

不同型号大孔树脂对金荞麦中有效成分的纯化工艺考察

盛华刚*,朱立俏
(山东中医药大学,济南 250355)

[摘要] 目的:考察不同型号大孔树脂对金荞麦中有效成分的纯化效果。方法:以表儿茶素和金 E 的含量、浸膏率为指标,结合 HPLC 指纹图谱,选择最佳型号大孔树脂。结果:AB-8 型大孔树脂对表儿茶素洗脱率为 89.78%,对金 E 洗脱率为 93.04%。HPLC 指纹图谱共有峰面积比较表明 AB-8 型大孔树脂最适合用于金荞麦有效成分的纯化。结论:采用 AB-8 型大孔树脂纯化金荞麦中有效成分是可行的,且操作简单、稳定。

[关键词] 大孔树脂;金荞麦;纯化;指纹图谱

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0041-04

Investigation of Purification Technology for Effective Constituents from *Fagopyrum dibotrys* by Different Types of Macroporous Resin

SHENG Hua-gang*, ZHU Li-qiao
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] Objective: To investigate purification effect of different types of macroporous resin on effective constituents from *Fagopyrum dibotrys*. Method: With the content of epicatechin and mixture of proanthocyanidins tannic condensation, extract rate as indexes, optimum resin was selected by combining with HPLC fingerprint.

[收稿日期] 20120727(012)
[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J11LF30)
[通讯作者] *盛华刚,讲师,博士,从事中药新制剂的研究,Tel:0531-89628590,E-mail:shenghuagang@sina.com

质处方制备 3 批胃炎消巴布剂,测定评价指标,结果综合评分分别为 93,92,94。表明所选处方及工艺稳定可行。

3 讨论

NP-700 是一种新型的合成高分子材料,是部分被中和的聚丙烯酸,是丙烯酸和丙烯酸钠的值键共聚物,在基质成型时必须先同多价金属离子交联反应,才能使膏体成型,具有一定的内聚力。NP-700 溶解速率>聚丙烯酸钠,且成型后各项指标均优于聚丙烯酸钠,故选择 NP-700 作为增黏剂。处方中甘羟铝能促进基质交联,增加凝胶层的内聚力,但用量过多,会使膏体黏性降低;酒石酸为交联调节剂,可控制胶凝时间,使巴布剂易于涂布。巴布剂基质中含有多种水溶性高分子化合物,需用一定量水溶胀溶解后,再按顺序加入搅拌混合,为便于各类基质混匀,温度控制在 35℃左右,温度过高会使粘性下降,

水份蒸发过多,影响成型性。

[参考文献]

[1] 刘淑芝,郭春燕,金日显. 中药巴布剂研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):62.

[2] 张纪兴,王建平,朱峰,等. 均匀设计法优化跌打镇痛巴布剂的基质处方[J]. 中药材,2011,34(6):972.

[3] 许丛辉,李渊贞,张春霞,等. 中药巴布剂研究新进展[J]. 北京联合大学学报:自然科学版,2009,23(77):19.

[4] 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:附录 74.

[5] 白才堂,吕竹芬,谢清春,等. 正交试验优选竭红跌打巴布剂基质处方[J]. 中国药房,2011,10(31):2910.

[6] 李智勇,孙冬梅,杜建平. 均匀设计法优选癌痛巴布剂的基质处方研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3):1.

[责任编辑 全燕]

Result: Elution rate of epicatechin by AB-8 resin was 89.78%, elution rate of mixture of proanthocyanidins tannic condensation by AB-8 resin was 93.04%. Comparison of the common peak area of HPLC fingerprint showed that AB-8 resin was the most suitable one to purify effective constituents from *F. dibotrys*. **Conclusion:** This process of applying AB-8 resin to purify effective constituents from *F. dibotrys* was feasible, simple and stable and could be extended to large-scale production applications.

