

蜘蛛香总缬草三酯提取物的纯化工艺优选

郜红利¹, 谭玉柱^{2*}

(1. 湖北民族学院, 湖北 恩施 445000; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选蜘蛛香总缬草三酯提取物的纯化工艺。方法: 采用动态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 通过单因素试验考察上样量、洗脱流速、洗脱溶剂及其用量对总缬草三酯富集纯化工艺的效果。结果: 采用 ADS-8 型大孔吸附树脂, 优选的纯化工艺为上样量 $42.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 上样液质量浓度 $1.692 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 30% 乙醇除杂, 用 95% 乙醇 6 BV 洗脱, 洗脱流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 总缬草三酯纯度 51%, 出膏率 26%。结论: 优选的纯化工艺稳定可靠、重复性好。

[关键词] 蜘蛛香; 总缬草三酯; 纯化工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0037-03

[doi] 10.11653/syjf2013120037

Optimization of Purification Technology of Total Valepotriates from Extract of *Valeriana jatamansi*

GAO Hong-li¹, TAN Yu-zhu^{2*}

(1. Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total valepotriates from extract of *Valeriana jatamansi*. **Method:** Models of macroporous resin was screened by dynamic adsorption-elution test, effect of sample volume, elution flow rate, elution solvent and its amount on purification process of total valepotriates was investigated by single factor test. **Result:** ADS-8 macroporous resin was adopted, optimized purification technology was as following: the concentration of sample solution $1.692 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, elution flow rate of $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, sample capacity $42.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, after eluted with 30% ethanol and 6 BV of 95% ethanol, yield of total valepotriates was 26% and purity was 51%. **Conclusion:** Optimized purification technology was stable, reliable and reproducible.

[Key words] *Valeriana jatamansi*; total valepotriates; purification technology

蜘蛛香主要分布在我国西南少数民族地区^[1], 以根茎及根入药, 用于治疗脘腹胀痛、呕吐泄泻、小儿疳积等^[2-3]。其主要化学成分为环烯醚萜类、黄酮类、生物碱类^[4], 环烯醚萜成分中缬草三酯类化合物是抗肿瘤、镇静催眠、抗焦虑、解痉等药效成分

之一^[5-6]。在提取工艺研究基础上, 本实验通过动态吸附-洗脱试验筛选大孔吸附树脂型号, 并通过单因素试验优选其纯化工艺。制备的缬草三酯提取物, 较文献报道的缬草三酯类提取物纯度高, 且操作简便^[7], 可作为抗肿瘤药、抗抑郁药研发的医药中间体, 同时为蜘蛛香资源的开发提供实验依据。

1 材料

UV 1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), UPT-I-10T 型优谱超纯水器(成都超纯科技有限公司), BS124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。HPD-600, AB-8, HPD300, S-8, ADS-8 型大孔树脂(成都亚荣生化设备有限公

[收稿日期] 20130110(005)

[基金项目] 湖北省自然科学基金重点项目(2010CDA047)

[第一作者] 郜红利, 副教授, 从事民族药物的开发与利用研究, Tel: 0718-8439504, E-mail: 349523825@qq.com

[通讯作者] * 谭玉柱, 硕士, 助教, 从事中药有效成分及质量标准化研究, Tel: 028-61800033, E-mail: 365762996@qq.com

司), 缬草三酯对照品(成都植标化纯生物有限公司, 批号 110756-200110, 纯度 > 98%), 蜘蛛香(采自湖北省恩施州利川市福宝山, 经湖北民族学院中药鉴定教研室朱敏英教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根), 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 精密称取适量缬草三酯, 用无水乙醇溶解配制成 $0.1096 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液。分别吸取该贮备液 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 配制系列对照品溶液。以无水乙醇作空白, 于 256 nm 处测吸光度(A)。以 A 为纵坐标, 缬草三酯质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 31.427X + 0.0372$ ($r = 0.9992$), 线性范围 $0.00548 \sim 0.0274 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 供试品溶液的制备 称取蜘蛛香粉末 5 g, 置具塞锥形瓶中, 加 50 mL 无水乙醇浸泡 1 h, 超声提取 3 次, 每次 30 min, 合并提取液, 过滤, 用无水乙醇定容至 50 mL, 摇匀, 即得。

2.3 大孔树脂的预处理^[8] 大孔树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h, 湿法装柱。用 95% 乙醇冲至洗脱液澄清, 用水冲洗至洗脱液无醇味; 用 2 BV 5% HCl 浸泡 3 h 左右, 按 $4 \sim 6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速冲洗, 用水冲洗至中性; 用 2 BV 2% NaOH 浸泡 3 h, 以 $4 \sim 6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗柱, 用水冲洗至中性, 备用。

