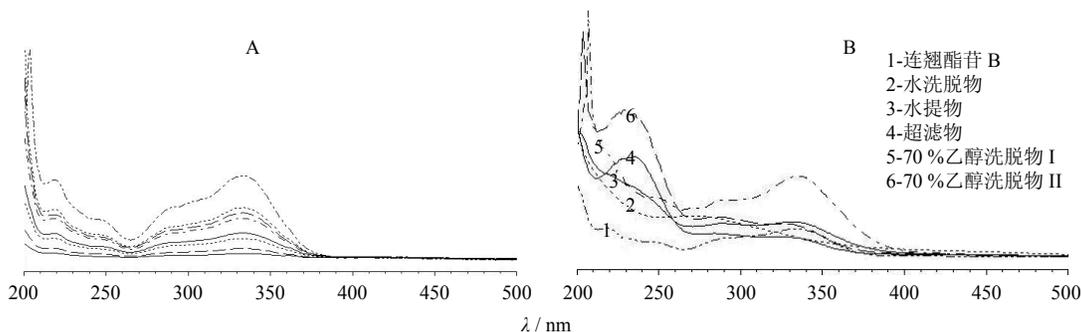


图 3 连翘酯苷 B (A) 及独一味不同提取物 (B) UV 色谱图

Fig. 3 UV chromatograms of forsythoside B (A) and different extracts of *L. rotata* (B)

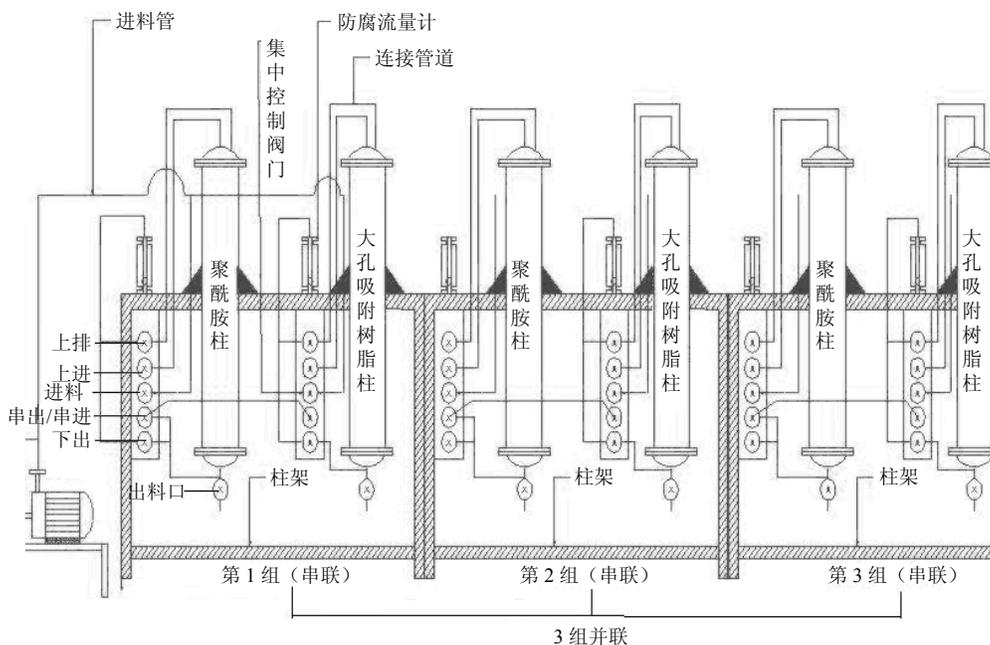


图 4 CCPP 设备工业化分离纯化独一味不同提取物工艺示意图

Fig. 4 Technology diagram of extraction and purification for different extracts from *L. rotata* by CCPP equipment in industrialization

