

## 工业化提取分离纯化独一味总环烯醚萜苷类成分

邱建国, 张泉龙, 尉丽力, 李茂星, 贾正平\*, 张汝学, 樊鹏程, 邱宜农  
(兰州军区兰州总医院药材科, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的:应用大孔吸附树脂结合聚酰胺柱色谱法富集分离独一味中总黄酮、总环烯醚萜苷类极性成分,实现工业化生产。方法:用系列色谱设备进行分离富集,一阶导数紫外分光光度法测定总环烯醚萜苷含量、高效液相色谱法测定山梗苷甲酯、8-O-乙酰山梗苷甲酯,并考察不同洗脱条件下有效成分总环烯醚萜苷的变化。结果:采用 70% 乙醇溶液为溶媒。大孔吸附树脂柱用“下进上出”的进样方式和“上进下出”的洗脱方式时,得率为 20.80%,总环烯醚萜苷、山梗苷甲酯和 8-O-乙酰山梗苷甲酯的转移率分别为 70.77%、76.36%、68.74%。结论:生产工艺方法及参数可以成功地将实验成果转化为工业化生产。

**[关键词]** 独一味;总环烯醚萜苷;分离富集;工业化生产

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)13-0032-04

## Extraction and Purification of Total Iridoid Glycosides from *Herba Lamiophlomis Rotata* in Industrialization

QIU Jian-guo, ZHANG Quan-long, WEI Li-li, LI Mao-xing, JIA Zheng-ping\*,  
ZHANG Ru-xue, FAN Peng-cheng, QIU Yi-nong

(Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

**[Abstract]** **Objective:** The macroporous adsorptive resins chromatographic column combining with polyamide chromatographic column was used to separate the flavonoides, iridoid glycosides and maximum polarity ingredients in industrialization. **Method:** The flavonoides, iridoid glycosides and maximum polarity ingredients were separated and enriched by CCPP serial laminar analysis equipment, the content of total iridoid glycosides was assayed by the first derivative spectrophotometry; the content of shanzhiside methylester and 8-O-acetyl shanzhiside methylester was determined by HPLC and the change of total iridoid glycosides was investigated in different elution requirement. **Result:** 70% alcohol was used as dissolvent. Using the ‘introduction from inferior surface’ sample introduction mode and ‘introduction from superior surface’ eluting mode in the macroporous adsorptive resins, the yield was 20.80%, transfusion ratio for shanzhiside methylester and 8-O-acetyl shanzhiside methylester was 70.77% 73.36% and 68.74% respectively. **Conclusion:** This production technology may transform experimental achievement to industrial production successfully.

**[Key words]** *Herba Lamiophlomis Rotata*; total iridoid glycosides; separating and enriching; industrial production

独一味系藏族习用药材,具有活血止血,祛风止

痛的功效<sup>[1]</sup>。本课题组通过药理实验筛选,首次确定了独一味总环烯醚萜苷是独一味的止血、镇痛活性部位,并应用现代天然药物化学分离方法,采用大孔吸附树脂结合聚酰胺柱色谱法实现独一味中总黄酮、总环烯醚萜苷及大极性部分的富集分离,相关工艺流程获得国家发明专利,为藏药独一味的研究及二次开发打下了良好基础。

**[收稿日期]** 20110227(002)

**[第一作者]** 邱建国,副主任药师,从事高原中药及新药的研究, Tel: 0931-8994676, E-mail: qjianguo@163.com

**[通讯作者]** \* 贾正平,主任药师,博士生导师,从事医院药学的研究, Tel: 0931-8994652, E-mail: jiazp166@sina.com

工业化提取纯化总环烯醚萜苷类成分与实验室有较大的不同,如工业化生产用的色谱柱比较长,至少在 2.5 m,因此如何提高产品的得率和转移率,溶媒、洗脱速度、洗脱方式等工业化生产的关键参数需进一步优选研究。