[**Key words**] macroporous resin; *Fagopyrum dibotrys*; purification; fingerprint

金荞麦具有清热解毒、排脓祛瘀的功效^[1],主治咽喉肿痛、痈疮、闭经等,其提取物具有明显的抗肿瘤作用,主要抗肿瘤活性成分是一类原花色素缩合性单宁混合物,称为金 E^[2]。本课题组前期研究表明以金 E 比吸附量为指标,D-101 型大孔树脂对金 E 有较好的纯化效果^[3]。本试验进一步以表儿茶素和金 E 为指标,结合 HPLC 指纹图谱考察不同型号大孔树脂对金荞麦中有效成分的纯化效果,为其下一步研究提供实验依据。

1 材料

L-2000 型高效液相色谱仪(日本日立公司),U-2000 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司),D101 型大孔树脂(天津海光化工有限公司),AB-8,DM130,HPD400,HPD600 型大孔树脂(河北沧州宝恩化工有限公司),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

表儿茶素、原儿茶酸、原儿茶醛、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 878-2001102,110809-200604,110810-200205,0080-9705),金荞麦药材购自济南建联中药店,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为蓼科植物 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 金荞麦提取液的制备^[3] 金荞麦粉碎成粗粉,加 70% 乙醇加热回流提取 3 次,第 1 次加 10 倍量提取 3 h,第 2,3 次加 5 倍量提取 1.5 h,合并提取液,回收乙醇,浓缩,加水定容至 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,摇匀,即得。

2.2 大孔树脂的处理 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,洗至洗涤液在试管中用水稀释不混浊时为止,用水反复洗至无醇味,备用。

2.3 表儿茶素的含量测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$),流动相乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90),检测波长 280 nm,柱温 35 °C,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称量表儿茶素对照品 3.04 mg 置 10 mL 量瓶中,加乙腈-0.01% 磷酸溶液(10:90)充分溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述对照品溶液 0.25,0.50,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 置 5 mL 量瓶中,吸取各溶液 40 μL ,注入高效液相色谱仪。结果表儿茶素在 $15.2 \sim 152 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈较好的线性关系,回归方程 $Y = 11\,121.6X - 4\,721.2$ ($r = 0.999\,9$)。

2.3.3 样品测定 精密吸取金荞麦提取液 5 mL,蒸干,残渣加甲醇转移置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)滤过,取续滤液测定含量。结果金荞麦提取液中表儿茶素质量浓度 $82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 金 E 的含量测定 以表儿茶素为对照品,采用紫外分光光度法于 280 nm 处测定吸光度(A)。

2.4.1 标准曲线的绘制^[3] 精密称取表儿茶素对照品 3.35 mg,置 5 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。分别精密量取上述对照品溶液 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL 置 5 mL 量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,于 280 nm 处测定 A。结果表儿茶素在 $13.4 \sim 107.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系,回归方程 $Y = 0.07 + 0.01X$ ($r = 0.999\,6$)。

2.4.2 样品测定^[3] 取金荞麦提取液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,混匀后取 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度。按 2.4.1 项下方法进行测定。结果金荞麦提取液中金 E 质量浓度为 $21.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 浸膏率测定 精密吸取金荞麦提取液 25 mL 置已干燥至恒重的蒸发皿中,蒸干,于 105 °C 烘 3 h,取出,置于玻璃干燥器中冷却后称定质量,计算浸膏率。结果金荞麦提取液的浸膏率为 8.87%。

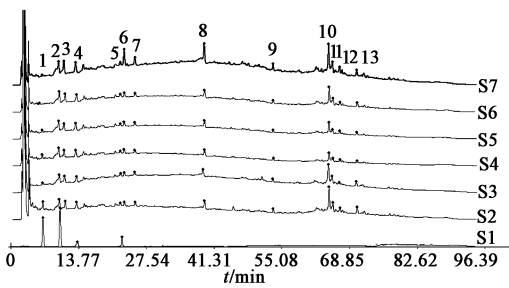
2.6 大孔树脂型号的选择 选择 D101,AB-8,DM130,HPD400,HPD600 等 5 种型号的大孔树脂,以表儿茶素和金 E 的洗脱率、浸膏率为指标,优选大孔树脂型号。取已经处理好的 5 种型号的大孔树脂装柱($1.5 \text{ cm} \times 11 \text{ cm}$),加入金荞麦提取液 15 mL,通过大孔树脂柱,流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,用 100 mL 水

