

大孔吸附树脂分离纯化龙胆药材中龙胆苦苷和马钱子苷酸的研究

李文龙¹, 陈军辉^{1,2}, 吴凤琪¹, 杨佰娟¹, 殷月芬^{1,2}, 王小如^{1,3}

(1 国家海洋局第一海洋研究所现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061; 2 中国海洋大学化学化工学院, 青岛, 266003; 3 厦门大学化学化工学院化学系 现代分析科学教育部重点实验室, 厦门 361005)

关键词: 大孔吸附树脂; 龙胆; 龙胆苦苷; 马钱子苷酸; 分离纯化

摘要: 目的: 建立利用大孔吸附树脂对龙胆药材中龙胆苦苷和马钱子苷酸进行富集和分离纯化的方法。方法: 采用加速溶剂萃取法对龙胆药材中两种有效成分进行高效提取, 比较了 D301, AB-8, D101, XDA-1 四种大孔树脂对龙胆苦苷和马钱子苷酸的吸附性能, 最终确定采用 D301 型大孔树脂对二者进行富集吸附, 对其工艺参数进行优化, 全程采用高效液相色谱进行目标化合物浓度检测。结果: 化优后的工艺参数为: 上样浓度: 0.2 g/mL, 最大上样量: 0.25 g 龙胆药材 /g 树脂, 最佳静态吸附时间: 8 h, 采用 8% 和 55% 的乙醇溶液对龙胆苦苷和马钱子苷酸分别进行洗脱; 龙胆苦苷和马钱子苷酸分别富集在 8% 和 55% 的乙醇洗脱液中, 洗脱液浓缩后冷冻干燥, 可得到纯度分别为 74.3% 和 80.9% 的粗产物, 龙胆苦苷和马钱子苷酸的回收率分别为 70.11% 和 67.82%。结论: 此法效率较高, 操作简便, 即可用于实验室制备少量的难以购置的标准品, 也可进行放大研究, 用于工业生产。

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2008)04-0522-04

龙胆 (*Radix Gentianae*) 又名胆草、水龙胆、山龙胆草、四叶草, 为龙胆科植物龙胆 (*Gentiana scabra* Bge.) 的根及根茎, 性寒, 味苦, 可用于清热燥湿, 泻肝胆火。其主要化学成分为裂环烯醚萜苷类化合物三萜类化合物, 多糖类化合物以及生物碱等^[1~3]。龙胆苦苷 ($C_{16}H_{20}O_9$) 和马钱子苷酸 ($C_{16}H_{24}O_{10}$) 是龙胆药材中含量较高的两种活性成分。大孔吸附树脂 (macro porous absorbing resin) 是 20 世纪 70 年代发展起来的一类有机高分子聚合物树脂, 它是具有三维空间网状结构的高分子聚合物, 理化性质稳定, 不溶于酸、碱及有机溶剂, 对有机物的选择性较好, 不受无机盐及强离子低分子化合物的影响。常用的大孔吸附树脂有苯乙烯型、丙烯腈型及丙烯酸酯型等。大孔吸附树脂为吸附和筛选原理相结合的分选材料, 同时具有吸附性和分子筛性, 不仅可以除去中草药中存在的生物大分子, 而且可根据小分子之间的极性不同将其分离开来, 特别适用于极性和弱极性化合物的分离纯化。其吸附机理主要有物理吸附作用、化学吸附作用和氢键吸附作用 3 种。应用大孔树脂可富集和纯化的中草药有效成分主要包括黄

酮、皂苷、生物碱以及其它苷类^[4~7]。目前, 国内外仅有两篇文献报道应用大孔吸附树脂对龙胆苦苷进行吸附纯化^[8,9], 而采用同一种树脂对两种有效成分进行分离纯化尚未见有文献报道。本试验探索采用大孔吸附树脂富集分离纯化龙胆苦苷和马钱子苷酸, 并对大孔树脂纯化后的粗品进行进一步的纯化, 得到了纯度均在 95% 以上的标准品, 效果较为满意。

1 仪器与试剂

1100 型 HPLC 仪, 配有二极管阵列检测器 (DAD), 四元泵, 自动进样器 (美国 Agilent 公司), ASE-100 型加速溶剂萃取系统 (美国 DIXON 公司), 旋转蒸发仪 R201 (上海申生科技有限公司), FD-1 冷冻干燥机 (北京博医康技术公司), Nu-6382E 型超低温冰箱 (美国 NuAire 公司), AJ100 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

