

集注》总结了三千多年前的药学成就后认为：“诸药所生，皆有境界……”，药王孙思邈认为：“用药必依土地，所以诊治十愈八九；今知医者，不知采药时节，至于生长土地，所以治疗十不得五也。”近年的科学研究也证明了地域、地质背景与地道药材质量之间密切的关系，地道药材之所以优质，其中微量元素的种类及含量与非地道药之间有十分明显的差异，就是其重要原因之一。

蜂胶的产地差异、植被不同或是由于不同产区的气候及土壤环境的差异，都可能造成其质量较大的差别。收集不同产地的蜂胶，并对其进行元素测定，了解不同产地蜂胶的元素分布特征，探讨主要含量元素与医疗保健功效之间的关系，为进一步提高蜂胶产品的品质并拓宽应用范围提供科学依据。

REFERENCES

- [1] XIA Z Y, JAING J M, FENG Y, et al. Comprehensive evaluation on pretreatment methods of propolis by

determination of total flavonoids, galangin and chrysin content [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(3): 268-271.

- [2] ZHANG C P, WANG K, HU F L. Phenolic acid in propolis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(1): 102-105.
- [3] HU F L. Research of pharmacological effects of propolis(蜂胶药理作用研究) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2005: 9-10.
- [4] SHENG W S, DU Q T, LI S L, et al. The content determination of eight species flavonoid and Cinnamic acid in Propolis and yang gun [J]. Apiculture China(中国蜂业), 2008, 59(3): 7-8.
- [5] YANG L, YAN Q H, DENG Y E, et al. Determination of constant and trace elements in propolis by microwave digestion with ICP-AES [J]. Guangzhou Chem Indust(广州化工), 2009, 37(2): 162-166.
- [6] XU X N, LI Y, YANG R H, et al. Determination of metal elements in propolis by flame atomic absorption spectrometry with microwave assisted sample digestion [J]. Progr Mod Biomed(现代生物医学进展), 2011, 11(11): 2058-2061.
- [7] LEI L D, OU Y L, LIU Y Q, et al. Character study of content and correlativity of elements in Radix Astragali obtained from different regions [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(3): 255-258.

收稿日期: 2013-07-15

大孔树脂分离纯化刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的工艺研究

樊如强^{1,2}, 金学英², 胡荣², 陈鹏^{1,2}, 王建斌¹, 傅宏征^{1*} (1.北京大学医学部, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 2.扬州大学医学院药理学系, 江苏 扬州 225001)

摘要: 目的 研究大孔树脂分离纯化刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的工艺。方法 比较了 4 种不同类型的大孔树脂对刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的吸附解吸性能, 确定适宜的树脂类型和最佳纯化工艺条件。结果 AB-8 型大孔树脂对紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的吸附性能及解吸效果较好。最佳工艺条件为上样浓度: 0.5 g·mL⁻¹, 吸附流速: 2 BV·h⁻¹, 上样量: 5 BV, 洗脱剂: 30%的乙醇, 用量: 11 BV, 洗脱流速: 1 BV·h⁻¹。纯化后的终产品中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量分别为 3.13%, 1.82%和 0.42%。结论 AB-8 型大孔树脂用于同时富集紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶效果最佳, 是一种理想的分离纯化介质。

关键词: 刺五加; 紫丁香苷; 刺五加苷 E; 异嗪皮啶; 大孔树脂

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)03-0302-06

Study on Separation and Purification of Syringin, Aleutheroside E and Isofraxidin from *Acanthopanax Senticosus* by Macroporous Resin

FAN Ruqiang^{1,2}, JIN Xueying², HU Rong², CHEN Peng^{1,2}, WANG Jianbin¹, FU Hongzheng^{1*} (1.State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 2.Department of Pharmaceutics, School of Medical Academy, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

作者简介: 樊如强, 男, 硕士生 Tel: 18800199871 E-mail: 542879140@qq.com *通信作者: 傅宏征, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (010)82805212 E-mail: drhzfu@sina.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the separation and purification technology of syringin, eleutheroside E and isofraxidin from *Acanthopanax senticosus* by macroporous resin. **METHODS** The adsorption and desorption rate of four types of macroporous resins was compared, so as to determine the proper kind of resin and the best condition for purifying. **RESULTS** The adsorption and isolation effect of AB-8 resin was much better. The optimal conditions were as follow: the concentration of sample solution was $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the adsorption flow rate was $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, the maximum loading amount was 5 BV, the eluent was 30% ethanol, the dosage was 11 BV and the elution flow rate was $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$. Under the optimal conditions, the content of syringin, eleutheroside E and isofraxidin in purified powder was 3.13%, 1.82% and 0.42%, respectively. **CONCLUSION** AB-8 is an ideal resin with the best enrichment for separating and purifying syringin, eleutheroside E and isofraxidin simultaneously.

