

东北铁线莲中抗肿瘤活性成分的大孔树脂纯化工艺优选

金晨, 罗晶, 张武岗, 廖辉, 冯育林, 杨世林, 张凌*

(江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立东北铁线莲中抗肿瘤活性成分 3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃核糖-(1 \rightarrow 3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖齐墩果酸苷(W2)的大孔树脂纯化工艺。方法:采用 HPLC 测定 W2 含量,通过对 9 种大孔树脂的吸附-洗脱能力进行考察,筛选最适宜的大孔树脂型号,对选定的大孔吸附树脂进行静态吸附动力学考察和动态梯度洗脱考察,通过单因素试验考察上样液浓度、吸附流速、除杂溶媒用量和流速等参数对大孔树脂纯化工艺的影响。结果:最佳纯化工艺为上样液质量浓度 0.4 g·mL⁻¹,以 1.5 BV·h⁻¹的流速过 LX-17 型大孔树脂柱,加水 4 BV 和 40% 乙醇 5 BV 除杂,除杂流速 3 BV·h⁻¹,加 80% 乙醇 1 BV 洗脱以替换柱内液体,加 80% 乙醇 6 BV 富集 W2,洗脱流速 1.5 BV·h⁻¹。浸膏中 W2 质量分数 43.14%。结论:LX-17 型大孔树脂适用于 W2 的分离纯化,优选的工艺稳定可行,可得到纯度相对较高的样品,为该成分的后续药理作用研究提供保障。

[关键词] 东北铁线莲; 齐墩果酸; 皂苷类; 大孔吸附树脂; 吸附量

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0014-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150014

Optimization of Purification Process of Anti-tumor Active Ingredient in *Clematis manshurica* by Macroporous Resin

JIN Chen, LUO Jing, ZHANG Wu-gang, LIAO Hui, FENG Yu-lin, YANG Shi-lin, ZHANG Ling*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a purification process for W2 [3-O- α -L-Rha- (1 \rightarrow 6) - β -D-Glu- (1 \rightarrow 4) - β -D-Glu- (1 \rightarrow 4) - β -D-Rib- (1 \rightarrow 3) - α -L-Rha- (1 \rightarrow 2) - α -L-Ara oleanolic saponin] in *Clematis manshurica* by macroporous resin. **Method:** The content of W2 was determined by HPLC, and it was used as index. Type of macroporous adsorption resin was screened by inspecting the adsorption and desorption ability of nine candidate macroporous resins. The static adsorption kinetics and dynamic gradient elution of the best type of macroporous resin was investigated, single factor tests were adopted to optimize purification process. **Result:** Optimum purification process was as following: the concentration of sample solution of 0.4 g·mL⁻¹, adsorbed by LX-17 macroporous resin column with a flow rate of 1.5 BV·h⁻¹, washed by 4 BV of water and 5 BV of 40% ethanol for removing impurity with a flow rate of 3 BV·h⁻¹, taking 1 BV of 80% ethanol to remove the solution in column, and eluted by 6 BV of 80% ethanol for enrichment of W2 with a flow rate of 1.5 BV·h⁻¹. Under these conditions, the purity of W2 in dry extract was 43.14%. **Conclusion:** LX-17 macroporous resin is suitable for separation and purification of W2. This optimized process is reasonable, stable and feasible, which can obtain W2 sample with high purity.

[Key words] *Clematis manshurica*; oleanolic acid; saponin; macroporous resin; adsorption capacity

[收稿日期] 20150909(003)

[基金项目] 江西中医药大学重点学科青年教师培养计划项目(2013jzdxk049)

