

基于指纹图谱的决明子有效组分纯化工艺

郭威^{1,2}, 曲永胜¹, 王亮¹, 刘建平³, 于宗渊^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;
3. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东临沂 276005)

[摘要] 目的:采用 HPLC 指纹图谱指导优化决明子有效组分纯化工艺。方法:采用 HPLC 建立决明子指纹图谱,以 5 个主要峰的回收率和指纹图谱相似度为指标,优选大孔树脂型号、上样量和洗脱条件。结果:D-101 树脂对 5 个成分的回收率最高,上样量为 3 mL,树脂用量为 10 mL,洗脱溶剂为 75% 乙醇 50 mL,纯化后主峰回收率均 > 85%,RSD 均 < 0.6%,HPLC 指纹图谱相似度 > 0.98。结论:采用 HPLC 指纹图谱指导优化决明子有效组分大孔树脂纯化工艺,可保持分离前后有效组分中化学成分的一致性。

[关键词] 指纹图谱; 决明子; 大孔吸附树脂; 有效组分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0061-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010061

Purification Technology of Active Materiomc from Cassiae Semen Based on Fingerprint

GUO Wei^{1,2}, QU Yong-sheng¹, WANG Liang¹, LIU Jian-ping³, YU Zong-yuan^{1*}

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine,
Ji'nan 250355, China; 3. Lunan Pharmaceutical Co. Ltd., Linyi 276005, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technological parameters in the purification process of active materiomc from Cassia Semen by HPLC fingerprint technique. **Method:** Using the established HPLC fingerprint of Cassia Semen, the macroporous resin type, loaded concentrations, and elution conditions were optimized using the similarity and recovery rates of five components in fingerprints as indexes. **Result:** D-101 type resin possessed the highest recovery rates of five components. The optimized purification process was as follows: the loaded concentration was 3 mL, the amount of resin was 10 mL, 50 mL of 75% ethanol was used as eluent, respectively. After being purified, the recovery rates of five components were all over 85%, and the similarity of fingerprints was higher than 0.98. These components could get balanced recovery. **Conclusion:** Based on HPLC fingerprint technique, the optimized purification process of active materiomc from Cassiae Semen with macroporous resin can ensure that the main effective components are consistent with the crude extract of Cassiae Semen.

[Key words] fingerprint; Cassiae Semen; active materiomc; macroporous resin

中药有效组分是中药具有药理活性的物质基础,体现了中药“多组分、多靶点、整体性”的特点,但其成分复杂且部分成分含量较低,因此有效组分的提取和分离纯化是中药研究中的关键问题^[1]。

20 世纪 60 年代大孔吸附树脂问世,由于其具有吸附容量大、选择性好、吸附速度快、易于解吸附、机械强度高、再生处理简便等优点^[2],使得它被广泛应用于中药的分离纯化,但常规的单组分评价技术多

[收稿日期] 20150624(011)

[第一作者] 郭威,硕士,助理研究员,从事中药分析与质量控制工作,Tel:0531-82949856,E-mail:331527800@qq.com

[通讯作者] * 于宗渊,博士,研究员,从事中药分析与质量控制工作,Tel:0531-82949805,E-mail:yuzys@sohu.com

以一种或几种成分的含量为指标^[3-4],不足以准确、完整地体现中药有效组分,使得该技术在中药生产应用中受限。指纹图谱作为一种多指标的中药质控手段^[5],可较全面地表征有效组分的整体面貌,并且文献中未见基于指纹图谱技术的决明子有效组分纯化工艺的相关报道,本文以指纹图谱为指标优化决明子有效组分的分离纯化过程,可较完整地保持分离前后有效组分中化学成分的一致性,以更全面、准确地衡量纯化工艺。

决明子含有萘并吡喃酮及其苷类、蒽醌及其苷类等物质,具有降血压、降血脂、明目、抑菌等功效,但目前的研究多集中于中小极性化合物^[6-7]。2010年版《中国药典》以橙黄决明素和大黄酚作为指标性成分控制质量,均要求通过水解后测定其含量,而且含量要求很低,难以准确地反映决明子的质量。甲醇极性较大,对苷等水溶性化合物有较大溶解性,可将决明子药材中苷类等大极性成分^[8-9]提取出来,因此,本实验采用甲醇作为决明子的提取溶剂,以反映决明子中苷类化合物的甲醇提取物指纹图谱为评价指标,优化决明子有效组分的纯化工艺,以保证有效组分的回收率,达到与药材成分组成一致的目的。