2.3.2 进样方式 聚酰胺柱采用“上进下出”方式，大孔吸附树脂柱采用“下进上出”方式，即打开聚酰胺柱的“上进”、“上排”、“进料”、“串出”阀门，大孔吸附树脂柱的“下进”、“串进”、“上排”、“出料口”阀门，聚酰胺柱的“上排”管流出溶液时，关闭此阀门，大孔吸附树脂柱的“出料口”流出溶液稳定时，关闭此阀门。

2.3.3 进样量 每隔2 h从聚酰胺柱出料口取样，进样50%量之后，每隔0.5 h从聚酰胺柱出料口取样，用AlCl₃试剂荧光检测是否有黄酮类成分流出，以确定进样饱和度，如果荧光检测有亮黄色荧光斑点，则说明有黄酮类成分流出，进样饱和，否则可

以继续进样。以1号柱和2号柱为例，优选进样体积流量及出料体积流量，结果见表1。

2.4 水洗脱物的制备

将聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱串联，用自来水洗脱，上水方式采用聚酰胺柱“上进下出”，大孔吸附树脂柱“下进上出”，洗至无色，收集洗脱液，减压浓缩干燥，工艺参数及结果见表2、3。

2.5 纯化水洗脱

将聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱串联，用纯化水120 L洗脱，上水方式采用聚酰胺柱“上进下出”，大孔吸附树脂柱“下进上出”，收集洗脱液，洗脱终液取样，HPLC法测定洗脱情况，见图5。

表1 进样工艺参数优选及检测指标测定结果

Table 1 Preference of sample introduction parameters and detection of indexes

时间 /h	进样体积流量 / (L·h ⁻¹)						1号柱出料颜色	1号柱出料 AlCl ₃ 试剂荧光检测
	1号柱 (A1)	2号柱 (B1)	1号柱 (A2)	2号柱 (B2)	1号柱 (A3)	2号柱 (B3)		
0	100	100	50	50	100	100	淡棕色	阴性
2	100	100	50	50	100	100	淡棕色	阴性
4	100	100	50	50	100	100	淡棕色	阴性
6	100	100	50	50	100	100	淡棕色	阴性
7	100	100	50	50	80	80	淡棕色	阴性
7.5	100	100	50	50	50	50	A1柱棕色；A2、A3柱淡棕色	阴性
8	100	100	50	50	50	50	A1柱棕色；A2、A3柱淡棕色	A1柱阳性；A2、A3柱阴性
8.5	—	—	50	50	50	50	淡棕色	阴性
9	—	—	50	50	50	50	A3柱棕色；A2柱淡棕色	A3柱阳性；A2柱阴性
9.5	—	—	50	50	—	—	淡棕色	A2柱阴性
10	—	—	50	50	—	—	淡棕色	A2柱阴性
10.5	—	—	50	50	—	—	淡棕色	A2柱阴性
11	—	—	50	50	—	—	淡棕色	A2柱阳性

AlCl₃试剂荧光检测阳性说明有黄酮类成分流出，阴性说明没有黄酮类成分流出

Positive fluorescence detection by AlCl₃ shows presence of flavonoids, on the contrary negative fluorescence detection means no flavonoids

表2 水洗脱工艺参数优选及检测指标测定结果

Table 2 Preference of water eluting parameters and detection of indexes

t/h	水洗脱体积流量 / (L·h ⁻¹)		2号柱出料颜色	2号柱洗脱体积 / L	t/h	水洗脱体积流量 / (L·h ⁻¹)		2号柱出料颜色	2号柱洗脱体积 / L
	1号柱 (A1)	2号柱 (B1)				1号柱 (A2)	2号柱 (B2)		
0	200	200	棕色	1 200	0	200	200	棕色	1 100
2	200	200	棕色		2	200	200	棕色	
4	200	200	淡棕色		4	100	100	淡棕色	
6	200	200	无色		6	50	50	淡黄色	
8	—	—	—		8	50	50	无色	