1 材料

独一味药材于 2004 年 5 月购自甘肃省玛曲县药材公司,经兰州大学药学院赵汝能教授鉴定为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata*;山栀苷甲酯 (8-O-乙酰山栀苷甲酯 (8-O-acetyl shanzhiside-methylester) 对照品 (由本研究室分离纯化并鉴定结构, HPLC 归一化法测定含量为 97.5%),柱色谱用聚酰胺粉 (14~30 目,台州市路桥四甲生化塑料厂, 20091022); XDA-1 大孔吸附树脂 (蓝晓科技有限公司特种树脂厂)。

高效液相色谱仪, Waters 960 泵, Waters 600 E 紫外检测器, C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), HP 8453 二级管阵列紫外-可见分光光度计 (美国惠普公司), BP210 S 型电子天平 (德国 Sartorius AG), TN 型托盘式扭力天平 (上海第二天平仪器厂), 真空干燥柜 (武汉制药机械厂), HTN-0.3/0.2 型多能提取罐 (陕西三原宏达实业公司), CCPP 系列色谱设备 (江阴市金确层析设备有限公司), HTN-3 型真空浓缩罐 (陕西三原宏达实业公司制造), 3200-25 型磁力驱动泵 (上海中耐制泵有限公司), MG12 A 型真空灭菌干燥箱 (江苏常熟中药制药机械总厂)。

2 方法与结果

2.1 独一味水提物的制备 称取独一味药材 134 kg,常水冲洗至无泥沙,至多能提取罐,加水适量 (2/3 罐体处),浸润 30 min,煎煮提取 3 次 (压力 ≤ 0.045 MPa),每次 1 h,提取液至贮罐,放凉,备用。

2.2 独一味水提取物联合柱纯化进样 第 1 组聚酰胺柱 (A1) 和大孔吸附树脂柱 (B1) 串联,第 2 组聚酰胺柱 (A2) 和大孔吸附树脂柱 (B2) 串联,第 3 组聚酰胺柱 (A3) 和大孔吸附树脂柱 (B3) 串联,这 3 组串联柱再并联。见图 1。

装柱:将每根聚酰胺柱装入聚酰胺粉 40 kg,大孔吸附树脂柱装入大孔吸附树脂 100 kg。

进样方式:聚酰胺柱,上进下出;大孔吸附树脂柱,下进上出;即打开聚酰胺柱的“上进”、“上排”、“进料”、“串出”阀门,大孔吸附树脂柱的“下进”、“串进”、“上排”、“出料口”阀门,聚酰胺柱的“上

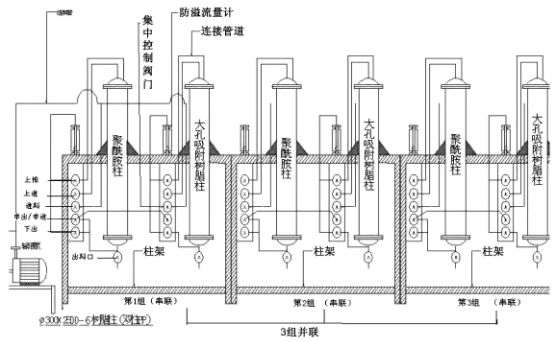


图 1 工业化分离、纯化独一味总环烯醚萜苷成分示意图  
排”管流出溶液时,关闭此阀门,大孔吸附树脂柱的“出料口”流出溶液稳定时,关闭此阀门。

进样量:每隔 2 h 从聚酰胺柱出料口取样,进样 50% 量之后,每隔 0.5 h 从聚酰胺柱出料口取样,用 AlCl<sub>3</sub> 试剂荧光检测是否有黄酮类成分流出,以确定进样饱和度,如果荧光检测有亮黄色荧光斑点,则说明有黄酮类成分流出,进样饱和,否则可以继续进样。各个参数及结果见表 1。