1 材料

1100 系列液相色谱系统(配有四元梯度泵、DAD 检测器、自动进样器、柱温箱,美国安捷伦),API 4000 型四极杆串联质谱仪(配有 Turbo Ionspray 源及 Analyst1.1 数据处理系统,美国应用生物系统公司),LC-10AT 型高效液相色谱仪(PDA 检测器,Class-VP 色谱工作站,日本岛津),SB-2000 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司),SK5210LHC 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

乙腈,磷酸(色谱纯),甲醇(分析纯);D-101,HPD-300,HPD-700,HPD-750,AB-8 型大孔吸附树脂(宝恩化工有限公司)。决明子药材购自济南建联中药店,经山东大学中草药教研室陈沪宁教授鉴定为钝叶决明 *Cassia obtusifolia* 的干燥成熟种子。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

称取决明子粉末(过三号筛)0.50 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 5.0 mL,称定质量,浸渍 1 h,超声 30 min,放冷,用甲醇补足减少的质量,摇匀,过滤。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件

Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),柱温 25 °C,流动相乙腈(A)-

0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min, 25% A; 25 ~ 35 min, 25% ~ 45% A; 35 ~ 50 min, 45% ~ 60% A; 50 ~ 55 min, 60% ~ 65% A),流速 0.5 mL · min⁻¹, 20 μL 定量环进样,检测波长 278 nm。见图 1。

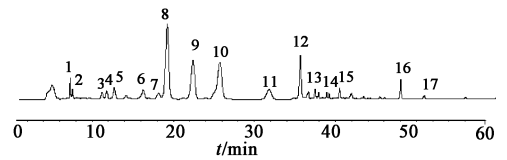


图 1 决明子甲醇提取物的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 Fingerprint of methanol extracts of Cassiae Semen by HPLC

2.2.2 精密度试验

取同一批药材提取液,重复进样 6 次,按 2.2.1 项下色谱条件进行分离,记录指纹图谱,以峰面积较大、重复性较好的 8 号峰为参照峰,6 次测定,图谱中 17 个主要色谱峰的相对保留时间 RSD 均 < 1%,相对峰面积 RSD 均 < 3%,仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验

取同一批药材按 2.1 项下制备 6 份供试品溶液,分别测定,6 份样品的 17 个主要峰相对保留时间 RSD < 1%,相对峰面积 RSD < 3%,证明方法的重复性良好。

2.2.4 稳定性试验

取新制备的供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测定图谱的 17 个主要色谱峰相对保留时间 RSD 0.07% ~ 0.6%,相对峰面积 RSD 0.5% ~ 2.9%,表明该方法处理的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.5 决明子指纹图谱特征峰的结构解析

通过 HPLC-MS 联用技术及 DAD 在线紫外光谱信息对决明子指纹图谱中主要色谱峰进行结构分析,结合有关文献报道^[10-13],推断 5, 6 号峰分别为大黄酚四吡喃葡萄糖苷、大黄酚-1-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→6)-β-D-吡喃葡萄糖苷, 8, 9, 10 号峰分别为红镰霉素-6-β-龙胆二糖苷、决明苷、决明子苷 C。由此可见,甲醇提取物的 HPLC 指纹图谱可以较好地反映决明子中的萘并吡喃酮苷及蒽醌苷类等药效成分。见表 1。

2.3 大孔吸附树脂纯化工艺的优化

2.3.1 树脂类型对吸附的影响

取不同类型的大孔吸附树脂,用乙醇浸泡 24 h,充分溶胀后,用乙醇洗脱树脂柱至流出液遇水不浑浊,以大量蒸馏水洗至无醇味,备用^[14]。

量取已处理好的各种类型的大孔树脂各 10 mL,湿法装柱。精密量取按 2.1 项下方法制备的供试品溶液 0.5 mL,共 2 份,其中 1 份蒸干甲醇后

表 1 色谱峰结构分析

Table 1 Analysis for peaks

峰号	色谱峰纯度	紫外光谱特征/nm	质谱特征 m/z	归属
5	0.999 81	223, 259, 286 (sh), 412	925 [M + Na] ⁺ , 941 [M + K] ⁺ , 255 [M + H - 3glucose] ⁺	大黄酚-四吡喃葡萄糖苷
6	0.999 26	223, 259, 286 (sh), 412	763 [M + Na] ⁺ , 779 [M + K] ⁺ , 255 [M + H - 3glucose] ⁺	大黄酚-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷
8	0.999 97	225, 255 (sh), 277	597 [M + H] ⁺ , 619 [M + Na] ⁺ , 273 [M + H - 2glucose] ⁺	红镰霉素-6- β -龙胆二糖苷
9	0.999 90	224, 255 (sh), 278	421 [M + H] ⁺ , 443 [M + Na] ⁺ , 459 [M + K] ⁺ , 259 [M + H-glucose] ⁺	决明苷
10	0.999 81	224, 269, 279	597 [M + H] ⁺ , 619 [M + Na] ⁺ , 273 [M + H - 2glucose] ⁺	决明子苷 C