甲醇, 乙醇为分析纯试剂, 乙腈, 冰醋酸为色谱纯试剂, 实验用水为 MilliQ 超纯水。

大孔吸附树脂: D301, AB-8 型购自南开大学化工厂, D101 型购自天津市海光化工有限公司, XDA-

收稿日期: 2007-04-12

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20235020), 青岛“2004 将才计划” (04-3-J11) 和共建生物医药研发测试中心 (LS-05-KJZX-76) 资助。

作者简介: 李文龙 (1980~), 男, 硕士研究生, 主要从事天然产物有效成分的分离纯化、结构表征, 及其质量控制研究, 电话: 0532-88961002。

1型购自西安蓝深公司。

本试验所采用的龙胆样品由山东绿叶制药集团提供,产地为内蒙古。龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品购自中国药品生物制品检定所。

2 方法、结果与讨论

2.1 上柱液的准备

供试样品(粉碎,过 60目筛)在 50 °C烘箱中干燥 10 h,准确称取 10 g以 80: 20的乙醇:水为溶剂,对样品进行加速溶剂萃取,萃取温度为 100 °C,压力为 1 400PSI,萃取时间为 10 min,萃取 3次,洗脱体积为萃取体积的 60%。提取液经旋转蒸发至无醇味,用 20 mL CHCl₃萃取 3次,弃去氯仿相,将水相定容至 50 mL,即得上柱液。

2.2 龙胆苦苷和马钱子苷酸的含量测定方法

本实验过程中需对多种提取液,洗脱液,粗产物和最终目标产物进行含量测定和纯度检验,均采用本方法进行分析。

2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Altima C₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 A: 0.2% 乙酸溶液, B: 色谱纯乙腈,梯度洗脱 t₀~ 20 min, B%: 10% ~ 40%,进样量: 20 μL,流速: 1.0 mL/min,柱温: 25 °C,检测波长: 238 nm。

2.2.2 对照品溶液配制及标准曲线绘制

分别准确称取 10.0 mg龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品,放入 10 mL量瓶中,用甲醇溶解定容,制成 1 g/L的储备液。分别自动进样对照品溶液 2.5, 10, 15, 20 μL,记录色谱图,测定峰面积值,以峰面积对进样量回归,得龙胆苦苷线性回归方程为: $Y = 6.4355233X + 87.3623$, $r = 0.9996$ 马钱子苷酸线性回归方程为: $Y = 5.8991841X + 102.5487$, $r = 0.9985$ 两种对照品在 0.2~ 20 μg之间与峰面积

值呈良好的线性关系。实验所需进行含量分析的样品,在测出色谱峰信号强度后,均采用以上两个方程进行线性回归计算,得到含量结果。

2.3 龙胆苦苷和马钱子苷酸的吸附与分离

2.3.1 树脂的预处理

称取大孔树脂 20 g置于三角瓶中,依次用 100 mL丙酮和 100 mL乙醇浸泡过夜,然后进行乙醇湿法装柱,并在柱上用乙醇流动清洗,不时检查流出液,至其不呈白色浑浊为止,然后用大量的去离子水清洗至流出液无醇味。

2.3.2 树脂的筛选

将上柱液 25 mL分别通过 4种不同型号的已进行预处理的树脂柱 (20 g),进行静态吸附 8 h,吸附结束后,先用 100 mL去离子水洗脱,然后依次用 8%和 55%乙醇各 100 mL洗脱,分别收集各洗脱过程的洗脱液,利用 2.2项所述的方法对洗脱液中龙胆苦苷和马钱子苷酸含量进行测定,以比吸附量 (mg/g),解吸率 (%),及纯度 (%)为评价指标,筛选最佳树脂,以上三个参数的计算公式分别如下:

比吸附量 = (M_{上样} - M_残 - M_{水洗}) / W, 其中 M_{上样}: 上样液中的目标成分质量; M_残: 上柱液中超出最大吸附量部分中目标成分的含量; M_{水洗}: 水洗液中的目标成分质量; W: 大孔吸附树脂的干重。

解吸率 = M_{洗脱} / M_{吸附} × 100%, 其中 M_{洗脱}: 解吸液中目标成分含量; M_{吸附}: 总吸附量。

纯度 = M_{成分} / M_{总固体} × 100%, 其中 M_{成分}: 得到的粗品中目标成分含量; M_{总固体}: 粗品质量。

式中各数值的测定均是在 2.2.1项下的色谱条件下分析对应的样品溶液,然后根据 2.2.2项下所得到的回归方程求得。测定结果如表 1所示。

表 1 4种不同类型大孔吸附树脂对龙胆苦苷和马钱子苷酸的吸附特性

树脂型号	比吸附量 /mg/g		解吸率 /%		纯度 /%	
	龙胆苦苷	马钱子苷酸	龙胆苦苷	马钱子苷酸	龙胆苦苷	马钱子苷酸
AB-8	8.63	4.22	74.28	75.26	72.56	42.36
D301	10.49	6.67	81.39	88.36	74.32	80.91
D101	7.44	5.19	66.50	70.32	66.79	58.20
XDA-1	7.60	4.38	67.94	55.21	42.58	53.20

