

大孔吸附树脂富集金银花中环烯醚萜苷类成分的工艺优选

张瑜^{1,2}, 杨健², 秦振娴¹, 齐梦蝶¹, 张权¹, 刘爽^{1,2}, 刘勇¹, 袁媛^{2*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选大孔吸附树脂分离纯化金银花中环烯醚萜苷类成分的工艺条件, 为该药材资源的充分利用与开发提供参考。方法: 采用 UPLC 对马钱苷酸、獐芽菜苷、断氧化马钱子苷和 7-表-马钱子苷进行定量分析, 流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长 236.5 nm , 进样量 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 单因素试验优选金银花中环烯醚萜苷类成分的纯化工艺条件。结果: 选择 H-103 型大孔树脂, 上样液质量浓度 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 吸附流速 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样量 2.5 BV , 吸附后加水 2.5 BV 和 30% 乙醇 3 BV 洗脱, 洗脱流速 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。总环烯醚萜苷的洗脱率达 90.0%, 浸膏中总环烯醚萜苷质量分数达 25.6%。结论: H-103 型大孔树脂对金银花中环烯醚萜苷类成分具有较好的分离和纯化效果, 工艺操作简单、稳定可行, 适用于工业化生产。

[关键词] 金银花; 环烯醚萜苷; 大孔树脂; 洗脱率; 吸附量; 獐芽菜苷

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0018-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240018

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0914.016.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:14

Optimization of Separation and Enrichment Process of Iridoid Glycosides from *Lonicerae Japonicae Flos* by Macroporous Resin

ZHANG Yu^{1,2}, YANG Jian², QIN Zhen-xian¹, QI Meng-die¹, ZHANG Quan¹,
LIU Shuang^{1,2}, LIU Yong¹, YUAN Yuan^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of iridoid glycosides from *Lonicerae Japonicae Flos* by macroporous resin. **Method:** The content of loganic acid, 7-epi-loganin, sweroside and secoxyloganin was determined by UPLC, static adsorption-elution test was adopted to screen type of macroporous resin, separation and purification process conditions of iridoid glycoside were optimized by single factor tests. **Result:** H-103 macroporous resin was selected, optimum technology was: sample solution concentration of $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, adsorption flow rate of $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, sample liquid volume of 2.5 BV , eluted by 2.5 BV of water and 3.0 BV of 30% ethanol at elution flow rate of $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. Under these conditions, elution rate and purity of iridoid glycosides were 90.0% and 25.6%, respectively. **Conclusion:** Iridoid glycosides from *Lonicerae Japonicae Flos* are purified effectively with H-103 macroporous resin, this optimized process is simple, stable and feasible.

[Key words] *Lonicerae Japonicae Flos*; iridoid glycosides; macroporous resin; elution rate; adsorption quantity; sweroside

[收稿日期] 20160112 (019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373959); 国家中医药行业科研专项(201407003)

[第一作者] 张瑜, 在读硕士, 从事中药新药物物质基础研究, Tel: 17801080778, E-mail: zhangyuddnh@163.com

[通讯作者] *袁媛, 副研究员, 从事中药功能基因组研究及中药分子鉴定研究, Tel: 010-64014411-2956, E-mail: y_yuan0732@163.com

金银花具有清热解毒、疏散风热的功效,常用于治疗痈肿疔疮、喉痹、温病发热等证,主要含有黄酮类、环烯醚萜苷类、挥发油等成分^[1]。其中环烯醚萜苷类成分具有显著的抗炎、抗病毒及抑制肿瘤细胞的活性等作用^[2]。大孔吸附树脂在天然产物的分离和纯化方面应用广泛,例如利用大孔树脂对吴茱萸、龙胆、栀子中环烯醚萜类成分进行分离和纯化,均取得了良好效果^[3-5],但采用该技术纯化金银花中环烯醚萜苷类成分的研究尚未见报道。本实验以金银花中含量最高的4种环烯醚萜苷类成分——马钱苷酸,7-表-马钱子苷,獐牙菜苷和断氧化马钱子苷为指标,利用大孔树脂对其进行分离和富集,采用UPLC测定树脂处理前后环烯醚萜苷类成分的含量,为该有效部位的应用和新产品开发提供参考。

