

大孔树脂分离复方黑骨藤药物有效成分工艺的研究

周秋月¹, 李琪², 李慧敏², 陈姚¹, 袁德彬², 张宏^{2,3*}

1. 四川师范大学化学与材料科学学院, 四川 成都 610068

2. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

3. 四川师范大学植物资源应用与开发研究所, 四川 成都 610101

摘要: **目的** 考察大孔树脂分离复方黑骨藤药物有效部位的工艺条件。**方法** 以黑骨藤中杠柳苷、秦艽中龙胆苦苷和元胡中延胡索乙素为检测指标, 采用 HPLC 法考察 3 种大孔树脂 (D-101、AB-8、NKA-9) 对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的吸附分离性能, 并考察分离纯化杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素成分的最佳工艺条件。**结果** 用大孔树脂 D-101 作为填料, 样品与填料的比为 1:10, 样品质量浓度为 50 mg/mL, 上样后吸附 1 h, 用 60%乙醇为洗脱液, 在 pH 7.0 条件下, 20 BV 洗脱 1 h。**结论** 该优选的工艺简便可行, 大孔树脂 D-101 可作为分离纯化复方黑骨藤药物中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素成分的有效方法。

关键词: 大孔树脂; 复方黑骨藤; 杠柳苷; 龙胆苦苷; 延胡索乙素; 分离工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)21-3098-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.012

Separation of active ingredients from Compound *Periploca forrestii* by macroporous resin

ZHOU Qiu-yue¹, LI Qi², LI Hui-min², CHEN Yao¹, YUAN De-bin², ZHANG Hong^{2,3}

1. College of Chemistry and Materials Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China

2. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

3. Institute of Application and Development of Plant Resources, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Abstract: Objective To investigate the technology for the separation of the active ingredients from Compound *Periploca forrestii* (CPF) by macroporous resin. **Methods** The absorption and separation properties of three kinds of absorption resins (D-101, AB-8, and NKA-9) were studied and the separation and purification technological process of glucoperiplocyarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine from CPF were optimized by HPLC with glucoperiplocyarin in *P. forrestii*, gentiamarin in *Gentiana macrophylla*, and tetrahydropalmatine in *Corydalis yanhusuo* as indexes. **Results** Using macroporous resin D-101 as filler, the rate of sample and macroporous adsorption resin was 1:10. The concentration of the sample was 50 mg/mL, adsorbing for 1 h and using 60% ethanol as eluent in the conditions of pH 7.0. The resin was washed by 20 BV in 1 h. **Conclusion** This technology is simple and feasible, and the process with macroporous resin D-101 is an effective method to separate and purify glucoperiplocyarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine from CPF.

Key words: macroporous resin; Compound *Periploca forrestii*; glucoperiplocyarin; gentiamarin; tetrahydropalmatine; separation technology

黑骨藤 *Periploca forrestii* Schltr. 属于萝藦科 (Asclepiadaceae) 杠柳属 *Periploca* Linn. 植物, 可舒筋活络、祛风除湿, 治风湿性关节炎、跌打损伤、胃痛、消化不良、闭经、痢疾等, 效果良好, 为贵

州少数民族用药^[1]。杠柳苷是黑骨藤有效抗炎成分之一, 在黑骨藤的药用开发中占有重要的地位^[2]。秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 为龙胆科多年生草本, 有保肝、治疗风湿性关节炎、清湿热、抗过敏、

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31240087)

作者简介: 周秋月 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为药物分析。Tel: 13981928834 E-mail: zhouqiuyue2008@126.com

*通信作者 张宏 Tel: 18008021106 E-mail: zhanghong651@aliyun.com

止痹痛等功效^[3]。秦艽的化学成分主要为环烯醚萜类化合物,其中龙胆苦苷为主要成分^[4-6]。元胡为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,具有活血化瘀、理气止痛的功效,临床主要集中用于各种疼痛、心血管疾病及痛经等^[7]。延胡索的主要有效成分为生物碱^[8],其中延胡索乙素为主要镇痛成分^[9]。

