

# 叠鞘石斛联苳类化合物的大孔树脂纯化工艺优选 及抗氧化活性考察

贾芳,夏厚林\*,黄萍,黄小燕,宁梓君,唐建军,张廷模

(成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室,成都 611137)

**[摘要]** 目的:优选叠鞘石斛联苳类化合物的大孔树脂纯化工艺条件并考察其体外抗氧化活性。方法:以静态饱和吸附量和洗脱率为指标,通过静态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号。采用单因素试验考察上样液质量浓度、上样量、乙醇体积分数、洗脱剂用量、上样流速及洗脱流速对纯化工艺的影响,通过体外抗氧化试验考察联苳类化合物的体外抗氧化能力。结果:HPD-300型树脂纯化联苳类化合物的效果最好,其最佳纯化工艺条件为上样液质量浓度 $9.04\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,上样量1.25 BV,上样流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,加水和70%乙醇各5 BV以 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速洗脱。纯化后联苳类化合物纯度达67.07%,较纯化前提高了4.25倍。联苳类化合物的纯化和粗提物对超氧阴离子自由基的抗氧化活性以半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )表示分别为 $0.408, 0.985\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对羟自由基的 $\text{IC}_{50}$ 依次为 $7.856, 7.827\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论:HPD-300型大孔吸附树脂对叠鞘石斛联苳类化合物的纯化效果较好,纯化物的体外抗氧化能力有所提高。

**[关键词]** 叠鞘石斛;联苳类化合物;大孔吸附树脂;纯化工艺;抗氧化活性

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0025-04

**[doi]** 10.11653/syjf2014040025

## Optimization of Purification Technology for Bibenzyl Compounds from *Dendrobium aurantiacum* by Macroporous Resin and Investigation of its Antioxidant Activity

JIA Fang, XIA Hou-lin\*, HUANG Ping, HUANG Xiao-yan, NING Zi-jun, TANG Jian-jun, ZHANG Ting-mo  
(Key Laboratory of Standardization for Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Chinese Pharmacy,  
Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize purification process of bibenzyl compounds from *Dendrobium aurantiacum* with macroporous resin and investigate its antioxidant ability before and after being purified. **Method:** With static adsorption capacity and elution ratio as indexes, five types of macroporous resin (X-5, HPD-300, D-101, AB-8 and S-8) were used to purify bibenzyl compounds by static adsorption-elution test. Single factor tests were adopted to investigate effects of the concentration of sample solution, the largest sample volume, ethanol concentration and other factors on purification process of bibenzyl compounds, and antioxidant ability of bibenzyl compounds was determined. **Result:** HPD-300 type of macroporous resin was selected, its optimum purification process was as follows: the concentration of sample solution  $9.04\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , the largest sample volume of 1.25 BV, sampling flow rate at  $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , separately eluted with 5 BV water and 70% ethanol at flow rate of  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Under these conditions, purity of bibenzyl compounds could reach 67.07%, which increased 4.25 times by compared with unpurified.  $\text{IC}_{50}$  of refined and crude bibenzyl compounds for superoxide anion radical were

**[收稿日期]** 20130717(006)

**[基金项目]** 国家科技部“十二五”支撑计划项目(2011BAI13B02-8)

**[第一作者]** 贾芳,在读硕士,从事药物分析研究, Tel:13568905797, E-mail: jiafang327@163.com

**[通讯作者]** \*夏厚林,教授,从事中药质量标准及物质基础研究, E-mail: XHL64@163.com

0.408 and 0.985 g · L<sup>-1</sup>, but they were 7.856 and 7.827 g · L<sup>-1</sup> for hydroxyl radical, respectively. **Conclusion:** HPD-300 type of macroporous resin had an excellent purification effect for bibenzyl compounds of *D. aurantiacum*, its purity and antioxidant ability were improved remarkably.

