

· 论著 ·

大孔吸附树脂分离纯化栀子豉汤有效部位的工艺研究

韩燕¹, 闻俊², 周婷婷^{1,2}, 范国荣² (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 研究大孔树脂分离纯化栀子豉汤有效成分的工艺条件及优化。方法 采用紫外分光光度法测定总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的量, 以总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的含量作为指标, 采用单因素实验考察上样液浓度、上样量、洗脱剂浓度及用量等对分离纯化工艺的影响。结果 最佳工艺条件: 上样液最佳吸附浓度为 0.1 g/ml (该浓度以每 1 ml 中所含生药材质量计), 上样量与树脂体积比是 2:1, 吸附时间 2 h, 依次用 1 BV (柱体积) 水, 6 BV 20% 乙醇洗脱, 6 BV 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液。结论 该纯化工艺合理、稳定, 可推广于工业生产。

[关键词] 栀子豉汤; 大孔吸附树脂; 分离纯化; 总环烯醚萜苷; 总大豆异黄酮

[中图分类号] R943

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)03-0238-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.012

The research of separation and purification technology for effective parts from Zhizichi decoction by macroporous absorption resins

HAN Yan¹, WEN Jun², ZHOU Tingting^{1,2}, FAN Guorong² (1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To optimize separation and purification technology of Zhizichi decoction by macroporous resins. **Methods** The content of total iridoid glycosides and total isoflavones were determined by ultraviolet spectrophotometry. Taking the content of total iridoid glycosides and total isoflavones as indexes, the effect of the concentration of sample solution, medicinal herbs on the amount of sample, concentration and volume of eluent was investigated by single factor test. **Results** The optimum separation and purification technology was as following: the concentration of sample solution was 0.1 g/ml, the volume ratio of resin to material drug was 2:1, the adsorption time was 2 h, and the sample was firstly eluted with 1 BV water, then 6 BV 20% ethanol and 60% ethanol, and the eluent was collected. **Conclusion** This optimized separation and purification technology was reasonable and stable, and it could be extended to large-scale production applications.

[Key words] Zhizichi decoction; macroporous absorption resin; separation and purification; total iridoid glycosides; total isoflavones

栀子豉汤出自张仲景所著《伤寒论》,由栀子和淡豆豉两味药材组成,其主要的有效成分是栀子中的环烯醚萜苷类和淡豆豉中的大豆异黄酮类。栀子豉汤在现代临床上有着广泛的应用价值,组方精练,二药配伍相得益彰,在现有的文献资料中看到其在临床疗效显著,安全性高^[1]。当前对栀子豉汤的临床应用表明该方可用于调节血脂,治疗抑郁焦虑、失眠、心烦,预防癌症及肝炎等病症,效果显著^[2-4]。

目前对于栀子豉汤中两类有效成分的分离研究都集中在单味药上^[5-7],对复方仅在提取方法上有所研究^[8],对有效成分的分离鲜有研究报道。为了充分地分离和保留栀子豉汤中的有效成分,更好地发挥药效,本实验利用大孔树脂的吸附容量大、再生简单、成本低廉、效果可靠、绿色环保等优点,通过考察大孔吸附树脂的分离纯化条件,优选最佳工艺条件,为栀子豉汤药效物质学基础的进一步研究以及工业化生产提供实验基础。

1 材料

UV2300 紫外可见分光光度计(上海天美),栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110749-200309)、染料木素对照品(深圳同田生物有

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30801541)

[作者简介] 韩燕,硕士研究生,研究方向:中药化合物组及代谢物组的多维色谱-质谱等新技术研究. E-mail: han123yan.ok@163.com

[通讯作者] 周婷婷,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药化合物组及代谢物组的多维色谱-质谱等新技术研究. Tel: (021) 81871261-82; E-mail: tingting_zoo@163.com

限公司,批号:04090801),D101型大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司),XS205DR电子天平(METTLER TOLEDO),紫外测定均采用30%甲醇水溶液作为溶剂,试剂均为分析纯。