目前,以黑骨藤药材入药的复方药物以多药材组方为主^[10]。本课题组以黑骨藤、秦艽和元胡3味药材组方的复方药物,已经证实复方药物具有良好的抗类风湿性关节炎的作用^[11]。本课题组在前期工作的基础上对复方药物的有效成分进行分离研究,选择了D-101、AB-8、NKA-9 3种大孔树脂,利用HPLC法同时测定杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量,初步筛选复方黑骨藤药物有效部位分离方法,优化大孔吸附树脂提取、分离复方黑骨藤药物工艺条件。

1 仪器与材料

Dionex-Summit P680A DGP—6 双三元高效液相色谱仪,美国戴安公司; Direct—Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司; THZ—98A 恒温振荡培养箱,上海一恒科学仪器有限公司; ESJ120—4 万分之一电子天平,沈阳龙腾电子有限公司; R501B 旋转蒸发仪,无锡市星海王生化设备有限公司; KQ5200E 超声清洗仪,昆山市超声波仪器有限公司; EC—pH510 标准智能型台式 pH 计,美国优特公司。

黑骨藤药材(批号 131218),2013 年购自四川西昌,经过成都中医药大学民族药学院张艺教授鉴定为萝藦科(Asclepiadaceae)杠柳属 *Periploca* Linn. 植物黑骨藤 *Periploca forrestii* Schltr.; 秦艽药材(批号 061118)和元胡药材(批号 061113)均购自四川中药饮片有限责任公司,经成都中医药大学民族药学院王张博士鉴定,分别为龙胆科龙胆属植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 和罂粟科紫堇属植物元胡 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang。

甲醇(色谱纯)购自美国天地公司;大孔树脂 D-101、AB-8、NKA-9(洁净级)购自成都科龙公司;杠柳苷自制,经核磁、质谱、红外、紫外鉴定为杠柳苷,经 HPLC 检测质量分数为 99.3%^[12];对照品龙胆苦苷(批号 110770-200308)、延胡索乙素(批号 110726-200208)购自中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%;其他试剂均为分析纯,购自成都科龙化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品杠柳苷 16.19 mg、龙胆苦苷 9.07 mg、延胡索乙素 10.82 mg 至 25 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,作为对照品母液。计算得到杠柳苷质量浓度为 647.6 mg/L,龙胆苦苷质量浓度为 362.8 mg/L,延胡索乙素质量浓度为 432.8 mg/L。

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 AichromBond-1 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0~9 min,甲醇-水(0.2%氨水溶液 pH 8.0)(35:65);10~30 min,甲醇-水(0.2%氨水溶液 pH 8.0)(65:35);体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 °C;检测波长:杠柳苷 239 nm、龙胆苦苷 233 nm、延胡索乙素 275 nm;进样量 10 μL。色谱图见图 1。

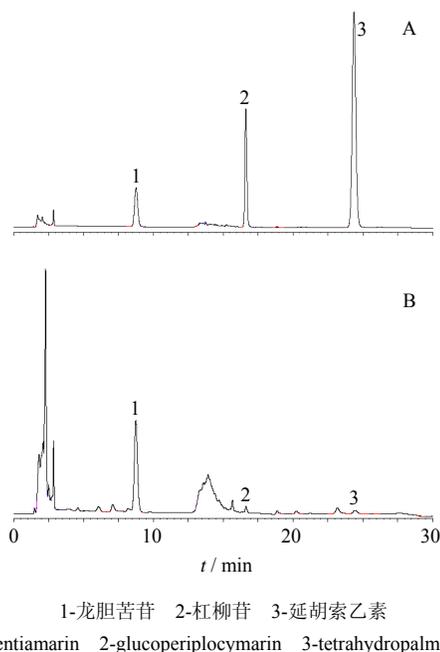


图 1 混合对照品(A)和样品(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC of reference substances (A) and samples (B)