1 材料

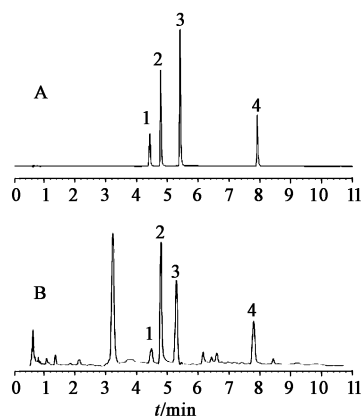
ACQUITY I-Class型超高效液相色谱仪(美国Waters公司),BSA224S型电子分析天平(德国Sartorius公司)。金银花药材购自云南昆明,经云南省农业科学院药用植物研究所刘大会研究员鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* 的干燥花蕾;LSA-21,LSA-30,LSA-40型大孔吸附树脂(西安蓝深交换吸附材料有限责任公司);HPD-100,HPD-300,HPD-400,HPD-600型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);D-101,AB-8,H-103,NKA-II型大孔吸附树脂(南开大学化工厂);YWD03D,YWD03F4,YWD07D,YWD09D型大孔吸附树脂(河北沧州远威化工有限公司);Diaion HP-10和HP-20型大孔吸附树脂(日本三菱公司),ME-1和ME-2型大孔树脂(天津欧瑞生物科技有限公司),XDA-1和XDA-16型大孔吸附树脂(西安蓝晓科技有限公司),马钱苷酸、獐牙菜苷、断氧化马钱子苷和7-表-马钱子苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号B20823-20140807, B21643-20140722, B30028-20140807, B20822-20140722),水为屈臣氏蒸馏水,甲醇、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 环烯醚萜苷类成分的含量测定^[6]

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 5%~14% B; 3~7 min, 14%~18% B; 7~11 min, 18%~23% B),流速0.3 mL·min⁻¹,柱温40℃,检测波长236.5 nm,进样量1 μL,见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取各对照品适



A. 对照品; B. 供试品; 1. 马钱苷酸; 2. 7-表-马钱子苷; 3. 獐牙菜苷; 4. 断氧化马钱子苷

图1 金银花 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of *Lonicerae Japonicae* Flos

量,分别加甲醇配成马钱苷酸,7-表-马钱子苷,獐牙菜苷和断氧化马钱子苷质量浓度分别为1.2, 2.9, 2.0, 1.5 g·L⁻¹的储备液。精密量取上述4种储备液各2.0 mL,置10 mL棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,得混合对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取2.1.2项下混合对照品溶液1, 2, 5, 8, 10, 15, 20 μL,按2.1.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得马钱苷酸,7-表-马钱子苷,獐牙菜苷和断氧化马钱子苷回归方程分别为 $Y = 1.06 \times 10^5 X - 3.02 \times 10^4$ ($r = 0.9997$), $Y = 2.04 \times 10^5 X + 1.49 \times 10^4$ ($r = 0.9998$), $Y = 2.16 \times 10^5 X - 1.31 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), $Y = 1.25 \times 10^5 X - 1.62 \times 10^4$ ($r = 0.999$),线性范围依次为0.24~4.8, 0.58~11.6, 0.40~8.0, 0.30~6.0 μg。

2.2 大孔树脂的预处理 大孔树脂加95%乙醇浸泡24 h以上,待充分溶胀后湿法装柱,用95%乙醇清洗至流出液加4倍量水后不出现浑浊为止,加水洗至无醇味,封存待用。

2.3 上样液的制备与测定^[6] 取金银花药材100 g,加16倍量60%乙醇超声提取2次,每次30 min,滤过,合并滤液,浓缩至无醇味,于3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液加水至1 L,得上样液。按2.1.1项下色谱条件测定,结果上样液中马钱苷酸、獐牙菜苷、断氧化马钱子苷和7-表-马钱子苷质量浓度分别为104.3, 495.2, 280.0, 833.6 mg·L⁻¹。