[第一作者] 金晨, 硕士, 助教, 从事中药资源开发与利用研究, Tel:0791-87119027, E-mail: last59@ sina. com

[通讯作者] * 张凌, 教授, 从事药物成分分析研究, Tel:0791-87118731, E-mail: dw64810@ 163. com

东北铁线莲具有祛风湿、通经络的功效,可用于治疗风湿痹痛、肢体麻木、筋脉拘挛、屈伸不利,作为威灵仙的基原植物之一收载于《中国药典》2015 年版^[1],其主要药用部位是干燥根和根茎。近年来研究报道该植物中含有皂苷类、木脂素类、苷类、生物碱类、内酯及有机酸等成分^[2-6]。现代药理研究表明东北铁线莲具有抗肿瘤、抗菌消炎、利胆、抗利尿等作用^[7-10]。前期研究发现东北铁线莲提取物中 3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 6)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃核糖-(1 \rightarrow 3)- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖齐墩果酸苷(W2)对肝癌细胞 SMMC-7721 具有显著的抑制作用,并优选了 W2 的提取工艺^[11],但所得 W2 纯度不高(<10%,不满足药理实验对于样品纯度的要求)。故本实验拟通过对不同类型的 9 种大孔吸附树脂进行筛选,选择最适宜的大孔树脂对东北铁线莲提取物碱水解样品进行纯化,优选相关工艺参数,以制得纯度相对较高的 W2,为该成分的后续药理作用研究提供保障。

1 材料

LC-1100 型手动高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),ELSD 2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司),AUW-220D 型 1/10 万电子分析天平(日本岛津公司),Simplicity 型超纯水器(美国 Millipore 公司)。LX-11, LX-17, LX-28, HPD-400, HPD-826, NKA-9, XDA-8, AB-8, D101 型大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司);W2(自制,经蒸发光散射检测器检测,峰面积归一化法计算纯度 $\geq 95\%$),东北铁线莲药材(产地辽宁,购自安徽亳州中药材交易中心,经江西中医学院刘庆华副教授鉴定为毛茛科植物东北铁线莲 *Clematis manshurica* 的干燥根),水为超纯水,酒精为工业酒精(体积分数 95%),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品的提取和碱水解^[11] 药材加 12 倍量 30% 乙醇回流提取 2 次,每次 2.5 h,得提取液,配成 0.3 g·mL⁻¹ 的溶液,按每 10 g 生药的提取液加入 10 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL,混匀,85 °C 以上磁力搅拌加热反应 3 h,得东北铁线莲提取物碱水解液。

2.2 W2 的含量测定^[11] COSMOSIL C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m),柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μ L,流动相甲醇-水梯度洗脱(0~14 min,70% 甲醇;14~15 min,70%~85% 甲醇,15~30 min,85% 甲醇),蒸发光散射检测器(温

度 80 °C,气体流速 2.1 L·min⁻¹)。以峰面积为纵坐标,W2 进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 193.09X - 103.65 (R^2 = 0.9996)$,线性范围 0.648~9.184 μ g。

2.3 大孔树脂的预处理^[12] 选择 LX-11, LX-17, LX-28, HPD-400, HPD-826, NKA-9, XDA-8, AB-8, D101 型大孔吸附树脂,用 95% 乙醇在室温下密封浸泡 24 h,使其充分溶胀后,滤去表面漂浮物,倒干乙醇,加入 2% 氢氧化钠溶液浸泡 24 h,滤去表面漂浮物,用水洗至中性;用 2% 盐酸浸泡 24 h,滤去表面漂浮物,用水洗至中性;用乙醇浸泡 12 h,加水洗至无醇味,密封,备用。

2.4 大孔树脂含水量的测定 取各种候选大孔吸附树脂各少量,用干燥恒重法测定含水量,见表 1。

表 1 大孔吸附树脂性能参数及其对 W2 的静态吸附-洗脱试验考察
Table 1 Water content and performance parameters of macroporous resins and investigation of their static adsorption-elution test for W2

型号	类型	含水量 /%	比表面积 /m ² ·g ⁻¹	吸附能力 /mg·g ⁻¹	洗脱率 /%
LX-11	非极性	65.53	≥ 600	43.39	61.57
D-101	非极性	71.46	≥ 400	45.19	65.91
AB-8	弱极性	72.28	480~520	49.73	61.49
LX-28	中极性	58.79	≥ 500	39.61	72.54
HPD-400	中极性	72.11	500~550	32.03	49.11
LX-17	极性	69.74	≥ 460	76.69	74.69
XDA-8	极性	59.90	≥ 1200	44.18	65.22
NKA-9	极性	68.66	500~550	20.41	46.17
HPD-826	氢键	64.13	500~600	44.91	33.95