2.1.3 线性关系考察 从“2.1.1”项的对照品混合液中分别移取 0.1、0.2、0.4、0.8、3.2、6.4、10.0 mL 溶液于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容。在“2.1.2”项色谱条件下分别进样 3 针,进样量为 10 μL。以峰面积为纵坐标,进样质量浓度(mg/L)为横坐标,绘制标准曲线。得到杠柳苷的回归方程: $Y=0.0743X+0.495$, $r=0.9999$,线性范围为 6.476~647.6 mg/L;龙胆苦苷的回归方程: $Y=0.1101X-0.0215$, $r=0.9999$,线性范围为 3.628~362.8 mg/L;延胡索乙素的回归方程: $Y=0.5075X-0.3903$, $r=$

0.999 9, 线性范围为 4.328~432.8 mg/L。

2.1.4 样品的制备与测定 称取过 2 未过 3 号筛的黑骨藤 25 g、秦艽 10 g、元胡 10 g 至 500 mL 塑料烧杯中, 加入 450 mL 50%乙醇。在功率 800 W, 超声间隙时间 5 s/3 s, 温度 60 °C 条件下提取 30 min^[13]。所得溶液旋转浓缩至无乙醇味时至冻干机中冻干, 得到提取物粗粉。称取 0.1 g 粗粉溶于 25 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解后, 取样品液 0.45 μm 微孔滤过后至进样瓶中, 在“2.1.2”项色谱条件下

进样, 进样量为 10 μL, 测定提取物中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量, 色谱图见图 1。通过计算得到样品中杠柳苷的量为 5.58 mg/L, 龙胆苦苷的量为 24.96 mg/L, 延胡索乙素的量为 2.24 mg/L。

2.2 大孔吸附树脂对复方黑骨藤纯化条件的考察

本实验先考察 3 种不同极性的大孔树脂对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的吸附与解吸附能力, 再对合适的树脂进行纯化条件考察, 3 种大孔树脂的具体参数见表 1。

表 1 3 种树脂规格对比

Table 1 Comparison on specifications of three macroporous adsorption resins

树脂型号	极性	平均孔径 / μm	粒径 / mm	比表面积 / (m ² ·g ⁻¹)	孔隙率 / %	外观
D-101	非极性	12~15	0.30~1.25	500~550	90~100	白色
AB-8	弱极性	130~140	0.30~1.25	480~520	42~46	乳白色
NKA-9	极性	155~165	0.30~1.25	250~290	46~50	乳黄色

2.2.1 静态吸附与解吸附 分别称取 20.0 g 经过预处理的 D-101、AB-8 和 NAK-9 3 种不同极性的大孔吸附树脂于洁净的三角瓶中 (各 3 个平行样), 分别加入质量浓度为 50 mg/mL 的提取物溶液各 40 mL, 在恒温振荡培养箱中振荡 24 h, 使树脂充分吸附, 滤过, 得溶液 1; 将滤渣置于洁净的三角瓶, 分别向其中加入 50 mL 60%乙醇, 于恒温振荡培养箱中振荡 24 h, 使吸附有效成分的树脂解吸附, 滤过, 得溶液 2。按照“2.1.2”项和“2.1.4”项的方法测定溶液 1 和溶液 2 中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量, 根据下列公式计算吸附率和解吸率, 结果见表 2。

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1) / (C_0V_0)$$

$$\text{解吸率} = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1)$$

C₀ 为上样溶液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的质量浓度; V₀ 为上样溶液体积; C₁ 为溶液 1 中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的质量浓度; V₁ 为溶液 1 体积; C₂ 为溶液 2 中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的质量浓度; V₂ 为溶液 2 体积

实验结果表明杠柳苷在 NKA-9 中吸附、解吸附效果最好, D-101 次之, AB-8 最差; 龙胆苦苷在 D-101 中吸附、解吸附效果最好, AB-8 次之, NKA-9 中最差, 死吸附很多; 延胡索乙素在 NKA-9 中吸附、解吸附效果最好, AB-8 和 D-101 都很差, 死吸附很多。