洗脱,弃去水洗液,用 70% 乙醇 100 mL 洗脱^[3],收集洗脱液,流速 0.5 mL·min⁻¹,将 70% 乙醇洗脱液移至 100 mL 量瓶中,用 70% 乙醇稀释至刻度,备用。计算表儿茶素洗脱率分别为 54.56%,89.43%,51.65%,58.26%,52.92%;金 E 洗脱率依次为 94.12%,93.11%,90.49%,82.63%,76.35%;浸膏率分别为 5.86%,4.32%,4.02%,3.94%,3.58%。说明以表儿茶素洗脱率为指标,排列顺序为 AB-8 > HPD400 > D101 > HPD600 > DM130;以金 E 洗脱率为指标,排列顺序为 D101 > AB-8 > DM130 > HPD400 > HPD600;浸膏率大小排列顺序为 D101 > AB-8 > DM130 > HPD400 > HPD600。综合考察,AB-8 型大孔树脂对金荞麦提取液中的表儿茶素和金 E 均有较好的吸附和洗脱效果,因此采用 AB-8 型大孔树脂。

2.7 指纹图谱

2.7.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.01% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 35 min,10% ~ 25% A;35 ~ 55 min,25% ~ 35% A;55 ~ 85 min,35% ~ 50% A;85 ~ 95 min,50% ~ 10% A),检测波长 280 nm,柱温 35 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。见图 1。

2.7.2 数据分析 由图 1 可知,经大孔树脂纯化后的药液指纹图谱相似度较大,说明各种大孔树脂对金荞麦提取液中各成分结构无较大影响。本试验确定了 13 个主要成分峰,从左至右编号依次为 1 ~ 13 号,将 1,2,3,4 号峰作为 1 区峰;5,6,7 号峰作为 2



S1. 混合标准品溶液;S2. 金荞麦提取液;
S3 ~ S7 分别为 DM130,HPD600,HPD400,
D101,AB-8 型大孔树脂纯化后药液;
1. 原儿茶酸峰;2. 原儿茶醛峰;4. 表儿茶素峰;5. 芦丁峰
图 1 金荞麦提取液 HPLC 指纹图谱

区峰;8,9 号峰作为 3 区峰;10,11,12,13 号峰作为 4 区峰。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版分析指纹图谱相似度。过柱前后的指纹图谱相似度见表 1。大孔树脂纯化对 1,2,3,4 区峰的影响趋势大致相同,其各峰匹配数据见表 2。

表 1 金荞麦提取液纯化前后 HPLC 指纹图谱的相似度比较

No.	S2	S3	S4	S5	S6	S7	对照指 纹图谱
S2	1	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	1
S3	0.998	1	0.996	0.997	0.997	0.998	0.998
S4	0.999	0.996	1	1	1	0.999	1
S5	0.999	0.997	1	1	1	0.999	1
S6	0.999	0.997	1	1	1	1	1
S7	0.999	0.998	0.999	0.999	1	1	1
对照指纹 图谱	1	0.998	1	1	1	1	1

表 2 金荞麦提取液纯化前后 HPLC 指纹图谱匹配数据

No.	保留时间 /min	S2	S3	S4	S5	S6	S7	对照指纹 图谱
1	6.45	226 053	36 250	63 770	38 691	5 532	21 841	65 356
2	9.77	266 045	255 418	130 144	131 324	134 810	156 295	179 006
3	10.90	282 264	92 772	94 825	106 515	103 170	278 524	159 678
4	13.27	226 191	129 808	132 992	146 428	137 129	214 712	164 543
5	22.26	68 005	57 427	35 267	36 735	39 651	51 166	48 042
6	23.04	319 314	58 815	64 456	69 514	65 781	278 118	142 666
7	25.20	174 443	69 481	99 021	70 589	62 345	163 590	106 578
8	39.29	335 373	105 067	94 157	103 726	112 520	303 095	175 656
9	53.33	113 409	53 335	32 766	36 287	44 739	100 268	63 467
10	64.64	623 624	333 134	119 984	157 396	243 169	401 812	313 186
11	65.42	247 476	118 997	45 244	62 316	101 468	160 599	122 683
12	66.88	125 850	36 668	36 321	44 612	51 131	104 429	66 502
13	70.36	186 629	94 286	29 356	41 584	60 587	98 733	85 196

