

采用树脂吸附法纯化何首乌二苯乙烯苷的工艺研究

张保顺¹ 黄明¹ 叶小利² 屠大伟¹ 李学刚¹

1(西南大学药用资源化学研究所, 重庆, 400716) 2(西南大学生命科学学院, 重庆, 400716)

摘要 研究大孔树脂吸附纯化何首乌二苯乙烯苷的最佳工艺条件和参数。以二苯乙烯苷的纯度为考察指标, 通过比较 D101、D100、D600、NKA-9 四种大孔树脂对二苯乙烯苷的吸附和解吸性能, 得出 D600 大孔树脂吸附和解吸性能较好, 吸附量为 69.72 $\mu\text{g/g}$, 体积分数 30% 乙醇洗脱解吸率为 53.06%。二苯乙烯苷最佳纯化工艺为: 体积分数 30% 乙醇洗脱, pH 4.0, 流速 3 mL/min, 纯度达 83.3%。

关键词 大孔树脂, 何首乌, 纯化, 二苯乙烯苷

2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystibane-2-O- β -D-glucoside)是何首乌(蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb 的干燥块茎)的主要水溶性成分, 也是何首乌及其制剂的质控标准。目前, 二苯乙烯苷的纯化主要有硅胶层析法^[1]、薄层层析法^[2]、溶剂回流法^[3], 大孔树脂吸附法研究报道的较少。硅胶层析法, 洗脱时易造成柱子堵塞; 薄层层析法, 处理的样品量小, 一般适合实验室提取纯化; 溶剂回流法加热时间长、溶剂消耗大; 而大孔树脂法具有吸附量大、再生容易、可反复使用等优点, 因此, 利用大孔树脂吸附法筛选出二苯乙烯苷分离纯化的最佳工艺, 对实现二苯乙烯苷工业化生产具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

高效液相色谱仪(美国 Waters201), Model 510 泵, UV200 II 紫外可变波长检测器(大连依利特科学仪器有限公司), 红外光谱仪(Perkin Elmer、英国), MP-8 电子天平(Sartorius), RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), SBD-50 恒温水浴锅(丹麦 Heto-Holten 公司)。

1.1.2 材料

何首乌(重庆市石柱中药材公司), 二苯乙烯苷标准品(批号: 0844-200003, 中国药品生物制品检定所), 大孔树脂 D101(天津市光复精细化工研究所), D100、D600、NKA-9(河北沧州宝恩化工有限公司), 其他的试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 二苯乙烯苷测定的色谱条件^[4]

色谱柱: μ Bondapak C₁₈: (3.9 \times 300) mm; 流动相: V(甲醇): V(水) = 60:40; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 320 nm。

1.2.2 标准品贮备液的制备

精密称取 7.1 μg 的二苯乙烯苷标准品, 置于 10 mL 的容量瓶中, 用体积分数 95% 乙醇溶解并稀释至刻度, 用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 得标准品贮备液。

1.2.3 样品液的制备及测定

何首乌粉碎, 过 60 目铜筛。称取适量的何首乌粉, 以 1:5(g:mL) 料液比加水浸泡 2 次, 每次 3 h, 抽滤去渣, 合并滤液, 即得样品液。再取适量样品液用水稀释一定的浓度, 精密吸取 20 μL 进样, 得峰面积, 代入标准曲线方程计算即可得到样品液的二苯乙烯苷的含量。

1.2.4 大孔树脂的预处理^[5]

在提取器中加入体积分数 95% 的乙醇反复浸泡大孔吸附树脂, 至浸泡液蒸干后无残留物。洗净的树脂挥去溶剂后保存备用。以乙醇湿法装柱, 95% 乙醇在柱上淋洗, 不时检测流出的乙醇, 至与水混合(体积比 1:5)不呈现白色浑浊为止, 再用纯水洗至无醇味, 备用。

1.2.5 二苯乙烯苷吸附量及吸附率的测定

准确称取经预处理的 4 种干树脂各 3g, 精确至 1 μg , 置于 100 mL 具塞磨口三角瓶中, 精确加入水提液各 50 mL(过量), 置电动振荡仪上振荡(25 $^{\circ}\text{C}$ 、100 次/min)24 h, 充分吸附后, 过滤, 测定滤液中剩余二苯乙烯苷的浓度, 按下式计算各树脂室温下对二苯乙烯苷的吸附量及吸附率:

$$Q = (C_0 - C_r) V / m, D / \% = (C_0 - C_r) / C_0 \times 100$$

式中: Q ——吸附量, $\mu\text{g/g}$; C_0 ——初始浓度, $\mu\text{g/mL}$; C_r ——剩余浓度, $\mu\text{g/mL}$; V ——溶液体积, mL; m ——树脂质量, g; D ——吸附率, %。