2.2.2 动态吸附与解吸附 分别称取 20.0 g 经过预处理的 D-101、AB-8 和 NAK-9 3 种不同极性的大孔吸附树脂于洁净的三角瓶中 (各 3 个平行样), 上样液质量浓度均为 50.0 mg/mL, 体积均为 40 mL, 体积流量均为 4.0 mL/min, 上样液的 pH 值均为 7.0, 填料均为 20.0 g。每一种树脂动态吸附实验分别先用 20 BV (BV 表示 1 个树脂体积) 的蒸馏水洗脱除杂得溶液 3, 再用 20 BV 的 60%乙醇洗脱, 收集洗脱液溶液 4, 按照“2.1.2”项和“2.1.4”项的方法测定溶液 3、溶液 4 中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量, 根据吸附率和解吸率公式计算, 结果见表 3。

实验结果表明杠柳苷在 3 种填料中吸附效果都

表 2 静态吸附与解吸附结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Result of static absorption and desorption ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

树脂	吸附量 / (mg·L ⁻¹)			吸附率 / %			解吸率 / %		
	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素
D-101	3.96 ± 0.011	23.96 ± 0.016	1.86 ± 0.004	70.97	95.99	83.04	30.81	87.23	34.41
AB-8	3.44 ± 0.011	24.48 ± 0.015	1.74 ± 0.003	61.65	98.08	77.68	25.00	70.10	42.53
NKA-9	4.26 ± 0.024	16.24 ± 0.013	1.48 ± 0.000	76.34	65.06	66.07	72.73	19.83	90.54

表 3 动态吸附与解吸附结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Result of dynamic absorption and desorption ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

树脂	吸附量 / (mg·L ⁻¹)			吸附率 / %			解吸率 / %		
	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素	杠柳苷	龙胆苦苷	延胡索乙素
D-101	5.58±0.000	24.58±0.010	2.24±0.000	100	98.48	100	91.04	95.77	90.18
AB-8	5.58±0.000	24.74±0.006	2.24±0.000	100	99.12	100	48.74	95.47	65.18
NKA-9	5.58±0.000	13.78±0.011	2.24±0.000	100	55.21	100	85.30	87.23	91.07

很好,全部吸附,在 D-101 中解吸附效果最佳,NKA-9 中解吸附效果较好,但是在 AB-8 中解吸附效果很差,只有一半洗脱出来;龙胆苦苷在 AB-8、D-101 中吸附效果较好,在 NKA-9 中仅一半被吸附,在 AB-8、D-101 中解吸附效果明显;延胡索乙素在 3 种填料中吸附能力都很好,但是在 AB-8 中解吸附能力较差,有 1/3 没有洗脱出来。

综合静态吸附与解吸附实验和动态吸附与解吸附实验,选择大孔树脂 D-101 作为最佳实验填料。

2.2.3 上样质量浓度对纯化效果的影响 分别称取大孔树脂 D-101 均为 20.0 g,取质量浓度为 20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0 mg/mL 的复方提取物溶液各 40.0 mL,洗脱液体积流量为 4.0 mL/min,上样溶液的 pH 值 7.0。用蒸馏水和 60%乙醇各洗脱 20 BV。收集洗脱液,利用 HPLC 法测定 60%乙醇洗脱液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量,计算吸附率,结果见表 4。

结果表明质量浓度低于 50.0 mg/mL 时,3 种物

表 4 上样液质量浓度对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素吸附率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of sample concentration on adsorption rates of glucoferiplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

上样液质 量浓度 / (mg·mL ⁻¹)	杠柳苷			龙胆苦苷			延胡索乙素		
	上样量 / (mg·L ⁻¹)	吸附量 / (mg·L ⁻¹)	吸附率 / %	上样量 / (mg·L ⁻¹)	吸附量 / (mg·L ⁻¹)	吸附率 / %	上样量 / (mg·L ⁻¹)	吸附量 / (mg·L ⁻¹)	吸附率 / %
30	3.35±0.005	1.95±0.001	58.21	14.98±0.003	7.47±0.0011	49.87	1.34±0.005	0.88±0.005	65.67
40	4.46±0.011	3.67±0.003	82.29	19.67±0.001	15.85±0.001	80.58	1.79±0.007	1.49±0.003	83.24
50	5.58±0.003	5.58±0.000	100.00	24.96±0.007	24.58±0.009	98.48	2.24±0.009	2.24±0.000	100.00
60	6.70±0.009	6.61±0.007	98.65	29.95±0.005	28.57±0.003	95.39	2.69±0.011	2.40±0.002	89.22
70	7.81±0.003	7.63±0.001	97.70	34.94±0.001	33.27±0.003	95.22	3.14±0.005	2.59±0.001	82.48