加水 3.0 mL, 溶解, 上样, 以 2 mL·min⁻¹ 流速进行洗脱, 先用水洗至 Molish 反应为阴性, 然后用 75% 乙醇溶液 50 mL 洗脱。蒸干洗脱液, 精密加入甲醇 4.0 mL 溶解, 得供试液 1。另 1 份蒸干溶剂后加甲醇 4.0 mL 溶解, 得供试液 2。分别经 0.45 μ m 滤膜过滤后 HPLC 法测定。

以供试液 1 的 HPLC 图谱中峰面积较大的成分 (5, 6, 8, 9, 10 号峰) 为指标, 与未经大孔树脂处理的供试液 2 比较, 计算各主峰的回收率。

回收率 = (洗脱液主峰峰面积/过柱前提取液主峰峰面积) \times 100%

采用国家药典委员会出版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版) 软件计算各洗脱液指纹图谱与决明子提取液指纹图谱相似度。

在其他工艺条件都相同的情况下, 不同类型的树脂对决明子提取液中各成分的吸附效果不同, D-101 型树脂对各主峰保留率均较高, 洗脱液指纹图谱与决明子提取液指纹图谱相似度也最高, 因此选择 D-101 型大孔树脂。见表 2。

表 2 不同型号树脂对主峰回收率和指纹图谱相似度的影响

Table 2 Effect of resin type on recovery rate and fingerprint similarity of main peaks

树脂型号	主峰回收率					相似度
	5	6	8	9	10	
D-101	0.949 2	0.875 5	0.931 9	0.924 1	0.885 0	0.952
HPD-300	0.881 1	0.839 4	0.802 1	0.855 8	0.774 2	0.881
HPD-700	0.846 7	0.829 5	0.787 6	0.845 1	0.765 9	0.824
HPD-750	0.873 0	0.814 7	0.775 4	0.860 7	0.506 7	0.566
AB-8	0.868 2	0.824 4	0.684 5	0.820 9	0.774 9	0.662

2.3.2 上样浓度对吸附的影响 量取处理好的 D-

101 型大孔树脂 10 mL, 装柱。精密量取决明子提取液 0.5 mL, 蒸干, 分别加水 3.0, 6.0, 9.0 mL 溶解后上样, 其他处理方法同供试液 1。经 HPLC 测定后, 计算各主峰的回收率, 结果表明, 随着上样浓度的减小, 主峰的回收率有增大的趋势, 但相差不大, 相似程度也相差不大, 而且上样体积越大, 上样时间越长, 为节省时间提高效率, 选择蒸干甲醇后加水 3.0 mL 溶解。见表 3。

表 3 不同上样浓度对主峰回收率和指纹图谱相似度的影响

Table 3 Effect of different loaded concentrations on recovery and fingerprint similarity

加水量 /mL	主峰回收率					相似度
	5	6	8	9	10	
3.0	0.946 7	0.873 5	0.929 4	0.925 1	0.878 9	0.975
6.0	0.947 1	0.874 4	0.929 9	0.926 8	0.880 1	0.976
9.0	0.948 2	0.875 7	0.930 1	0.927 6	0.879 6	0.978

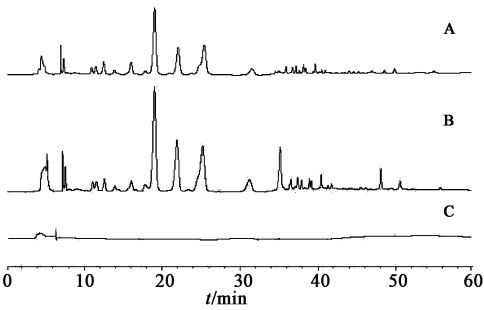
2.3.3 树脂用量对吸附的影响 分别量取处理好的 D-101 型大孔树脂 20, 15, 10, 5 mL 装柱, 同 2.3.1 项下供试液 1 的处理方法, 测定并计算各主峰的回收率, 结果见表 4。由表 4 可知, 树脂用量越少, 主峰的回收率越小, 相似度越小, 但 20, 15, 10 mL 时, 主峰回收率和相似度相差都不大, 从节约实验成本的角度考虑, 选用树脂用量为 10 mL。