2.4 大孔树脂型号的选择

2.4.1 静态吸附试验 称取预处理好的D-101, AB-8, H-103等21种型号大孔树脂各5 g(湿重),分别置于50 mL具塞磨口锥形瓶中,精密加入上样液

20 mL, 置于 25 °C 恒温振荡器上振荡 24 h, 取上清液测定, 按 $(C_0 - C_1) \times V_0 / m$ 计算不同树脂的比吸附量, 见表 1。式中 C_0 为吸附前上样液中环烯醚萜苷质量浓度, C_1 吸附后样液中环烯醚萜苷质量浓度,

V_0 为上样液体积, m 为树脂用量。结果总环烯醚萜苷比吸附量较大的树脂分别为 D-101, H-103, NKA-II, ME-1, ME-2, XDA-1, YWD03D, YWD07D 和 YWD09D, 故选择这 9 种树脂进行洗脱率考察。

表 1 不同型号大孔树脂对环烯醚萜苷类成分的吸附-洗脱性能比较

Table 1 Comparison on adsorption and elution performance of different macroporous resin for iridoid glycosides in *Lonicerae Japonicae* Flos

树脂型号	马钱苷酸		7-表-马钱苷		獐牙菜苷		断氧化马钱苷	
	比吸附量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	洗脱率 /%	比吸附量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	洗脱率 /%	比吸附量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	洗脱率 /%	比吸附量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	洗脱率 /%
D-101	351.8	84.4	2 563.6	82.8	1 916.3	85.2	784.0	83.2
AB-8	348.3	-	2 136.7	-	1 879.1	-	733.1	-
H-103	404.8	91.2	3 252.8	89.3	1 928.3	91.0	1 086.1	89.9
NKA-II	400.4	89.6	3 224.0	88.3	1 949.6	90.6	1 076.7	87.9
ME-1	401.6	90.9	3 176.3	88.3	1 911.3	90.1	1 008.4	90.0
ME-2	357.5	88.6	2 535.6	88.9	1 965.9	87.7	799.2	88.1
XDA-1	361.9	85.8	2 772.4	83.5	1 953.9	85.1	830.3	82.8
XDA-16	336.8	-	1 868.0	-	1 750.9	-	613.7	-
LSA-21	341.3	-	2 386.8	-	1 649.3	-	783.5	-
LSA-30	343.2	-	2 469.3	-	1 722.2	-	785.8	-
LSA-40	332.6	-	1 613.9	-	1 765.5	-	595.5	-
HP-10	341.6	-	2 385.2	-	1 698.4	-	758.1	-
HP-20	347.1	-	2 503.2	-	1 705.9	-	828.9	-
HPD-100	355.9	-	2 216.0	-	1 872.1	-	789.1	-
HPD-300	355.1	-	2 138.3	-	1 866.0	-	767.9	-
HPD-400	341.9	-	1 961.7	-	1 739.0	-	669.6	-
HPD-600	339.3	-	1 308.0	-	1 616.4	-	478.0	-
YWD03D	362.5	83.6	2 686.3	81.3	1 929.6	82.6	832.6	82.8
YWD03F4	354.5	-	2 185.4	-	1 940.6	-	827.3	-
YWD07D	362.4	86.5	2 804.4	85.7	1 937.1	85.9	858.1	85.5
YWD09D	362.5	86.3	2 672.3	83.9	1 877.2	86.2	820.8	85.3

2.4.2 静态吸附-洗脱性能试验 分别称取 D-101, H-103, NKA-II, ME-1, ME-2, XDA-1, YWD03D, YWD07D 和 YWD09D 树脂各 5 g (湿重), 置于 50 mL 具塞磨口锥形瓶中, 精密加入金银花提取液 20 mL, 置 25 °C 恒温振荡器上振荡 24 h, 将吸附饱和的大孔树脂装入色谱柱 (28 mm × 400 mm, 下同) 中, 加 70% 乙醇 50 mL 进行洗脱, 测定样品溶液和乙醇洗脱液中各环烯醚萜苷类成分的含量, 计算洗脱率。

$$\text{洗脱率} = (C_2 \times V_2) / (C_0 \times V_0 - C_1 \times V_1) \times 100\%$$