KEY WORDS: *Acanthopanax senticosus*; syringin; eleutheroside E; isofraxidin; macroporous resin

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus*(Rupr. et Maxim.)Harms 的干燥根和根茎或茎^[1], 商品名为五加参, 味辛、微苦, 性温、无毒, 主要分布在中国东北、华北、俄罗斯远东地区及日本北海道、朝鲜等地^[2]。刺五加有促性腺、抗疲劳和防止记忆衰退等活性, 医学上被称之为“适应原”样药物^[3-4]。根据目前的文献报道^[5-10], 紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶是刺五加中主要的活性成分。

大孔树脂是内部呈交联网状结构的高分子的珠状体, 是一种吸附性和分子筛性原理结合的分选材料^[11-12]。大孔树脂具有高吸附、易解吸、低成本和易再生的优点, 且对物质具有选择性分离作用, 被广泛的应用于天然活性物质的分离纯化^[13-18]。本实验以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶含量为指标, 采用大孔吸附树脂法, 分别对 HP20、D101、AB-8 及 NKA-9 四种大孔树脂进行动静态分析, 优选出最佳大孔树脂, 并对优选出的大孔树脂富集紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的工艺条件和参数进行研究。

1 仪器与试剂

Waters e2695 Separations Module HPLC(美国 Waters 公司), Waters 2998 PAD 紫外检测器(美国 Waters 公司, 含真空脱气、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱), Empower 2 色谱管理系统; 旋转蒸发器(巩义市英峪高科仪器厂); DZTW 型调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂); CPA225D 分析天平(Sartorius); 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

刺五加来源于黑龙江, 经北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室傅宏征教授鉴定为五加科植物刺五加 *Acanthopanax Senticosus* (Rupr. et Maxim.)Harms, 标本存放于北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室; 紫丁香苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111574-

200603, 纯度: 99.9%); 刺五加苷 E 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111713-200502, 纯度: 99.9%); 异嗪皮啶对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110837-201005, 纯度: 99.9%); HP20 型大孔树脂(北京绿百草科技发展有限公司); D101、AB-8、NKA-9 型大孔树脂(南开大学化工厂); 乙腈(色谱纯); 甲醇(色谱级); 双蒸水; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大孔树脂的预处理

将 4 种大孔树脂先用蒸馏水冲洗数次, 再用 95%乙醇溶液浸泡 24 h, 倒入里面装有 1/3 蒸馏水的树脂柱中, 用 2 BV 的 95%乙醇以 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速通过树脂柱, 并浸泡 4~5 h, 再用水以同样流速洗净, 用 95%乙醇洗至流出液加水不呈白色混浊为止。用 2 BV 的 5%HCl 溶液以 $4\sim6 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂层, 并浸泡树脂 24 h, 而后用水以同样流速洗至出水 pH 至中性。用 2 BV 的 2%NaOH 溶液以 $4\sim6 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂层, 并浸泡树脂 24 h, 而后用水以同样流速洗至出水 pH 至中性, 每种树脂取适量在相同条件下抽滤至干, 备用。

2.2 样品溶液的制备

取刺五加药材适量, 粉碎成粗颗粒, 以 10 倍量的 50%的乙醇浸泡 24 h, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 加压回收至无醇味, 加适量水稀释至 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 抽滤, 即得刺五加提取液。