2.4 动态吸附-洗脱试验 称取预处理好的 5 种大孔吸附树脂(HPD-600, AB-8, HPD-300, S-8, ADS-8) 各 15 g, 湿法装柱, 分别吸取等量蜘蛛香提取液过柱, 进行动态吸附。至吸附均匀时, 停止上样, 记录上样液体积。用水冲洗树脂柱, 收集所有冲洗液, 定容, 计算蜘蛛香总缬草三酯吸附量依次为 7.19, 7.83, 7.63, 6.28, 7.50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 吸附率分别为 89.10%, 97.02%, 94.50%, 77.8%, 92.90%。用 95% 乙醇 100 mL 洗脱至洗脱液近无色, 收集洗脱液并定容至 100 mL。各精密量取 0.2 mL, 挥干溶剂, 用无水乙醇定容至 10 mL, 测定蜘蛛香总缬草三酯洗脱量分别为 7.10, 5.10, 6.31, 5.74, 7.16 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 洗脱率依次为 98.7%, 65.1%, 82.7%, 91.4%, 95.5%。综合考虑, ADS-8 型大孔树脂对蜘蛛香总缬草三酯的吸附和解吸能力相对较好。

吸附量 = (母液质量浓度 - 滤液质量浓度) × 溶液体积 / 干树脂质量;

吸附率 = (母液质量浓度 - 滤液质量浓度) / 母液质量浓度 × 100%;

洗脱量 = 洗脱液质量浓度 × 洗脱液体积 / 干树脂质量;
洗脱率 = 解吸量 / 吸附量 × 100%

2.5 单因素试验考察^[9-10]

2.5.1 上样量 称取 ADS-8 型大孔树脂 10 g, 湿法装柱, 加蜘蛛香提取液 ($4.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 上柱, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集流出液, 每 10 mL 收集 1 份, 共收集 12 份, 测定 A, 吸附曲线见图 1, 故确定最大上样量 $42.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

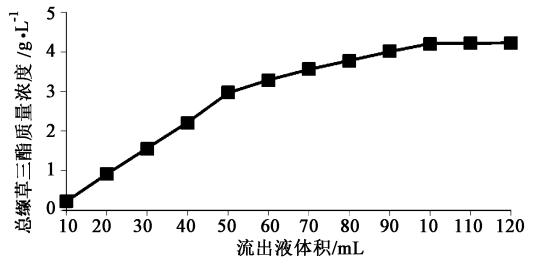


图 1 ADS-8 型大孔树脂对蜘蛛香总缬草三酯成分的动态吸附曲线

2.5.2 上样流速 称取已吸干表面水分的 ADS-8 型树脂 4 份, 每份 10 g, 准确加入蜘蛛香提取液 20 mL, 用等量水洗脱, 考察流速为 1, 2, 4, 8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 对蜘蛛香总缬草三酯纯化工艺的影响, 收集流出液, 测定 A, 测定总缬草三酯含量。结果总缬草三酯吸附量分别为 7.25, 8.29, 8.02, 6.59 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 吸附率依次为 85.7%, 97.9%, 94.8%, 77.9%, 故选择上样流速 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.5.3 上样液质量浓度 精密量取蜘蛛香提取液 5, 10, 15, 20 mL, 分别稀释定容至 50 mL。称取已吸干表面水分的 ADS-8 型树脂 4 份, 每份 5 g, 分别浸泡于上述 4 份提取液中, 置于 20 °C 恒温水浴箱, 每间隔 30 min 振荡 1 min (60 次/min), 1 h 后抽滤, 制成总缬草三酯制备液, 测定 A, 计算总缬草三酯含量。结果发现, 随上样液质量浓度的提高, 吸附率上升, 当上样质量浓度为 $1.692 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 吸附率最高, 随后上样质量浓度上升吸附率反而下降, 故确定上样质量浓度 $1.692 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (生药质量浓度 $0.035 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.5.4 洗脱溶剂 取已处理备用的 ADS-8 型树脂 20 g, 湿法装柱, 吸取蜘蛛香提取液 20 mL 上柱, 分别用体积分数为 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 95% 的乙醇溶液 50 mL 以 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 收集洗脱液, 测得总缬草三酯质量分别为 0.134, 1.025, 2.013, 19.458, 8.469, 2.468, 0.092 mg; 得率依次为 0.40%, 3.05%, 5.98%, 57.81%,