质的吸附率均随着上样液质量浓度的增大而增大,杠柳苷和元胡索乙素在质量浓度为 50.0 mg/mL 时,吸附率为 100%,但在质量浓度高于 50.0 mg/mL 后,3 种物质的吸附率开始降低,并且实验中观察到上样液质量浓度过高容易造成树脂内部过饱和堵塞树脂孔隙而影响吸附和解吸附。综合考虑上样液的质量浓度为 50.0 mg/mL。

2.2.4 上样量对纯化效果的影响 分别取质量浓度为 50.0 mg/mL 的复方提取物溶液 40.0 mL,洗脱液体积流量为 4.0 mL/min,上样溶液的 pH 值 7.0。用蒸馏水和 60%乙醇作洗脱剂,按照样品-填料 1:40、1:30、1:20、1:15、1:10 称取不同量的大孔树脂 D-101 装柱,蒸馏水和洗脱液体积均为 20 BV。收集洗脱液,利用 HPLC 法测定蒸馏水、60%乙醇洗脱液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量,结

果见表 5。实验中先用蒸馏水洗脱可有效去除糖类、蛋白质等水溶性杂质及大部分脂溶性杂质。结果表明 60%乙醇洗脱时杠柳苷和延胡索乙素在上样量高时被洗脱的量多些,说明低比例时填料对样品死吸附比较多。综合考虑可以选择样品填料比为 1:10。

2.2.5 吸附时间的确定 取 pH 值为 7.0、质量浓度为 50.0 mg/mL 的复方提取物溶液 40 mL 上柱后,大孔树脂 D-101 均为 20.0 g,分别静置 0、0.5、1.0、2.0、4.0 h,用 20 BV 的蒸馏水和 20 BV 的 60%乙醇洗脱,分别收集洗脱液,用 HPLC 法测定各洗脱液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量,结果见表 6。结果表明吸附时间对龙胆苦苷影响最大,在吸附时间 1 h 时水相洗脱液中洗脱最少,过早由于吸附不充分,过晚则由于分子扩散,都被水相洗脱液大量洗脱出来。而杠柳苷、延胡索乙素的量相对

表 5 不同上样量对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Effect of different sample mass on contents of glucoperiplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品-填料	杠柳苷 (醇相) / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)		延胡索乙素 (醇相) / (mg·L ⁻¹)
		水相	醇相	
1 : 10	4.994 ± 0.005	2.036 ± 0.005	18.519 ± 0.000	1.516 ± 0.015
1 : 15	4.976 ± 0.009	1.524 ± 0.000	17.882 ± 0.000	1.432 ± 0.012
1 : 20	4.451 ± 0.003	1.745 ± 0.002	18.538 ± 0.000	1.402 ± 0.015
1 : 30	4.554 ± 0.002	1.279 ± 0.000	21.039 ± 0.001	0.203 ± 0.009
1 : 40	4.252 ± 0.002	1.341 ± 0.000	17.662 ± 0.003	0.161 ± 0.000

表 6 吸附时间对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effect of different absorbing time on contents of glucoperiplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

吸附时间 / h	杠柳苷 (醇相) / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)		延胡索乙素 (醇相) / (mg·L ⁻¹)
		水相	醇相	
0	4.411 ± 0.000	1.543 ± 0.003	19.008 ± 0.005	1.364 ± 0.009
0.5	4.635 ± 0.000	0.926 ± 0.005	20.023 ± 0.001	1.489 ± 0.007
1.0	4.978 ± 0.001	0.889 ± 0.000	20.844 ± 0.002	1.528 ± 0.012
2.0	4.725 ± 0.000	2.043 ± 0.000	18.069 ± 0.002	1.444 ± 0.012
4.0	4.837 ± 0.000	1.962 ± 0.005	19.987 ± 0.003	1.581 ± 0.009