栀子和淡豆豉分别购于上海童涵春堂中药饮片厂和浙江中医药大学中药饮片有限公司,经第二军医大学药学院生药教研室秦路平教授鉴定,分别为茜草科植物山栀(*Gardenia jasminoides* Ellis)的干燥果实,大豆(*Glycin max*)的种子炮制品。总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮粗提物由实验室人员从单味药材中分离纯化制得。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品3.02 mg置50 ml量瓶中,加30%甲醇定容至刻度,摇匀,得60.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的栀子苷对照品溶液;精密称取染料木素对照品5.62 mg置50 ml量瓶中,加30%甲醇定容至刻度,摇匀,得112.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的染料木素对照品溶液。

2.2 样品溶液的制备 栀子和淡豆豉按2:1的比例磨成粗粉,混匀,用50%的乙醇回流提取2次,每次1 h,过滤,合并滤液,离心,减压浓缩(60 $^{\circ}\text{C}$)至无醇味,加水稀释至2 g/ml(该浓度以每1 ml中所含总的生药材质量计)的上样液,备用。

2.3 最大吸收波长的确定 以30%甲醇分别配制一定浓度的栀子苷、染料木素对照品溶液和总环烯醚萜苷、总大豆异黄酮溶液,在紫外分光光度仪200~500 nm扫描,随行空白对照。结果表明,对照品和样品溶液分别在238 nm和260 nm处有最大吸收,且峰形相似,因此分别选238、260 nm作为总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的检测波长。

2.4 标准曲线的绘制 分别精密量取栀子苷和染料木素对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 ml于5 ml量瓶中,加30%甲醇定容至刻度,摇匀。以30%甲醇为空白,在238 nm波长处测量栀子苷的吸光度,在260 nm波长处测量染料木素的吸光度。

以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,分别绘制栀子苷和染料木素标准曲线方程,得栀子苷标准曲线回归方程为: $Y=0.0238X-0.0035$, $r=0.9999$,表明在6.04~30.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内总环烯醚萜苷浓度与吸光度呈良好的线性关系;染料木素标准曲线回归方程为: $Y=0.0134X+0.0045$, $r=0.9999$,表明在11.24~56.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内总大豆异黄酮浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.5 树脂预处理 取D101型大孔吸附树脂,经分样筛筛取20~80目的颗粒,用1 ml/L的盐酸溶液浸泡4 h,然后用去离子水洗至中性,用1 ml/L的NaOH溶液浸泡4 h。然后用去离子水洗至中性,再用95%乙醇浸泡约24 h后用去离子水洗至无醇味,装柱。

2.6 D101型大孔吸附树脂纯化工艺优选

2.6.1 上样液浓度考察 取“2.2”项下样品溶液适量,共7份,分别加水稀释至浓度为0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1 g/ml(该浓度以每1 ml中所含总的生药材质量计)。取D101型大孔吸附树脂1.85 g,分别加入上述样品液(相当于1 g总的生药材量),置于恒温摇床中振摇24 h后测定树脂静态吸附率。吸附率按下式计算。

$$\text{树脂的吸附量} = \frac{V \times (C_0 - C_1)}{M}$$

$$\text{树脂的吸附率} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

C_0 :树脂吸附前溶液中总环烯醚萜苷或总大豆异黄酮的浓度; C_1 :树脂吸附后溶液中总环烯醚萜苷或总大豆异黄酮的浓度; V :吸附液体积; M :树脂干重。

分别以总固形物、总环烯醚萜苷以及大豆异黄酮树脂吸附率对生药材浓度作图,见图1。树脂对样品的吸附一般在低浓度情况下有利,但样品液浓度太低则上样液体积太大,操作烦琐。故结合图中生药材浓度对树脂吸附率的影响趋势,本工艺中生药材的最佳吸附浓度为0.1 g/ml。