**[Key words]** *Dendrobium aurantiacum*; bibenzyl compounds; macroporous resin; purification process; antioxidant activity

叠鞘石斛为四川“嘉定石斛”的主要品种,其干燥茎又名“黄草”<sup>[1]</sup>,味甘,微寒,归胃、肾经,具有益胃生津、滋阴清热的作用<sup>[2]</sup>,临床被广泛用于治疗慢性萎缩性胃炎及降血糖、抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等症,这些疾病的产生在很大程度上均与体内活性氧的代谢失调有关<sup>[3]</sup>。叠鞘石斛主要含有生物碱类、联苳类、菲类、氨基酸、倍半萜类、多糖类等化学成分。联苳类为石斛的生物活性成分之一,具有抗肿瘤、抗氧化、抗血管新生、抑制 NO 生成、抗诱变活性等生物活性<sup>[4]</sup>,可应用于抗氧化性药物新制剂的开发<sup>[5]</sup>。本实验采用大孔吸附树脂法纯化叠鞘石斛联苳类化合物<sup>[6]</sup>,考察其抗氧化活性,并对纯化前后体外抗氧化能力进行比较,为叠鞘石斛联苳类化合物的研究开发提供参考。

## 1 材料

UV-1100 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BSA124 S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),PHB-8 型 pH 计(上海隆拓仪器设备有限公司),VARIOSKAN FLASH 2.4.3 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

X-5,HPD-300,D-101,AB-8,S-8 型大孔树脂(天津海光化工有限公司),石斛酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111875-201202),石斛(四川万安石斛产业开发有限公司提供,经成都中医药大学药用植物教研室卢先明教授鉴定为兰科植物叠鞘石斛 *Dendrobium aurantiacum* var. *Denneanum* 的干燥茎),三羟甲基氨基甲烷(Tris,天津市博迪化工有限公司),硫酸亚铁(重庆茂业化学试剂有限公司),水为离子交换蒸馏水,其他试剂均为国产分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 联苳类化合物的粗提取** 称取叠鞘石斛药材粉末(过 50 目筛)适量,加 12 倍量 70% 乙醇于 85 °C 水浴回流提取 3 次,每次 2 h,过滤,合并 3 次滤液,旋转蒸发浓缩至无醇味,加水稀释至生药质量浓度 1.0 g · mL<sup>-1</sup>,即得。

**2.2 对照品溶液的配制** 精密称取石斛酚对照品适量,置 5 mL 量瓶中,用甲醇制成 0.976 g · L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

## 2.3 联苳类化合物的含量测定

**2.3.1 检测波长的确定** 精密量取对照品溶液和供试品溶液分别置于 10 mL 量瓶中,参照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 VA)<sup>[7]</sup>,在 200 ~ 600 nm 进行扫描,结果表明二者均在 280 nm 处有最大吸收峰。

**2.3.2 标准曲线的制备** 分别量取对照品溶液 0.025,0.05,0.1,0.15,0.2,0.25,0.3 mL 置于 5 mL 量瓶中,加 70% 乙醇溶液溶解并定容至刻度,摇匀,以试剂空白作参比,于 280 nm 处测定吸光度(A),以 A 为横坐标,质量浓度为纵坐标,得回归方程  $A = 15.511C + 0.0037 (R^2 = 0.9996)$ 。取联苳类化合物粗提液,按上述方法测定 A,计算联苳类化合物质量分数 2.46%。

## 2.4 大孔树脂纯化工艺优选

**2.4.1 大孔树脂预处理** 用 95% 乙醇浸泡 24 h,用 95% 乙醇洗至流出液加水不显浑浊为止,于乙醇中储存备用。

**2.4.2 大孔树脂的筛选** 分别称取预处理好的 X-5,HPD-300,D-101,AB-8,S-8 型大孔树脂约 2 g,分别置于 150 mL 具塞锥形瓶中,各加入 2.15 g · L<sup>-1</sup> 的提取液 100 mL,室温静置 24 h,期间适当振摇,使其达到饱和吸附,过滤,测定滤液中联苳类化合物含量,计算饱和吸附率分别为 66.56,59.16,57.21,54.81,47.86 mg · g<sup>-1</sup>。滤出各型号吸附饱和的大孔树脂,吸干表面水分,加入 95% 乙醇 100 mL,室温静置 24 h,期间适当振摇,过滤,测定滤液中联苳类化合物含量,计算洗脱率依次为 90.90%,94.06%,83.46%,84.74%,84.62%。综合生产成本考虑,选择 HPD-300 型树脂。

$$\text{饱和吸附率} = (C_{\text{吸附前}} - C_{\text{吸附后}}) \times V_{\text{药液}} / m_{\text{树脂}};$$
$$\text{洗脱率} = (V_{\text{洗脱液}} \times C_{\text{洗脱液}}) / (m_{\text{树脂}} \times \text{饱和吸附率})$$