表 1 独一味水提取物联合柱纯化进样速度及检测

| t/h  | 进样速度 /L·h <sup>-1</sup> |     |    |    |     |     | 出料口 AlCl <sub>3</sub> 试剂荧光检测 |
|------|-------------------------|-----|----|----|-----|-----|------------------------------|
|      | A1                      | B1  | A2 | B2 | A3  | B3  |                              |
| 0    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 100 | 100 | 阴性                           |
| 2    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 100 | 100 | 阴性                           |
| 4    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 100 | 100 | 阴性                           |
| 6    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 100 | 100 | 阴性                           |
| 7    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 80  | 80  | 阴性                           |
| 7.5  | 100                     | 100 | 50 | 50 | 50  | 50  | 阴性                           |
| 8    | 100                     | 100 | 50 | 50 | 50  | 50  | A1 柱阳性;<br>A2, A3 柱阴性        |
| 8.5  | -                       | -   | 50 | 50 | 50  | 50  | 阴性                           |
| 9    | -                       | -   | 50 | 50 | 50  | 50  | A3 柱阳性;<br>A2 阴性             |
| 9.5  | -                       | -   | 50 | 50 | -   | -   | 阴性                           |
| 10   | -                       | -   | 50 | 50 | -   | -   | 阴性                           |
| 10.5 | -                       | -   | 50 | 50 | -   | -   | 阴性                           |
| 11   | -                       | -   | 50 | 50 | -   | -   | 阴性                           |

注: AlCl<sub>3</sub> 试剂荧光检测阳性说明有黄酮类成分流出, 阴性说明没有流出黄酮类成分。

2.3 水洗除杂 先用常水洗脱,洗至无色,上水速度 200 L·h<sup>-1</sup>,上水方式:聚酰胺柱,上进下出;大孔吸附树脂柱,下进上出;再用纯化水 120 L 洗脱, HPLC 测定洗脱情况。

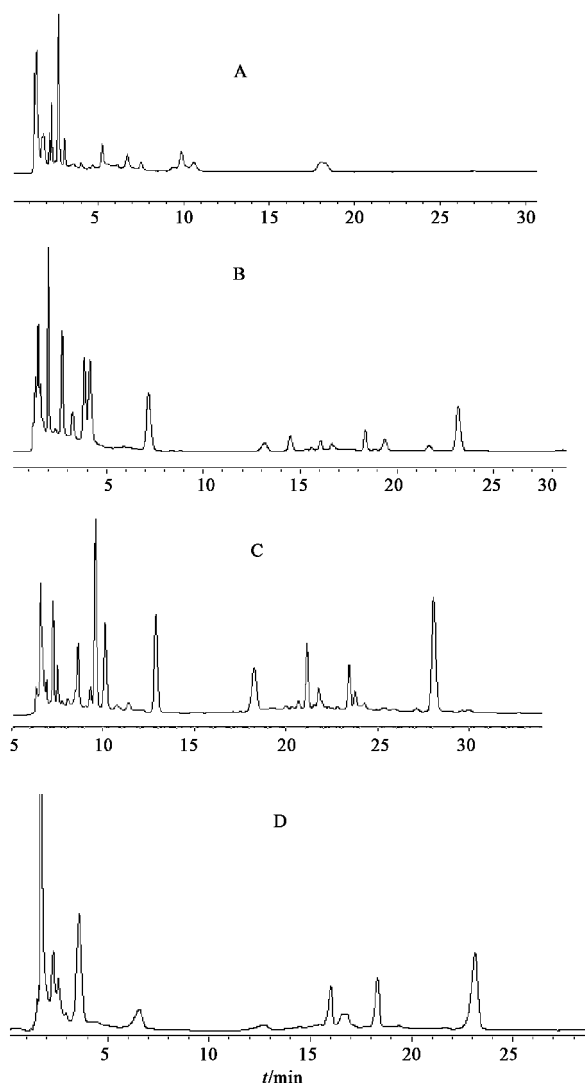
**2.4 70% 乙醇溶液洗脱** 聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱采用并联。用 70% 乙醇溶液 140 kg 分别洗脱聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱,洗脱至流出液有乙醇味时,停止洗脱,浸泡 2 h,继续洗脱,洗脱速度  $40 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ,洗脱方式“上进下出”。HPLC 测定大孔吸附树脂柱洗脱情况,见图 2。

