

龙胆中环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺

冯波^{*}, 朱鹤云, 关皎, 郭小存, 李进山
(吉林医药学院药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 优选大孔吸附树脂分离纯化龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷的工艺条件。**方法:** 采用高效液相色谱法对龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷进行定量分析, 通过考察静态和动态吸附、洗脱效果, 筛选大孔吸附树脂分离纯化龙胆中环烯醚萜苷的最佳工艺条件。**结果:** 最佳工艺为 HPD300 树脂, 上样液质量浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 吸附流速 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 上样量 10 BV, 吸附后的树脂柱先用 2 BV 蒸馏水洗脱, 再用 8 BV 30% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速洗脱。**结论:** HPD300 大孔树脂对龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷具有较好的分离纯化效果, 优选工艺操作简单、稳定可行。

[关键词] 大孔吸附树脂; 龙胆; 龙胆苦苷; 獐芽菜苦苷; 獐芽菜苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0020-04

Purification Technology of Iridoid Glycoside from *Gentiana scabra* by Macroporous Adsorption Resin

FENG Bo^{*}, ZHU He-yun, GUAN Jiao, GUO Xiao-cun, LI Jin-shan
(College of Pharmacy, Jilin Medical College, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology conditions of gentiopicroside, swertia bitter glycoside and swertia glycoside from *Gentiana scabra*. **Method:** The content of gentiopicroside, swertia bitter glycoside and swertia glycoside was determined by HPLC, optimum separation and purification process conditions of iridoid glycoside from *G. scabra* was screened by static and dynamic adsorption, desorption tests. **Result:** Optimum technology was: HPD300 macroporous resin was selected, the concentration of sample solution was $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, adsorption flow rate was $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, dosage of sample liquid was 10 BV, eluted by 2 BV water, then eluted with 8 BV 30% ethanol at elution flow speed was $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. **Conclusion:** Gentiopicroside, swertia bitter glycoside and swertia glycoside from *G. scabra* were purified effectively with HPD300 macroporous resin, optimized process was simple, stable and feasible.

[Key words] macroporous adsorption resin; *Gentiana scabra*; gentiopicroside; swertia bitter glycoside; swertia glycoside

龙胆具有清热燥湿、泻肝胆火的功效^[1], 所含的主要活性成分为环烯醚萜苷类化合物, 包括龙胆苦苷、獐牙菜苦苷及獐牙菜苷等。文献报道环烯醚萜苷类化合物具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、保

肝利胆、解痉镇痛、增强免疫、降糖降脂等多种生物活性, 并且对神经系统、心血管系统和消化系统有很好的作用^[2-3]。

大孔吸附树脂广泛应用于天然产物的分离和纯化^[4-6], 关于龙胆药材中环烯醚萜苷类成分的研究, 已有多篇文献报道^[7-12]。本实验以龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷的含量为指标, 对 AB-8, D-101, D-301, HPD100, HPD300 型大孔吸附树脂进行了筛选, 并优选了龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苦苷和獐芽菜苷的分离纯化工艺, 为龙胆药材的进一步研究提供依据。

[收稿日期] 20111120(004)

[基金项目] 吉林省科技厅科研课题(200905113)

[通讯作者] * 冯波, 教授, 在读博士, 从事中药质量控制以及中药新药研发, Tel: 0432-64560529, E-mail: fengbo2@sina.com

1 仪器与试药

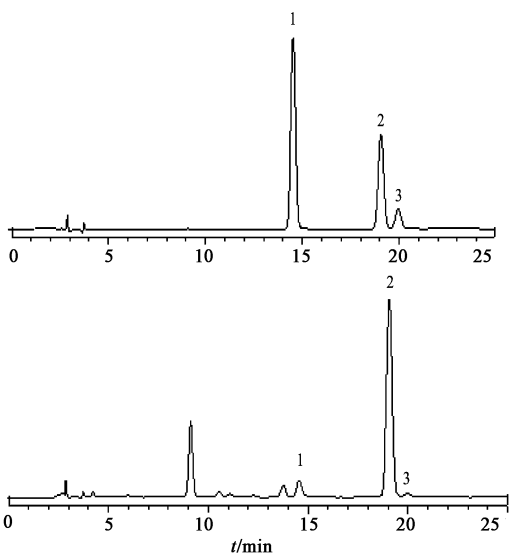
LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津,包括自动进样器,二极管阵列检测器、LC solution 色谱工作站等),CPA-64 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯仪器有限公司),R-3 型旋转蒸发器(瑞士步琪),玻璃柱(40 mm × 600 mm, 20 mm × 400 mm)。