结果表明, D301型大孔吸附树脂无论是任何指标,均优于其他树脂,因而选用该类型的树脂进行龙胆苦苷和马钱子苷酸的富集,分离和纯化。

2.3.3 D301型大孔吸附树脂纯化龙胆苦苷和马钱子苷酸的工艺参数研究

2.3.3.1 上样浓度的确定

按照 2.1项上柱液的制备方法,分别制备了浓度为 0.1 g/mL, 0.2 g/mL, 0.5 g/mL的上柱液,将 3种不同浓度的上柱液分别通过树脂柱,进行吸附洗脱,结果表明浓度为 0.2 g/mL时,龙胆苦苷和马钱

子苷酸的回收率(每克药材得到的粗品)均为最高,因此上样浓度以 0.2 g/mL 为宜。

2.3.3.2 最大上样量的考察

分别将 5、10、15、20、25、30 mL 0.2 g/mL 的龙胆药材提取液通过树脂柱(20 g),进行充分吸附后,收集水洗脱残留液,利用 2.2 项所述的方法对洗脱液中龙胆苦苷和马钱子苷酸含量进行测定,结果表明,当上样量增至 30 mL 时,残留液中龙胆苦苷和马钱子苷酸显著增加,即开始出现泄漏,因此确定龙胆药材提取液的最大上样量为 25 mL,即 0.25 g 龙胆药材 /g 树脂。

2.3.3.3 最佳静态吸附时间的选择

分别考察了经过不同时间的静态吸附后,水洗残留液中龙胆苦苷和马钱子苷酸的含量,以 24 h 的吸附量为参照,吸附量随吸附时间的变化曲线如图 1 所示,由图可以看出,随着时间的增加,吸附量会逐渐增加,但当静态吸附时间增至 8 h 时,吸附量增幅显著降低,基本趋于平稳,综合考虑吸附效率和时间因素,选择 8 h 为最佳静态吸附时间。

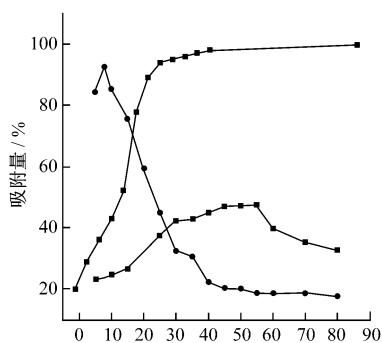


图 1 吸附量随时间变化的曲线

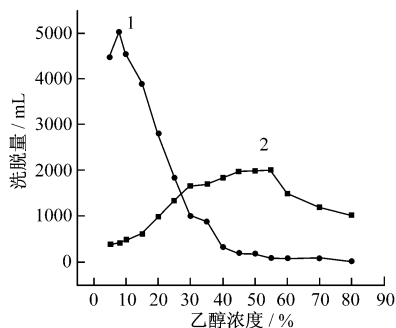


图 2 目标成分的洗脱曲线

1 龙胆苦苷 2 马钱子苷酸

2.3.3.4 洗脱剂的选择

按照上述确定的工艺条件,将 0.2 g/mL 药材提取液 50 mL 通过 40 g D301 大孔吸附树脂装填的吸附柱,然后依次用 5% ~ 100% 浓度逐渐增加的乙醇溶液各 50 mL 进行洗脱,利用 2.2 项所述的方法对

洗脱液中龙胆苦苷和马钱子苷酸含量进行测定,作出洗脱曲线如图 2 所示,由洗脱曲线可以看出,乙醇浓度为 8% 时,洗脱液中龙胆苦苷含量最高,而乙醇浓度为 55% 时,洗脱液中马钱子苷酸含量最高,因而选用浓度分别为 8% 和 55% 的乙醇溶液各 250 mL 对两种目标化合物进行分别洗脱。根据龙胆苦苷和马钱子苷酸标准品在 C8 反相色谱柱上的流出顺序来看,马钱子苷酸极性比龙胆苦苷极性更强,但在 D301 大孔吸附树脂上,采用较低浓度的乙醇溶液(极性较强)可将极性较弱的龙胆苦苷先行洗脱,可见大孔吸附树脂的吸附机理并非仅仅基于极性的强弱,树脂和样品组分之间还可能还存在其他形式的作用力,目前正在进行更为深入的研究。

