

# 大孔吸附柱色谱法优选接骨木的纯化工艺\*

韩 华,殷 鑫,杨炳友,杨 柳,夏永刚,王秋红,匡海学\*\*

(黑龙江中医药大学北药基础与应用研究教育部重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室 哈尔滨 150040)

**摘 要:**目的:优选接骨木的纯化工艺。方法:以莫诺苷为指标,采用不同型号大孔吸附树脂优选接骨木根皮乙醇提取物的最佳纯化工艺。上样量小于 1:250(莫诺苷:树脂)的接骨木醇提取物,水洗脱通过 AB-8 型大孔吸附柱色谱,弃去 20 倍柱体积的水洗脱液,以 10%乙醇完全洗脱,洗脱液,浓缩,冷冻干燥,即得接骨木总苷。结果:总苷中莫诺苷含量大于 50%。结论:该提取工艺简单、可靠、重复性好,适用于工业生产。

**关键词:**接骨木 莫诺苷 大孔吸附柱色谱 纯化工艺

doi: 10.11842/wst.2013.09.008 中图分类号:R284.2 文献标识码:A

接骨木(*Sambucus williamsii* Hance.)为忍冬科(*Caprifoliaceae*)接骨木属(*Sambucus linn*)植物,具有较好的促进骨折愈合作用<sup>[1]</sup>。接骨木根皮中的主要有效成分为环烯醚萜苷类化合物,其中莫诺苷的含量最高。前期以莫诺苷含量为指标优选接骨木根皮的提取工艺,得到提取物中莫诺苷的含量约为 13%<sup>[2]</sup>,距中药新药 5 类的要求(有效部位占总提取物的 50%)甚远。本实验采用大孔吸附柱色谱法开展接骨木的纯化工艺研究,旨在使有效部位含量达到中药新药 5 类的要求。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

KQ-250B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;DZF-6090 型真空干燥箱,上海恒科技仪器有限公司;101A-1E 型电热鼓风干燥箱,上海实验仪器有限公司;R201B 旋转蒸发仪,上海申胜生物

技术有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司;LC-2010 高效液相色谱,日本 SHIMADZU 公司。

### 1.2 试药

接骨木根皮醇提取物(每 1 g 含 0.028 01 g 莫诺苷),自制;莫诺苷对照品(纯度>98%),自制;甲醇为色谱纯,美国 DIKMA 公司;HPD-417、HPD-450A、HPD-400、HPD-600、HPD-100、DM130 型大孔吸附树脂,沧州宝恩吸附材料科技有限公司;AB-8、D3520、NKA-II、NKA-9、S-8 型大孔吸附树脂,南开大学化工厂。

## 2 方法与结果

### 2.1 莫诺苷的含量测定方法

称取样品约 5 mg,精密称定,于 5 mL 容量瓶中,加 30%甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 样品溶液,作为供试品溶液。分别精密吸取各供试品溶液 10  $\mu$ L,进样检测。

收稿日期:2013-03-07

修回日期:2013-03-30

\* 国家自然科学基金委面上项目(81173501):接骨木促进骨折有效成分及作用机制研究,负责人:杨炳友;黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划(B201201):接骨木促进骨折有效成分及作用机制研究,负责人:杨炳友;黑龙江中医药大学博士创新基金项目(B201003):莫诺苷类化合物的构效关系研究,负责人:韩华。

\*\* 通讯作者:匡海学,本刊编委,教授,博士,主要研究方向:中药及复方药效物质基础研究。

## 2.2 大孔吸附树脂的选择

### 2.2.1 动态吸附实验

精密称取经预处理的各种不同型号大孔吸附树脂 (HPD-417、HPD-450A、HPD-400、HPD-600、HPD-100、DM130、AB-8、D3520、NKA-II、NKA-9、S-8) 50 g, 水湿法装柱, 树脂床体积为 100 mL。称取 3 g 接骨木根皮醇提取物精密称定, 上样, 以相同的流速水洗脱, 每 100 mL 流出液收集 1 次, 依次编号 :1、2、3……n 瓶, 分别浓缩并定容至 5 mL, 按“2.1.2”项下方法进行莫诺昔的含量测定, 以莫诺昔的峰面积比及回收率为指标, 考察不同型号大孔吸附树脂对接骨木醇提取物的分离能力, 确定最佳的大孔树脂。

### 2.2.2 结果及分析

HPD-417、NKA-II 型树脂 :经薄层色谱法鉴定, 含有大量不同极性的化合物, 其中包括大量莫诺昔, 说明这 2 种型号的大孔吸附树脂对莫诺昔没有吸附能力, 首先被淘汰。

HPD-450A、HPD-400、NKA-9 型树脂 :经 HPLC 检测, 含大量极性化合物, 包括大量莫诺昔, 使莫诺昔难与其它极性大的化合物分离, 达不到纯化目的, 这 3 种型号的大孔吸附树脂也被淘汰。

S-8 型树脂 :这种树脂本身极性较大, 用水、10% 及 20% 乙醇洗脱, 只有极少量的化合物被洗脱, 莫诺昔也极少。用 30% 乙醇洗脱, 莫诺昔连同大量极性大的化合物一同被洗脱, 不能完全分离, 因此也被淘汰。

