

狗脊中鞣质类成分的纯化工艺研究[△]

王 丽*, 曹 跃, 贾天柱, 许 枏*(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R283;R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0219-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.09

摘要 目的:研究狗脊中鞣质类成分的纯化工艺。方法:以大孔吸附树脂纯化狗脊中鞣质类成分。以静态吸附量、静态吸附率和静态解吸量、静态解吸率为指标,筛选大孔吸附树脂型号;以洗脱率为指标,筛选纯化工艺。结果:最佳纯化工艺为选用D101型大孔吸附树脂,上样量为6个柱体积(BV),洗脱流速为1 BV/h,3 BV水除杂,各收集4 BV的10%和20%乙醇洗脱液。该工艺下,洗脱率为92.64%,总鞣质质量分数为69.5%。结论:所选工艺合理、可行,可作为狗脊中鞣质类成分的纯化工艺。

关键词 狗脊;鞣质;大孔吸附树脂

Study on Purification Technology of Total Tannins from *Cibotium baronetz*

WANG Li, CAO Yue, JIA Tian-zhu, XU Nan (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the purification technology of total tannins from *Cibotium baronetz*. METHODS: Tannins from *C. baronetz* was optimized by macroporous adsorptive resins. The types of macroporous adsorptive resins were screened with static adsorption capacity, static adsorption rate, static desorption quantity and static desorption rate as index. The purification technology was optimized with elution rate as index. RESULTS: The optimal purification technology was as follows: D101 macroporous adsorption resin, sample of 6 BV, flow rate of 1 BV/L, eluted by 3 BV water, collecting 10% and 20% ethanol eluent of 4 BV. The elution rate was 92.64% and the content of total tannins was 69.5%. CONCLUSION: The technology is reasonable and feasible, and it can be used for the purification technology of tannins from *C. baronetz*.

KEY WORDS *Cibotium baronetz*; Tannin; Macroporous adsorption resin

狗脊,是祛风湿类中药,为蚌壳科植物金毛狗脊 *Cibotium baronetz*(L.)J. Sm.的干燥根茎。狗脊的70%乙醇提取物可显

著抑制卵巢切除大鼠的骨密度降低及其所伴随的骨结合素、碱性磷酸酯酶下降、股骨钙流失^[1]。狗脊的正丁醇提取物可显

sy Res, 2009, 85(2/3):293.

[2] Hong J, Shin KH, Lim SS, et al. Lead compounds for anti-inflammatory drugs isolated from the plants of the traditional oriental medicine in Korea[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(3):195.

[3] Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, et al. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P₄₅₀ 3A4 and 2C9 activity[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1):429.

[4] He JY, Zhang W, He LC, et al. Imperatorin induces vasodilatation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca²⁺ influx and release[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 573(1/3):170.

[5] Wang S, Chen Q, Wang L, et al. Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of imperatorin in rat plasma and

tissue: application to study its pharmacokinetics[J]. *Anal Sci*, 2009, 25(7):869.

[6] 郭丁丁, 马逾英, 吕强, 等. 不同产地白芷中欧前胡素含量及HPLC指纹图谱的对比研究[J]. *中药材*, 2010, 33(1):22

[7] 李瑾翡, 黎旸, 谭舜, 等. HPLC法测定大鼠血浆、肝脏中欧前胡素[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(2):174.

[8] 王晓燕, 张翠英, 陈士林, 等. HPLC法分析禹白芷药材的质量[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(1):45.

[9] 樊萍, 孙宁, 刘冰, 等. HPLC法测定白芷酊中欧前胡素的含量[J]. *中国药房*, 2010, 21(23):2178.

[10] 丁光超, 叶肖栗, 任国飞. 高效液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中的欧前胡素[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(7):1056.

[11] Zhang XK, Xie YH, Cao W, et al. Brain distribution study of imperatorin in rat after oral administration assessed by HPLC[J]. *Chromatographia*, 2011, 74(3/4):259.