式中 C_0 为上样液中各成分的质量浓度, C_1 为洗脱前样液中各成分质量浓度, C_2 为 70% 乙醇洗脱液中各成分质量浓度, V_0 为上样液体积, V_1 为洗脱前样液体积, V_2 为 70% 乙醇洗脱液体积。结果表明 H-103, NKA-II 和 ME-1 型大孔树脂的比吸附量和洗脱率相当, 相较其他型号的树脂均具有明显优势。H-103 型大孔树脂的比吸附量和洗脱率略优, 且价格较另外 2 型树脂便宜, 故选择 H-103 型大孔树脂。

2.5 上样条件考察

2.5.1 上样液质量浓度 准确称取预处理好的 H-103 型大孔树脂 20 g, 湿法装柱 (1 BV = 30 mL, 下同), 按 2.3 项下方法制备 4 份质量浓度 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (按原药材计, 下同) 的样品溶液, 每份 30 mL, 后 3 份分别稀释至 40, 60, 120 mL, 过柱, 流速 $2.0 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 收集流出液, 计算吸附率。

$$\text{吸附率} = [(C_0 - C_1) \times V_0] / (C_0 \times V_0) \times 100\%$$

式中 C_0 为上样液中各成分质量浓度, C_1 为吸附后样液中各成分质量浓度, V_0 为上样液体积。结果发现不同质量浓度上样液的吸附率分别为 86.4%, 88.9%, 91.8% 和 89.2%。上样液质量浓度过大, 物质扩散速度降低, 树脂对目标物吸附的选择性下降, 导致吸附率下降, 故选择上样液质量浓度 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5.2 上样量 准确称取预处理好的 H-103 型大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 取 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 金银花液以 $2.0 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速上样, 收集流出液 (每 0.5 BV 为 1 份), 测定环烯醚萜苷含量, 计算第 3, 4, 5, 6 份流

出液吸附率分别为 90.8%, 89.7%, 85.4%, 69.9%, 表明上样量达 3 BV 时开始明显泄漏, 综合实验效率考虑, 选择上样量 2.5 BV, 即 1 g 树脂对应 0.375 g 金银花药材。

2.5.3 吸附流速 准确称取 4 份预处理好的 H-103 型大孔树脂, 每份 20 g, 分别湿法装柱。取 100 g·L⁻¹ 金银花样液 2.5 BV, 分别以 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂柱, 收集流出液, 检测流出液中环烯醚萜苷的含量, 计算吸附率分别为 93.2%, 92.5%, 90.1%, 88.5%, 综合考虑, 吸附流速以 2.0 BV·h⁻¹ 为宜。

2.6 洗脱条件考察

2.6.1 洗脱剂浓度 准确称取 5 份预处理好的 H-103 型大孔树脂, 每份 20 g, 分别湿法装柱。取 100 g·L⁻¹ 金银花样液 2.5 BV 以 2.0 BV·h⁻¹ 的流速上样。吸附饱和后, 加水 2.5 BV 以 2.0 BV·h⁻¹ 流速洗脱(除去上样液中水溶性糖和蛋白质等), 分别用体积分数为 10%, 20%, 30%, 50% 和 70% 的乙醇溶液各 4 BV 洗脱, 洗脱流速 2.0 BV·h⁻¹, 分别收集洗脱液, 计算不同体积分数乙醇洗脱的总环烯醚萜苷质量分别为 29.6, 42.6, 25.9, 3.1, 1.2 mg, 占总固形物的质量分数分别为 22.0%, 23.6%, 25.2%, 17.8%, 16.5%。30% 乙醇洗脱液中总环烯醚萜苷质量占全部醇洗脱液的 95.8%, 纯度达 24.5%。故选择 30% 乙醇为洗脱溶剂。

