

# 大孔树脂富集泽兰中酚酸类成分

李佳彦<sup>1</sup>, 聂波<sup>2\*</sup>, 张壮<sup>2</sup>, 闫彦芳<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学东直门医院、  
中医内科学教育部重点实验室暨北京市重点实验室, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 确定富集泽兰中酚酸类成分的大孔树脂的方法。方法: 以原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸为指标, 在同一条件下比较 10 种不同树脂解吸附液中 3 个成分的 HPLC 色谱峰峰面积, 优选树脂类型 (HPD-600 和 AB-8 河北); 以不同洗脱部位固体物中这 3 个成分的含量为指标, 确定乙醇洗脱剂浓度。结果: 富集原儿茶醛, 最佳树脂为 HPD-600, 洗脱溶剂为 50% 乙醇; 富集咖啡酸, 最佳树脂为 HPD-600, 洗脱溶剂为 95% 乙醇; 富集迷迭香酸, 最佳树脂为 AB-8, 洗脱溶剂为 95% 乙醇。结论: 该试验为泽兰酚酸类成分富集工艺研究奠定基础, 为泽兰的化学成分深入研究提供了关键技术。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 泽兰; 酚酸

**[中图分类号]** R 283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0022-04

## Enrichment of Phenolic Acids from Herba Lycopi by Macroporous Resins

LI Jia-yan<sup>1</sup>, NIE Bo<sup>2\*</sup>, ZHANG Zhuang<sup>2</sup>, YAN Yan-fang<sup>2</sup>

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. Dongzhimen Hospital affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of  
Chinese Internal Medicine of Education and Key Laboratory of Beijing City,  
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** The technology of enriching phenolic acids was researched from *Lycopus lucidus* Turcz by macroporous resins. **Method:** The peak areas of protocatechualdehyde, caffeic acid and rosmarinic acid were compared from the ten kinds of macroporous resins' desorbED solutions under the same HPLC condition to determine the kind of macroporous resins. The contents of protocatechualdehyde, caffeic acid and rosmarinic acid were chosen as assessment index to decide the concentration of ethanol. **Result:** The two kinds of macroporous resins, HPD-600 and AB-8 from Hebei province were optimized. The adsorption resin of HPD-600 was appropriate to enrich protocatechualdehyde and the eluant was 50% ethanol; the adsorption resin of HPD-600 was appropriate to enrich caffeic acid and the eluant was 95% ethanol; the adsorption resin of AB-8 was appropriate to enrich rosmarinic acid and the eluant was 95% ethanol. **Conclusion:** This experientelaid a foundation for the enrichment technology of the phenolic acids from Herba Lycopi, it provided the key technology for the further research of Herba Lycopi's consitutions.

**[Key words]** macroporous resins; Herba Lycopi; phenolic acids

泽兰始载于《神农本草经》,列为中品,为唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel. 的干燥地上部分。具有活血化瘀、行水消肿的功效,主治月经不调、痛经、闭经、产后瘀血腹痛、水肿等<sup>[1]</sup>。研究表明,泽兰中含有多种酚酸类成分,如原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸及其衍生物<sup>[2]</sup>。本试验针对泽兰中酚酸类成分的特点,以原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸为指标,在同一条件下,

**[收稿日期]** 2009-11-12

**[基金项目]** 北京中医药大学科研基金项目(2008 年度);北京市教育委员会共建项目(2008 年度)

**[第一作者]** 李佳彦,女,硕士,研究方向:中药物质基础研究, Tel: 13810534352, E-mail: bearfist2001 @ yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 聂波,女,助理研究员,博士,研究方向:中药化学及中药药理, Tel: (010) 84013190, E-mail: nieboww\_1977@163.com

通过对 10 种不同树脂解吸附液中 3 个成分的 HPLC 色谱峰峰面积, 优选出 2 种树脂 (HPD-600 和 AB-8, 河北); 进一步以固形物中该 3 个成分的含量百分比为指标, 观察了不同浓度乙醇洗脱情况, 确定了洗脱溶剂浓度, 为泽兰酚酸类成分富集工艺研究奠定基础, 为泽兰的化学成分深入研究提供关键技术。