HPD-600、D3520、DM130、AB-8、HPD-100 型树脂 :这 5 种型号的大孔吸附树脂可以在一定程度上达到纯化的目的, 但洗脱行为仍然有很大不同。结果见表 1、2。

HPD-600、D3520、DM130 型树脂 :应用 HPD-600、D3520、DM130 这 3 种型号的树脂, 莫诺昔未能与大极性杂质完全分开, 峰面积百分含量大于 80% 的流出液回收率较低, 被淘汰。

AB-8、HPD-100 型树脂 (水) :AB-8 和 HPD-100 型树脂洗脱行为相似, 均可以使莫诺昔与大极性杂质较好的分离, 峰面积百分含量大于 80% 的流出液回收率也比较高。但只用水洗脱, 费时、费力、回收困难, 显然不可取。因此当大极性杂质几乎洗脱完全时, 改用 10% 乙醇洗脱, 解决时间长和回收困难的问题。

AB-8、HPD-100 型树脂 (10% 乙醇) :按上法装柱及上样, 并以同样的速度洗脱, 每 100 mL 流出液收集 1 次, 依次编号 :1、2、3……n 瓶。待水洗脱完全, 改用 10% 乙醇洗脱, 仍每 100 mL 流出液收集 1 次, 依次编号 :1'、2'、3'……n'。分别浓缩并定容至 5 mL, 按“2.1.2”项下方法进行莫诺昔的含量测定, 以莫诺昔的峰面积比及回收率为指标, 考察 AB-8、HPD-100 型大孔吸附树脂。AB-8 洗至 15 瓶时洗脱完全, HPD-100 洗至 19 瓶时洗脱完全, 即 AB-8 型树脂的洗脱液中, 峰面积百分含量大于 80% 的洗脱液流出的更快, 且回收率更高, 最终确定选用 AB-8 型大孔吸附树脂。结果见表 1。

### 2.3 最大上样量的确定

精密称取 4 份 AB-8 型大孔吸附树脂 50 g, 水湿法装柱, 编号为 1、2、3、4, 树脂床体积均为 100 mL。依次精密称取 3、6、9、12 g 样品溶液上样, 以相同的流速水洗脱。收集 100 mL 洗脱液, 浓缩并定容至 5 mL, 薄层色谱法进行检识, 观察洗脱液是否含莫诺昔, 从而确定 AB-8 型大孔吸附树脂的最大上样量。结果见表 2。

由表 2 可知, 以莫诺昔与树脂质量比为指标, 评价 AB-8 型大孔吸附树脂对乙醇提取液的吸附性能, 即最大上样量在莫诺昔与树脂质量比 1:298~1:198 之间, 为进一步精确最大上样量, 追加 5 号柱, 精密称取上述样品溶液 7.14 g, 即莫诺昔与树脂质量比 1:250, 上样, 薄层色谱法对 100 mL 洗脱液进行检识, 结果不含莫诺昔。即 AB-8 型大孔吸附树脂的最大上样量约为莫诺昔与树脂质量比为 1:250。

表 1 AB-8 和 HPD-100 型树脂的动态吸附性能

流出液	AB-8		HPD-100	
	Area/%	回收率/%	Area/%	回收率/%
15	79	2.54	-	-
19	-	-	79	3.15
1'	85	69.43	86	67.34
2'	78	4.24	79	6.44
3'	43	2.30	55	3.46
4'	12	0.58	25	1.91

### 2.3 最佳洗脱流速的确定

精密称取 4 份 AB-8 型大孔吸附树脂 50 g, 水湿法装柱, 编号为 1、2、3、4, 树脂床体积均为 100 mL。精密称取 4 份 3 g 样品溶液, 分别以 1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h 流速洗脱。收集各洗脱液, 浓缩并定容至 10 mL, 按“2.1.2”项下方法进行莫诺苷的含量测定, 计算莫诺苷回收率。结果见表 3。

由表 3 可知, 大孔树脂色谱柱流速越慢, 洗脱效果就越好, 但无限制慢速洗脱, 生产周期延长, 生产成本也会增加, 显然很不现实。故综合考虑选择最佳洗脱流速为 1.5 BV/h。

### 2.4 纯化周期的确定

为确定纯化周期, 精密称取 6 份 AB-8 型大孔吸附树脂 50 g, 水湿法装柱, 树脂床体积均为 100 mL。精密称取 3 g 样品溶液 6 份上样, 以 1.5 BV/h 流速, 分别以 5、10、15、20、25、30 BV 水洗脱, 除水溶性杂质, 再以 10% 乙醇完全洗脱, 得洗脱液, 浓缩并定容至 10 mL。按“2.1.2”项下方法进行莫诺苷的含量测定, 计算莫诺苷回收率。结果见表 4。