2.6.2 洗脱剂用量 准确称取预处理好的 H-103 型大孔树脂 20 g, 湿法装柱, 取 100 g·L⁻¹ 金银花样液按优选的条件进行吸附。吸附饱和后, 加水 2.5 BV 以 2.0 BV·h⁻¹ 流速洗脱, 弃去水液; 加 30% 乙醇洗脱, 洗脱流速 2.0 BV·h⁻¹, 收集洗脱液(每 0.5 BV 为 1 份), 计算各流分中总环烯醚萜苷累积质量分别为 13.2, 35.5, 66.2, 83.5, 91.9, 96.5, 97.4, 98.2 mg, 说明用 30% 乙醇 3 BV 基本可洗脱完全。

2.6.3 洗脱速度 准确称取 4 份预处理好的 H-103 型大孔树脂, 每份 20 g, 分别湿法装柱。取 100 g·L⁻¹ 金银花样液 2.5 BV 按优选条件上样吸附。吸附饱和后, 加水 2.5 BV 洗脱, 弃去水液; 加 30% 乙醇 3 BV 分别以 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 BV·h⁻¹ 的流速洗脱, 收集洗脱液, 计算总环烯醚萜苷洗脱率分别为 90.5%, 90.2%, 88.7%, 84.5%。故选择洗脱流速 2.0 BV·h⁻¹。

2.7 验证试验 准确称取预处理好的 H-103 型大孔树脂 100 g, 湿法装柱, 取 100 g·L⁻¹ 金银花样液 225 mL, 按优选的工艺条件进行吸附和洗脱, 收集

30% 乙醇洗脱液, 测定总环烯醚萜苷的含量。结果表明洗脱率达 90.0%, 浸膏得量 384.8 mg, 浸膏中总环烯醚萜苷质量分数达 25.6%。

3 讨论

作为常用大宗药材, 金银花化学成分及药理活性研究主要集中在绿原酸及黄酮类成分, 而环烯醚萜苷作为金银花中重要的水溶性成分, 其研究报道则略显单薄。金银花中环烯醚萜苷类成分马钱苷酸、断氧化马钱子苷和 7-表-马钱子苷具有抗炎作用^[7], 獐牙菜苷具有抗菌和抗氧化作用^[8]; 这 4 种环烯醚萜苷类成分约占金银花总环烯醚萜苷的 80% 以上^[9]。故本研究以这 4 种成分的含量为指标, 采用 UPLC 测定树脂处理前后环烯醚萜苷类成分的含量, 能够准确、科学地反映金银花中该类成分在大孔吸附树脂上的吸附与洗脱特点; 相对 HPLC 亦大大缩短了检测时间。结果表明 H-103 型大孔树脂对金银花中环烯醚萜苷类成分具有较好的吸附和洗脱能力, 并确定了最佳工艺参数。该工艺稳定、可行, 成本较低廉, 可为金银花资源的深度开发与利用提供参考。

[参考文献]

- [1] 夏远, 李弟灶, 裴振昭, 等. 金银花化学成分研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 26-32.
- [2] 丁霞, 余宗亮, 杜伟峰, 等. SP825-大孔树脂富集山茱萸环烯醚萜苷的工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(1): 53-56.
- [3] 李姝影, 李晓菲, 陈飞, 等. 吴茱萸碱的大孔树脂分离纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 27-29.
- [4] 冯波, 朱鹤云, 关皎, 等. 龙胆中环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 20-23.
- [5] 杨军宣, 赵成城, 刘昊, 等. 梔子环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1756-1759.
- [6] 张轲, 张东, 梁彩霞, 等. 白花蛇舌草中环烯醚萜苷类成分的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 38-40.
- [7] Xiong J H, Li S C, Wang W J, et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves[J]. Food Chem, 2013, 138(1): 327-333.
- [8] Wu M, Wu P, Liu M F, et al. Iridoids from *Gentiana loureirii*[J]. Phytochemistry, 2009, 70(6): 746-750.
- [9] Hang X, Pan H, Li M, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 1-21.

[责任编辑 刘德文]