2.3.4 洗脱溶剂种类的考察 按照上述实验确定的上样量和树脂用量, 将决明子药材提取液通过已处理的 D-101 型树脂柱, 水洗至 Molish 反应为阴性后, 分别以 3 倍柱体积的 50%, 75% 乙醇和无水乙醇分次洗脱树脂柱, 收集洗脱液, 蒸干, 分别加甲醇 4.0 mL 溶解, 过滤, HPLC 测定, 见图 2。结果表明, 75% 乙醇洗脱液出峰最多, 且包含其他 2 种乙醇洗

表 4 不同树脂用量对主峰回收率和指纹图谱相似度的影响
Table 4 Effect of different amounts of resin on recovery and fingerprint similarity

树脂用量 /mL	主峰回收率					相似度
	5	6	8	9	10	
20	0.950 1	0.880 3	0.928 7	0.931 6	0.887 3	0.990
15	0.944 1	0.880 5	0.926 9	0.925 9	0.881 5	0.989
10	0.947 9	0.871 3	0.929 5	0.920 5	0.879 5	0.987
5	0.834 1	0.813 5	0.891 3	0.881 7	0.791 4	0.856

脱液中的峰,因此,确定以 75% 乙醇为洗脱溶剂。

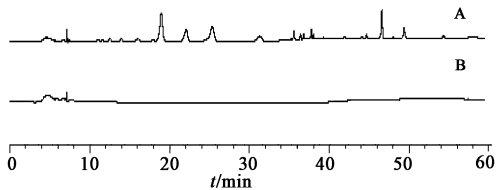


A. 50% ; B. 75% ; C. 无水乙醇

图 2 不同体积分数乙醇洗脱液的 HPLC

Fig. 2 HPLC of ethanol eluent at different concentration

2.3.5 洗脱溶剂用量的考察 按照上述试验确定的上样浓度和树脂用量,将决明子药材提取液通过已处理的 D-101 型树脂柱,水洗至 Molish 反应为阴性后,依次采用 30, 20, 10 mL 的 75% 乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,蒸干溶剂,分别加甲醇 4.0 mL 溶解,过滤, HPLC 测定,见图 3。结果表明,第二次洗脱后仍有色谱峰出现,第三次洗脱后无色谱峰出现,即 75% 乙醇溶液 50 mL 可将吸附的成分基本洗脱完全,因此确定洗脱溶剂的用量为 50 mL。



A. 20 mL; B. 10 mL

图 3 不同体积乙醇洗脱液的 HPLC

Fig. 3 HPLC of ethanol eluent at different volume

2.3.6 方法专属性 精密吸取蒸馏水 3.0 mL 上样,按 2.3.1 项下供试品 1 的方法处理后,按 2.2.1 项下方法测定,得空白溶液的色谱图。由空白与决明子甲醇提取物的色谱图可知,用本实验拟定方法处理的大孔树脂处理决明子样本后,在 55 min 色

谱图中无大孔树脂成分流出。

2.3.7 大孔树脂处理效果的重复验证 称取决明子粉末(过三号筛)0.50 g 3 份,分别置于具塞锥形瓶中,按 2.1 项下方法制备供试品溶液。量取 D-101 树脂 10 mL 装柱,用乙醇洗至洗脱液遇水不浑浊,然后用水洗至无醇味。准确吸取甲醇提取液 0.5 mL,其余操作按 2.3.1 项下供试液 1 的制备方法,自“蒸干甲醇后加水 3.0 mL……”起,同法操作,计算各主峰的回收率,见表 5。结果表明,甲醇提取液经大孔树脂处理后各主峰回收率均在 85% 以上, RSD 均 < 0.6%,重复性较好,说明确定的树脂用量、上样浓度、洗脱剂种类及用量等条件较为合理,样本处理的重复性好且主成分保留率较高。决明子有效组分的 HPLC 指纹图谱与决明子提取液的相似度均 > 0.98,实现了成分的均衡回收^[15]。

表 5 大孔树脂处理效果的重复验证

Table 5 Technology repeated experiment of macroporous resin

No.	主峰回收率					相似度
	5	6	8	9	10	
1	0.949 4	0.875 1	0.931 5	0.924 3	0.884 7	0.981
2	0.945 7	0.871 5	0.930 7	0.921 4	0.880 1	0.988
3	0.944 3	0.880 1	0.940 1	0.928 1	0.887 9	0.986