由表 4 可知, 以第 4 号方案洗脱, 可得到纯度和收率都较可观的接骨木总苷。故确定原料药的最佳纯化工艺为上样量小于 1:250(莫诺苷:树脂)的接骨木醇提取液, 以 1.5 BV/h 的流速水洗脱通过 AB-8 型大孔树脂柱色谱, 弃去 20 BV 的水洗脱液, 以 10% 乙醇完全洗脱, 得洗脱液, 浓缩, 冷冻干燥, 即得原料药接骨木总苷。

### 2.5 纯化工艺的验证

精密称取 AB-8 型大孔吸附树脂 100 g, 水湿法装柱, 树脂床体积为 200 mL。称取 6 g 样品溶液, 精密称定, 各 3 份, 上样, 以 1.5 BV/h 的流速水洗脱通过 AB-8 型大孔树脂柱色谱, 弃去 20 BV 的水洗脱液, 以 10% 乙醇完全洗脱, 得洗脱液, 浓缩,

冷冻干燥, 即得接骨木总苷, 称重。按“2.1.2”项下方法进行莫诺苷的含量测定, 计算总苷中莫诺苷的含量。结果见表 5。

结果表明, 大孔吸附树脂法纯化工艺稳定, 所得接骨木总苷中总苷含量(以莫诺苷计)均达 52% 以上, 总苷回收率达到 82% 以上, 可作为接骨木总

表 2 上样量与薄层检识结果

组别	莫诺苷总上样量/g	莫诺苷总上样量:树脂量	薄层检识结果
1	0.084	1:595	无
2	0.168	1:298	无
3	0.252	1:198	有
4	0.336	1:149	有

表 3 洗脱流速对莫诺苷回收率的影响

组别	流速(BV/h)	总上样量/g	回收量/g	回收率/%
1	1.0	0.084	0.060	66.4
2	1.5	0.084	0.055	65.5
3	2.0	0.084	0.047	60.0
4	2.5	0.084	0.041	48.8

表 4 水洗脱除杂质对莫诺苷收率的影响

组别	水洗脱液/BV	莫诺苷峰面积/%	莫诺苷收率/%
1	5	56	96
2	10	65	91
3	15	76	86
4	20	85	83
5	25	80	75
6	30	71	70

注 峰面积百分含量小于 80% 其莫诺苷百分含量均小于 50%。

表 5 纯化工艺的验证结果

实验号	接骨木总苷/g	莫诺苷/g
1	0.259 1	0.134 45
2	0.264 2	0.138 65
3	0.262 1	0.136 87
RSD	0.979%	1.54%

苷的纯化工艺。

### 3 讨论

大孔树脂是 20 世纪 70 年代引入药用领域的有机高分子吸附剂,具有理化性质稳定、吸附速度快、操作简便、再生容易、有机溶剂用量小、提取率高等特点,在中草药及其制剂的提取分离中主要用于提取物的纯化和有效成分的富集等方面<sup>[3-5]</sup>。本实验通过动态吸附试验,对不同型号大孔树脂柱色谱的吸附解吸行为进行考察,最终选定 AB-8 型大孔树脂。通过对最大上样量、洗脱流速的考察确定了原料药的最佳纯化工艺,即醇提取物进行 AB-8 型大孔树脂柱色谱,2.5 BV/h 流速水洗脱,

弃去 20 BV 的水洗液,收集无色 10% 乙醇洗脱液部分,回收,冷冻干燥。此方法稳定、可行,适用于工业化生产,可作为接骨木的纯化工艺。

### 参考文献

- 1 韩华,闫雪莹,匡海学,等.接骨木的研究进展.中医药信息,2008,25(6):14~16.
- 2 韩华,匡海学,李振宇,等.正交试验优选莫诺苷的提取工艺.中医药信息,2011,28(4):33~35.
- 3 李文亮.大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的一些应用.中草药,1995,11(3):138.
- 4 安建忠,许志惠.新技术新方法在中草药提取方面的应用.时珍国医国药,2001,12(5):465~467.
- 5 刘友萍,鄢丹,秦春梅,等.大孔吸附树脂纯化中药有效成分的影响因素.中药新药与临床药理,2003,14(3):212~214.

## Optimization of Purification Technology for *Sambucus williamsii* Hance. by Macroporous Resin Adsorption Column Chromatography

Han Hua, Yin Xin, Yang Bingyou, Yang Liu, Xia Yonggang, Wang Qiuhong, Kuang Haixue

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine / Heilongjiang Key Laboratory of TCM Pharmacodynamic Material Bases, Harbin 150040, China)

**Abstract:** This study was aimed to optimize the purification technology for *Sambucus williamsii* Hance. With the morroniside as a marker, the purification technology for *Sambucus williamsii* Hance was optimized by different types of macroporous resin. The results showed that the optimum purification technology was that, the extract of less than 1:250 (morroniside:resin) was adsorbed and the AB-8 resin was washed with distilled water, and then the morroniside was eluted from the macroporous resin with 10% ethanol. And the content of the morroniside was more than 50%. It was concluded that the purification technology was simple, reliable, repeatable and suitable for industrial production.

**Keywords:** *Sambucus williamsii* Hance., morroniside, macroporous resin adsorption column chromatography, purification technology

(责任编辑:叶丽萍 张志华,责任译审:汪晶)