第一作者: 硕士研究生(叶小利为通讯作者)。

收稿日期: 2006-03-05, 改回日期: 2006-06-19

1.2.6 二苯乙烯苷解吸率的测定

将按 1.2.5 的方法充分吸附后的树脂,分别无损的装入树脂柱中,滤过,精确加入体积分数 30% 的乙醇 30 mL,0.5 mL/min 流速进行解吸,准确收集解吸液(纯化后的二苯乙烯苷溶液)定容于 50 mL30% 的乙醇中,按 1.2.3 的方法测定解吸液的浓度,用下式计算其解吸率:

$$E/\% = C_t V/Q \times 100$$

式中: C_t ——解吸液浓度, $\mu\text{g/mL}$; V ——解吸液体积, mL; Q ——3g 大孔树脂吸附量, μg ; E ——解吸率, %。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

准确吸取 1.2.2 贮备液各 0.2、0.6、1.0、1.4、1.8 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加 95% 乙醇稀释,定容至刻度,然后各分别进样 20 μL ,以二苯乙烯苷的浓度 C ($\mu\text{g/mL}$)为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线为 $A = 20\,564C + 8\,899.2$,其中 $R^2 = 0.998\,4$; $n = 5$ 。标准曲线说明,在 4.24~38.16 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,二苯乙烯苷的浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系。

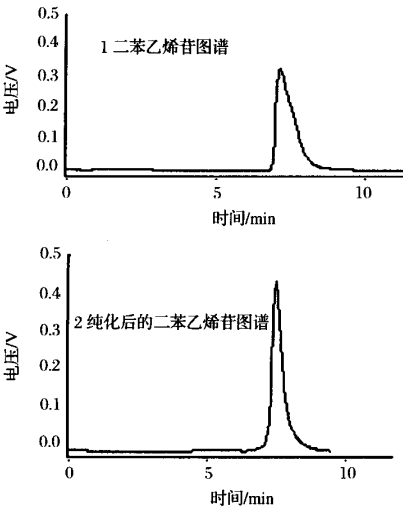


图 1 二苯乙烯苷的高效液相色谱图

2.2 树脂的筛选

2.2.1 二苯乙烯苷吸附量及吸附率的确定

按 1.2.5 方法测得的二苯乙烯苷吸附量及吸附率如表 1 所示。从表 1 中得知,4 种大孔树脂对二苯乙烯苷的吸附量依次为: D600>NKA-9>D101>D100,其中 D600、NKA-9 吸附量大,吸附率达 95% 以上。

表 1 不同树脂对二苯乙烯苷吸附量及吸附率的比较

树脂名称	D100	D101	D600	NKA-9
吸附量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	52.95	54.19	69.72	68.33
吸附率/%	74.79	76.53	98.47	96.50

2.2.2 二苯乙烯苷解吸率的确定

按 1.2.6 方法测得的二苯乙烯苷解吸率如表 2 所示。由表 2 所得,4 种大孔树脂对二苯乙烯苷的解吸率依次为 NKA-9>D600>D100>D101。

表 2 不同树脂对二苯乙烯苷解吸率的比较

树脂名称	D100	D101	D600	NKA-9
解吸率/%	5.38	4.15	53.06	66.03

综合表 1、表 2 所得的结果,D600 与 NKA-9 对二苯乙烯苷不仅吸附量大,而且解吸率高,可是实验中发现,NKA-9 对二苯乙烯苷损失率较高,所以宜选用 D600 大孔树脂。

2.3 洗脱溶剂的确定

选用 D600 型大孔树脂适量装柱 150 mL,吸取水提液 500 mL(4.25 g/L)上柱,穿透液重复吸附 2 次,再依次用纯水 600 mL,体积分数 5%、15%、30%、50%、70%、90% 乙醇各 300 mL 梯度洗脱,洗脱液流速为 3 mL/min,纯水洗脱液收集 100 mL 6 份,5%、15%、90% 乙醇洗脱液收集 100 mL 各 3 份,30%、50%、70% 乙醇洗脱液分别收集 50 mL6 份,测定洗脱液中二苯乙烯苷含量,以容量瓶编号为横坐标,二苯乙烯苷含量为纵坐标,绘制洗脱曲线(见图 2)。

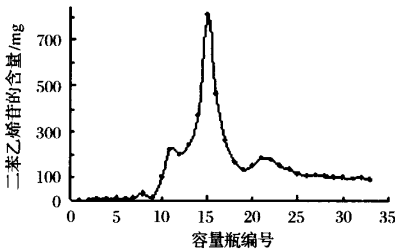


图 2 不同乙醇体积分数洗脱对二苯乙烯苷的影响

由图 2 所示,二苯乙烯苷主要集中在 30% 乙醇洗脱液中,实验中随着乙醇体积分数的增加,醇溶性杂质增多,二苯乙烯苷含量降低。因此,用溶剂洗脱前,应先用尽可能多的纯水洗去可溶性的糖、蛋白质等,再用 30% 乙醇洗脱。