表 3 减压浓缩干燥工艺参数优选

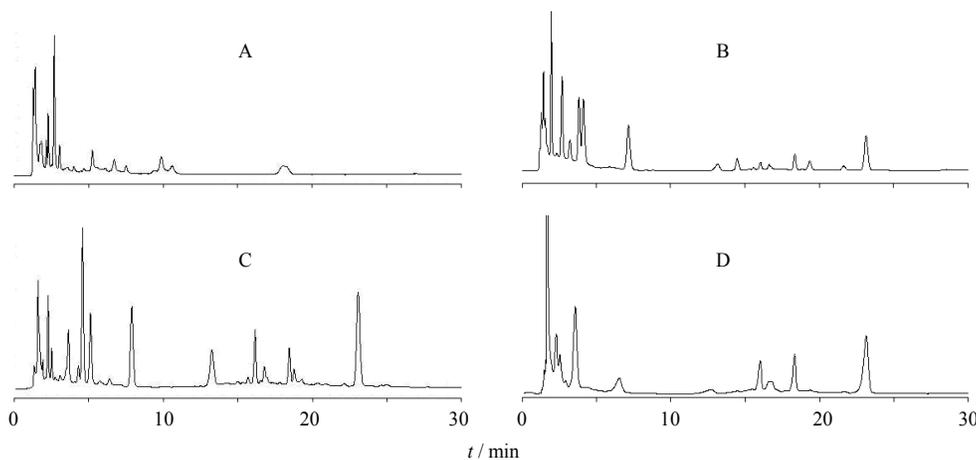
Table 3 Preference of parameters for dried process under reduced pressure

浓缩体积 / L (罐体积 50 L)	压力 / MPa	浓缩罐设定 温度 / °C	浓缩罐内物 料温度 / °C	备注
33	-0.060	120	40	压力不能太大, 否则浓缩液被吸入冷却液收集罐中; 浓
25	-0.065	120	55	缩液泡沫太多, 影响蒸发, 适当打开排气阀消除泡沫
17	-0.070	110	55	
稠浸膏, 位于罐底	-0.075	80	58	稠浸膏容易堵塞出料口, 所以适当打开出料口吸入空气

2.6 70%乙醇洗脱物的制备

聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱采用并联, 聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱均采用“上进下出”的洗脱方式, 分别收集乙醇洗脱溶液。用 70%乙醇 140 kg 分别洗脱聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱, 洗脱至有乙醇味, 取样, 并停止洗脱, 浸泡 2 h 后浸泡溶液取样, 继续洗脱, 洗脱体积流量 40 L/h, 洗脱结束, 乙醇洗脱终液取样, 用纯化水洗脱, 将柱中的残留乙醇洗脱至无乙醇味, 并收集洗脱溶液, 纯化水洗脱终

液取样。取 AlCl_3 试剂荧光检测考察聚酰胺柱洗脱情况, 有亮黄色荧光斑点则说明有黄酮类成分流出, 没有亮黄色荧光斑点说明已没有黄酮类成分流出, 停止洗脱; HPLC 法测定考察大孔吸附树脂柱洗脱情况, 结果见图 5。洗脱溶液环烯醚萜苷成分 HPLC 色谱图响应值很低, 有的成分已检测不到, 停止洗脱。将乙醇洗脱溶液按表 3 分别进行减压回收乙醇, 并减压浓缩干燥为干浸膏, 即分别得 70%乙醇洗脱物 I (70%乙醇洗脱聚酰胺柱)、70%乙醇洗脱物 II



A-2 号柱水洗脱物 B-2 号柱 70%乙醇洗脱初液 C-2 号柱 70%乙醇浸泡溶液 D-2 号柱 70%乙醇洗脱物

A-column 2 water eluate B-column 2 initial solution of 70% ethanol eluate C-column 2 70% ethanol soak solution D-column 2 70% ethanol eluate

图 5 工业化生产纯化、分离不同阶段提取物 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of extracts in different stages of purification and separation in industrialization

