

基于指纹图谱考察不同型号大孔树脂 对莱菔子水提液的纯化效果

朱立俏, 盛华刚, 周洪雷*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**考察不同型号大孔吸附树脂对莱菔子水提液的纯化效果。**方法:**采用 HPLC 测定芥子碱硫氰酸盐含量, 流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B)进行梯度洗脱(0~15 min, 5%~10% A; 15~17 min, 10%~12.5% A; 17~27 min, 12.5%~14% A; 27~55 min, 14%~25% A; 55~57 min, 25%~70% A; 57~70 min, 70%~100% A), 检测波长 225 nm。以芥子碱硫氰酸盐洗脱率和 HPLC 指纹图谱共有峰的总有效成分洗脱率为指标, 比较各型号树脂纯化效果, 筛选最佳型号大孔树脂。**结果:**各树脂对芥子碱硫氰酸盐洗脱率的影响顺序为 AB-8 > NKA-9 > HPD100C > HPD400 > X-5 > HPD750 > HPD722 > D101 > DM130, 对总有效成分洗脱率的影响顺序则为 HPD400 > HPD100C > HPD722 > AB-8 > NKA-9 > HPD750 > DM-130 > D101 > X-5。AB-8 型树脂对芥子碱硫氰酸盐的洗脱率达 96.39%, 对总有效成分的洗脱率 70.03%。**结论:**采用 AB-8 型大孔吸附树脂纯化莱菔子水提取液有效成分是可行的。

[关键词] 莱菔子; 大孔吸附树脂; 指纹图谱; 纯化工艺; 芥子碱硫氰酸盐; 相似度

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0021-04

[doi] 10.11653/syfj2013240021

Investigation of Purification Effect of Different Types of Macroporous Resin on Water Extract of Raphani Semen Based on HPLC Fingerprint

ZHU Li-qiao, SHENG Hua-gang, ZHOU Hong-lei*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate purification effect of different types of macroporous resin on water extract of Raphani Semen. **Method:** The content of sinapine thiocyanate was determined by HPLC, mobile phase of acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid (B) using a gradient elution program (0-15 min, 5% -10% A; 15-17 min, 10% -12.5% A; 17-27 min, 12.5% -14% A; 27-55 min, 14% -25% A; 55-57 min, 25% -70% A; 57-70 min, 70% ~100% A), detection wavelength 225 nm. With elution rate of sinapine thiocyanate and elution rate of total active ingredients in HPLC fingerprint common peaks as indexes, optimum macroporous resin was screened by comparing purification effect of each model of resin. **Result:** Effect of each resin on elution rate of sinapine thiocyanate was in order of AB-8 > NKA-9 > HPD100C > HPD400 > X-5 > HPD750 > HPD722 > D101 > DM130, but influencing sequence of elution rate of total active ingredients was HPD400 > HPD100C > HPD722 > AB-8 > NKA-9 > HPD750 > DM-130 > D101 > X-5. Elution rates of sinapine thiocyanate and total active ingredients by AB-8 resin were 96.39% and 70.03%, respectively. **Conclusion:** Process of applying AB-8 resin to purity effective constituents from water extract of Raphani Semen was feasible.

[Key words] Raphani Semen; macroporous resin; fingerprint; purification technology; sinapine thiocyanate; similarity

[收稿日期] 20130519(004)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省高等学校科技计划项目(J105LL05)

[第一作者] 朱立俏, 硕士, 讲师, 从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究, Tel: 0531-89628590, E-mail: zliqiao@163.com

[通讯作者] * 周洪雷, 博士, 教授, 从事中药及天然药物有效成分及质量控制研究, Tel: 0531-89628081, E-mail: hongleizhou@yahoo.com.cn

莱菔子性辛,味甘、平,归肺、脾、胃经,具有消食除胀、降气化痰之功效,临床用于治疗饮食停滞、脘腹胀痛、大便秘结、积滞泻痢、痰壅喘咳^[1]。研究表明莱菔子还具有明显的抗高血压的作用,目前关于大孔吸附树脂纯化莱菔子水提液的研究未见报道。本实验以芥子碱硫氰酸盐含量为指标,结合 HPLC 指纹图谱,考察不同型号大孔吸附树脂对莱菔子水提取液的纯化效果。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),DT-100 型分析天平(北京医用仪器厂),ES-J120 型电子天平(沈阳龙腾电子量程仪器厂)。NKA-9,HPD-722,HPD100C,X-5,AB-8,D101,HPD750,DM-130,HPD400 型大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),莱菔子(购于济南建联中药店,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子),芥子碱硫氰酸盐对照品(自制,经 HPLC 检测,纯度 >98%),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 莱菔子水提取液的制备^[2] 莱菔子粉碎成粗粉,加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩,加水定容至 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,摇匀,作为上样液。