2.4 pH 对吸附率的影响

由表 3 所示,pH 值越低,大孔树脂对二苯乙烯苷的吸附率越高。在 $\text{pH} \leq 5$ 时,树脂吸附率达 90% 以上, $\text{pH} > 5$ 时,树脂吸附率只有 80% 左右。 pH 为 3~

5 时,树脂吸附率较高,这可能是由于二苯乙烯苷有酚羟基存在的原因,此时化合物呈分子状态,不生成烺盐,以氢键方式被吸附。pH>5 时,树脂吸附率较差,可能是由于疏水键遭到破坏,而造成吸附率下降。因此实验中在用溶剂洗脱时选择 pH 4 为适宜。

表 3 不同 pH 值条件下大孔树脂对二苯乙烯苷的吸附率的影响

pH 值	3	4	5	6	7
吸附率/%	94.4	94.3	92.4	87.9	72.2

2.5 纯化品与标准品的红外光谱图比较

由图 3、图 4 可知,纯化后得到的二苯乙烯苷样品与标准品红外光谱图基本一致。 $\text{IRV}_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$: 3 400(羟基),1 606, 1 514(取代苯)。

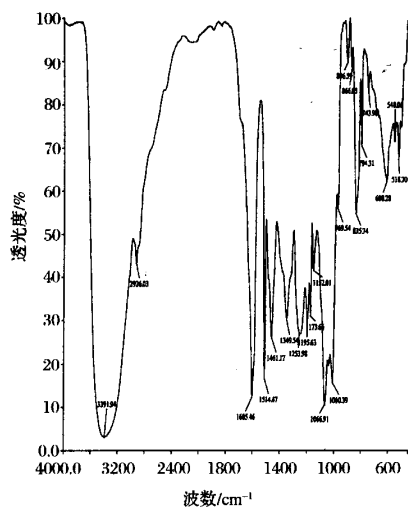


图 3 二苯乙烯苷的标准品图谱

生容易等特点,实验中,D600 大孔树脂对二苯乙烯苷的吸附量和解吸率较高,能有效分离二苯乙烯苷。用 30% 乙醇洗脱、pH4.0、流速 3 mL/min,所纯化的二苯乙烯苷纯度达 83.3%,并且经红外图谱鉴定,两者官能团结构基本相同。所以大孔树脂吸附法适合于何首乌中二苯乙烯苷的纯化。

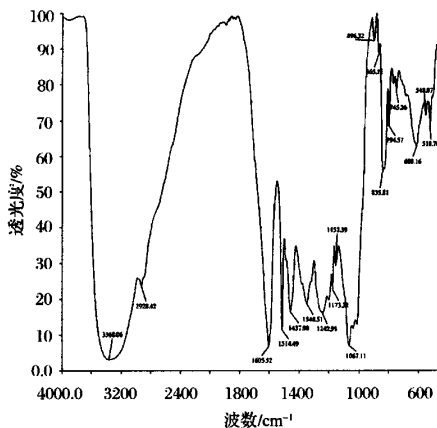


图 4 纯化后的二苯乙烯苷样品图谱

参 考 文 献

- 1 Gen Ichiro Nonaka, Naoko Miwa, Itsuo Uishioka. Stilbene glycoside gallates and pro- anthocyanidins from Polygonum multiflorum[J]. Phytochemistry, 1982, 2(21):429~432
- 2 严秀珍. 何首乌中二苯乙烯苷的分离与鉴定[J]. 上海第一医学院学报, 1981, 8(2):123
- 3 吕丽爽, 汤 坚. 何首乌中二苯乙烯苷的醇提工艺[J]. 食品与发酵工业. 2004, 30:132~135
- 4 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 2000
- 5 中国医学科学院药物研究所植化室. 大孔吸附树脂在中草药化学成分提取分离中的一些应用[J]. 中草药, 1999, 19(1):40

3 讨 论

树脂吸附法与其他方法相比,具有吸附量大、再

Study on Purification of Stilbene Glucoside from Polygonum Multiflorum with Macroporous Resin

Zhang Baoshun¹ Hung Ming¹ Xie Xiaoli² Tu Dawei¹ Li Xuegang²

1(Chemistry Institute of Pharmaceutical Resource, Southwest University, Chongqing 400716, China)

2(College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT Abstract The purpose of this study is to evaluate the optimum condition and parameters of purifying stilbene glucoside from Polygonum multiflorum with macroporous resin. Absorption and adsorption capacities of three resins for stilbene glucoside were determined and compared, the results showed that D600 resin was better than the others and its absorption capacity was 69.72mg/g, the desorbing rate was 53.06% when eluted with 30% ethanol and 83.3% purification was achieved under the optimum conditions; 30% ethanol as the elution reagent, pH4.0, 3ml/min.

Key words macroporous resin, polygonum multiflorum, purification, stilbene glucoside