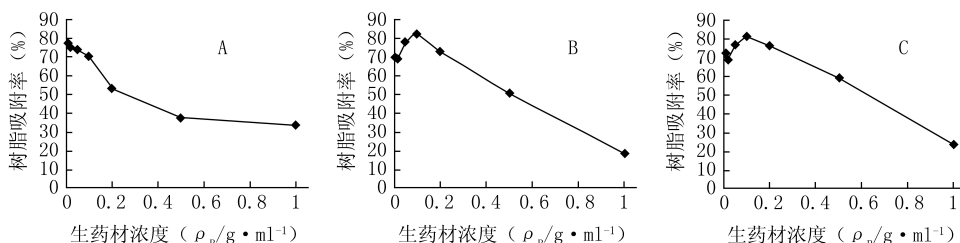


图1 不同浓度下D101型大孔吸附树脂的吸附率

A.总固形物;B.总环烯醚萜苷;C.总大豆异黄酮

2.6.2 树脂静态吸附平衡曲线的测定 称取预处理好的大孔吸附树脂适量,加入 0.1 g/ml 的样品液 20 ml,置于恒温摇床中振摇,于不同时间(0.5、1、2、4、6、8、10 h)取样并测定树脂对总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的吸附量 Q 。以 Q 对时间 t 制图,得到树脂对总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的静态吸附平衡曲线,见图 2。结果表明样品静态吸附 2 h 即可达到吸附平衡。

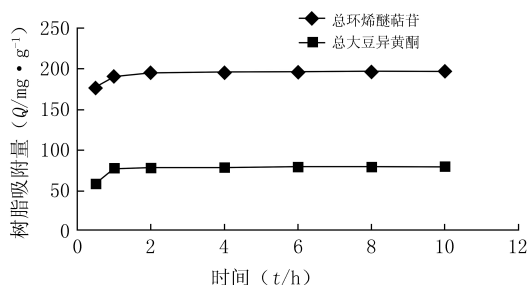


图 2 D101 型大孔吸附树脂对栀子豉汤中有效成分的静态吸附平衡曲线

2.6.3 洗脱溶剂解吸考察 在充分吸附样品后的大孔树脂中分别精密加入一定体积不同浓度乙醇(10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%)进行树脂解吸试验,置于恒温摇床中振摇 24 h,测定解吸液中总环烯醚萜苷和大豆异黄酮的含量,计算解吸率(图 3)。由图 3 可知,20% 的乙醇就可以把环烯醚萜苷基本洗脱出来,60% 的乙醇可以洗脱出大部分的大豆异黄酮。

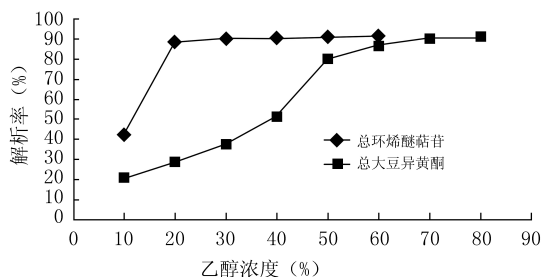


图 3 不同浓度乙醇洗脱液对栀子豉汤中有效成分的解吸率

2.6.4 泄露曲线 将 0.1 g/ml 的样品液缓慢地加到已预处理好的装有 40 ml 树脂的层析柱中,进行动态吸附。控制流速为 2 BV/h,按份收集流出液,每 10 ml 收集一份,测定流出液中总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的含量,当树脂不再吸附总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮时,停止上样,以流出液中总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的浓度对所加样品液体积制图,绘制泄露曲线(图 4)。由图 4 可知,当上样体积为 80 ml 时,总环烯醚萜苷开始明显泄露,总大豆异黄酮也开始泄