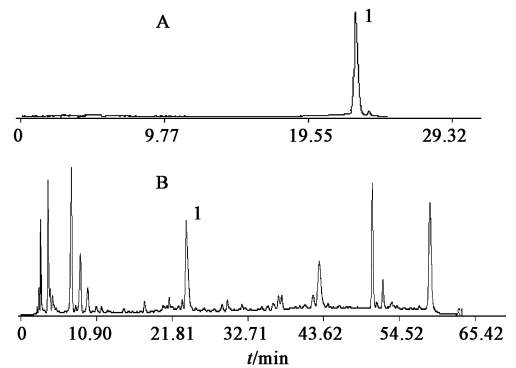
2.2 大孔树脂的预处理 称取大孔树脂,用 95% 乙醇浸泡至充分溶胀后装柱,继续用 95% 乙醇洗涤,洗涤至洗脱液在试管中用水稀释不混浊时为止,用水反复洗涤至无醇味,备用。

2.3 大孔树脂的再生 在树脂柱内加入高于树脂层的 2% ~ 3% 盐酸溶液浸泡 2 ~ 4 h,加相同浓度的盐酸溶液 5 BV 洗脱,再用水洗至洗脱液近中性,继用 5% 氢氧化钠溶液同盐酸溶液操作再处理 1 次,加水洗至洗脱液接近中性,即可再投入使用。

2.4 芥子碱硫氰酸盐的含量测定

2.4.1 色谱条件 KromasilC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)进行梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 10% A; 15 ~ 17 min, 10% ~ 12.5% A; 17 ~ 27 min, 12.5% ~ 14% A; 27 ~ 55 min, 14% ~ 25% A; 55 ~ 57 min, 25% ~ 70% A; 57 ~ 70 min, 70% ~ 100% A),检测波长 225 nm,柱温 30 °C,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 20 μL,见图 1。

2.4.2 对照品溶液的配制 精密称量芥子碱硫氰酸盐对照品 4.06 mg,置 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶液充分溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芥子碱硫氰酸盐

图 1 莱菔子水提取液 HPLC

2.4.3 供试品溶液的制备 精密吸取莱菔子水提取液 5 mL,蒸干,残渣加 80% 甲醇溶液转移至 10 mL 量瓶中,用 80% 甲醇定容至刻度,摇匀,经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。按 2.4.1 项下色谱条件测得上样液中芥子碱硫氰酸盐质量浓度 $28.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.4 线性关系的考察 精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,按 2.4.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 558.8X + 858.47$ ($r = 0.9999$),表明芥子碱硫氰酸盐在 $8.12 \sim 97.44 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系。

2.4.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件重复进样 5 次,结果芥子碱硫氰酸盐峰面积的 RSD 0.3%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,按 2.4.1 项下色谱条件测定,结果芥子碱硫氰酸盐峰面积的 RSD 0.7%,表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

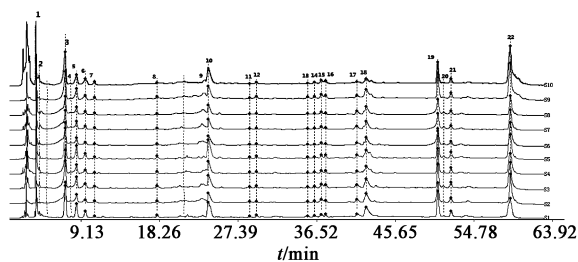
2.4.7 加样回收率试验 取同一已知含量的供试品 6 份,各精密加入芥子碱硫氰酸盐对照品适量,按 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件测定芥子碱硫氰酸盐含量,计算平均加样回收率 103%, RSD 2.6%,说明该方法准确度高。

2.5 不同型号大孔吸附树脂的吸附效果比较

2.5.1 供试品溶液的制备^[3] 选择 NKA-9,HPD-722,X-5,D101,AB-8,HPD-400,HPD-100C,DM-130,HPD-750 共 9 种型号的大孔吸附树脂,取已经处理好的各大孔树脂湿法装柱(1.5 cm × 11 cm),各加入莱菔子水提液 5 mL 过柱,流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,用 25 mL 水洗脱,弃去水洗液,继用 50% 乙醇 50 mL 于 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液,置于

蒸发皿中水浴蒸至近干,残渣用 80% 甲醇溶液转移并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5.2 指纹图谱的建立 分别精密量取莱菔子水提液和 2.5.1 项下 9 个供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件测定,建立 HPLC 指纹图谱,见图 2。采用中国药典委员会推荐的计算机辅助相似性评价系统软件《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)对 HPLC 指纹图谱进行综合评价,结果共有峰峰面积和保留时间见表 1,相似度评价见表 2。