2.5 大孔吸附树脂筛选 精密称取已处理好的 9 种大孔树脂适量(各相当于干重 1 g),置于 9 个 250 mL 锥形瓶中,分别移取东北铁线莲提取物碱水解液 9 份,每份 50 mL(W2 质量浓度约 2.7 g·L⁻¹),加入对应的锥形瓶中,将大孔吸附树脂和碱水解液充分混合,置于水浴振荡器中振荡(25 °C,180 r·min⁻¹,下同)12 h 以达到吸附平衡;抽滤,抽去并收集未吸附液,加水清洗,将清洗后的大孔树脂移回锥形瓶;加入 95% 乙醇 50 mL,振荡 12 h 解吸附,抽滤,收集解吸附液($n = 3$),测定 W2 含量,评价大孔树脂吸附和洗脱能力,见表 1。

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V_i}{W}$$

$$D = \frac{C_d V_d}{(C_0 - C_e)V_i} \times 100\%$$

式中 Q_e 为吸附达平衡时大孔吸附树脂的吸附

能力, C_0 为碱水解液中 W2 的质量浓度, C_e 为未吸附液中 W2 的质量浓度, V_i 为初始溶液的体积, W 为干树脂质量, D 为洗脱率, C_d 为洗脱液中 W2 的质量浓度, V_d 为洗脱液的体积。结果表明 LX-17 型大孔树脂对 W2 具有较强的吸附能力和洗脱率。

2.6 LX-17 型大孔树脂的静态吸附动力学研究^[13-15] 准确称取已处理好的 LX-17 型大孔树脂(干重 1 g), 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入东北铁线莲提取物碱水解液 50 mL (W2 质量浓度约 $2.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 混合均匀后置于水浴振荡器中振荡, 于振荡过程 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 270, 360 min 时取样, 按 2.2 项下方法测定 W2 含量, 计算大孔树脂的吸附能力, 得吸附动力学曲线, 见图 1, 较符合二级吸附动力学公式 $t/Q_t = t/Q_e + 1/(Q_e^2 \times k_2)$, Q_t 表示 t 时间大孔树脂的吸附能力, t 表示吸附时间, k_2 为二级吸附动力学参数。计算 $k_2 = 0.103$, 饱和吸附量 $76.687 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

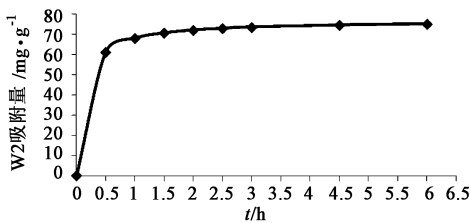


图 1 LX-17 型树脂对东北铁线莲提取物碱水解液的吸附动力学曲线

Fig. 1 Adsorption kinetics curves of LX-17 macroporous resin for alkaline hydrolysate of *Clematis manshurica* extract

2.7 纯化工艺考察

2.7.1 上样液质量浓度 取已预处理好的 LX-17 型大孔吸附树脂柱 5 根, 分别加入质量浓度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的上柱液(上柱液均为 10 g 生药的提取物碱水解液), 以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上柱预吸附, 上样流出液重吸附 1 次, 吸附完毕后静置一段时间, 加水 4 BV 洗至洗脱液呈无色, 加 95% 乙醇洗脱, 洗脱流速均为 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 95% 乙醇洗脱液, 计算洗脱液中 W2 的转移率分别为 56.50%, 60.27%, 66.31%, 70.51%, 61.55%。故选择上样液质量浓度 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7.2 吸附流速 取已预处理好的 LX-17 型大孔吸附树脂柱 3 根, 配制 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上柱液(上样液对应 10 g 生药的提取物碱水解液), 分别以 1.5, 3, 6 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速过大孔树脂柱吸附, 吸附完毕后静置一段时间, 加水 4 BV 洗至洗脱液呈无色, 加 95% 乙醇洗脱, 洗脱流速均为 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集乙醇洗脱液,

计算洗脱液中 W2 的转移率分别为 65.66%, 65.50%, 64.99%。结果表明吸附流速对结果的影响不是很大, 为了确保吸附完全, 在后期考察中吸附流速均选择 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$