HPD-100, HPD-300 型大孔树脂购于河北宝恩树脂科技有限公司;AB-8, D-101, D-301 型大孔树脂购于天津兴南允能高分子技术有限公司;乙腈(Fisher 科技, 色谱纯);磷酸(北京化工厂, 分析纯);所用水为娃哈哈纯净水。龙胆苦苷对照品(批号 110770-200611)、獐牙菜苦苷对照品(批号 110785-200203)均购自中国药品生物制品检定所,獐牙菜苦苷对照品(批号 100622)购自上海融禾医药科技有限公司,纯度均 > 99.5%。龙胆药材购于辽宁清原,经吉林医药学院生药学教研室李景华副教授鉴定为龙胆科植物龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamasil C₁₈ (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), C₁₈ 保护柱(3.0 mm × 4 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 22 min, 10% ~ 16% A; 22 ~ 25 min, 16% ~ 10% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 240 nm, 进样体积 5 μL。见图 1。



A. 混合对照品; B. 样品; 1. 獐牙菜苦苷; 2. 龙胆苦苷; 3. 獐牙菜苦苷

图 1 龙胆 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苦苷适量,用甲醇分别

配成龙胆苦苷 1.0 g · L⁻¹、獐牙菜苦苷 1.0 g · L⁻¹、獐牙菜苦苷 0.12 g · L⁻¹ 的单一成分对照品储备液。精密量取上述 3 种对照品溶液各 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 即得到含龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苦苷分别为 0.1, 0.1, 0.012 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取 2.1.2 项下制备的龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苦苷对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 按上述色谱条件进样, 测定色谱峰面积, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 色谱峰面积 (Y) 为纵坐标, 得回归方程分别为龙胆苦苷 $Y = 1.000 \times 10^6 X - 3.944 \times 10^5$ ($r = 0.9997$), 线性范围 1.0 ~ 20 μg; 獐牙菜苦苷 $Y = 2.000 \times 10^6 X - 4.566 \times 10^5$ ($r = 0.9995$), 线性范围 1.0 ~ 20 μg; 獐牙菜苦苷 $Y = 2.739 \times 10^5 X - 1.781 \times 10^4$ ($r = 0.9995$), 线性范围 0.12 ~ 2.4 μg。

2.1.4 龙胆样品的含量测定 精密吸取龙胆样品溶液 5 μL, 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1.1 项下的色谱条件测定色谱峰峰面积, 计算龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苦苷的含量。

2.2 大孔树脂的筛选

2.2.1 上柱样品液的制备 称取龙胆药材 500 g, 用 70% 乙醇 15 倍量回流提取 2 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩(45 °C)至无醇味, 浓缩液 4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 除去沉淀, 取上清液加水至 5 000 mL, 制成按原药材计 0.10 g · mL⁻¹ 的样品溶液。

2.2.2 大孔树脂的预处理 称取不同型号的大孔吸附树脂, 用乙醇浸泡 24 h, 将树脂按湿法装柱(40 mm × 600 mm), 用 4 ~ 5 倍的乙醇清洗, 流速保持为 2 BV · h⁻¹, 不时检查流出液, 至流出液与水混合(1:3)后不呈白色混浊为止, 用水洗去乙醇至无醇味, 密封存放, 待用。

2.2.3 树脂型号的选择 采用静态吸附、静态洗脱方法进行树脂的筛选。分别称取 10 g(干重)经预处理的 AB-8, D-101, D-301, HPD100, HPD300 型树脂于 250 mL 具塞磨口锥形瓶中, 加入 100 mL 龙胆提取液(按龙胆药材计为 0.10 g · mL⁻¹, 含龙胆苦苷 439.0 mg, 獐牙菜苦苷 20 mg, 獐牙菜苦苷 5 mg), 置于 25 °C 恒温振荡器上振荡 24 h, 取上清液测定龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苦苷的质量浓度, 计算树脂的吸附量和吸附率。将已吸附饱和的不同树脂置于 250 mL 的具塞磨口锥形瓶中, 分别加入 100 mL 30% 乙醇振荡 24 h 进行静态洗脱, 测定洗脱液中龙

胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,计算洗脱率。结果见表 1。

$$\text{吸附量} = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{m}$$

$$\text{吸附率} = \frac{C_0 V_0 - C_1 V_1}{C_0 V_0} \times 100\%$$

$$\text{洗脱率} = \frac{C_2 V}{C_0 V_0 - C_1 V_1} \times 100\%$$

表 1 不同型号大孔树脂对龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷吸附、洗脱性能的比较

树脂型号	龙胆苦苷			獐牙菜苦苷			獐牙菜苷		
	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	洗脱率 /%	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	洗脱率 /%	吸附量 /mg·g ⁻¹	吸附率 /%	洗脱率 /%
AB-8	37.36	85.12	70.56	1.66	83.35	67.45	0.42	84.82	68.52
D-101	35.98	81.95	67.50	1.58	78.83	65.62	0.40	80.06	65.28
D-301	19.44	44.26	37.39	0.86	42.58	35.81	0.22	45.82	38.63
HPD-100	38.80	88.38	69.24	1.72	85.87	66.25	0.44	86.05	69.08
HPD-300	39.62	90.25	85.68	1.78	88.56	82.85	0.46	90.28	84.95