龙胆苦苷较少极性较低, 填料能够充分吸附, 故只能在醇相洗脱液中被洗脱出来, 由于吸附时间对龙胆苦苷影响最大, 综合考虑确定吸附时间为 1 h。

2.2.6 洗脱液 pH 值对纯化效果的影响 分别取质量浓度为 50.0 mg/mL 的复方提取物溶液 40 mL, 洗脱液体积流量为 4.0 mL/min, 大孔树脂 D-101 均为 20.0 g, 用蒸馏水和 60% 乙醇作洗脱剂, 分别用 HCl、乙酸和氨水调节洗脱液的 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 蒸馏水和洗脱液体积均为 20 BV。收集洗脱液, 用 HPLC 法测定各溶液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量。结果见表 7。

实验结果表明龙胆苦苷在 pH 6.0 时水相洗脱液中洗脱出最多, pH 8.0 时水相洗脱液较少而醇相洗脱液最多, 杠柳苷在 pH 6.0、7.0、8.0 醇相洗脱液中都能较好地洗脱出来, 延胡索乙素在 pH 为 7.0 时醇相洗脱液中洗脱效果最好, 其他组与 pH 为 7.0 组对比均呈负显著性差异, 综合考虑选择 pH 为 7.0, 这样既能较好的洗脱各组分, 也能大量节省操作时间, 节约成本。

2.2.7 洗脱液体积分数对纯化效果的影响 取质量浓度为 50.0 mg/mL 的复方提取物溶液液 40 mL, 洗脱液体积流量为 4.0 mL/min, pH 值为 7.0, 大孔树

表 7 不同 pH 值洗脱液对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Effect of different pH values on contents of glucoperiplocymarin, gentamicin, and tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	杠柳苷 (醇相) / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)		延胡索乙素 (醇相) / (mg·L ⁻¹)
		水相	醇相	
4.0	3.826 ± 0.010**	0.654 ± 0.011*	12.560 ± 0.012**	0.148 ± 0.000**
5.0	4.581 ± 0.009	1.632 ± 0.008	13.514 ± 0.011**	0.154 ± 0.000**
6.0	4.260 ± 0.012	1.649 ± 0.009	12.934 ± 0.008	0.146 ± 0.000**
7.0	4.486 ± 0.011	1.383 ± 0.009	12.938 ± 0.008	0.196 ± 0.001
8.0	4.520 ± 0.012*	0.962 ± 0.008**	13.802 ± 0.010**	0.140 ± 0.000**
9.0	4.247 ± 0.009**	0.061 ± 0.010	12.824 ± 0.014	0.118 ± 0.000**

与 pH 7.0 对比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs pH 7.0

脂 D-101 为 20.0 g, 用乙醇作洗脱溶液, 分别考察水及 20%、40%、60%、80%、95%乙醇, 各洗脱液体积均为 20 BV。收集洗脱液用 HPLC 测定溶液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量。结果见表 8。

实验结果表明在水相洗脱液中只有龙胆苦苷被洗脱出来, 而杠柳苷和延胡索乙素未被洗脱出来。龙胆苦苷在 20%乙醇中洗脱效果最好, 杠柳苷在 40%乙醇中洗脱效果最好, 延胡索乙素在 60%乙醇

表 8 各洗脱片段中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Contents of glucoperiplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine by each elution fragment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

洗脱液	杠柳苷 / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)	延胡索乙素 / (mg·L ⁻¹)
水	—	2.12 ± 0.005	—
20%乙醇	—	18.18 ± 0.019	—
40%乙醇	4.02 ± 0.009	2.04 ± 0.007	—
60%乙醇	1.04 ± 0.005	1.04 ± 0.003	1.58 ± 0.003
80%乙醇	0.16 ± 0.000	0.06 ± 0.000	0.34 ± 0.000
95%乙醇	—	0.02 ± 0.000	0.14 ± 0.000
样品	5.58 ± 0.003	24.96 ± 0.007	2.24 ± 0.009