2.7.3 泄漏曲线 取 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上柱液, 通过预处理好的 LX-17 型大孔树脂柱, 以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 分段收集流出液, 每 10 mL 收集 1 次, 按 2.2 项下方法测定流出液中 W2 的含量, 直至流出液的 W2 质量浓度基本与上样液一致。结果显示当流出液体积 $< 60 \text{ mL}$ 时, W2 基本被吸附, 流出液中 W2 转移率较小; 当流出液体积在 $60 \sim 120 \text{ mL}$ 时, 流出液中 W2 转移率迅速增大, 说明从第 6 份开始, W2 开始泄漏; 流出液体积 $> 120 \text{ mL}$ 时, 流出液中 W2 的转移率达最大, 基本接近 100%, 说明大孔吸附树脂达到最大吸附量。故确定上样量 50 mL。

2.7.4 梯度洗脱曲线 取 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液 50 mL, 通过已处理好的 LX-17 型大孔吸附树脂柱, 以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附; 吸附完毕加水 and 体积分数为 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 的乙醇依次洗脱, 每个梯度洗脱液用量均为 4 BV, 收集各段洗脱液, 每 1 BV 为 1 份, 计算各段洗脱液中 W2 的转移率, 见图 2。结果显示以 40% 乙醇洗脱时有极少量 W2 被洗脱, 从 60% 乙醇开始 W2 即被洗脱下来, 为了尽可能多地除杂并尽快富集 W2, 确定先加一定量水和 40% 乙醇除杂, 再加 80% 乙醇洗脱。

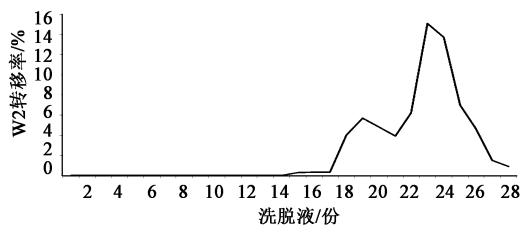


图 2 东北铁线莲提取物碱水解液的梯度洗脱曲线

Fig. 2 Gradient elution curve of alkaline hydrolysate of *Clematis manshurica* extract

2.7.5 除杂溶媒用量 取 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液 50 mL, 通过已处理好的 LX-17 型大孔树脂柱, 以 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速进行动态吸附; 吸附完毕后加水 4 BV 和 40% 乙醇 7 BV 除杂, 分段收集 40% 乙醇除杂液, 每 1 BV 为 1 份。将每段除杂液干燥至恒重, 结果显示每份除杂液的质量分别为 0.221, 0.176, 0.036, 0.026, 0.016, 0.009, 0.007 g, 故 40% 乙醇的用量控制在 5 BV。

2.7.6 洗脱溶媒用量 取 $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上样液 50 mL, 通过已处理好的 LX-17 型大孔树脂柱, 以 1.5

$BV \cdot h^{-1}$ 的流速进行动态吸附;吸附完毕后加水 4 BV 和 40% 乙醇 5 BV 除杂,加 80% 乙醇 10 BV 洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,计算每份洗脱液中 W2 的转移率分别为 0, 12.37%, 28.23%, 19.23%, 8.62%, 5.24%, 3.39%, 2.66%, 2.18%, 1.78%。为了尽可能多地富集 W2,确定先以 80% 乙醇 1 BV 转换柱内液体,再用 80% 乙醇 6 BV 洗脱富集 W2 的方案。

2.7.7 除杂流速和洗脱流速 取 $0.4 g \cdot mL^{-1}$ 上样液 50 mL,共 3 份,分别通过 3 根已处理好的 LX-17 型大孔树脂柱,按优选的工艺进行动态吸附和洗脱,除杂流速和洗脱流速均分别为 $1.5, 3, 6 BV \cdot h^{-1}$,结果显示除杂流速为 $1.5, 3, 6 BV \cdot h^{-1}$ 时,除杂液干重分别为 0.546, 0.554, 0.544 g;当洗脱流速为 $1.5, 3, 6 BV \cdot h^{-1}$ 时, W2 转移率分别为 91.00%, 83.96%, 80.91%。故确定除杂流速和洗脱流速分别为 $3, 1.5 BV \cdot h^{-1}$ 。