有较好的吸附和洗脱能力,故选择 HPD-300 大孔树脂对龙胆环烯醚萜苷成分进行分离纯化研究。

2.3 HPD300 型大孔树脂纯化环烯醚萜苷的工艺考察

2.3.1 静态吸附动力学 称取 HPD-300 型树脂 10 g 于 250 mL 具塞磨口锥形瓶中,加入龙胆样品液 100 mL(按龙胆药材计为 0.10 g·mL⁻¹,含龙胆苦苷 439.0 mg,獐牙菜苦苷 20 mg,獐牙菜苷 5 mg),室温震荡,于 0.5,1.0,1.5,2.0,3.0,4.0,6.0,8.0,10 h 取样,测定溶液中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,计算树脂的总吸附量。实验结果表明,HPD-300 型树脂初始吸附速率较快,2 h 后吸附速率开始缓慢增加,4 h 后基本达到最大吸附量(总吸附量为 49.66 mg·g⁻¹)。

2.3.2 上样流速的考察 称取 30 g(干重)预处理后的 HPD-300 树脂湿法装于(20 mm×400 mm)玻璃柱中(柱体积约为 50 mL),加入龙胆样品液(按龙胆药材计为 0.10 g·mL⁻¹,含龙胆苦苷 439.0 mg,獐牙菜苦苷 20 mg,獐牙菜苷 5 mg)100 mL,分别以 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 BV·h⁻¹的流速通过树脂柱,室温下进行动态吸附,检测流出液中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,计算树脂的总吸附量,分别为 4.90,4.86,4.77,4.62,4.48,4.46 mg·g⁻¹。兼顾树脂的吸附量和工作效率,选择 1.0 BV·h⁻¹作为最佳上样流速。

2.3.3 最大动态吸附量的考察 将龙胆样品液(按龙胆药材计为 0.10 g·mL⁻¹,含龙胆苦苷 439.0

C_0 为吸附前龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度; V_0 为吸附前样品溶液体积, C_1, C_2 分别为吸附后和解析后龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度; V_1 为吸附后样品溶液体积, V_2 为解析液体积, m 为树脂质量。

由表 1 可知,中等极性的 HPD-300 大孔树脂具

mg,獐牙菜苦苷 20 mg,獐牙菜苷 5 mg)以流速 1.0 BV·h⁻¹加于 30 g(干重)预处理后的 HPD-300 型树脂柱上,每 50 mL 收集一份流出液,检测流出液中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,结果见图 2。由图可知,第 6 份开始,龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷开始出现泄漏,到第 10 份时泄漏曲线趋于平缓,此时 HPD-300 大孔树脂的动态吸附已饱和,通过计算得出 HPD-300 大孔树脂对三者的动态饱和吸附量为 77.3 mg·g⁻¹。

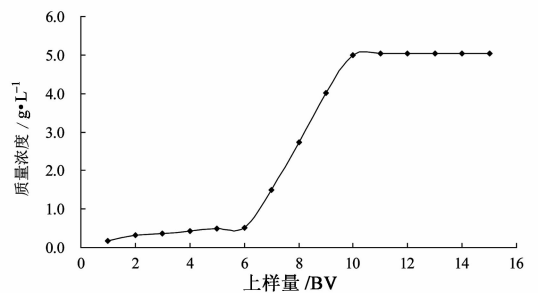


图 2 HPD300 型树脂最大动态吸附量考察

2.3.4 洗脱溶剂的考察 将龙胆样品液(按龙胆药材计为 0.10 g·mL⁻¹,含龙胆苦苷 439.0 mg,獐牙菜苦苷 20 mg,獐牙菜苷 5 mg)100 mL 以 1.0 BV·h⁻¹的流速上样至 5 根 HPD-300 型树脂柱(20 mm×400 mm,30 g),收集流出液,检测龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,从而计算出树脂柱的吸附量。树脂柱分别用 2 BV 纯化水以 2.0 BV·h⁻¹洗脱用 2 BV 水即可洗去水溶性杂质糖和蛋白质等),再用体积分数分别为 10%,20%,30%,40%,50%乙醇各 100 mL 以 2.0 BV·h⁻¹流速

洗脱,检测洗脱液中检测龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度,计算洗脱率,分别为 8.2%, 39.2%, 88.6%, 62.1%, 44.7%。30% 乙醇洗脱率最高,因此,选择 30% 乙醇作为洗脱溶剂。