## 1 仪器与试剂

岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪 (包括 CTO-10AS 柱温箱, LC-10AT 双泵, SPD-M10Avp 紫外-可见二极管阵列检测器)。岛津 AEG-45SM 精密天平, 亚荣 RE-52A 旋转蒸发仪, FD-1D-80 °C 冷冻干燥机 (北京博医康), 湘仪 GL20A 低温离心机, 日立 U-2000 紫外可见全波长扫描仪。

药材: 泽兰产于河北白洋淀, 于 2007 年 4 月采集, 由北京中医药大学中药学院阎玉凝教授鉴定为唇形科植物地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Threuz. 的干燥全草。大孔树脂: AB-8, HPD-100, HPD-300, HPD-400, HPD-450, HPD-600 (河北沧州保恩化工有限公司), AB-8, X-5, D4020, NKA-II (天津南开化工厂), 均为药用级。甲醇、乙腈 (色谱纯, Merck), 甲酸 (色谱纯, Fluka), 娃哈哈纯净水, 去离子水。对照品: 咖啡酸 (中国药品生物制品检定所, 批号 110885-200102), 原儿茶醛 (中国药品生物制品检定所, 批号 110810-200506), 迷迭香酸 (Sigma, 批号 1208745 25205022)。

## 2 方法

**2.1 样品的制备** 取 500 g 泽兰药材, 加水 6 000 mL, 浸泡 1 h 后, 加热至沸腾继续煎煮 30 min, 过滤, 药渣加水 3 000 mL, 加热至沸腾继续煎煮 20 min, 过滤, 合并滤液, 浓缩定容至 500 mL, 离心 (4 °C, 8 000 r·min<sup>-1</sup>, 20 min), 得泽兰总提液 (生药 1 g·mL<sup>-1</sup>), 4 °C 保存, 备用。

### 2.2 酚酸成分的定量分析方法

**2.2.1 3 种酚酸成分的峰面积比较** 色谱条件: 色谱柱: Cadenza CD C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 流动相为乙腈/水系统, 两相均含有 0.75% 的甲酸, 洗脱梯度以有机相 10% 起始, 保持 5 min 后, 于 65 min 内线性变为 55%。流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL<sup>[2]</sup>。以原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸为指标, 在以上条件下, 通过对 10 种不同树脂解吸附液中 3 种成分的 HPLC 色谱峰峰面积进行比较, 确定树脂类型。

**2.2.2 3 种酚酸成分的含量比较** 色谱条件基于文献 [3] 报道优化为: 色谱柱 Cadenza CD C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 325 nm, 280 nm 双波长, 流动相乙腈/水系统, 两相均含有 0.75% 的甲酸, 洗脱梯度以有机相 10% 起始, 保持 5 min 后, 于 17 min 内线性变为 13%, 于 27 min 内线性变为 18%, 于 47 min 内线性变为 23%, 于 65 min 内线性变为 55%。流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL<sup>[3]</sup>。理论塔板数依原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸计均在 8 000 以上, 分离度均在 1.2 以上。在以上条件下, 以固形物中 3 个成分的含量百分比为指标, 确定洗脱溶剂浓度。

**2.3 树脂的预处理** AB-8, HPD-100, HPD-300, HPD-400, HPD-450, HPD-600 (河北沧州保恩化工有限公司): 以乙醇湿法装柱, 用 95% 乙醇洗脱, 检查乙醇流出液, 至乙醇: 水 (1:1) 流出液不呈白色浑浊为止, 然后用大量的蒸馏水洗去乙醇, 取出, 备用。AB-8, X-5, D4020, NKA-II (天津南开化工厂): 将新树脂先用乙醇浸泡充分溶胀, 然后用乙醇洗至流出液加适量水无白色浑浊现象, 再用蒸馏水洗尽醇, 最后转入酸碱处理。即用 4 BV 的 5% HCl 溶液, 以 5 BV·h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂层, 并浸泡 3 h, 而后用蒸馏水以同样流速洗至出水 pH 为中性; 用 4 BV 的 5% NaOH 溶液, 以 5 BV·h<sup>-1</sup> 的流速通过树脂层, 并浸泡 3 h, 而后用蒸馏水以同样流速洗至出水 pH 中性。