2.3 指标含量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱 ($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 0.05%三氟乙酸水溶液-乙腈(0~20 min, 90:10→80:20; 20~30 min, 80:20→75:25; 30~40 min, 75:25→90:10; 40~50 min, 90:10); 检测波长: 265 nm(紫丁香苷), 210 nm(刺五加苷 E), 344 nm(异嗪皮啶); 流速: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取紫丁香苷 2.36 mg、刺五加苷 E 1.12 mg 和异嗪皮啶 1.32 mg, 分别加 50%的甲醇溶解于 10 mL 量瓶中, 超声, 溶解后定容, 分别得浓度为 236 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的紫丁香苷、112 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的刺五加苷 E 和 132 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的异嗪皮啶对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液制备 每次取适量的样品溶液蒸去溶剂, 置于 100 mL 量瓶中, 加 50%的甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.3.4 标准曲线制备 分别吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mL 的已配制好的 3 种对照品储备液至 10 mL 量瓶中, 用 50%的甲醇定容至刻度, 摇匀, 分别吸取 10 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 以每个对照品的浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。紫丁香苷的回归方程为 $Y=23\ 270X+2\ 432.9$, $r=0.999\ 9$; 刺五加苷 E 的回归方程为 $Y=78\ 974X-15\ 878$, $r=0.999\ 9$; 异嗪皮啶的回归方程为 $Y=30\ 330X+287.6$, $r=0.999\ 7$ 。结果表明, 紫丁香苷在 4.72~23.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 刺五加苷 E 在 2.24~11.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 异嗪皮啶在 2.64~13.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 其浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 仪器精密度试验 取紫丁香苷(23.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、刺五加苷 E(11.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和异嗪皮啶(13.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对照品溶液, 重复进样 6 次, 结果紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的平均峰面积分别为 553 585, 871 633 和 397 287, RSD 分别为 0.6%, 0.8%和 0.5%。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样, 每次进样 10 μL , 按“2.3.1”项下色谱条件测定峰面积, 结果紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的 RSD 分别为 1.2%, 0.9%和 1.3%, 表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份, 分别进样, 结果紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的平均含量分别为 30.29, 19.15 和 3.85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 0.9%, 0.8%和 1.2%。

2.3.8 加样回收率试验 精密量取 6 份已知含量的同一供试品溶液 1 mL, 分别加入到 10 mL 的量瓶中, 分别精密加入等体积的紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶适量, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 依法测定各供试品溶液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 计算紫丁香苷、刺五

加苷 E 和异嗪皮啶的平均回收率分别为 99.5%, 99.4%和 99.2%, RSD 分别为 0.9%, 1.3%和 1.1%。

2.4 大孔树脂的筛选

2.4.1 大孔吸附树脂的静态吸附及解吸的研究

分别精密称取 4 种已处理好的树脂 1 g, 置 250 mL 具塞锥形瓶中, 各加入已稀释一定倍数的样品溶液 100 mL, 每隔 10 min 振摇 30 s, 持续 2 h, 静置 24 h 后, 抽滤。把几种抽滤后的树脂分别置于具塞锥形瓶中, 加入 30%乙醇适量, 其余操作同上, 得解吸后的滤液。按“2.3”项下方法测定吸附后的滤液和解吸附后的滤液里 3 种对照品的浓度, 根据公式计算静态饱和吸收量、洗脱量和洗脱率: 饱和吸收量=[(初始液浓度-吸附后浓度)×吸附液体积]/树脂的质量; 解吸量=解吸液浓度×解吸液体积/大孔树脂质量; 解吸率=解吸液浓度×解吸液体积/饱和吸收量。结果见表 1~3。结果显示, HP20 和 AB-8 大孔树脂对紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的静态饱和吸收量和解吸量都比 D101 和 NKA-9 要大, 且 AB-8 型大孔树脂对紫丁香苷和刺五加苷 E 的解吸量比 HP20 型大孔树脂要大。因此, 确定 AB-8 型大孔树脂作为分离纯化刺五加提取物效果较好。

表 1 4 种树脂对紫丁香苷静态吸附解吸结果

Tab 1 The result of the static absorption and desorption of the four types of macroporous resin on syringin

树脂类型	吸附前紫丁香苷/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附后紫丁香苷/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	饱和吸收量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	解吸量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	解吸率/ %
HP20	30.23	16.61	1.362	1.249	91.70
D101	30.23	23.42	0.681	0.603	88.55
AB-8	30.23	16.63	1.360	1.339	98.46
NKA-9	30.23	27.54	0.269	0.094	34.94