中洗脱效果最好。综合选择 60%乙醇作为洗脱液, 这样才能同时较好地分离出杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素。

2.2.8 洗脱体积流量对纯化效果的影响 分别取质量浓度为 50.0 mg/mL 的复方提取物溶液 40 mL, pH 值为 7.0, 大孔树脂 D-101 为 20.0 g, 用蒸馏水和 60%乙醇作洗脱剂, 洗脱体积流量分别为 2、4、6、8、10 mL/min, 蒸馏水和 60%乙醇洗脱 20 BV。收

集洗脱液, 用 HPLC 法测定各溶液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量。结果见表 9。

通过洗脱曲线可得随着洗脱剂体积流量的不断增加, 杠柳苷和龙胆苦苷的洗脱率逐渐降低, 当体积流量为 4 mL/min 时, 虽然其洗脱率略低于 2 mL/min, 但却可以节省一半时间; 而延胡索乙素在体积流量为 4 mL/min 时, 洗脱率最高, 综合选择洗脱剂的体积流量为 4 mL/min。

表 9 洗脱体积流量对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素量的影响 (醇相) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of elution velocity on content of glucoperiplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine (alcohol) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

洗脱体积流量 / (mL·min ⁻¹)	杠柳苷 / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)	延胡索乙素 / (mg·L ⁻¹)
2	5.176 ± 0.003	21.909 ± 0.005	1.576 ± 0.009
4	5.080 ± 0.000	21.265 ± 0.003	1.593 ± 0.001
6	4.648 ± 0.001	20.359 ± 0.001	1.487 ± 0.007
8	4.212 ± 0.001	20.125 ± 0.001	1.476 ± 0.003
10	3.965 ± 0.000	19.624 ± 0.007	1.355 ± 0.000

2.2.9 洗脱时间的确定 pH 7.0、质量浓度为 50 mg/mL 的复方提取物溶液 40 mL 上柱后静置 60 min, 大孔树脂 D-101 均为 20.0 g, 以 20 BV/h 体积流量洗脱, 先用 20 BV 的蒸馏水 (pH 7.0) 洗脱, 再以 4.0 mL/min 的 60%乙醇 (pH 7.0) 洗脱。60%乙醇洗脱液每 10 min 收集 1 次, 用 HPLC 法测定溶液中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量, 确定洗脱时间。结果见表 10。

结果表明杠柳苷和龙胆苦苷在前 40 min 基本被完全洗脱, 延胡索乙素在 60 min 后大部分被洗

脱, 60 min 后还有少量被洗脱出来。为节约时间和材料成本, 考虑选择洗脱终点为 60 min, 由此即可得到洗脱体积 20 BV。

2.2.10 验证试验 称取洁净大孔树脂 D-101 2 kg (平行 3 份) 到色谱柱装柱, 称取黑骨藤复方提取物干粉 200 g 加 1 000 mL 蒸馏水超声溶解后上样, 上样吸附 1 h 后, 先用 20 L 蒸馏水洗脱除杂, 再用 60%乙醇 pH 7.0 以体积流量 40 mL/min 洗脱, 洗脱 1 h, 收集 60%乙醇洗脱液旋转浓缩后冻干, 测定冻干粉中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量。结果见表 11。

表 10 洗脱时间对杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素量的影响 (醇相) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of eluting time on contents of gluco-periplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine (alcohol) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