**2.4.3 大孔树脂静态吸附动力学特性试验** 称取处理好的 HPD-300 型树脂约 2 g,装入 150 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 6.78 g · L<sup>-1</sup> 提取液 100 mL,室温静置,适当振摇,以树脂与样品溶液接触时为 0 时刻,在 7 h 内每隔 1 h 取药液 2 mL,测定联苳类化合物含量,绘制静态吸附动力学曲线,图 1 结果显示

HPD-300 型大孔吸附树脂对联苳类化合物的吸附为快速平衡型,起始阶段的联苳类化合物质量浓度较大,在 1 h 后基本达到平衡,表明 HPD-300 型大孔树脂对联苳类化合物具有良好的吸附动力学特性。

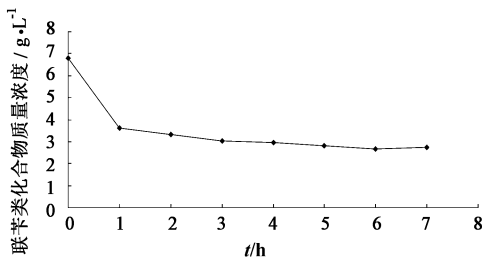


图1 HPD-300 型大孔树脂对联苳类化合物的静态吸附动力学曲线

#### 2.4.4 大孔树脂动态吸附及洗脱试验

**2.4.4.1 上样液质量浓度考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔树脂约 2 g, 共 5 份, 分别湿法装于相同规格(1.6 cm × 20 cm)树脂柱中, 取叠鞘石斛提取液 25 mL, 共 5 份, 分别用水稀释至生药质量浓度 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 g·mL<sup>-1</sup>, 以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的流速上柱进行动态吸附, 加水 2.5 BV (1 BV = 20 mL) 洗涤, 继用 95% 乙醇 5 BV 洗脱, 收集乙醇洗脱液, 测定指标成分含量, 结果联苳类化合物质量依次为 93.47, 141.46, 156.46, 199.17, 192.32 mg, 计算转移率分别为 55.16%, 62.61%, 46.17%, 44.03%, 34.05%, 考虑到上样液质量浓度过高时易发生絮凝和沉淀致使树脂污染和堵塞, 故选择上样液质量浓度 0.4 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.4.4.2 上样量考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔吸附树脂约 2 g, 湿法装柱, 取 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 上样液 5 BV 以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的流速通过树脂柱, 分段收集残留液, 每 0.5 BV 收集 1 次, 测定每次收集液中联苳类化合物含量。图 2 显示流出液中联苳类化合物的含量随上样量增加而增加, 上样量在 1 BV 时, 联苳类化合物开始泄漏, 1.5 BV 时达饱和, 故选择上样量 1.5 BV (联苳类化合物动态吸附容量约 47.964 mg·g<sup>-1</sup>)。

**2.4.4.3 乙醇体积分数考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔吸附树脂约 5 g, 湿法装柱, 取 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 上样液 1.25 BV, 以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的流速通过树脂柱, 收集残留液, 继用水和不同体积分数乙醇溶液各 5 BV 洗涤, 收集洗脱液, 每 1.25 BV 为 1 份, 测定不同洗脱液中联苳类化合物含量, 结果见图 3。显示 30% 乙醇和 50% 乙醇洗脱部位为联苳类化合物主要存在部位, 70% 乙醇部位亦存在少量联苳类