表 2 4 种树脂对刺五加苷 E 静态吸附解吸结果

Tab 2 The result of the static absorption and desorption of the four types of macroporous resin on eleutheroside E

树脂类型	吸附前刺五加苷 E/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附后刺五加苷 E/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	饱和吸收量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	解吸量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	解吸率/ %
HP20	22.72	3.553	1.917	1.678	87.53
D101	22.72	4.437	1.828	1.497	81.89
AB-8	22.72	3.622	1.910	1.757	91.99
NKA-9	22.72	17.07	0.565	0.408	72.21

表 3 4 种树脂对异嗪皮啶静态吸附解吸结果

Tab 3 The result of the static absorption and desorption of the four types of macroporous resin on isofraxidin

树脂类型	吸附前	吸附后	饱和	解吸量/ mg·g ⁻¹	解吸率/ %
	异嗪皮啶/ mg·L ⁻¹	异嗪皮啶/ mg·L ⁻¹	吸收量/ mg·g ⁻¹		
HP20	4.916	2.409	0.251	0.243	96.81
D101	4.916	2.809	0.211	0.180	85.31
AB-8	4.916	2.477	0.244	0.242	99.20
NKA-9	4.916	2.542	0.237	0.201	84.81

2.4.2 大孔吸附树脂的动态吸附实验 分别精密称取 4 种在相同条件下处理好的树脂 10 g, 选择干净的 2 cm×25 cm 色谱柱, 用湿法装柱, 精密吸取已稀释一定倍数的样品溶液 100 mL, 以 1 BV·h⁻¹ 的流速进行动态吸附, 静置 24 h, 用水洗至无色, 然后用 30%乙醇解吸, 至洗脱液颜色不再变化为止, 用 HPLC 测定吸附剩余液和洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 计算 4 种大孔树脂的吸附率和解吸率[吸附率=(初始液浓度×原液体积-吸附剩余液浓度×吸附剩余液体积)/大孔树脂质量], 结果见表 4~6。

表 4 4 种树脂对紫丁香苷动态吸附解吸结果

Tab 4 The result of the dynamic absorption and desorption of the four types of macroporous resin on syringin

树脂类型	吸附前紫	吸附后紫	吸附率/ %	解吸液紫	解吸率/ %
	丁香苷/ mg·L ⁻¹	丁香苷/ mg·L ⁻¹		丁香苷/ mg·L ⁻¹	
HP20	30.23	0	100	29.32	96.99
D101	30.23	0	100	25.12	83.10
AB-8	30.23	0	100	30.02	99.31
NKA-9	30.23	4.319	85.71	22.35	86.26

表 5 4 种树脂对刺五加苷 E 动态吸附解吸结果

Tab 5 The result of the dynamic absorption and desorption of the four types of macroporous resin on eleutheroside E

树脂类型	吸附前刺	吸附后刺	吸附率/ %	解吸液刺	解吸率/ %
	五加苷 E/ mg·L ⁻¹	五加苷 E/ mg·L ⁻¹		五加苷 E/ mg·L ⁻¹	
HP20	22.72	0	100	22.47	98.90
D101	22.72	0	100	22.28	98.06
AB-8	22.72	0	100	22.49	98.99
NKA-9	22.72	0	100	18.36	80.81

表 6 4 种树脂对异嗪皮啶动态吸附解吸结果

Tab 6 The result of the dynamic absorption and desorption of the four types of macroporous resin on isofraxidin

树脂类型	吸附前异	吸附后	吸附率/ %	解吸液	解吸率/ %
	嗪皮啶/ mg·L ⁻¹	异嗪皮啶/ mg·L ⁻¹		异嗪皮啶/ mg·L ⁻¹	
HP20	4.916	0.321	93.47	4.075	88.68
D101	4.916	0.991	79.84	3.197	81.45
AB-8	4.916	0.286	94.18	4.185	90.39
NKA-9	4.916	1.103	77.56	1.660	43.54

结果显示, 4 种大孔树脂的动态吸附规律与静态基本一致, 根据动静态试验结果, 最终确定选择 AB-8 型大孔树脂作为富集刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的最佳树脂。

