

洋金花中醉茄内酯总甾体的纯化工艺优选

王艳艳,孙海蛟,王知斌,王秋红,杨炳友,匡海学*

(黑龙江中医药大学北药基础与应用研究教育部重点实验室,
黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室,哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:优选洋金花中醉茄内酯总甾体大孔吸附树脂纯化工艺。方法:以醉茄内酯总甾体含量和纯度为指标,通过比较不同型号大孔树脂对甾体成分的吸附性能和解析能力,筛选树脂类型。采用单因素试验考察上样量、树脂量、上样速度、洗脱剂种类、洗脱速度、用量等对纯化工艺的影响。结果:选用 D941 型大孔树脂,其最佳纯化工艺为上样量-树脂量 < 7.5 g·L⁻¹,上样液 pH 7,加 3 BV 水以 6 BV·h⁻¹ 流速洗脱,总甾体的纯度 >90%。结论:该优选工艺简单可行,纯化效果好。

[关键词] 洋金花; 醉茄内酯; D941 型大孔树脂; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6,R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0017-03

[doi] 10.11653/syfyj2013150017

Optimization of Purification Technology for Total Steroids of Withanolides from Effective Part of *Datura metel*

WANG Yan-yan, SUN Hai-jiao, WANG Zhi-bin, WANG Qiu-hong, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue*
(Key Laboratory of Basic and Applied Research of North Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Basic Research of Pharmacodynamic Constituents of Chinese Materia Medica and Natural Medicine in Heilongjiang Province, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology for total steroids of withanolides from effective part of treatment psoriasis in *Datura metel*. **Method:** With content and purity of total steroids as indexes, optimum resin model was screened by comparing adsorption properties and elution ability of different macroporous resins. Single factor tests were adopted to investigate effect of loading capacity, type of eluent, elution rate and other parameters on purification technology. **Result:** D941 macroporous resin was selected, its optimum purification technology was as following: ratio of sample mass to macroporous resin < 7.5 g·L⁻¹, pH of sample liquid 7, eluted with 3 BV water at elution flow speed of 6 BV·h⁻¹. After purified, purity of total steroids was more than 90%. **Conclusion:** This optimized purification technology was simple, stable and feasible with good purification effect.

[Key words] *Datura metel*; withanolides; D941 macroporous resin; purification technology

洋金花性温味辛,有小毒,具有平喘止咳、镇痛解痉、麻醉等功效^[1],是国际市场上生产和流通量最大的 8 种药用植物之一^[2]。其化学成分主要包括

生物碱类、黄酮类、醉茄内酯类等^[3]。洋金花治疗银屑病的药效物质基础为黄酮类和醉茄内酯类成分^[4-7],其中醉茄内酯类化合物具有显著的抗菌、抗

[收稿日期] 20130328(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371736,30672633);国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09102-117);全国优秀博士论文作者专项资金项目(200980);哈尔滨市科技攻关计划项目(2012DB3BS055)

[第一作者] 王艳艳,讲师,从事中药药效物质基础研究和创新药物研究,Tel:0451-87268682,E-mail:729930185@qq.com

[通讯作者] *匡海学,教授,博士生导师,从事中药性味理论及中药药效物质基础研究,Tel:0451-87266862,E-mail:hxkuang@hotmail.com

炎、抗肿瘤、免疫调节等生物活性。本实验通过动态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号,通过单因素试验优选大孔树脂纯化醉茄内酯总甙体的工艺参数,为洋金花醉茄内酯总甙体的药理活性、作用机制研究及洋金花胶囊的质量控制提供物质基础及实验依据。

1 材料

756PC 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),AL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多称重设备系统有限公司),BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)。玻璃柱(40 mm × 600 mm, 15 mm × 200 mm),HPD950,HPD407 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),D101, D941, D301, D330 型大孔树脂(山东鲁抗立科药业有限公司),香草醛(天津市大茂化学试剂厂),Daturataturin A 对照品(黑龙江中医药大学中药化学实验室自制,纯度 > 97%),洋金花(购于黑龙江中医药大学附属第一医院药剂科,经黑龙江中医药大学药学院中药鉴定教研室王振月教授鉴定为茄科植物白花曼陀罗 *Datura metel* L. 的干燥花),乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 取 Daturataturin A^[8] 对照品适量,精密称定,加甲醇制成 3.02 g·L⁻¹ 的对照品溶液,备用。

2.2 供试品的制备 取洋金花干燥花 300 g,用 30 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 2.5 h,合并提取液,冷却至室温,静置,滤过,减压回收至无醇味。加 0.1% 盐酸溶液稀释溶解后过阳离子交换树脂,洗脱液过 AB-8 型大孔树脂,分别用水和 50% 乙醇洗脱,收集 50% 乙醇洗脱液,回收,干燥,即得洋金花治疗银屑病有效部位,备用。