S1. NKA-9; S2. HPD-722; S3. HPD100C; S4. X-5; S5. AB-8; S6. D101; S7. HPD750; S8. DM-130; S9. HPD400; S10. 水提液

图 2 不同型号大孔树脂处理后的莱菔子水提液 HPLC 指纹图谱

表 1 莱菔子水提液经不同型号树脂纯化后 HPLC 指纹图谱共有峰的峰面积

峰号	t/min	NKA-9	HPD-722	HPD100C	X-5	AB-8	D101	HPD750	DM130	HPD400	水提取液
1	4.3	1 634.0	358.1	1 554.2	1 469.1	1 555.8	1 290.3	3 166.0	559.6	859.6	4 734.6
2	5.2	522.6	586.4	727.8	714.6	741.7	171.5	121.3	405.3	743.4	699.5
3	7.3	14 755.5	15 247.2	16 818.0	14 047.8	15 161.6	16 182.4	17 951.0	17 580.4	15 188.1	20 900.2
4	7.9	944.2	1 903.5	1 345.1	1 061.2	986.2	1 993.1	2 159.3	2 183.5	1 518.8	1 650.9
5	8.6	6 653.6	6 447.8	7 088.0	5 229.2	6 116.8	4 398.2	5 165.3	5 082.6	7 717.5	7 147.2
6	9.6	3 934.8	4 240.3	4 434.9	3 211.6	3 883.3	2 789.0	3 191.3	2 753.9	4 700.8	4 581.1
7	10.7	1 342.7	3 386.0	1 512.9	877.9	1 152.8	1 169.0	2 135.0	1 439.4	2 018.4	3 739.1
8	18.0	1 646.6	3 451.0	2 515.8	1 503.0	1 877.0	1 456.7	1 678.4	1 377.2	4 072.5	3 319.3
9	21.1	435.1	1 448.7	1 121.5	857.1	640.1	1 270.6	2 012.9	2 521.6	3 772.2	4 914.9
10	23.9	14 096.5	7 133.4	10 321.9	8 311.5	16 101.7	6 476.4	7 549.8	6 100.4	10 279	16 673.8
11	28.7	1 753.5	3 559.8	2 743.8	1 712.2	2 257.4	1 939.2	2 643.8	2 016.2	2 295.4	3 129.9
12	29.5	1 944.8	2 443.1	2 241.4	1 729.4	1 999.4	1 708.9	1 307.4	1 313.6	2 086.7	3 891.8
13	35.4	2 124.7	2 896.2	2 622.0	1 695.6	2 053.1	1 325.8	2 567.9	1 884.7	3 129.1	3 881.1
14	36.2	2 560.6	2 682.6	2 578.0	1 874.2	1 916.0	1 303.1	1 615.1	1 499.3	2 484.6	3 428.0
15	37.1	3 405.3	3 542.2	3 143.8	2 163.6	2 568.6	2 754.4	3 109.1	2 949.5	2 985.7	3 690.0
16	37.6	2 488.8	2 679.7	2 853.4	2 295.1	2 897.3	2 471.1	1 797.4	1 616.1	2 793	3 749.8
17	41.2	4 365.5	4 545.2	5 124.5	2 426.9	3 198.7	1 628.7	3 757.8	3 456.4	4 827.1	10 368.5
18	42.3	10 524.0	10 889.8	11 354.4	6 448.5	7 129.4	7 877.6	7 792.7	8 332.2	11 422.6	8 623.1
19	50.6	11 264.6	13 312.6	13 277.0	10 589.0	12 307.5	13 810.8	14 199.6	13 417.1	13 263.1	11 956.2
20	51.2	1 861.7	2 551.6	3 011.6	1 836.0	2 420.1	1 782.0	2 695.8	2 537.5	3 314.8	3 085.3
21	52.1	3 892.7	4 914.6	4 967.3	3 463.3	4 232.5	3 492.4	3 249.2	3 095.4	6 202.4	8 739.3
22	59.0	13 984.4	18 115.0	19 333.1	16 228.3	21 483.4	13 816.5	11 591.5	10 639.5	17 764	28 003.9

由图 2 可知,莱菔子水提液和 9 种供试品溶液的 HPLC 色谱图中均主要有 22 个共有峰,其中 10 号色谱峰为芥子碱硫氰酸盐。由表 1 可知,不同型号大孔吸附树脂对有效成分的纯化及损失各有不同,但结合相似度评价发现相差不大,相似度均 > 0.9,单从芥子碱硫氰酸盐含量考虑,AB-8, NKA-9 型大孔树脂的损失较少。

2.5.3 纯化效果比较 以芥子碱硫氰酸盐含量、洗

脱率和 HPLC 指纹图谱总有效成分洗脱率为指标,筛选具有较好吸附和洗脱能力的最佳大孔树脂,结果见表 3。

由表 3 可知,以芥子碱硫氰酸盐洗脱率为指标,洗脱率大小排列顺序为 AB-8 > NKA-9 > HPD100C > HPD400 > X-5 > HPD750 > HPD722 > D101 > DM130,其中 AB-8, NKA-9 型树脂的洗脱率较高,与其他型号树脂差别较大。以总有效成分洗脱率为指标,洗脱率