(70%乙醇洗脱大孔吸附树脂柱), 计算得率, 结果见表 4。干浸膏超微粉碎成细粉, 按“2.1”项下方法进行总环烯醚萜苷、山柰苷甲酯、8-O-乙酰山柰苷甲酯、总黄酮、总苯乙醇苷的量测定, 结果见表 4。

得率 = 成品量 / 投料量

2.7 超滤物的制备

称取 70%乙醇洗脱物 II 500 g, 加 5 L 纯化水溶解, 用超滤设备超滤纯化, 打开浓液阀, 开机, 启动泵, 待聚砜膜超滤组件充满溶液后, 逐步调整浓液阀并观察压力表至工作压力 (≤ 0.1 MPa), 超滤

至超滤液颜色近无色, 收集超滤液, 按表 4 进行减压浓缩干燥超滤液为干浸膏, 即得超滤物, 工艺参数优选见表 5。

2.8 工艺验证

根据优选的上样、洗脱、减压浓缩、干燥等工艺, 独一味水提物 (批号 20111001) 分 3 批, 即水提物 2、水提物 3、水提物 4, 验证优选工艺, 考察其得率及总环烯醚萜苷、总黄酮、总苯乙醇苷、山柰苷甲酯和 8-O-乙酰山柰苷甲酯的量, 结果见表 4, 结果显示本工艺具有较好的可行性和重复性。

表4 独一味不同提取物得率考察及工艺验证结果

Table 4 Investigation on yield of different extracts from *L. rotata* and verification of technology

名称及批号	投料量 / 成品量 / 得率 / kg kg %	总环烯醚萜 苷 / (g·g ⁻¹)	总黄酮和总苯乙 醇苷 / (g·g ⁻¹)	总苯乙醇 苷 / (g·g ⁻¹)	山梔苷甲 酯 / (g·g ⁻¹)	8-O-乙酰山梔苷 甲酯 / (g·g ⁻¹)	备注 (大孔吸附 树脂柱上样方式)	
水提物 1	20	16.14	23.91	8.74	1.819	1.938	上进下出	
水提物 2	42	16.04	23.97	8.93	1.918	2.139	下进上出	
水提物 3	31	16.08	23.79	8.81	1.913	2.046	下进上出	
水提物 4	48.8	17.68	22.99	8.80	2.032	1.944	下进上出	
水提物-均值 (RSD / %)		16.49 (0.80)	23.67 (0.45)	8.82 (0.08)	1.92 (0.09)	2.02 (0.10)		
70 %乙醇洗脱物 II-1	1.30	6.50	53.95	26.81	10.01	7.198	7.019	上进下出
70 %乙醇洗脱物 II-2	9.10	21.67	54.83	25.98	9.96	7.772	6.951	下进上出
70 %乙醇洗脱物 II-3	6.40	20.65	55.79	24.62	10.21	7.366	7.107	下进上出
70 %乙醇洗脱物 II-4	9.80	20.08	54.73	22.01	10.43	6.25	6.21	下进上出
70 %乙醇洗脱物 II- 均值 (RSD / %)	—	20.80 (0.81)	54.83 (0.75)	24.86 (2.10)	10.15 (0.21)	7.15 (0.64)	6.82 (0.41)	70 %乙醇洗脱物 II-2、3、4 与水提物 2、3、4 相对应
70 %乙醇洗脱物 I-1	0.55	2.75	—	148.83	55.90	—	—	
70 %乙醇洗脱物 I-2	0.97	2.31	—	151.29	56.81	—	—	
70 %乙醇洗脱物 I-3	0.79	2.55	—	150.07	56.32	—	—	
70 %乙醇洗脱物 I-4	1.03	2.12	—	152.91	57.22	—	—	
70 %乙醇洗脱物 I- 均值 (RSD / %)	—	2.43 (0.28)	—	150.78 (1.74)	56.56 (0.58)	—	—	70 %乙醇洗脱物 I-2、3、4 与水提物 2、3、4 相对应
水洗脱物-2	—	—	—	3.01	1.67	—	—	由于减压浓缩干燥时间长
水洗脱物-3	—	—	—	3.09	1.72	—	—	(7 d), 后面的溶液霉变,
水洗脱物-4	—	—	—	2.98	1.65	—	—	所以没有全部干燥
水洗脱物-均值 (RSD / %)	—	—	—	3.02 (0.06)	1.68 (0.04)	—	—	水洗脱物-2、3、4 与水 提物 2、3、4 相对应
超滤物	0.5 0.413	82.60	76.25	22.30	8.84	10.01	9.48	由 70 %乙醇洗脱物 II 制备