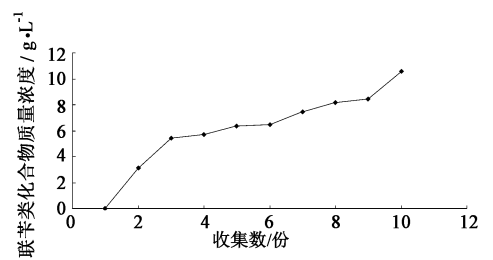


图2 HPD-300 型树脂对联苳类化合物的动态吸附泄漏曲线

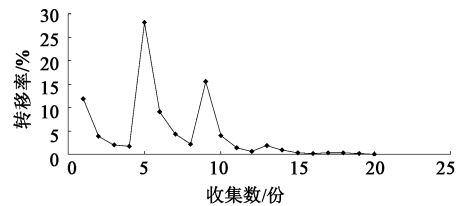


图3 联苳类化合物大孔树脂纯化工艺中转移率-收集份数曲线

化合物, 综合考虑, 确定选用 70% 乙醇作为洗脱溶剂; 水洗脱部位虽有少量联苳类化合物, 但大部分为杂质, 故采用水洗除杂。

**2.4.4.4 洗脱剂用量考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔吸附树脂约 5 g, 湿法装柱, 按 2.4.4.3 项下方法过柱, 收集残留液, 加水 5 BV 洗涤, 收集洗脱液, 继用 70% 乙醇 6 BV 洗涤, 收集洗脱液, 每 1 BV 收集 1 份, 测定醇洗液中联苳类化合物含量, 计算转移率依次为 47.35%, 2.24%, 0.56%, 0.23%, 0.15%, 0.00%。结果表明随 70% 乙醇用量的增加, 联苳类化合物含量不断增加, 但转移率却降低, 即用量至 100 mL 时联苳类化合物已基本被洗脱, 故确定 70% 乙醇用量 5 BV。

**2.4.4.5 上样流速考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔吸附树脂约 2 g, 湿法装柱, 取 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 上样液 25 mL, 共 3 份, 分别以 0.5, 1.0, 1.5 mL·min<sup>-1</sup> 的流速过柱, 收集残留液, 加水 2.5 BV 洗涤, 继用 70% 乙醇 5 BV 洗脱, 收集乙醇洗脱液, 测定联苳类化合物含量, 计算吸附量分别为 185.12, 132.23, 107.61 mg, 转移率依次为 81.93%, 58.53%, 47.63%, 故选择上样流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.4.4.6 洗脱流速考察** 取处理好的 HPD-300 型大孔吸附树脂约 5 g, 湿法装柱, 取 0.4 g·mL<sup>-1</sup> 上样液 25 mL 以 0.5 mL·min<sup>-1</sup> 的流速过柱, 收集残留液, 加水和 70% 乙醇各 5 BV 洗脱, 洗脱流速分别为 0.5, 1.0, 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 收集乙醇洗脱液, 测定联苳类化合物含量, 计算洗脱率分别为 73.62%, 79.50%, 80.82%, 故选用洗脱流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

## 2.5 抗氧化活性试验

**2.5.1 超氧阴离子自由基清除作用**<sup>[8-9]</sup> 取 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 225 μL, 置于 25 °C 水浴中预热 30 min, 分别加入样品溶液 50 μL 和在 25 °C 预热过的 9 mmol·L<sup>-1</sup> 邻苯三酚溶液 10 μL, 混匀, 振荡使之充分反应 5 min 后, 加 12 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶液 2.5 μL 终止反应, 于 299 nm 处测定吸光度(A<sub>1</sub>), 每组平行设 4 个复孔; 模型对照组(A<sub>0</sub>)用水 50 μL 代替样品溶液; 向 0.05 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液 225 μL 中加入样品溶液 50 μL, 充分混匀后加水 10 μL, 作为样品参比组(A<sub>1</sub>); 空白对照组(A<sub>2</sub>)用水 60 μL 代替样品溶液和邻苯三酚溶液, 计算抗氧化剂的清除率。结果表明联苳类化合物粗提物(0.49, 0.74, 0.98, 1.23, 2.46 g·L<sup>-1</sup>)和纯化物(0.40, 0.60, 0.80, 1.00, 2.00 g·L<sup>-1</sup>)均对超氧阴离子的生成具有抑制作用, 二者相应质量浓度的清除率依次为 34.16%, 44.75%, 48.74%, 80.71%, 87.05% 和 50.78%, 58.38%, 69.68%, 79.70%, 82.41%; 纯化物的清除作用较粗提物强, 二者 IC<sub>50</sub>分别为 0.408, 0.985 g·L<sup>-1</sup>。