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30973938)
* 硕士研究生。研究方向:中药化学成分及活性。E-mail: LiLWang2009@126.com
通信作者:副教授。研究方向:中药化学成分及活性。E-mail: xudanbs@163.com

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-06-24)

著增加卵巢切除大鼠的骨密度,改善骨微观结构,并可明显提高血清碱性磷酸酯酶水平,降低骨质疏松大鼠肋骨干骺端MMP-2蛋白表达^[2-3]。单体成分研究表明,狗脊中的Cibotiumbaroside A和Cibotiumbaroside B成分具有明显的抗骨质疏松作用^[4]。为深入揭示狗脊中鞣质的抗骨质疏松作用及其作用机制,笔者在课题组前期研究的基础上^[3,5-6],采用大孔吸附树脂法,对狗脊中鞣质类成分进行富集纯化,优化出狗脊中鞣质类成分的制备工艺。

1 材料

FA1004B型万分之一分析天平(上海精密科学仪器有限公司);U3010型紫外分光光度计(日本日立公司);超声波清洗器(天实中美科技有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz)。

狗脊,购自湖南怀化,经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为蚌壳科植物金毛狗脊的干燥根茎。

D101型树脂(天津欧瑞生物科技有限公司);HPD700、HPD100、HPD450、DM130型树脂(河北沧州宝恩化工有限公司);没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-200803);水为重蒸馏水,磷钼钨酸试液按2010年版《中国药典》附录中方法配制,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸对照品10 mg,置于100 ml棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取狗脊样品粉末5.0 g,精密称定,置于100 ml具塞锥形瓶中,加60%丙酮50 ml,超声提取30 min,滤过,取续滤液,蒸干,残渣加水50 ml溶解,滤过,取续滤液作为供试品溶液(含生药量0.1 g/ml)。

2.3 检测波长的确定

精密吸取供试品溶液1 ml、对照品溶液0.6 ml,分别置于25 ml棕色量瓶中,加入磷钼钨酸试液1 ml,加水补至13 ml,再加入20% Na₂CO₃溶液稀释至刻度,摇匀,静置30 min。以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法,在400~800 nm波长范围测定吸光度。结果,供试品和对照品溶液均在760 nm波长处有最大吸收,且吸收峰平缓,故确定760 nm为检测波长。

2.4 狗脊中总鞣质的质量浓度测定

2.4.1 标准曲线的制备 精密量取没食子酸对照品溶液0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 ml,分别置于25 ml棕色量瓶中,分别加磷钼钨酸试液1 ml,再分别加水11.90、11.75、11.50、11.00、10.00、9.00 ml,用20% Na₂CO₃溶液稀释至刻度,摇匀,放置30 min。以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法在760 nm波长处测定吸光度。以吸光度(Y)为纵坐标,没食子酸质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=1.043.6X+0.000.08$ ($r=0.999.2, n=6$)。结果表明,没食子酸质量浓度在0.04~1.20 mg/L范围内与吸光度呈良好线性关系。

2.4.2 样品中总酚质量浓度测定 精密量取供试品溶液2 ml,置25 ml棕色量瓶中,按“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,并根据回归方程计算供试品溶液中总酚质量浓度。

2.4.3 样品中不被吸附的多酚质量浓度测定 精密量取供试品溶液25 ml,加至已盛有干酪素0.6 g的100 ml具塞锥形瓶中,密塞,置30℃水浴中保温1 h,时时振摇,取出,放冷,摇匀,滤过,弃去初滤液。精密量取续滤液2 ml,置25 ml棕色量瓶

中,按“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,并根据回归方程计算供试品溶液中不被吸附的多酚质量浓度。按下式计算狗脊中总鞣质的质量浓度:总鞣质质量浓度=总酚质量浓度-不被吸附的多酚质量浓度。

2.5 不同型号的大孔吸附树脂筛选

2.5.1 大孔吸附树脂的预处理^[7] 分别量取D101、HPD100、HPD450、HPD700、DM130型大孔吸附树脂各100 ml,加95%乙醇浸泡24 h,装入色谱柱,用95%乙醇洗脱,至流出液与水(1:5, V/V)混合不产生浑浊,再用水洗至洗脱液无醇味,备用。

2.5.2 大孔吸附树脂静态吸附量和静态吸附率测定 准确量取上述处理过的大孔吸附树脂各6 ml,分别装入具塞锥形瓶中,加入供试品溶液30 ml,静置12 h,时时振摇,抽滤,滤液按“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度。从标准曲线中读出总鞣质质量浓度,按下式计算比吸附量(Q)、吸附率和比上样量: $Q=(c_0-c_1) \times V/m$ 、吸附率= $(c_0-c_1)/c_0 \times 100\%$ 、比上样量=(上柱液中总鞣质质量-过柱液中总鞣质质量)/树脂体积[式中, c_0 为初始质量浓度(mg/ml), c_1 为剩余质量浓度(mg/ml), V 为溶液体积, m 为大孔树脂质量(g)]。5种大孔吸附树脂对狗脊总鞣质的静态吸附量和静态吸附率见表1。

表1 5种大孔吸附树脂对狗脊总鞣质的静态吸附量和静态吸附率

Tab 1 Static adsorption quantity and adsorption rate of total tannins from *C. baronetz* by 5 types of macroporous resin