注:从 1 ~ 13 分别为图 1 中各主要成分峰。

由表 1 可知,各指纹图谱相似度均 >0.99,说明不同型号大孔树脂对药液皆具有明显的纯化效果。S3~S7 的相似度高,说明不同型号大孔树脂对药液的纯化效果相似,但因条件不同,纯化效果也有差别。由表 2 可知,S3,S4,S5,S6 损失较大,S7 损失较小。所以 AB-8 型大孔树脂较其他型号树脂更适合用于金荞麦提取液的纯化。

2.8 验证试验 选用 AB-8 型大孔树脂进行金荞麦提取液的纯化,进行 3 次验证试验,结果表儿茶素洗脱率分别为 89.84%,90.57%,88.93%;金 E 洗脱率分别为 93.02%,93.32%,92.77%;浸膏率依次为 4.40%,4.56%,4.28%。说明采用 AB-8 型大孔树脂纯化金荞麦中有效成分是可行的。

3 讨论

张雯杰等^[4]报道从金荞麦抗肿瘤有效部位中分离得到的 6 个酚性化合物中(-)表儿茶素、(-)表儿茶素-3-O-没食子酸酯、原矢车菊素 B-2,原矢车菊素 C-1 在 280 nm 附近皆有明显紫外吸收。光谱扫描发现表儿茶素对照品同本文方法制得的供试品溶液在 280 nm 处皆有最大吸收峰,方法学研究表明该方法准确可行,故本文以表儿茶素为对照品测定金荞麦中金 E 的含量。指纹图谱研究中分别采用了 235,254,280,324 nm 作为检测波长,发现在 280 nm 波长下基线较平稳,且色谱峰较多,分离度好,峰形较好,最终确定应用 280 nm 作为指纹图谱的检测波长。

指纹图谱研究中以乙腈(A)-0.01%磷酸溶液为流动相,考察了其他 2 种流动相系统,梯度洗脱流动相系统 1 为 0~20 min,10%~30% A;20~30 min,30%~40% A;30~50 min,40%~70% A;50~60 min,70%~10% A。梯度洗脱流动相系统 2 为 0~35 min,10%~25% A;35~55 min,25%~35% A;55~80 min,35%~65% A;80~90 min,65%~

10% A。结果表明使用流动相系统 1 时,基线漂移太严重;使用流动相系统 2 时,60 min 以后色谱峰分离不理想;而使用 2.7.1 项下流动相系统分离效果最理想。

以有效成分结合 HPLC 指纹图谱分析技术研究不同纯化方法对中药提取液中有效成分的影响,可为深入研究中药提取液的纯化效果提供依据^[5-7]。大孔树脂法对金荞麦提取液的纯化工艺简单,纯化后药液杂质少,通过表儿茶素和金 E 的含量测定结合 HPLC 指纹图谱、可更全面地对各种型号大孔树脂进行综合评价。研究结果表明,AB-8 型大孔树脂对金荞麦中有效成分具有较好的纯化效果,最适用于金荞麦提取液的纯化。

[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,2010:203.

[2] 林洪生. 金荞麦抗肿瘤研究进展[J]. 中西医结合学报,2004,2(1):72.

[3] 盛华刚,朱立俏,张超,等. 金荞麦提取液的大孔树脂分离纯化工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(15):1832.

[4] 张雯杰,李兴从,刘玉青,等. 威麦宁的酚性成分[J]. 云南植物研究,1994,16(4):354.

[5] 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.

[6] 陈积优,郭丽蓉,童玉林,等. 川芎 HPD-100 大孔树脂和醇沉纯化物指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):100.

[7] 李娆娆,王彩芳,黄兰岚,等. 大孔树脂处理对芫花药材 HPLC 指纹图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):4.

[责任编辑 仝燕]