**2.4 大孔树脂类型的筛选** 以 10 种不同极性的树脂为研究对象, 采用 HPLC-DAD 获取不同解吸附液中的原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸的峰面积, 进行直观定量比较, 以确定树脂类型。

称取 10 种预处理过的树脂各 1.5 g, 加入 15 mL 泽兰上样液 (生药 0.1 g·mL<sup>-1</sup>), 静态吸附 24 h 后, 收集吸附残液, 剩余树脂过滤至干后, 再用水洗至 FeCl<sub>3</sub> 反应阴性, Molish 反应阴性, 转移入 50 mL 锥形瓶中, 加入 95% 乙醇 15 mL, 静态解吸附 24 h, 得解吸附液, 按 2.2.1 对各树脂解吸附液中的 3 种酚酸成分的峰面积进行直观比较。

**2.5 洗脱溶媒的考察** 树脂的筛选常常采用不同浓度乙醇作为洗脱溶剂, 在预实验中发现, AB-8 的 10% 乙醇洗脱部位几乎未见目标产物, 因此洗脱溶剂选为 30%, 50%, 70%, 95% 的乙醇。HPD-600 的各乙醇洗脱部位均能不同程度的富集目标产物, 因

此溶剂选为 10% ,30% ,50% ,70% ,95% 的乙醇。为排除上样体积的干扰,采用树脂过量上样的方法。

取泽兰上样液(生药 0.5 g·mL<sup>-1</sup>)9 份,每份 80 mL,取 4 份 AB-8,5 份 HPD-600,上样量(相当于生药克数)与树脂体积比为 1:8,使用动静相结合(静态吸附过夜后动态洗脱)的洗脱方法,以 2 mL·min<sup>-1</sup> 的流速,上样后水洗至 FeCl<sub>3</sub> 反应阴性,Molish 反应阴性。对装有 AB-8 树脂的各柱,分别用 30% ,50% ,70% ,95% 的乙醇洗脱;对装有 HPD-600 树脂的各柱,分别用 10% ,30% ,50% ,70% ,95% 的乙醇洗脱,以 FeCl<sub>3</sub> 反应观察洗脱终点。收集洗脱液,冷冻干燥,得固形物,按 2.2.2 测定各部位 3 种酚酸成分的含量以及固形物中各酚酸含量百分比。

### 3 结果

**3.1 大孔树脂类型的筛选** 根据保留时间、紫外 DAD 光谱信息以及与对照品进行对照,确定了原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸,比较 10 种不同树脂解吸附液中 3 种酚酸成分色谱峰的峰面积发现,10 种树脂中,HPD-600 对咖啡酸、原儿茶醛的富集效果最佳,AB-8 对迷迭香酸的富集效果最佳,见表 1。

表 1 同一 HPLC 条件下 10 种不同树脂泽兰解吸附液中 3 种酚酸成分的峰面积

No.	树脂型号	峰面积		
		原儿茶醛	咖啡酸	迷迭香酸
1	AB-8 天津	24 664	6 672	3 646 794
2	X-5	39 917	2 909	2 897 092
3	D4020	19 532	1 242	2 287 828
4	NKA-II	333 634	348 621	2 483 490
5	HPD400	193 224	4 553	3 605 595
6	HPD600	404 384	931 613	3 772 643
7	AB-8 河北	130 264	25 994	5 040 806
8	HPD450	34 479	1 532	1 723 544
9	HPD100	168 621	13 908	4 346 692
10	HPD300	79 495	301	3 202 433