$$\text{抑制率} = [A_0 - (A_1 - A_1) + A_2] / A_0 \times 100\%$$

**2.5.2 羟自由基清除作用** 参照文献[10]的方法进行试验, 结果发现粗提物(1.23, 2.46, 3.69, 4.91, 7.37 g·L<sup>-1</sup>)和纯化物(1.00, 1.99, 2.98, 3.98, 5.96 g·L<sup>-1</sup>)均对羟自由基具有清除作用(清除率依次为 8.00%, 8.98%, 14.74%, 17.93, 49.84% 和 9.79%, 13.22%, 14.74%, 21.59%, 36.77%), 随剂量的增加而增强, 二者的 IC<sub>50</sub>分别为 7.827, 7.856 g·L<sup>-1</sup>, 无明显差异。

## 3 讨论

通过静态-洗脱试验对 5 种树脂进行筛选, 确定 HPD-300 型树脂对叠鞘石斛联苳类化合物具有较好的吸附和洗脱性能, 且具有良好的吸附动力学特性, 故选用 HPD-300 型树脂。经大孔树脂纯化后, 联苳类化合物纯度达 67.07%, 比纯化前提高了 4.25 倍。

邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化反应, 产生稳定浓度的超氧阴离子自由基与中间物, 中间物又与超氧阴离子自由基反应, 得到一种带有颜色的中间产物<sup>[9]</sup>, 该产物在 299 nm 处有紫外吸收; 当加入抗氧化剂后, 超氧阴离子自由基的生成受到抑制, 邻苯三酚的自氧化反映受阻, 通过溶液在 299 nm 处

A 的变化即可反映抗氧化剂的清除能力。在 Fenton 反应体系中<sup>[11]</sup>, Fe<sup>2+</sup> 与邻二氮菲生成红色配合物, 该红色配合物在 536 nm 处有最大吸收; Fenton 反应产生的羟自由基氧化 Fe<sup>2+</sup>-邻二氮菲为 Fe<sup>3+</sup>-邻二氮菲, 使最大吸收波长处的 A 强烈减小甚至消失; 当体系中加入抗氧化剂后, 抗氧化剂与羟自由基作用, 减弱了羟自由基对 Fe<sup>2+</sup>-邻二氮菲的氧化作用, 从而减弱最大吸收波长处 A, 通过 A 变化即可反映抗氧化剂的清除能力。试验表明叠鞘石斛联苳类化合物对超氧阴离子、羟自由基均具有一定的清除作用, 且其纯化物的清除作用明显强于粗提物。

## [参考文献]

- [1] 包雪声, 顺庆生, 陈立钻. 中国药用石斛形色图谱 [M]. 上海: 上海医科大学出版社、复旦大学出版社, 2001: 65.
- [2] 江苏省药物检验所. 石斛药材质量标准(草案) [S]. 南京: 江苏教育出版社, 1998.
- [3] 刘春荣, 潘小炎. 石斛临床与药理研究近况 [J]. 广西中医药, 2002, 25(2): 6.
- [4] 魏小勇, 龙艳, 詹宇坚, 等. 金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22(2): 27.
- [5] 周向军, 高义霞, 袁毅君, 等. 乌龙茶茶褐素提取工艺的优化及抗氧化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 36.
- [6] 王怡薇, 梁日欣, 杨滨, 等. 茶叶、槐米、金荞麦、红花醇提物的抗氧化活性的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 58.
- [7] 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, 2010: 附录 30.
- [8] 赵芳, 梁慧, 程慧, 等. 大黄酸金属配合物的合成、表征及抗氧化性活性研究 [J]. 化学学报, 2011, 69(8): 925.
- [9] 郭雪峰, 岳永德, 汤峰, 等. 用清除超氧阴离子自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(8): 1823.
- [10] 刘婷, 匡文波, 王婷, 等. 水蒸气蒸馏和超临界萃取薰衣草精油抗氧化作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3035.
- [11] 郭雪峰, 岳永德, 孟志芬, 等. 用清除羟自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力 [J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(2): 508.

[责任编辑 仝燕]