2.5 AB-8 型大孔树脂纯化刺五加总苷的工艺研究

2.5.1 最佳上样浓度的考察 分别称取 AB-8 大孔树脂 10 g, 共 5 份, 湿法上柱, 分别取浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1 和 2 g·mL⁻¹ 样品溶液 480, 240, 120, 60 和 30 mL, 流速 1 BV·h⁻¹ 吸附, 静置 24 h 后, 分别用水洗至无色, 然后用 30%乙醇解吸, 至洗脱液颜色近无色为止, 定容至 500 mL, 用 HPLC 测定洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 结果见表 7。

表 7 不同上样浓度对解吸附性的影响

Tab 7 The effect of concentration of the crude extract solution for desorption rate

上样浓度/ g·mL ⁻¹	紫丁香苷 浓度/mg·L ⁻¹	刺五加苷 E 浓度/mg·L ⁻¹	异嗪皮啶 浓度/mg·L ⁻¹
0.125	29.78	20.78	7.95
0.25	29.19	21.75	7.78
0.5	33.13	23.62	8.08
1	32.77	23.02	7.26
2	31.85	20.96	7.86

结果显示, 当上样浓度为 0.5 g·mL⁻¹ 的时, 洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的浓度较高, 所以选择刺五加提取液的上样浓度为 0.5 g·mL⁻¹。

2.5.2 流速对 AB-8 型大孔树脂吸附容量的影响

分别称取 AB-8 大孔树脂 10 g, 共 5 份, 湿法上柱, 各加入 0.5 g·mL⁻¹ 的刺五加样品溶液 50 mL, 分别以 1, 2, 3, 4, 5 BV·h⁻¹ 流速上柱吸附, 静置 24 h, 分别用水洗至无色, 然后用 30%乙醇解吸, 至洗脱液颜色近无色为止, 定容至 500 mL, 用 HPLC 测定洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 结果见表 8。

表 8 不同上样流速对解吸附性的影响

Tab 8 Effects of the desorption flow rate on desorption rate

上样流速/ BV·h ⁻¹	紫丁香苷浓度/ mg·L ⁻¹	刺五加苷 E 浓度/mg·L ⁻¹	异嗪皮啶 浓度/mg·L ⁻¹
1	28.02	19.49	4.79
2	30.45	20.54	5.12
3	28.17	19.39	4.71
4	27.56	19.23	4.69
5	27.81	18.39	4.54

结果显示, 当上样流速为 1~3 BV·h⁻¹ 时, AB-8 型大孔树脂对紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶

吸附性较大, 综合考虑, 选择 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的上样流速。

2.5.3 泄露曲线考察 称取 10 g 已经处理好的 AB-8 型大孔树脂, 湿法上柱, 取生药浓度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液上样, 上样流速为 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 每 1 BV 收集 1 次, 连续接取, 依次编号, 各精密吸取一定量注入高效液相中, 记录紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的峰面积, 以流出液体积为横坐标, 以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的质量浓度为纵坐标作泄露曲线, 结果见图 1。

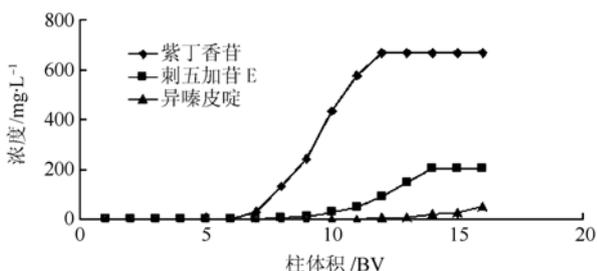


图 1 AB-8 型树脂上样吸附泄露曲线

Fig 1 Adsorption leaking curve on AB-8 macroporous resin

由泄露曲线可知, 上样液达到 5 BV 时, 紫丁香苷开始泄露, 12 BV 时达到饱和, 上样液到 7 BV 时, 刺五加苷 E 开始泄露, 14 BV 达到饱和, 上样液到 11 BV 时, 异嗪皮啶开始泄露, 16 BV 尚未泄露完全, 为了能够完全吸附紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶, 选择 5 BV 作为最佳上样量, 由预实验可知, 1 个柱体积约等于 20 mL , 即相当于原药材 10 g , 所以确定的最佳上样量为 $1:5$ (大孔树脂: 原药材)。