洗脱时间 / min	杠柳苷 / (mg·L ⁻¹)	龙胆苦苷 / (mg·L ⁻¹)	延胡索乙素 / (mg·L ⁻¹)
10	2.837±0.001	12.534±0.001	0.453±0.000
20	1.376±0.001	5.762±0.005	0.546±0.001
30	0.259±0.001	0.238±0.001	0.238±0.001
40	0.125±0.003	0.009±0.000	0.102±0.000
50	0.000±0.000	0.000±0.000	0.098±0.001
60	0.000±0.000	0.000±0.000	0.026±0.001
70	0.000±0.000	0.000±0.000	0.024±0.001
80	0.000±0.000	0.000±0.000	0.012±0.001
90	0.000±0.000	0.000±0.000	0.039±0.001
100	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

表 11 杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素的量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Contents of gluco-periplocymarin, gentiamarin, and tetrahydropalmatine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成分	样品质量 / g		转移率 / %
	纯化前	纯化后	
杠柳苷	0.558±0.003	0.501±0.009	89.78
龙胆苦苷	2.496±0.007	2.327±0.039	93.23
延胡索乙素	0.224±0.009	0.194±0.053	86.61

实验得到纯化后样品平均质量为 37.132 g。通过数据分析得到杠柳苷的平均转移率为 89.78%，龙胆苦苷的平均转移率为 93.23%，延胡索乙素的平均转移率为 86.61%，说明该分离纯化工艺效果良好，重复性较好。

3 讨论

本实验对黑骨藤复方药物有效成分纯化工艺进行了研究，实验结果表明，3 种大孔树脂中，D-101 树脂比较适合黑骨藤复方药物有效成分的纯化，此方法与文献报道相似^[14-15]，纯化工艺参数为样品与填料的比为 1:10，样品质量浓度为 50 mg/mL，上样后吸附 1 h，用 60%乙醇为洗脱液，在 pH 7.0 条件下，4 mL/min 洗脱 1 h，其转移率较好，总体富集效果明显，大孔树脂 D-101 可作为分离纯化复方黑骨藤药物中杠柳苷、龙胆苦苷和延胡索乙素成分的有效方法。

本课题组还对复方黑骨藤药物各个纯化产物进行了相关药效学考察，可为后续研究提供参考。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M].

上海: 上海科学技术出版社, 1999.

[2] 甘秀海, 周欣, 赵超, 等. 黑骨藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2012, 39(9): 20-21.

[3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[4] 白晓朝. 宁夏产秦艽化学成分研究 [J]. 科技信息, 2010, 32(2): 382.

[5] 曹晓燕, 王政军, 王喆之. 4 种秦艽属植物不同器官中 4 种环烯醚萜苷成分含量的比较分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(1): 58-63.

[6] 王琳, 聂艳琼, 孙娜, 等. 秦艽的化学成分、分子生物学和药理学研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9629-9630.

[7] 范卓文, 武斌, 刘国臣. 延胡索药理研究及临床应用进展 [J]. 黑龙江医药, 2007, 20(5): 522-524.

[8] Shi J M, Han W L, Ye W C, et al. Phytochemical investigation of *Corydalis yanhusuo* [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(4): 647-651.

[9] 徐婷, 金昔陆, 曹惠明. 延胡索乙素药理作用的研究进展 [J]. 中国临床药学杂志, 2001, 10(1): 58-60.

[10] 耿亚, 马永明. 黑骨藤追风活络胶囊质量控制的研究 [J]. 中外医疗, 2010(21): 128.

[11] 陆墨婷. 复方黑骨藤提取物对佐剂性关节炎模型大鼠滑膜组织的影响 [D]. 成都: 四川师范大学, 2011.

[12] 景小楠. 黑骨藤抗肿瘤活性成分的研究 [D]. 成都: 四川师范大学, 2009.

[13] 钟茵. 黑骨藤单方及复方有效成分提取工艺研究 [D]. 成都: 四川师范大学, 2010.

[14] 赵勇, 张儒, 孙文基. 大孔吸附树脂富集秦艽叶中龙胆苦苷的工艺研究 [J]. 中药材, 2007, 30(12): 1583.

[15] 徐丽琳, 熊雪丰, 何三民, 等. 元胡总生物碱的大孔树脂纯化工艺研究 [J]. 中华中国医药学刊, 2013, 31(6): 1358-1361.