**3.2 洗脱溶剂的筛选** 不同洗脱部位中原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸的含量结果见表 2,无论从含量还是固形物中相对百分含量,对于原儿茶醛的富集,50% 乙醇洗脱 HPD-600 树脂,效果最佳;对于咖啡酸的富集,95% 乙醇洗脱 HPD-600 树脂,效果最佳。对于迷迭香酸,从含量来看,AB-8 95% 乙醇洗脱部

分 > AB-8 50% 乙醇洗脱部分 > HPD-600 95% 乙醇洗脱部分;从固形物中相对百分含量来看,HPD-600 10% 乙醇洗脱部分 > AB-8 95% 乙醇洗脱部分 > AB-8 50% 乙醇洗脱部分,综合树脂类型的筛选结果,选定 95% 乙醇洗脱 AB-8 树脂富集迷迭香酸。

表 2 HPD-600 型和 AB-8 型树脂的泽兰不同洗脱部位中 3 种酚酸的含量

树脂类型	洗脱溶剂	固形物的质量/mg	原儿茶醛/mg	咖啡酸/mg	迷迭香酸/mg
HPD-600	水	—	0.00	4.67	0.00
	10% 乙醇	311.65	0.00	1.40	37.42
	30% 乙醇	743.06	0.00	2.11	43.57
	50% 乙醇	852.77	1.16	2.53	59.72
	70% 乙醇	816.89	0.54	5.40	53.01
AB-8	95% 乙醇	635.02	0.38	6.92	62.19
	水	—	0.00	1.81	0.03
	30% 乙醇	643.17	0.81	0.31	50.26
	50% 乙醇	679.09	0.96	0.17	65.62
	70% 乙醇	587.20	0.00	0.35	42.06
	95% 乙醇	663.59	0.00	0.00	74.10

### 4 讨论

**4.1 样品制备方法** 实验中发现直接用水煎液上样,上样及洗脱过程产生浑浊,分析原因可能是药液中含有大量大分子的蛋白及多糖,且大分子物质易于堵塞树脂孔,影响吸附效率,查阅文献<sup>[4]</sup>,采用冷离心的方法除蛋白多糖等物质。

**4.2 检测指标的选择** 本实验在筛选树脂类型时曾以咖啡酸为指标,采用比色法测定不同树脂解吸附液中总酚酸的含量,结果显示各树脂差异不显著。分析其原因可能是泽兰主要成分为黄酮和酚酸类成分,但两类成分结构很相似易相互干扰,多种以总酚酸为指标的方法均受到黄酮类物质的干扰,不能准确地评价树脂的富集效果,因此在树脂类型的筛选实验中不采用总酚酸作为指标,而是在同一 HPLC 条件下,分别以咖啡酸、原儿茶醛和迷迭香酸色谱峰的峰面积为指标,比较 10 种不同树脂对 3 种酚酸成分的富集效果而确定树脂类型。为了尽可能多的观察各段树脂吸附和解吸的各种成分,色谱条件选用文献报道泽兰的 HPLC 指纹图谱所用条件<sup>[2]</sup>。

**4.3 转移率的探讨** 本实验测定了 3 种酚酸类成分在 40 g 原药材中的含量分别为:原儿茶醛 2.639 8 mg,咖啡酸 14.507 8 mg,迷迭香酸

112.254 4 mg, 因此 50% 乙醇洗脱 HPD-600 树脂, 原儿茶醛转移率为 43.99%; 95% 乙醇洗脱 HPD-600 树脂, 咖啡酸的转移率为 47.72%; 95% 乙醇洗脱 AB-8, 迷迭香酸的转移率为 66.01%。可见本试验得出的洗脱条件对迷迭香酸的吸附及解吸附效果较佳, 对于原儿茶醛和咖啡酸的富集效果欠佳, 这可能与咖啡酸具一定酸性, 原儿茶醛结构上有多个酚羟基, 而本实验未考察 pH 对吸附效果的影响有关。