2.8 纯化工艺验证试验 取 $0.4 g \cdot mL^{-1}$ 上样液 50 mL,共 3 份,按优选的工艺条件进行纯化,计算 80% 乙醇洗脱液中 W2 的质量分别为 95.975, 94.903, 95.573 mg,平均转移率 85.52%。说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

恶性肿瘤是目前危害人类生命健康的严重疾病,利用化学合成药物治疗恶性肿瘤的方法虽治愈率较高,但常引起严重的副反应。近年来,运用中药提取物及其衍生物治疗恶性肿瘤已成为恶性肿瘤综合治疗中的有效手段,其中皂苷类被认为是中药治疗恶性肿瘤较理想的一类成分^[16]。在前期研究中,发现 W2 对肝癌细胞有显著的抑制作用,并建立了 W2 的提取工艺和碱水解工艺。为了得到纯度相对较高的 W2 用于其药理作用研究,本文采用大孔树脂对东北铁线莲提取物碱水解液中的 W2 进行分离和纯化。

不同类型的大孔树脂对物质的吸附能力不同,通过对 9 种不同类型的大孔树脂进行吸附能力筛选和吸附动力学考察,发现 LX-17 型大孔树脂对皂苷类成分 W2 具有优异的吸附能力,且其吸附符合二级动力学,采用单因素试验对工艺的各个主要参数进行优化。验证试验显示该工艺的纯化效果较好, W2 质量分数 43.14%,可有效分离和纯化目标成分 W2,可为后续药理试验研究提供较好的原料。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:250-251.
- [2] Shi S P, Jiang D, Dong C X, et al. Triterpene Saponins from *Clematis mandshurica* [J]. J Nat Prod, 2006, 69 (11):1591-1595.
- [3] Shi S P, Jiang D, Dong C X, et al. Lignans from the roots and rhizomes of *Clematis mandshurica* [J]. ChemInform, 2007, dio:10.1002/chin.200709202.
- [4] Shi S P, Jiang D, Dong C X, et al. New phenolic glycosides from *Clematis mandshurica* [J]. Helv Chim Acta, 2006, 89(5):1023-1029.
- [5] Shi S P, Tu P F, Dong C X, et al. Alkaloids from *Clematis manshurica* Rupr [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8(1/2):73-78.
- [6] Shi S P, Dong C X, Jiang D, et al. Macrocyclic glucosides from *Clematis mandshurica* and *Clematis hexapetala* [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 35(1):57-60.
- [7] 张昌浩,金光洙,郑艳. 东北铁线莲对小鼠肿瘤的抑制作用[J]. 延边大学医学学报, 2006, 29(2):95-97.
- [8] 宋志宏,赵玉英,段京莉,等. 铁线莲属植物的化学成分及药理作用研究概括[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2):66-71.
- [9] 陈飞雁,顾湘杰,钟明康,等. 威灵仙注射液对骨关节炎关节液与软骨白介素-1 水平的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(7):524-526.
- [10] 耿宝勤,雍定国,徐继红,等. 威灵仙治疗胆囊炎的实验研究[J]. 浙江医科大学学报, 1997, 26(1):13-16.
- [11] 金晨,翟兴英,李翔,等. 东北铁线莲中抗肿瘤活性成分的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):33-36.
- [12] 屠鹏飞,贾存勤,张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(4):22-28.
- [13] 孙健. 茶多酚的定性定量分析方法及大孔吸附树脂纯化工艺条件优化的研究[D]. 大连:大连理工大学, 2002.
- [14] 韩金玉,李海静,李岩,等. 大孔吸附树脂对银杏内酯和白果内酯吸附性能的研究[J]. 离子交换与吸附, 2000, 16(5):426-431.
- [15] 史作清,施荣富,范云鸽,等. 树脂吸附法在中草药有效成分提取中的应用[J]. 中草药, 2001, 32(7):660-662.
- [16] 张秀萍,孙达辰,肖洪彬. 辽东槲木叶总皂苷抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11):232-234.

[责任编辑 刘德文]