露,故确定最佳上样量与树脂体积比为 2:1。

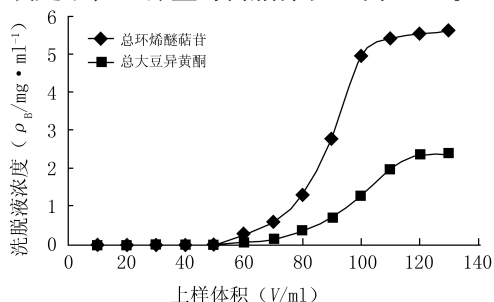


图 4 栀子豉汤中有效成分大孔树脂纯化工艺泄露曲线

2.6.5 洗脱溶剂用量考察 取活化好的 D101 树脂装柱,上样量为药材(ml)/树脂(ml)(2:1),样品液浓度为 0.1 g/ml,上样后静态吸附 2 h,先以 1 BV 的水洗脱,再用 20% 乙醇解吸,分段收集洗脱液(以树脂床体积计),最后用 60% 乙醇解吸,分段收集洗脱液,测定洗脱液中总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的浓度,以总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的浓度对体积制图,绘制洗脱曲线(图 5)。由图 5 可知,前 1 BV 为水洗脱,在此期间环烯醚萜苷有效成分基本没有流失;从第 2 BV 开始为 20% 乙醇洗脱,洗脱 6 BV 后环烯醚萜苷基本被洗脱,同时大豆异黄酮也开始被洗脱出来,此时用 60% 的乙醇洗脱 6 BV 后大豆异黄酮基本被洗脱,由此可见本工艺可以很好地分离纯化栀子豉汤中的两类有效成分。

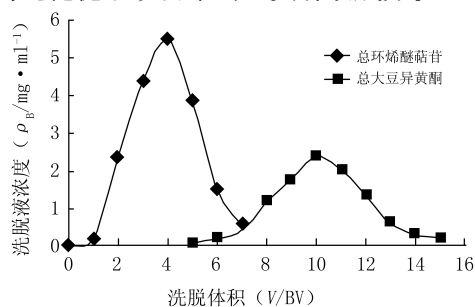


图 5 栀子豉汤中有效成分洗脱曲线

2.7 验证试验 按上述优选工艺制备 3 批样品液,测定总环烯醚萜苷和总大豆异黄酮的含量。结果见表 1。表明优选的工艺稳定可行。

表 1 栀子豉汤纯化工艺验证试验 3 批样品的结果 (n=3)

批次	乙醇提取物得率 (%)	乙醇洗脱物得率 (%)		纯度 (%)	
		总环烯醚萜苷	总大豆异黄酮	总环烯醚萜苷	总大豆异黄酮
1	23.1	8.25	6.50	73.9	58.9
2	20.5	7.42	5.48	72.8	58.2
3	21.8	8.03	5.88	71.6	57.8

3 讨论

药材粗提物的水溶液中还有很多不溶性的杂质,如果直接上大孔树脂会堵塞大孔树脂,影响分离纯化效果,因此在上样前应对样品液进行一定的前处理。洗脱溶剂为乙醇溶液,成本低廉且绿色环保,不污染环境。本实验中严格控制水和乙醇的用量,先用少量的水洗脱,既可以洗掉大量的水溶性成分,又能避免环烯醚萜苷中极性大的成分被洗脱出来,控制20%乙醇的用量,在环烯醚萜苷类成分基本洗脱出来的同时减少大豆异黄酮成分的流失。本实验优选的最佳纯化工艺是上样液吸附浓度为0.1 g/ml(该浓度以每1 ml中所含生药材质量计),上样量与树脂体积比是2:1,吸附时间2 h,依次用1 BV水,6 BV 20%乙醇洗脱,6 BV 60%乙醇洗脱。按照此工艺分离纯化栀子豉汤中的有效成分,总环烯醚萜苷的平均得率和纯度分别为7.9%、72.7%;总大豆异黄酮的平均得率和纯度分别为6.0%、58.3%。本实验中的优化工艺使栀子豉汤中的两类有效成分得到了很好的分离,得率和纯度也很高,且成本低,绿色环保无污染,适合大规模的工业化生产,并为栀