3 讨论

决明子药材的提取主要考察了提取溶剂,提取方式,提取时间,溶剂用量及提取次数。在提取溶剂考察中,考虑中药的习惯用法为水煎,而甲醇极性较大,故比较了水和甲醇的提取效果,结果表明水提液和甲醇提取液色谱图的色谱峰个数相同,分离效果无明显差别,但药材的水提液黏度较大,样品处理过程比较麻烦,所以选择甲醇作为提取溶剂;本实验又比较了超声和加热回流两种提取方法,发现加热回流与超声提取效果相差不大,为操作方便,确定用超声提取方法;分别考察了超声 10, 20, 30, 40 min,结果表明 30 和 40 min 提取效果基本一致,因此确定提取 30 min;还考察了溶剂用量(5, 10, 20 mL)和提取次数(1, 2, 3 次),结果表明,随着溶剂用量和提取次数的增多,色谱峰的个数无明显增多,为节约溶剂、提高效率,选择 5 mL 甲醇提取 1 次。

采用二极管阵列检测器观察了 224, 278, 350, 400 nm 波长处的色谱图,结果在 278 nm 处色谱信息最为丰富,且各色谱峰的分度度较好。因此,选择该波长作为检测波长。

决明子采用甲醇提取时,出膏率 > 40%,经本工

艺纯化后,出膏率 $<15\%$,提高了主要成分萘并吡喃酮苷类及蒽醌苷类成分的含量,在保持有效组分一致的同时减少了服用量。

本实验采用大孔树脂处理样本,在无对照品的情况下,采用HPLC-MS联用技术及DAD在线紫外光谱信息对指纹图谱中的5个特征性强、重复性好的色谱峰进行了结构解析,推断为大黄酚四吡喃葡萄糖苷、大黄酚-1-O- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- β -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷、红镰霉素-6- β -龙胆二糖苷、决明苷、决明子苷C。以这5个峰的回收率和相似度作为评价指标,跟踪评价大孔树脂的处理效果。

本实验以指纹图谱为评价手段精制决明子提取物,与传统的以单一成分保留率为指标的常用评价方法相比更为精细,可较全面地反映大孔树脂分离纯化中药时其药效物质的回收率,更好地体现了中药多成分多靶点的特征,可为中药及其复方制剂的精制工艺提供参考。

[参考文献]

[1] 田景振,王厚伟. 基于中药方剂的中药多维组合药物研究模式探讨[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(2): 99-120.

[2] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 175.

[3] 盛华刚,朱立俏. 不同型号大孔树脂对金荞麦中有效成分的纯化工艺考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 41-44.

[4] 杜建平,孙冬梅. 积雪草总苷大孔树脂纯化工艺研究[J]. 江西中医学院学报, 2012, 24(2): 39-41.

[5] 孟庆华,刘永锁,蒋淑敏,等. 色谱指纹图谱综合信息指数在中药质量控制中的应用研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 359-364.

[6] 孙国祥,侯志飞,张春玲,等. 色谱指纹图谱定性相似度和定量相似度的比较研究[J]. 药科学报, 2007, 42(1): 75-80.

[7] Wong M M, Seligmann O. Anthraquinone glycosides from the seeds of *Cassia tora*[J]. Phytochemistry, 1989, 28(1): 211-220.

[8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 949.

[9] Wong S M, Wong M M, Seligmann O. New antihepatotoxic naphthopyrone glycoside from the seeds of *Cassia tora* [J]. Planta Medica, 1989, 55(3): 276-271.

[10] Tsutomu H, Hiroshi U. Phenolic constituents of *Cassia* Seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chem Pharm Bull, 1999, 47(8): 1121-1127.

[11] Kaneda M, Morishita E, Shibata S. Chemical studies on the oriental plant drugs. XXI. The constituents of *Cassia tora* L. A glycoside of rubrofusarin [J]. Chem Pharm Bull, 1969, 17(3): 458-461.

[12] Lee G Y, Jang D S, Lee Y M. Naphthopyrone glucosides from the seeds of *Cassia tora* with inhibitory activity on advanced glycation end products (AGEs) formation [J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(7): 587-590.

[13] Takido M. Studies on the constituents of the seeds of *Cassia obtusifolia* L. I. The structure of obtusifolin [J]. Chem Pharm Bull, 1958, 6(4): 394-400.

[14] 曾元儿,王凤云,江滨,等. 绵茵陈提取液的大孔树脂静态吸附工艺影响因素考察[J]. 中成药, 2007, 29(2): 199-202.

[15] 李守信,展金祥,刘武占,等. 基于指纹图谱的金银花物质组纯化工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(1): 55-60.

[责任编辑 顾雪竹]