2.3 显色剂的配制 称取香草醛 1 g,用高氯酸稀释至 100 mL,摇匀,即得 1% 香草醛-高氯酸溶液,备用。

2.4 标准曲线的制备 精密吸取 2.1 项下对照品溶液 0.05, 0.08, 0.1, 0.12, 0.15, 0.18 mL, 分别置于具塞试管中,水浴蒸干,加入 1% 香草醛-高氯酸 0.5 mL,于 60 °C 恒温水浴中充分混匀,加热 15 min,立即用冰水冷却 2 min,加入 77% H₂SO₄ 溶液 5 mL,摇匀,以相应试剂为空白,于 517 nm 处测定吸光度(A)。以 Daturataturin A 质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.7629X - 0.0037$ ($r = 0.9997$),表明 Daturataturin A 在 0.1510 ~ 0.5436

g·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.5 树脂的预处理^[9-11] 称取不同型号的大孔吸附树脂一定量,用乙醇浸泡 24 h,湿法装柱(40 mm × 600 mm),用 4 ~ 5 倍乙醇清洗,流速 2 BV·h⁻¹,不时检查流出液,至流出液与水混合(1:4)后不呈白色混浊为止,加水洗至无醇味,加 2 BV 的 5% HCl 溶液浸泡 2 h,反复用水洗脱至洗脱液呈中性,加 2 BV 的 2% NaOH 溶液浸泡 2 h,用水洗脱至中性,密封存放,备用。

2.6 大孔树脂型号的筛选 采取动态洗脱法进行筛选。分别量取已处理好的 D101, D941, D301, D330, HPD950, HPD407 型大孔树脂适量,湿法装柱(20 mm × 400 mm),径高比 1:5,用水冲至中性。精密称取 2.2 项下供试品 250 mg,加水 5 mL 溶解,以 6 BV·h⁻¹ 流速上样,用 3 BV 水以相同流速洗脱,收集洗脱液,蒸干,用甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中,按 2.4 项下方法测定,结果洗脱液中醉茄内酯总甙体提取量分别为 44.3, 94.0, 92.1, 62.5, 0.0, 40.80 mg·g⁻¹, 纯度依次为 34.9%, 93.2%, 73.4%, 49.8%, 0.0%, 32.5%, 故选择 D941 型大孔树脂进行纯化工艺研究。

$$\text{提取量} = m_1/m, \text{纯度} = m_1/m_2 \times 100\%$$

式中 m_1 为测得的醉茄内酯总甙体质量, m 为供试品的质量, m_2 为洗脱液精制物的质量。

2.7 纯化工艺优选

2.7.1 上样量考察 选用 5 根相同玻璃柱(20 mm × 400 mm),量取 D941 大孔树脂 5 份,每份 40 mL,湿法装柱。分别精密称取供试品 100, 250, 300, 350, 400 mg,用 5 mL 水溶解,以 6 BV·h⁻¹ 流速上样,用 3 BV 水以相同流速洗脱,收集洗脱液,蒸干,用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,结果测得洗脱液中醉茄内酯总甙体提取量分别为 92.8, 90.5, 93.0, 60.0, 0 mg·g⁻¹, 纯度依次为 93.2%, 91.3%, 90.5%, 80.69%, 0, 表明当上样量 > 300 mg 时树脂对总甙体吸附量已达饱和,故确定上样量 7.5 g·L⁻¹。

2.7.2 上样液 pH 考察 取经预处理的 D941 型大孔树脂 3 份,每份 40 mL,湿法装柱。分别精密称取供试品 3 份,每份 250 mg,用 5 mL 水溶解,调节上样液 pH 分别为 4, 7, 8,以 6 BV·h⁻¹ 流速上样,用 3 BV 水以相同流速洗脱,测定洗脱液中醉茄内酯总甙体含量。结果表明,当上样液 pH 4 或 8 时,紫外下均检测不到总甙体,而 pH 7 时,洗脱液中总甙体质量浓度 91.2 g·L⁻¹, 纯度 93%, 故确定上样液

pH 7。

2.7.3 洗脱溶剂考察 取经预处理的 D941 型大孔树脂 40 mL,湿法装柱。分别精密量取供试品 5 份,每份 250 mg,用水 5 mL 溶解,上样液 pH 7,以 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,分别用 3 BV 水,30% 甲醇,100% 甲醇,50% 乙醇,95% 乙醇以相同流速洗脱,收集洗脱液,结果洗脱液中醉茄内酯总甾体提取量分别为 93.5,92.4,92.2,91.9,91.7 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,纯度依次为 92.8%,91.6%,91.5%,91.0%,90.8%,故确定水为洗脱溶剂。