子豉汤进一步开发和研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 范越,田明,王秀海,等. 栀子豉汤临床和实验研究进展[J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 118-119.
- [2] 田义龙,赵静,任艳青,等. 栀子豉汤对胰岛素抵抗的改善作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2010, (6): 5-7.
- [3] 张超云,谢东霞. 栀子豉汤治疗抑郁症有效部位的筛选研究[J]. 中华中医药刊, 2011, 29(11): 2493-2494.
- [4] 袁圣龙. 栀子豉汤在心身疾病治疗中的应用[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(6): 76-77.
- [5] 杨军宣,赵成城,刘昊. 栀子环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1756-1759.
- [6] 彭柳,范开静,熊清平. 大孔树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 20-24.
- [7] 郭文勇,刘彬果,钟蕾,等. 大孔树脂吸附层析法提取淡豆豉总异黄酮的研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(9): 1003-1034.
- [8] 王虹玉,喇孝瑾,白素芬,等. 正交试验法优选栀子豉汤的水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 36-38.

[收稿日期] 2014-12-18 [修回日期] 2015-01-28

[本文编辑] 陈静

(上接第237页)

- [6] 蔡金平,董琳,关薇薇,等. 裸花紫珠的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.
- [7] 九芝堂股份有限公司. 一种裸花紫珠提取物及其制备方法、制剂和用途[P]. 中国, CN101623394A, 2009-01-12.
- [8] 张洁,柳文媛,冯锋. 裸花紫珠的化学成分研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(9): 77-79.
- [9] 张洁,李宝泉,冯锋,等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297-3301.
- [10] 王祝年,韩壮,崔海滨,等. 裸花紫珠的化学成分[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(4): 359-362.
- [11] 梁纪军,徐凯,李留法,等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(26): 3161-3162.
- [12] Mei WL, Zhuang H, Cui HB, et al. A new cytotoxic iridoid from *Callicarpanudiflora* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(10): 899-904.
- [13] Liang JJ, Qi JL, Li L, et al. Flavonoids from *Callicarpanudiflora* leaves [J]. Chem Nat Compd, 2011, 47(1): 110-111.
- [14] 杨远珊. 裸花紫珠片的临床应用进展[J]. 临床合理用药, 2012, 5(9): 151-153.
- [15] 倪海峰,赵淑英. 裸花紫珠片用于上环后止血的临床观察[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(26): 3426-3427.
- [16] 席作武,高宗跃,牛明了. 裸花紫珠片治疗肛肠术后出血128例[J]. 陕西中医, 2009, 30(9): 1155.
- [17] 段晓东,汪淑英,李晓静,等. 裸花紫珠片在鼻腔鼻窦术后止血的临床应用[J]. 中国伤残医学, 2009, 17(3): 59-60.
- [18] 薛焱,王同智. 蒙药材阿给(冷蒿)止血活性部位的药理学

筛选研究[J]. 青岛医药卫生, 2012, 44(1): 40-42.

- [19] 张玉萍,余琼. 三七素的止血活性及其神经毒作用实验研究[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(1): 98-99.
- [20] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 179-185.
- [21] 王杉,青桂玲,韦颖,等. 白花九里明提取液对小鼠出血时间、凝血时间和血小板数量的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(9): 1228-1230.
- [22] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学[M]. 16版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 569.
- [23] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 684.
- [24] 刘萍,刘文波,张婧,等. 仙脉通胶囊对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 中医药信息, 2012, 29(6): 40-41.
- [25] 金松今,张红英,朴惠顺. 桃仁乙醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 延边大学医学学报, 2010, 33(2): 98-99.
- [26] 吴久健,孟岳良,邹丽华,等. 白及不同提取部位对小鼠止血活性实验[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(3): 206-207.
- [27] 郭雪婷,杨晓君,王颖. 复合红花黄色素抗凝血作用研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(9): 1759-1763.
- [28] 白东鲁,陈凯先. 高等药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 1017-1019.
- [29] 董珂. 大孔树脂技术在中药研究中的应用概况[J]. 药学实践杂志, 2006, 4(1): 13-16.

[收稿日期] 2013-10-27 [修回日期] 2014-05-22

[本文编辑] 陈静