**2.5 洗脱物含量测定** 将乙醇洗脱溶液进行减压回收乙醇,回收后的洗脱物减压浓缩干燥,温度控制在  $80^\circ\text{C}$  以下。干浸膏超微粉碎成细粉,测定总环烯醚萜苷、山栀苷甲酯、8-O-乙酰山栀苷甲酯的含量,并计算得率及其转移率,结果见表 2。

**2.6 聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱的再生利用** 聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱采用并联。配制  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液适量,冲洗至无色;配制  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 溶液适量,冲洗;用常水冲洗至中性,用 95% 乙醇溶液保存。洗脱速度  $300 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ,洗脱方式“上进下出”。

## 2.7 含量测定

**2.7.1 总环烯醚萜苷类成分含量测定** 称取 8-O-乙酰山栀苷甲酯对照品 20.4 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,蒸馏水溶解并定容,得对照品溶液 I。分别精密吸取对照品溶液 I 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 mL 于 10 mL 量瓶中,蒸馏水定容,测定吸收度( $\lambda = 253 \text{ nm}$ ),以质量浓度为横坐标、A 为纵坐标作工作曲线图,得回归方程  $A = -0.001 C + 0.0002$ 。精密称取洗脱物细粉 0.01 g,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解定容至 100 mL,一阶导数法测定<sup>[2]</sup>。



A. 水洗除杂流出液;B. 大孔树脂柱 70% 乙醇洗脱初液;  
C. 大孔树脂柱乙醇浸泡 2 h 溶液;D. 最终洗脱液  
图 2 工业化生产纯化、分离不同阶段分离物 HPLC

表 2 水提物和洗脱物含量测定及转移率、得率计算

| 批号     | 药材<br>投料量<br>/kg | 水提物中质量分数 /% |           |                 | 洗脱物中质量分数 /% (转移率 /%) |              |                 | 洗脱物<br>得量 /kg<br>(得率 /%) | 备注(大孔<br>吸附树脂柱<br>上样方式) |
|--------|------------------|-------------|-----------|-----------------|----------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
|        |                  | 总环烯<br>醚萜苷  | 山栀苷<br>甲酯 | 8-O-乙酰<br>山栀苷甲酯 | 总环烯<br>醚萜苷           | 山栀苷<br>甲酯    | 8-O-乙酰<br>山栀苷甲酯 |                          |                         |
| 2009-1 | 20               | 16.14       | 1.82      | 1.94            | 53.94(21.72)         | 7.20(25.72)  | 7.02(23.54)     | 1.30(6.50)               | 上进下出                    |
| 2009-2 | 42               | 16.04       | 1.92      | 2.14            | 57.91(78.22)         | 7.772(87.80) | 6.951(70.41)    | 9.10(21.67)              | 下进上出                    |
| 2009-3 | 31               | 16.08       | 1.91      | 2.05            | 57.77(74.17)         | 7.366(79.49) | 7.107(71.71)    | 6.40(20.65)              | 下进上出                    |
| 2010-1 | 48.8             | 17.68       | 2.03      | 1.94            | 52.74(59.91)         | 6.25(61.80)  | 6.21(64.10)     | 9.80(20.08)              | 下进上出                    |