树脂类型	比上样量,mg/L	比吸附量,mg/L	吸附率,%
D101	20.01	19.80	99.25
HPD450	20.03	18.58	96.84
HPD100	20.00	19.19	98.05
DM130	20.03	19.51	98.68
HPD700	20.04	16.29	92.30

2.5.3 大孔吸附树脂静态解吸量和静态解吸率测定 上述吸附饱和的5种大孔吸附树脂用水冲洗后,加入95%乙醇50 ml,静置12 h,时时振摇,抽滤,滤液按“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度。从标准曲线中读出总鞣质质量浓度,按下式计算解吸量(W)、解吸率和比上样量: $W=c \times V/m$ 、解吸率= $c/(c_0-c_1) \times 100\%$ 、比上样量=(上柱液中总鞣质质量-过柱液中总鞣质质量)/树脂体积(式中, c 为解吸液质量浓度)。5种大孔吸附树脂对狗脊总鞣质的静态解吸量和静态解吸率见表2。

表2 5种大孔吸附树脂对狗脊总鞣质的静态解吸量和静态解吸率

Tab 2 Static desorption quantity and static desorption rate of total tannins from *C. baronetz* by 5 types of macroporous resin

树脂类型	比上样量,mg/L	比解吸量,mg/L	解吸率,%
D101	20.01	14.30	87.08
HPD450	20.03	8.14	81.32
HPD100	20.00	17.71	82.52
DM130	20.03	12.15	71.03
HPD700	20.04	18.08	85.09

以上综合考察了各种树脂对狗脊总鞣质的吸附和解吸附性能。结果表明,D101型大孔吸附树脂对狗脊总鞣质具有易于吸附和易于解吸的优点,适于狗脊总鞣质的富集和纯化。

2.6 大孔吸附树脂富集狗脊中总鞣质的工艺考察

2.6.1 泄露曲线的绘制 量取D101型树脂20 ml,装柱,将供试品溶液缓缓加入树脂柱中,控制流速为1柱体积(BV)/h,收集洗脱液,每20 ml为一份,跟踪测定每份样品的吸光度。从标准曲线中读出总鞣质质量浓度,按下式计算泄漏率:泄漏率=洗脱液中总鞣质质量浓度/上样液中总鞣质质量浓度×100%,并绘制泄露曲线。狗脊总鞣质泄露曲线见图1。

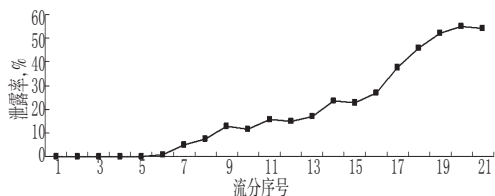


图1 狗脊总鞣质泄露曲线

Fig 1 Leak curve of total tannins from *C. baronetz*

由图1可知,上样量为180 ml时,泄漏率为12%,确定120 ml(6 BV)为最大上样量。

2.6.2 吸附时间考察 量取D101型树脂20 ml,共3份,分别装柱,将6 BV供试品溶液缓缓加入树脂柱中,分别吸附30、60、90 min,以5 BV水洗脱,控制流速为1 BV/h,收集流分,照“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,计算洗脱率(按泄漏率公式计算)。结果,洗脱率依次为2.79%、1.58%、0.06%,吸附90 min后洗脱率最低,故确定90 min为最佳吸附时间。

2.6.3 水洗用量考察 照“2.6.2”项下方法装柱、上样、吸附后,依次用1、2、3、4、5、6 BV水洗脱,照“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,计算得洗脱液中总鞣质质量分别为0.01、0.02、0.04、0.10、0.11、0.15 mg。同时,将流分干燥至恒重,得干膏质量分别为0.09、0.05、0.04、0.03、0.03、0.03 g。由此可知,水洗用量超过4 BV时,杂质质量无明显变化,而总鞣质质量逐渐增加,故确定最佳水洗用量为3 BV。

2.6.4 洗脱溶媒的确定 照“2.6.2”项下方法装柱、上样、吸附后,先用3 BV的水洗脱,去除杂质,再依次用10%、20%、30%、50%乙醇洗脱,各洗脱4 BV,收集流分(每1 BV为一流分),照“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,计算洗脱率。狗脊总鞣质在不同溶剂中的洗脱率见表3。

表3 狗脊总鞣质在不同溶剂中的洗脱率(%)

Tab 3 Elution rates of total tannins from *C. baronetz* in different solvents (%)