2.5.4 洗脱剂浓度的考察 分别称取 5 份 10 g 已经处理好的 AB-8 型大孔树脂, 按上述确定的吸附条件上样, 进行动态吸附, 先用蒸馏水洗至水澄清, 再分别用 10% , 30% , 50% , 70% 和 90% 的乙醇为洗脱剂按 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速进行洗脱, 分别收集过柱液, 洗脱至洗脱液颜色近无色为止, 定容至 1000 mL , 用 HPLC 测定洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 结果见表 9。

表 9 不同浓度乙醇时树脂柱的洗脱效果

Tab 9 The influence of different ethanol concentration on desorption

乙醇体积 分数/%	紫丁香苷 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	刺五加苷 E 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	异嗪皮啶 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
10	22.68	0.96	0.62
30	39.37	24.26	4.35
50	37.63	24.09	4.39
70	30.91	19.83	4.65
90	24.26	13.97	4.72

结果显示, 紫丁香苷和刺五加苷 E 用 30% 和 50% 的乙醇作为洗脱剂时, 洗脱效果较好, 异嗪皮啶用 70% 和 90% 的乙醇作为洗脱剂时, 洗脱效果较好, 但是 70% 和 90% 洗脱紫丁香苷和刺五加苷 E 效果一般, 且 50% 作为洗脱剂时, 洗脱下来的杂质比较多, 综合考虑, 以 30% 作为洗脱剂。

2.5.5 洗脱流速的考察 分别称取 5 份 10 g 已经处理好的 AB-8 型大孔树脂, 按上述确定的吸附条件上样, 进行动态吸附, 先用蒸馏水洗至水澄清, 再分别用 30% 的乙醇以 $1, 2, 3, 4, 5 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速洗脱, 分别收集过柱液, 洗脱至洗脱液颜色近无色为止, 定容至 1000 mL , 用 HPLC 测定洗脱液中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量, 结果见表 10。

表 10 不同洗脱流速时树脂柱解吸效果

Tab 10 The influence of different eluting rate on desorption

洗脱流速/ $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$	紫丁香苷 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	刺五加苷 E 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	异嗪皮啶 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	31.67	19.41	5.21
2	31.31	19.25	5.12
3	30.84	19.13	5.13
4	30.82	19.06	5.08
5	30.61	18.94	4.94

结果显示, 随着洗脱流速的增加, 紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的洗脱量有所降低, 故以 $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的洗脱流速进行洗脱。

2.5.6 洗脱曲线的考察 取适量的刺五加样品溶液, 按上述确定的吸附和洗脱条件, 进行上柱、吸附和洗脱, 每 1 BV 收集 1 次, 连续接取, 依次编号, 各精密吸取一定量注入高效液相中, 记录紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的峰面积, 以洗脱液体积为横坐标, 以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的浓度为纵坐标作洗脱曲线, 结果见图 2。

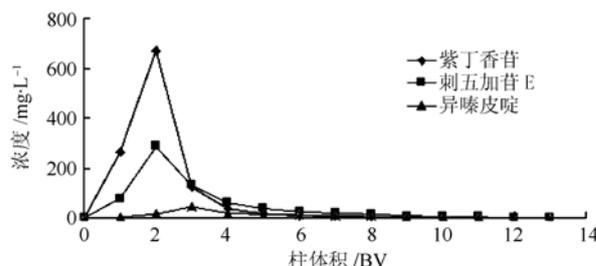


图 2 AB-8 型树脂洗脱曲线

Fig 2 Elution curve of AB-8 macroporous resin

由洗脱曲线可知,用 11 BV 的 30%的乙醇可将紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶基本洗脱下来。

2.5.7 验证试验 分别称取 10 g AB-8 型大孔树脂 3 份,装柱,分别加入 0.5 g·mL⁻¹ 的刺五加样品溶液 100 mL,以 2 BV·h⁻¹ 的速度上样,静置 24 h,先用蒸馏水洗至无色,再用 11 BV 的 30%的乙醇按 1 BV·h⁻¹ 的流速洗脱,收集洗脱液,蒸干,按“2.3”项下测定方法,计算紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量,结果见表 11。由结果可知,刺五加纯化物中,紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的平均含量分别为 3.13%, 1.82%和 0.42%。