“—”表示没有检测到
“—” means not detected

表5 超滤纯化工艺参数优选及检测指标测定结果

Table 5 Preference of ultrafiltration purification parameters and determination of indexes

配制质量浓度 / (g·mL ⁻¹)	压力 / MPa	流出体积分流 量 / (L·h ⁻¹)	超滤液 颜色	备注
0.20	>0.1	2.5	棕色	压力容易超过 0.1 MPa, 且流速慢
0.10	≤0.1	3	淡棕色	循环超滤浓缩液质量浓度较高时, 随时加入纯化水至质量浓度达到 0.10 g/mL
0.05	≤0.1	3	淡棕色	超滤时间太长, 循环超滤浓缩液质量浓度较高时, 随时加入纯化水至质量浓度达到 0.05 g/mL

2.9 聚酰胺柱、大孔吸附树脂柱及超滤设备的再生利用

将聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱并联, 采用“上进下出”洗脱方式, 洗脱体积流量 300 L/h。配制 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液适量, 冲洗至无色; 配制 0.1 mol/L 盐酸溶液适量, 冲洗; 用自来水冲洗至中性, 用 95%乙醇溶液保存。

以 0.2%~0.3%氢氧化钠溶液适量, 待聚酰胺超

滤组件充满溶液后浸泡 2 h, 然后循环清洗 1 h, 再以 0.2%~0.3%盐酸溶液适量, 浸泡 2 h 后循环清洗 1 h, 用纯化水清洗至排除液至中性, 用 0.3%~1% 苯甲酸钠溶液保存。

3 讨论

本课题组应用聚酰胺柱串联、并联大孔吸附树脂柱分离富集独一味中的总黄酮、总苯乙醇苷、总环烯醚萜苷类成分的工业化生产, 如何将不同的成

分在 2.5 m 长的柱子上进行分离、富集并且尽可能降低成本,洗脱体流量的控制很重要,如表 2,体流量太大,成分会冲洗下来,达不到分离富集的效果;体流量太小,会增加成本;通过反复实验、摸索,进样时,选用 A3 柱的体流量较好,即在 $\leq 50\%$ 进样量时体流量相对大一点,超过 50% 进样量则体流量相对小点。洗脱吸附在大孔吸附树脂上的总环烯醚萜苷类成分时,70%乙醇注满柱子后先浸泡 2 h 以后再用较低体流量洗脱。

如何提高洗脱物的得率,除了洗脱体流量的影响,还与进样方式和洗脱方式有很大的关系,尤其大孔吸附树脂柱,如采用“上进下出”还是“下进上出”的方式,结果截然不同,如表 4 中水提物 1 和 70%乙醇洗脱物 II-1 即采用“上进下出”的进样方式和洗脱方式,得率为 6.5%;反之用“下进上出”的进样方式和“上进下出”的洗脱方式时(表 4 中水提物 2、3、4 和洗脱物 2、3、4),平均得率达到 20.80%,因为采用“下进上出”的方式,成分大多数富集在下部,用“上进下出”的方式洗脱更容易洗脱下来。