洗脱溶媒	上样的总鞣质质量,mg	流分			
		1 BV	2 BV	3 BV	4 BV
10%乙醇	146.6	8.7	11.1	11.9	9.8
20%乙醇	146.6	19.5	14.6	13.1	7.8
30%乙醇	146.6	5.3	1.0	1.4	1.7
50%乙醇	146.6	1.6	0.9	1.1	1.4

由表3可知,10%、20%乙醇可将96.5%的狗脊总鞣质洗脱下来,而30%、50%乙醇洗脱下来的总鞣质质量仅为7%左右。由此可知,10%、20%乙醇对总鞣质有较好的洗脱能力,故确定洗脱溶媒为10%、20%乙醇,洗脱体积为4 BV。

综上,狗脊总鞣质的树脂纯化工艺为狗脊药材粉末采用60%丙酮超声提取,上D101型大孔吸附树脂,最大上样量为6 BV(0.1 g/ml),吸附90 min后,以1 BV/h流速洗脱,3 BV水除杂,以各4 BV的10%、20%乙醇洗脱,收集洗脱液即可得到狗脊总鞣质。100 g洗脱液经富集纯化后的总鞣质质量可达

69.2 g。

2.7 放大试验

精密吸取供试品溶液360 ml,缓缓上于装有已处理好的60 ml D101型大孔吸附树脂的色谱柱中,吸附90 min后,以1 BV/h流速洗脱,3 BV水除杂,以各4 BV的10%、20%乙醇洗脱,收集流分,照“2.4.1”项下自“加入磷钼钨酸试液1 ml”起操作,依法测定吸光度,计算洗脱率。结果,洗脱率为92.64%,即100 g供试品溶液上样后,可洗脱出92.64 g溶液;总鞣质质量分数为69.5%,即100 g洗脱液经富集纯化后总鞣质质量可达69.5 g。

3 讨论

本试验考察了包含非极性、中等极性、极性和强极性的5种树脂,结果显示,不同型号的树脂对狗脊总鞣质的吸附和解吸附能力差别较大,提示树脂型号的筛选对纯化有效成分影响较大^[8]。试验最终优选出对狗脊总鞣质吸附和解吸性能较好的D101型树脂,原因是D101型大孔吸附树脂比表面积较大,且对糖、无机盐等杂质成分吸附较差,而对狗脊中鞣质类成分具有较好的选择性吸附。

采用《中国药典》方法^[9]进行质量浓度测定时,发现由于质量浓度过高,29% Na₂CO₃极易析出,影响含量测定。为避免Na₂CO₃溶液的析出,分别考察了15%、20%、29%的Na₂CO₃溶液对吸光度的影响,结果三者的吸光度无显著性差异(RSD<3%)。采用20% Na₂CO₃溶液为显色剂时,测定结果稳定(RSD=2.21%)、重现性好(RSD=0.78%),加样回收率为99.5%(RSD=1.7%)。因此,本试验选用20% Na₂CO₃溶液作为显色剂。

干酪素可选择性吸附具有生理活性的鞣质,对鞣质的吸附作用较经典的皮粉法更具专属性^[10]。因此,本试验采用干酪素法测定总鞣质质量浓度。

参考文献

- [1] Zhao X, Wu ZX, Zhang Y, et al. Anti-osteoporosis activity of *Cibotium barometz* extract on ovariectomy-induced bone loss rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1 083.
- [2] 索天娇. 狗脊生、制品不同提取部位药效学研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2010: 6.
- [3] 步显坤. 烫狗脊的炮制机制研究[D]. 大连: 辽宁中医药大学, 2010.
- [4] Cuong NX, Minh CV, Kiem PV, et al. Inhibitors of osteoclast formation from Rhizomes of *Cibotium barometz* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(9): 1 673.
- [5] 许枏, 贾天柱. 烫狗脊炮制过程的化学反应及产物研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(15): 2 066.
- [6] 许枏, 章琪, 曹跃, 等. 烫狗脊中的两个新鞣质[C]//中华中医药学会中药炮制分会2011年学术年会论文集. 贵阳: 中华中医药学会中药炮制分会, 2011: 245.
- [7] 应雪, 陈文, 江发寿, 等. 大孔吸附树脂分离纯化甘草总黄酮工艺研究[J]. *中国药房*, 2006, 17(17): 1 355.
- [8] 李红冰, 唐玲, 陈跃龙, 等. D101型大孔吸附树脂纯化油茶皂苷的工艺研究[J]. *中国药房*, 2009, 20(12): 900.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录62.
- [10] 罗文毓, 李计萍, 章育中. 中药中鞣质含量测定方法的比较研究[J]. *药物分析杂志*, 1990, 10(4): 249.

(收稿日期: 2012-02-12 修回日期: 2012-04-17)