表 11 刺五加纯化物中紫丁香苷、刺五加苷 E、异嗪皮啶的含量

Tab 11 The content of syringin, eleutheroside E and isofraxidin in purified powders

组 分	洗脱前/%	洗脱后/%	平均含量/%	RSD/%
紫丁香苷	1.13	3.12	3.13	0.32
		3.14		
		3.13		
		1.82		
刺五加苷 E	0.67	1.81	1.82	0.55
		1.83		
		0.43		
异嗪皮啶	0.15	0.41	0.42	2.38
		0.42		

3 讨论

在中国药典 2010 年版中,刺五加中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量测定的检测波长都是 220 nm,而本实验以三波长法,分别以紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的最大吸收波长作为检测波长,能够更好的测定紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶在刺五加药材中的含量。

本实验通过比较几种大孔树脂,发现 AB-8 型大孔树脂适合于紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的分离纯化,经过大孔树脂精制以后,紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量分别提高了 2.77, 2.72 和 2.73 倍,为进一步的制剂工艺奠定了良好基础。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 194.
[2] ZHOU Y L. Heilongjiang Tree Species(黑龙江树木志) [M].

Haerbing: Heilongjiang Science and Technology Press, 1986.
[3] BREAKHMAN II, DARDYMOV IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 1969(9): 419-430.
[4] DAVYDOV M, KRIKORIAN A D. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: A closer look [J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(3): 345-393.
[5] PANOSSIAN A, WAGNER H. Stimulating effect of adaptogens: An overview with particular reference to their efficacy following single dose administration [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(10): 819-838.
[6] LIU K Y, WU Y C, LIU I M, et al. Release of acetylcholine by syringin, an active principle of *Eleutherococcus senticosus*, to raise insulin secretion in Wistar rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 434(2): 195-199.
[7] NIU H S, HSU F L, LIU I M. Role of sympathetic tone in the loss of syringin-induced plasma glucose lowering action in conscious Wistar rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 445(1): 113-116.
[8] KIMURA Y, SUMIYOSHI M. Effects of various *Eleutherococcus Senticosus* Cortex on swimming time, natural killer activity and corticosterone level in forced swimming stressed mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(2/3): 447-453.
[9] LIU J, TIAN J, TIAN X, et al. Interaction of isofraxidin with human serum albumin [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(2): 469-474.
[10] YAMAZAKI T, TOKIWA T, SHIMOSAKA S, et al. Anti-inflammatory effects of a major component of *Acanthopanax senticosus* Harms, isofraxidin [J]. *Seibutsu Butsuri Kagaku*, 2004, 48(2): 55-58.
[11] JIANG X Y, ZHOU J H, ZHOU C S. Study on adsorption and separation of naringin with macroporous resin [J]. *Front Chem China*, 2006, 1(1): 77-81.
[12] PI G P, REN P, YU J M, et al. Separation of sanguinarine and chelerythrine in *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. based on methyl acrylate-co-divinylbenzene macroporous adsorbents [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1192(1): 17-24.
[13] JIA G T, LU X Y. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1193(1/2): 136-141.
[14] MA C H, LIU T T, YANG L, et al. Preparation of high purity biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra* extract by ion exchange resin catalytic transformation combined with macroporous resin separation [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(30): 3444-3451.
[15] LIU S, YI L Z, LIANG Y Z. Traditional Chinese medicine and separation science [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(11): 2113-2137.
[16] YANG F J, MA C H, YANG L, et al. Enrichment and purification of deoxyschizandrin and γ -schizandrin from the extract of *Schisandra chinensis* fruit by macroporous resins [J]. *Molecules*, 2012, 17(3): 3510-3523.
[17] ZHU J F, HAN H X, LIN C M, et al. Study on the purification of coumarin in chicory with macroporous resin [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(2): 136-139.
[18] SHEN G Z, JIN Y X, YU C G. Study on the technology for extracting flavonoids in *Tamarix chinensis* Lour by macroporous resin [J]. *Her Med*(医药导报), 2012, 31(4): 477-479.

收稿日期: 2013-05-14