水洗脱物的制备时,洗脱体流量也比较重要,洗脱体流量太大,洗脱收集液相对较大,增加了后续减压浓缩干燥的负担,而且最终导致部分洗脱液没有减压浓缩干燥已经发生霉变,只好放弃。

本研究采用减压浓缩罐代替了实验室中旋转蒸发仪进行浓缩,工艺参数截然不同,其压力的调节、温度的控制至关重要,压力太大,则浓缩液会被吸到收集罐中,压力太小,则时间太长,所以根据浓缩液在浓缩罐中不同位置调整压力;浓缩时温度的设定,根据浓缩液的密度进行调整,浓缩液密度较小时,浓缩罐温度相对较高,当浓缩液浓缩成稠浸膏时,浓缩罐的温度设置要低,否则浓缩液温度太高,不但破坏成分且容易粘壁、炭化。

优选各环节工艺参数很重要,但是工业化生产如果根据正交实验等设计方案进行优选,则周期长、成本高,所以在实验中必须根据最直观、显著的指标进行判断此工艺参数是否理想,如上样时判断是否饱和,根据聚酰胺柱流出液 AlCl_3 试剂荧光检测判断是否饱和;如水洗脱时根据流出液的颜色调整体流量,颜色越浅,体流量越小;减压浓缩时则根据浓缩液沸腾情况和浓缩液温度调整浓缩罐的压力、温度,而且根据浓缩液状况,适当调整排气

阀和出料阀。

虽然碱性硝酸铝-亚硝酸钠比色法在《中国药典》2010 年版一部用以测定独一味制剂中的总黄酮,但是本课题组根据前期定量测定实验结果显示,该方法测定结果应该是总黄酮和总苯乙醇苷 2 类成分之和(150%),根据碱性硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定原理, Al^{3+} 可与分子结构式中的邻二酚羟基苯生成络合物而显色,苯乙醇苷类成分连翘酯苷 B、麦角甾苷分子^[9]结构式中均有 2 个邻二酚羟基苯。

文献报道采用聚酰胺树脂纯化油菜花粉黄酮,纯化后黄酮质量分数由粗品的 24.65% 提高到 74.90%,提高了 2.04 倍^[10]。本课题组各项测定数据显示,总黄酮和总苯乙醇苷质量分数由水提物 23.67% 提高到 70%乙醇洗脱物 I 的 150.78%,提高了 5.37 倍;总苯乙醇苷质量分数由水提物 8.82% 提高到 70%乙醇洗脱物 I 的 56.56%,提高了 5.41 倍;总环烯醚萜苷质量分数由水提物 16.49% 提高到 70%乙醇洗脱物 II 的 54.83%,提高了 2.33 倍,说明此生产工艺方法及参数可以较成功地将实验成果转化为工业化生产。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王瑞冬. 独一味的生药学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2005.
- [3] 林天幕, 顾宜, 方坤泉, 等. 藏药独一味两种方法提取组分对小鼠镇痛作用的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(5): 444-446.
- [4] 贾正平, 李茂星, 张汝学. 从藏药独一味中提取总环烯醚萜苷的方法及其用途: 中国, CN200410011679.0 [P]. 2005-08-31.
- [5] 李茂星, 贾正平, 胡之德, 等. 藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2): 208-210.
- [6] 樊鹏程, 李茂星, 贾正平, 等. RP-HPLC 同时测定不同产地独一味药材中 4 种环烯醚萜苷 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 483-486.
- [7] 王丽楠, 陈君, 杨美华, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷的含量测定 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 67-69.
- [8] 李茂星, 尉丽力, 贾正平, 等. 独一味水提物质量标准研究 [J]. 医药导报, 2011, 30(5): 653-655.
- [9] 郑晓珂, 刘媛媛, 冯卫生, 等. 天然苯乙醇苷类化合物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(3): 230-234.
- [10] 杨必成, 刘海, 杨义芳, 等. 聚酰胺树脂纯化油菜花粉黄酮部位工艺研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2240-2244.