2.3.4 龙胆苦苷和马钱子苷酸粗品纯度和回收率的测定

将 50 mL 0.2 g/mL 龙胆药材提取液通过 40 g 大孔吸附树脂装填而成的树脂柱进行吸附洗脱,分别用 8% 和 55% 乙醇溶液各 250 mL 进行洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发浓缩至适当体积(约 1~2 mL),放入超低温冰箱进行冷冻后,进行冷冻干燥,得龙胆苦苷粗品 0.2633 g 马钱子苷酸粗品 0.1182 g 取适量粗品溶解,按照 2.2 项所示的色谱条件进行分析,分析结果与标准品进行对照,计算其纯度,分别可达到 74.3% 和 80.9%。与供试品中两种目标成分的含量(龙胆苦苷含量为 2.79%, 马钱子苷酸含量为 1.41%)进行比较,可计算出两种目标成分的回收率,龙胆苦苷和马钱子苷酸的回收率分别为 70.11% 和 67.82%。上柱液和两种粗品的色谱图如图 3 所示。

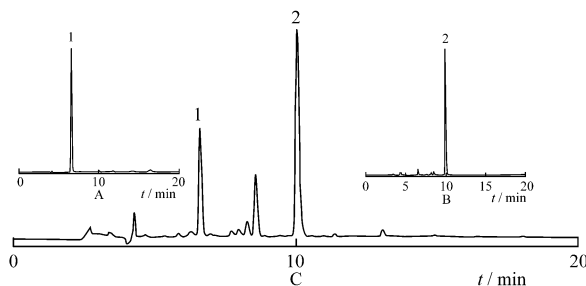


图 3 龙胆药材提取液和大孔树脂分离纯化后的马钱子苷酸(1)和龙胆苦苷(2)粗产物色谱图

A 马钱子苷酸粗品 B 龙胆苦苷粗品 C 上柱液

2.3.5 龙胆苦苷和马钱子苷酸标准品的制备

取龙胆苦苷和马钱子苷酸粗品各 100 mg 溶解于 1 mL 甲醇溶液中,然后利用半制备柱在高效液相色谱仪上进行少量制备,半制备柱色谱条件:色谱柱

为 ZORBAX ODS C₁₈半制备柱 (250 mm × 9.4 mm, 5 μm), 流动相为 30% 甲醇水溶液, 进样量为 100 μL, 流动相流速: 2.5 mL/min, 柱温: 25 °C, 检测波长: 238 nm。分别接取保留时间分别为 6.4~6.9 min (马钱子苷酸)和 9.4~10.2 min(龙胆苦苷)时的色谱流出物, 共接取 10次, 合并接取液, 旋转蒸发浓缩后进行冷冻干燥, 分别可得纯品 68.2 mg和 70.6 mg 对其行 HPLC 分析, 根据 HPLC 工作站上的 DAD 识别软件进行分析, 两个色谱峰对应的化合物均为纯组分。与购买得到的龙胆苦苷和马钱子苷酸对照品进行对比计算, 本文所得两种标准品的纯度分别为 95.36% 和 96.79%, 均大于 95%, 可作为标准品用于定量分析。由于半制备色谱柱柱效较低, 而龙胆提取液中成分较为复杂, 直接进入半制备色谱柱不能进行有效分离, 而在过大孔吸附树脂纯化后的粗产物中, 龙胆苦苷和马钱子苷酸纯度已经达到较高水平, 在半制备柱上很容易实现与其他组分的分离, 从而能够得到纯度较高的标准品。

3 结论

龙胆苦苷和马钱子苷酸为龙胆药材中含量较高且具有药效作用的两种成分, 采用现代化的提取、纯化手段将其开发为二类新药 (中药制剂) 是较为可行的, 本实验即是做了这方面的基础性研究。本文所建立的龙胆药材中两种含量较高的活性成分的

分离, 纯化与标准品制备技术既可用于实验室制备少量标准品, 也可进行放大研究, 应用于工业提取, 具有较强的实用意义, 对于其他药材中有效成分的分离纯化表征, 也具有一定的借鉴作用。

致谢: 烟台哈博生物技术有限公司提供产地明确的优质龙胆药材, 南京大学张一鸣同学提供相关参考文献。

参考文献:

- [1] Kakuda R, Iijima T, Yaoita Y, et al. Triterpenoids from *Gentiana scabra* [J]. *Phytochem*, 2002, 59: 791-794.
- [2] 罗集鹏, 楼之岑. 龙胆药材中龙胆苦苷、当药苦苷和当药苷的分离与鉴定 [J]. *中草药*, 1986, 17(4): 1-4
- [3] 杨书彬, 王承. 龙胆化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2005, 33(6): 54-56.
- [4] 张虹, 柳正良, 王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用 [J]. *中国医药工业杂志*, 2001, 32(1): 41-44
- [5] 黎海彬, 李小梅. 大孔吸附树脂及其在天然产物研究中的应用 [J]. *广东化工*, 2005, 3: 22-25
- [6] 米靖宇, 宋纯清. 大孔吸附树脂在中草药研究中的应用 [J]. *中成药*, 2001, 23(12): 914-917
- [7] 李平华, 王兴文. 大孔吸附树脂在中药有效成分分离纯化中的研究进展 [J]. *云南中医学报*, 2003, 26(3): 43-46
- [8] 耿平, 查建莲, 付焱, 等. 大孔吸附树脂对龙胆中龙胆苦苷吸附分离研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(8): 879-881.
- [9] 才谦, 刘涛, 付玉芹, 等. 大孔吸附树脂法富集龙胆中裂环烯醚萜苷类成分的实验研究 [J]. *中成药*, 2003, 25(4): 271-272

《制药工业水污染物排放标准》上半年出台 原料药企业成本将倍增

国家环境保护制药废水污染控制工程技术中心权威专家、《制药工业水污染物排放标准》主要起草人之一任立人在接受记者采访时谈到新标准对企业影响时表示, 成本的增加主要体现在运行成本上, 粗略估计一般企业因为新标准而增加的运行成本在 100% 以上。华药集团的一位人士告诉记者, 即使对于华药这样治污技术较成熟的大型原料药企业, 成本也要增加一倍以上。由此可见, 对于那些原本不注意治污的企业, 新标准更将带来其成本的倍增。

对于行业影响, 任立人着重指出, 标准对行业产生的影响将是十分深远的。“一批落后的、低水平重复建设、以牺牲环境为代价和依靠廉价劳动力的超标污染企业将难以生存, 只有生产工艺技术先进、有社会责任感的环保达标企业才能获得生存发展的机会。”他说, “新规将会推动医药产业升级的步伐, 推进企业节能减排工作。同时起到保护先进, 淘汰落后的作用, 行业会面临重新的洗牌。”

从具体细分行业上看, 他指出, 对污染严重的化学合成类, 发酵类和提取类原料药生产企业影响较大, 对产污量较少的制剂类生产企业影响相对小。不过, “这也会促使我国医药产业结构从重污染的原料药型向轻污染的制剂型加快调整, 弥补我国在医药剂型上开发的软肋。而医药剂型的开发相对容易, 生产过程产污少。”他认为。

那么, 原料药企业应该如何面对呢? “新《标准》的即将颁布实施, 对国内所有制药企业都是一个严峻的挑战, 企业应看清当前大的形势, 去积极面对。标准严了, 会促使大家自觉把本企业的环保事情做好。也会促使企业引进先进技术、节能降耗, 推动技术进步和提高工艺水平, 向国际先进企业靠拢。目前包括华药集团在内的国内一些大型制药企业都在加大污染处理设施改造力度, 推进企业清洁生产, 节能减排、加速产业结构调整, 为新《标准》的颁布实施做准备。”任立人指出。

目前, 业内普遍担心的是会不会出现各地标准不一, 东部重污染企业向内地转移的情况。任立人认为, 这种情况会被得到有效控制的, 首先, 《制药工业水污染物排放标准》属国家标准, 在一般的情况下任何地方《标准》限值都是统一的, 地标只能严于国标, 而不能宽于国标, 任何地方都不是高污染企业的“天堂”, 各地政府都不会保护重污染企业。

对于《制药工业水污染物排放标准》何日出台的问题, 任立人表示, 现在还处在对《标准》征集意见的处理阶段, 对每一条意见标准编制组都要认真研究、处理, 并将这些意见进行归类, 对《标准》内容进行进一步修改、补充、完善, 并经过专家评审等《标准》审核程序, 最后报主管部门批准后颁布, 他说目前来看, 标准没有大的问题, 制订过程非常严谨。业内非常关注, 环保总局作为主管部门对此也非常关注, 抓得很紧, 今年上半年定会推出。”

(信息由新华社提供)