2.7.4 洗脱速度考察 取经预处理的 D941 型大孔树脂 6 份,每份 40 mL,湿法装柱。分别精密量取供试品 6 份,每份 250 mg,加 5 mL 水溶解,上样液 pH 7,分别以 1,3,4,6,7,8 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,用 3 BV 水以相同流速洗脱,测得洗脱液中醉茄内酯总甾体提取量分别为 82.3,88.4,94.5,94.3,76.9,0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,纯度依次为 80.3%,86.3%,91.3%,94.5%,64.2%,0,故确定洗脱流速 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.7.5 洗脱剂用量考察^[12] 取经预处理的 D941 型大孔树脂 6 份,每份 40 mL,湿法装柱。分别精密称取供试品 6 份,每份 250 mg,用 5 mL 水溶解,上样液 pH 7,以 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上样,分别加 1,2,3,4,5,6 BV 水以相同流速洗脱,测得洗脱液中醉茄内酯总甾体提取量分别为 65.2,82.4,96.2,94.1,93.3,93.4 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,纯度依次为 93.2%,92.4%,94.2%,92.3%,91.8%,92.5%,故选择洗脱剂体积 3 BV。

2.7.6 验证试验 精密称取供试品 3 份,每份 250 mg,加 5 mL 水溶解,分别上样至 D941 型树脂柱(20 mm × 400 mm,40 mL),按优选的工艺上样和洗脱,收集洗脱液,测得洗脱液中醉茄内酯总甾体提取量分别为 91.4,91.8,91.5 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,纯度依次为 93.5%,93.2%,93.7%,说明该工艺稳定可行。

3 讨论

洋金花治疗银屑病的主要活性成分为黄酮类和醉茄内酯类甾体成分,二者发挥不同的药理作用。因此,在进行洋金花治疗银屑病有效部位含量测定时,应对二者的含量分别测定。黄酮类成分有较强的紫外吸收,定量比较容易。而采用紫外-可见分光光度计法检测醉茄内酯类甾体成分含量时,黄酮类成分干扰较大,无法准确定量,故有必要对醉茄内酯总甾体进行纯化。

D941 型大孔树脂是弱碱性阴离子交换树脂,常

用于天然药物提取过程中脱色、去除蛋白等。利用 D941 型树脂对洋金花有效部位中黄酮类化合物的强吸附能力,使几乎无色的醉茄内酯总甾体成分随洗脱剂流出,进而将两类成分分离,这与传统大孔树脂纯化工艺原理不同,因此无需考虑目标成分的泄漏问题,只需在上样量考察时注意杂质成分的吸附过饱和问题。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:1700.
- [2] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志. 第 7 卷 [M]. 1 分册. 北京:科学出版社,1978:67.
- [3] 杨炳友,唐玲,太成梅,等. 洋金花化学成分的研究 (I) [J]. 中草药,2006,37(8):1147.
- [4] YANG B Y, WANG Q H, XIA Y G. Withanolide compounds from the flower of *Datura metel* L. [J]. Helvetica Chimica Acta,2007,90(8):1522.
- [5] YANG B Y, WANG Q H, XIA Y G. Baimantuoluolines D-F, three new withanolides from the flower of *Datura metel* L. [J]. Helvetica Chimica Acta, 2008, 91(5):964.
- [6] YANG B Y, WANG Q H, XIA Y G. Baimantuoluosides D-G, four new withanolides from the flower of *Datura metel* L. [J]. Arch Pharm Res,2010,33(8):1143.
- [7] KUANG H X, YANG B Y, XIA Y G. Two new withanolide Lactones from the Flos *Daturae* [J]. Molecules,2011,16(7):5833.
- [8] MA L, XIE C M, LI J. Daturametelins H, I, and J; three new withanolide glycosides from *Datura metel* L. [J]. Chem Biodivers,2006,3(2):180.
- [9] 冯素香,苗明三,苗晋鑫,等. AB-8 大孔吸附树脂同时分离纯化毛冬青总黄酮、总皂苷工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):5.
- [10] 杜茂波,金日显,李军红,等. X-5 型大孔树脂纯化黄连巴布膏中黄连的工艺研究 [J]. 中成药,2009,31(1):139.
- [11] 李莹,李艳丹,刘圆,等. 大孔树脂富集纯化红毛五加中总苷类成分的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):24.
- [12] 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(19):20.

[责任编辑 全燕]