2.3.5 洗脱剂流速的考察 将 5 份 100 mL 的龙胆样品液(按龙胆药材计为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含龙胆苦苷 439.0 mg, 獐牙菜苦苷 20 mg, 獐牙菜苷 5 mg)以 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样至 5 根 HPD-300 树脂柱(20 mm × 400 mm, 30 g), 收集流出液, 检测龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度, 从而计算出树脂柱的吸附量。树脂柱用 2 BV 纯化水洗脱, 再用 30% 乙醇分别以 $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱, 检测洗脱液中检测龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度, 计算洗脱率, 分别为 64.8%, 64.2%, 61.5%, 60.9%, 50.5%, 49.8%。随着洗脱流速的增加, 醇洗脱龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的量逐渐减少, 考虑到洗脱剂用量和工作效率, 选择洗脱剂流速为 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.3.6 洗脱剂用量的考察 称取树脂 30 g(干重), 装入玻璃柱(20 × 400 mm, 柱体积约为 50 mL), 将龙胆样品液按上述确定的吸附和洗脱条件, 进行上柱、吸附和洗脱, 每 50 mL 收集一份洗脱液, 检测洗脱液中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的质量浓度, 结果见图 3。由图可知, 用 8 BV 的 30% 乙醇可基本将龙胆中的龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷洗脱完全。

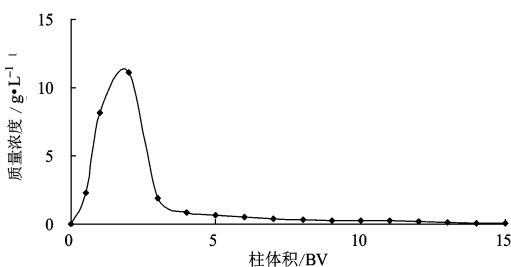


图3 洗脱剂用量的考察

2.3.7 大孔树脂纯化工艺的确定 取龙胆样品溶液 500 mL(按龙胆药材计为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含龙胆苦苷 439.0 mg, 獐牙菜苦苷 20 mg, 獐牙菜苷 5 mg)以 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速上柱(柱体积 50 mL), 用 2 BV 的蒸馏水以 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速除去水溶性杂质, 再用 8 BV 30% 乙醇以 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 收集洗脱液减压浓缩至干, 即得龙胆环烯醚萜苷纯化物。

2.3.8 验证试验 按上述优选的工艺条件进行 3 次平行试验, 并计算龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜

苷的质量分数分别为 61.68%, 2.44%, 0.66%, 三者的质量分数与纯化前进行比较, 分别提高 6.1, 5.2, 5.5 倍。经过一系列考察得出的 HPD300 型大孔树脂分离、纯化和富集龙胆环烯醚萜苷的工艺合理、可行、稳定。

3 讨论

本实验参考大孔吸附树脂纯化环烯醚萜苷的有关文献[10-12], 选择 AB-8, D-101, D-301, HPD100, HPD300 等 6 种型号树脂纯化龙胆中环烯醚萜苷。结果表明, HPD-300 型大孔吸附树脂对龙胆中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷具有较好的吸附和解析能力。试验中采用高效液相色谱法测定树脂处理前后 3 种环烯醚萜苷成分的含量, 能够准确、科学地反应龙胆环烯醚萜苷成分在 HPD300 型树脂上的吸附与洗脱等特点, 该工艺稳定、可行, 可以为龙胆药材的进一步研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 89.
- [2] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用. 第 2 卷[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 1398.
- [3] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 47.
- [4] 王辉, 何伟, 任军, 等. 大孔吸附树脂纯化人参皂苷类成分的工艺研究[J]. 中国药房, 2009, 20(24): 1865.
- [5] 李文霞, 颜彦, 叶晓川, 等. 大孔吸附树脂分离纯化菝葜总黄酮[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1292.
- [6] 周剑, 丁玉峰. 大孔吸附树脂分离中草药有效成分的应用[J]. 中国中药杂志, 2006, 26(1): 69.
- [7] 杨爱梅, 韩晗, 孙静, 等. 藏药高山龙胆的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 121.
- [8] 沈涛, 金航, 杨涛, 等. 不同产地野生滇龙胆中主要裂环烯醚萜类成分的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 70.
- [9] 王金鹏, 王砚, 任华忠. HPLC 测定复方茵陈糖浆中龙胆苦苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 5(7): 28.
- [10] 徐泽红, 才谦. 秦艽中裂环烯醚萜苷类成分的纯化工艺研究[J]. 中国医药导报, 2008, 5(7): 28.
- [11] 许有威, 齐艳, 韩旭. 高速逆流色谱结合大孔树脂从龙胆中快速分离高纯度龙胆苦苷[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2595.
- [12] 王良贵. 微波辅助萃取-大孔树脂分离纯化龙胆苦苷的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2723.

[责任编辑 全燕]