大小排列顺序为 HPD400 > HPD100C > HPD722 > AB-8 > NKA-9 > HPD750 > DM-130 > D101 > X-5, 其中前 5 种大孔树脂的洗脱率相差不大。综合考虑, AB-8,

NKA-9 型大孔吸附树脂较其他型号树脂更适合莱菔子水提取液中有效成分的纯化富集, 且 AB-8 型树脂优于 NKA-9 型树脂。

表 2 莱菔子水提液经不同型号树脂纯化后 HPLC 指纹图谱共有峰的相似度

样品	NKA-9	HPD-722	HPD-100C	X-5	AB-8	D101	HPD750	DM130	HPD400	水提取液	对照指纹图谱
NKA-9	1	0.809	0.862	0.795	0.855	0.871	0.85	0.877	0.812	0.765	0.915
HPD-722	0.809	1	0.912	0.83	0.835	0.847	0.896	0.824	0.825	0.776	0.924
HPD-100C	0.862	0.912	1	0.889	0.895	0.877	0.862	0.846	0.869	0.815	0.956
X-5	0.795	0.83	0.889	1	0.938	0.829	0.778	0.795	0.862	0.824	0.927
AB-8	0.855	0.835	0.895	0.938	1	0.84	0.8	0.804	0.87	0.841	0.943
D101	0.871	0.847	0.877	0.829	0.84	1	0.887	0.923	0.81	0.758	0.927
HPD-750	0.85	0.896	0.862	0.778	0.8	0.887	1	0.893	0.767	0.736	0.908
DM-130	0.877	0.824	0.846	0.795	0.804	0.923	0.893	1	0.8	0.723	0.908
HPD-400	0.812	0.825	0.869	0.862	0.87	0.81	0.767	0.8	1	0.849	0.926
水提取液	0.765	0.776	0.815	0.824	0.841	0.758	0.736	0.723	0.849	1	0.892
对照指纹图谱	0.915	0.924	0.956	0.927	0.943	0.927	0.908	0.908	0.926	0.892	1

表 3 不同型号大孔吸附树脂对莱菔子水提液的洗脱效果比较

大孔树脂型号	芥子碱硫 氰酸盐/mg·L ⁻¹	芥子碱硫氰酸盐 洗脱率/%	总有效成分 洗脱率/%
NKA-9	23.69	83.71	65.96
HPD-722	11.23	39.68	72.30
HPD100C	16.94	59.84	75.01
X-5	13.34	47.13	55.77
AB-8	27.28	96.39	70.03
D101	10.05	35.53	56.62
HPD750	11.97	42.31	63.05
DM-130	9.38	33.15	57.65
HPD400	16.86	59.57	76.71

3 讨论

大孔吸附树脂作为一种新型非离子型高分子聚合物吸附剂, 已被广泛用于中药材的分离纯化工艺, 但不同组分在大孔树脂上的吸附量和洗脱率均存在较大的差异, 因此选择合适型号(极性)的大孔树脂对于中药活性成分的分离纯化具有广泛意义^[4]。

莱菔子中水溶性生物碱为其降血压的有效部位^[4-5], 其中芥子碱硫氰酸盐为主要有效成分, 目前尚无该成分指纹图谱的报道, 试验分别考察了 225, 242, 280, 326 nm 共 4 种检测波长, 发现在 225 nm 处基线较平稳, 且色谱峰较多, 分离度好, 峰形较好。

通过分析芥子碱硫氰酸盐的含量测定和 HPLC 指纹图谱, 可以更全面地对各种型号大孔树脂进行综合评价^[6], 研究结果表明, 与其他型号树脂相比, AB-8 型大孔树脂对莱菔子有效成分的纯化效果更好。

[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, 2010: 225.
- [2] 丁臻, 蔡梅超, 周洪雷, 等. 正交试验法优选莱菔子水溶性生物碱提取工艺[J]. 食品与药品, 2011, 13(1): 19.
- [3] 李民, 周洪雷, 丁臻, 等. 大孔吸附树脂分离纯化莱菔子水溶性生物碱的工艺研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(5): 974.
- [4] 李铁云, 李天国, 张国侠, 等. 莱菔子水溶性生物碱对自发性高血压大鼠降压作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(1): 25.
- [5] 李炳根, 李铁云, 盖国忠, 等. 莱菔子水溶性生物碱逆转 SHR 心血管重构的实验研究[J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(3): 7.
- [6] 朱立俏, 盛华刚, 魏强强, 等. 壳聚糖絮凝沉降法对延胡索水提液的纯化工艺研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(2): 212.

[责任编辑 仝燕]