注:转移率 = 洗脱物中的含量 × 成品量 / (水提物中的含量 × 投料量) × 100%;得率 = 成品量 / 投料量 × 100%。

**2.7.2 山栀苷甲酯和 8-O-乙酰山栀苷甲酯的含量测定**<sup>[1,3]</sup> 照高效液相色谱法(《中国药典》2010 年

版一部 附录 VID)测定。

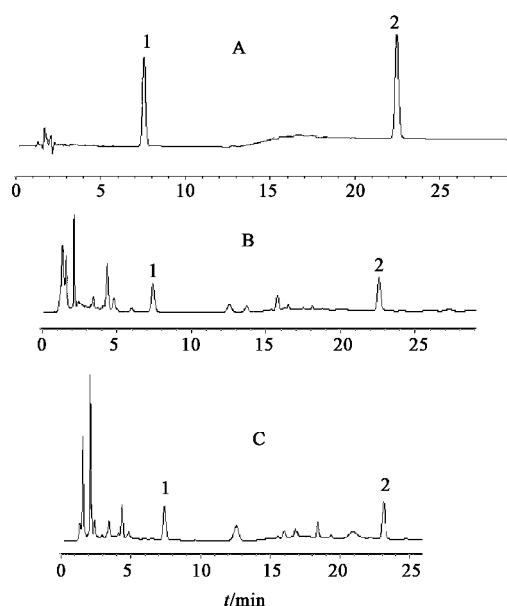
色谱条件与系统适用性试验: 以十八烷基硅

烷键合硅胶为填充剂,以9%乙腈溶液和15%乙腈溶液为流动相,梯度洗脱(0~11 min,9%乙腈溶液;11~24 min,15%乙腈溶液;24~31 min,9%乙腈溶液),检测波长235 nm。理论塔板数按山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯峰计算不低于1 500。

对照品溶液的制备:分别称取对照品山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯适量,制成每mL含山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯均为35 μg。

供试品溶液的制备:分别称取独一味药材0.5 g,洗脱物细粉0.06 g,精密称定,置25 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇溶液25 mL,称定质量,超声提取(功率250 W,频率50 kHz)30 min,放冷,称定质量,补足质量,滤过,滤液备用。

测定:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。见图3。



A. 对照品;B. 独一味对照药材;C. 大孔树脂柱70%乙醇洗脱物;  
1. 山梔苷甲酯;2. 8-O-乙酰山梔苷甲酯

图3 独一味中山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯HPLC

### 3 讨论

应用聚酰胺富集、分离独一味中的总黄酮,大孔吸附树脂富集、分离独一味总环烯醚萜苷类成分的工业化生产,分离、富集效果与降低成本都要兼顾,洗脱速度的控制很重要,速度太快,成分会泄漏;速度太慢,会增加成本;通过反复实验、摸索,进样时,选用A3柱的速度较好,即在≤50%进样量速度相对快一点;后面则慢点。由图2、3可知,水洗脱对山梔苷甲酯和8-O-乙酰山梔苷甲酯没有造成损失。用70%乙醇洗时,先浸泡2 h后再用较低速度洗脱,更容易将成分解析出来。洗脱吸附在大孔吸附树脂上的总环烯醚萜苷类成分时,70%乙醇溶液注满柱子后先浸泡2 h以后,再用较低速度洗脱。

如何提高洗脱物的得率和转移率,除了洗脱速度的影响,还与进样方式和洗脱方式有很大的关系,尤其大孔吸附树脂柱,进样方式不同,结果截然不同,如表2中洗脱方式均采用“上进下出”,进样方式采用“上进下出”时,得率为6.5%,总环烯醚萜苷、山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯的转移率分别为21.72%、25.72%、23.54%;反之用“下进上出”的进样方式,得率为20.80%,总环烯醚萜苷、山梔苷甲酯、8-O-乙酰山梔苷甲酯的转移率分别为70.77%、76.36%、68.74%;因为采用“下进上出”的方式,成分大多数富集在下部,用“上进下出”的方式洗脱更容易洗脱下来。根据各项测定数据,此生产工艺方法及参数较成功地将实验成果转化为工业化生产。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:245.
- [2] 李茂星,贾正平,沈涛. 分光光度法测定藏药独一味及其制剂中总环烯醚萜苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1):45.
- [3] 桑国卫. 中国药品检验标准操作规程[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2005:6.

[责任编辑 全燕]