**4.4 吸附行为的探讨** 根据相似相容原理, 极性较强的树脂适用于在弱极性溶剂中吸附极性较大的物质, 极性弱的树脂适合用于在强极性溶剂中吸附极性小的物质。泽兰中的酚酸类成分多为咖啡酸及其衍生物, 极性较强, 因此, 极性树脂是较好的选择。原儿茶醛和咖啡酸极性相对较强, 极性树脂 HPD-600 对它们的富集具有优势。从这两个成分在 HPLC 的色谱行为来看, 原儿茶醛的极性大于咖啡酸, 因此它被较低浓度乙醇洗脱下来。迷迭香酸极性比前两者弱, 因而使用弱极性 AB-8 较为理想。另外, 吸附质的分子大小和树脂孔径对吸附也有很大影响。迷迭香酸为咖啡酸的二聚体, 分子质量相对较大, 而 AB-8 的孔径大于 HPD-600, 因此 AB-8 对分子量相对较大的迷迭香酸的富集效果更佳, 与本

实验结果一致。大孔吸附树脂对中药成分的吸附性能和多种因素有关, 包括被分离成分的性质——极性、分子大小, 上样溶剂性质——溶剂对成分的溶解性、溶剂 pH, 上样溶液浓度, 吸附流速, 洗脱剂性质——洗脱剂种类、洗脱剂的 pH、洗脱流速等<sup>[5]</sup>。本实验仅以产物纯度为指标筛选了树脂类型和洗脱溶剂, 在以后的研究中, 还将针对以上各因素, 优化工艺, 以提高其得率, 获取有效部位。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 157.  
[2] 聂波. 泽兰及地笋活性成分的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006: 7.  
[3] 聂波, 刘勇, 石晋丽, 等. 高效液相色谱法同时测定泽兰中咖啡酸和迷迭香酸[J]. 精细化工, 2009, 26(3): 258.  
[4] 何玲玲, 王新. 脱蛋白工艺对苦丁茶冬青叶多糖提取率的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(23): 6302, 6334.  
[5] 刘斌, 石任兵, 余超. 影响大孔吸附树脂吸附分离中草药化学成分的因素[J]. 中草药, 2002, 33(5): 475.

[责任编辑 全燕]

(上接第 21 页)

超临界流体萃取法使用的媒体主要是 CO<sub>2</sub>, 是廉价且无污染的, 而且此法大大缩短提取时间, 且能降低溶剂的残留量, 所以超临界流体技术是值得推广应用的提取、分离方法。

[参考文献]

[1] 吴纯洁, 蒲旭峰, 张朝燕. 气相色谱法测定安产乳剂中亚油酸和蓖麻酸的含量[J]. 中成药, 2006, 24(6): 456.  
[2] 林文群, 陈宏靖, 陈忠. 茺蔚子化学成分的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学学报), 2001, 17(2): 84.  
[3] 徐欣, 王远程, 杨峰, 等. 香椿籽油的制取精炼及品质分析[J]. 中国粮油学报, 1994, 9(3): 38.

[4] 鲁建江, 王莉, 陈宏伟, 等. 佩兰中挥发油的微波提取法[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(9): 774.  
[5] 刘晓冬, 阎雪, 卫永第, 等. 苍术挥发油成分的分析[J]. 分析测试学报, 1998, 17(3): 56.  
[6] Franz Muller, John Lee. A Convenient Method to Prepare Labile FMN Derivatives[J]. Molecules, 2001, 6: 825.  
[7] 安伟建. 中药益母草有效成分提取和测定方法的研究[J]. 天津药学, 2003, 6(3): 68.  
[8] 王威, 闫喜英, 李振宝, 等. 紫苏子中亚麻酸的气相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(5): 316.  
[9] 周景春, 孟冬娅, 石富成, 等. 大豆油、水分和铁对大豆磷脂酸值和碘值的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2001, 22(2): 90.

[责任编辑 全燕]