25.16%, 7.33%, 0.27%。结果显示,30%乙醇洗脱液中总缬草三酯含量较低,70%乙醇洗液不能完全洗脱总缬草三酯成分,而95%乙醇洗脱时,其含量显著减少。因此,洗脱溶剂确定为先用30%乙醇洗脱除杂,后用95%乙醇溶液洗脱。

2.5.5 洗脱剂用量 称取 ADS-8 型树脂 20 g 装柱,加 1.692 g·L⁻¹ 蜘蛛香提取液 20 mL 上柱,待吸附均匀,用适量水和 30% 乙醇 100 mL 冲洗至流出液近无色,用 95% 乙醇洗脱至洗脱液无色,收集洗脱液,每 20 mL 为 1 个流份,共收集 10 份,挥干,制成总缬草三酯供试品溶液,测定 A,结果见图 2。

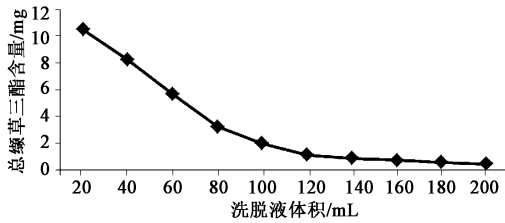


图 2 蜘蛛香总缬草三酯洗脱曲线

由图 2 可知,当收集至第 6 份时,洗脱液中总缬草三酯含量已降至较低水平,故认为此洗脱剂 120 mL(6 BV)即可将总缬草三酯洗脱完全。

2.6 验证试验 称取蜘蛛香药材粉末 3 份,每份 20 g,超声提取,得蜘蛛香提取液。按优选的纯化工工艺富集总缬草三酯,进行 3 次验证试验,结果总缬草三酯平均收率 26.12% (RSD 2.56%),平均质量分数 51.38% (RSD 3.12%)。

3 讨论

考察上样流速时,随流速的升高,其吸附率降低,可能是由于缬草三酯分子扩散速率较慢,与树脂接触不充分,使大量缬草三酯类来不及与 ADS-8 型树脂交换吸附而发生泄漏。缬草三酯类成分极性较小,脂溶性较强,因此用 30% 乙醇洗脱,可在保证不洗脱目标成分的前提下将水溶性杂质尽可能除去,从而最大限度富集目标成分。

缬草三酯属环烯醚萜类成分,遇酸碱易分解,对热不稳定^[11],同时在水三氯甲烷和无水乙醇中较

稳定^[12],故应控制提取纯化温度 (< 37 °C) 并选择合适的提取溶剂 (无水乙醇)。本实验采用超声快速提取,避光放置树脂柱,避免了因药材提取温度过高、接触溶剂过久、见光易分解而导致的缬草三酯类成分变化。大孔树脂吸附总缬草三酯后可采用溶解度较高的溶剂如甲醇、乙醇作洗脱剂,但考虑工业生产中甲醇毒性较大、污染严重,故选用乙醇为洗脱剂。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:北京科学出版社,2000:28.

[2] 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,2010:345.

[3] 肖婷,闫智勇,左长英,等. 蜘蛛香总黄酮大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):36.

[4] 陈磊,郑清明,郑汗臣,等. 蜘蛛香的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2002,21(1):8.

[5] 李蓉,吴莹. 蜘蛛香的药理作用研究进展[J]. 科技资讯,2009,7(31):159.

[6] 王延丽,石晋丽,郭建友,等. 缬草素抗焦虑活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):36.

[7] 狄宏晔,石晋丽,闫兴丽,等. 蜘蛛香中总缬草素的提取纯化工艺研究[J]. 中药材,2007,30(9):1127.

[8] 金汝城,谢伟雪,逢艳. 大孔吸附树脂对大黄总蒽醌类物质的吸附纯化[J]. 兰州大学学报:医学版,2006,31(14):47.

[9] 曹骋,叶殷殷,王浩龙,等. DM301 型大孔吸附树脂分离纯化大黄总蒽醌的研究[J]. 中国现代中药,2010,12(8):37.

[10] 徐晶,陈再兴,袁昌鲁. 大孔吸附树脂富集纯化大黄总蒽醌的工艺研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(1):115.

[11] 李少华,闫智勇. 蜘蛛香环烯醚萜类成分的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(6):634.

[12] 陈玉娟,石晋丽,闫兴丽,等. 蜘蛛香中缬草素在不同溶媒中的稳定性研究[J]. 北京中医药大学学报,2009,32(5):349.

[责任编辑 仝燕]