

不同型号大孔树脂对雷公藤提取物主要成分富集作用考察

吴德智, 蔡佳, 管咏梅, 王森, 陈丽华*, 欧阳胜
(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 筛选富集雷公藤提取物中主要有效成分的最佳大孔树脂型号。方法: 建立雷公藤甲素、雷公藤吉碱的 HPLC 含量测定方法。以雷公藤甲素、雷公藤吉碱为指标, 采用静态、动态吸附法筛选最佳大孔树脂型号。结果: HPD100 型大孔树脂对雷公藤甲素和雷公藤吉碱的吸附量、解吸附量、解吸附率均较高, 其中静态筛选时解吸附率分别为 92.75%、84.84%, 动态筛选时洗脱率分别为 92.95%、90.02%。结论: 可选用 HPD100 型树脂用于分离纯化雷公藤提取物。

[关键词] 雷公藤; 大孔树脂; 筛选; 静态吸附; 动态吸附

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0014-03

Investigation of Enrichment Effect for Main Ingredients from Extract of *Tripterygium wilfordii* by Different Types of Macroporous Resin

WU De-zhi, CAI Jia, GUAN Yong-mei, WANG Sen, CHEN Li-hua*, OUYANG Sheng

(Key Lab for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education of China;
Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To select optimum macroporous resin for enrichment of triptolide and wilforgine from *Tripterygium wilfordii*. **Method:** Methods of determination for triptolide and wilforgine from extract of *T. wilfordii* by HPLC were established. Optimum type of macroporous resin was selected by static and dynamic adsorption with the contents of triptolide and wilforgine as indexes. **Result:** HPD100 macroporous resin was the best resin of purifying triptolide and wilforgine, rate of static adsorption of triptolide and wilforgine was 92.75% and 84.84%, respectively. Rate of dynamic adsorption of triptolide and wilforgine was 92.95% and 90.02%, respectively. **Conclusion:** HPD100 macroporous resin could be used to purify extract of *T. wilfordii*.

[Key words] *Tripterygium wilfordii*; macroporous resin; select; static adsorption; dynamic adsorption

雷公藤对治疗风湿性关节炎、慢性肾炎、红斑狼疮及肿瘤等自身免疫性疾病疗效显著^[1], 其主要成分为雷公藤甲素和雷公藤吉碱。关于两者的提取, 目前主要采用水或乙醇提取, 然后采用三氯甲烷、乙酸乙酯等有机溶剂萃取^[2], 亦有采用超临界 CO₂ 流

体萃取技术分离雷公藤的有效成分^[3]。本课题组前期试验初步探讨了雷公藤提取液的萃取工艺及大孔吸附树脂对雷公藤有效成分富集的可行性。本试验以萃取后雷公藤提取物为原料, 以不同极性大孔树脂为考察对象, 比较静态、动态吸附对纯化效果的影响, 旨在优选出最佳大孔树脂型号, 为雷公藤提取物的进一步分离纯化提供试验依据。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪 (Agilent), UV2550 型紫外分光光度计 (日本岛津公司), TG328A 型 1/10 万电子天平 (德国 Startorius 公司)。

雷公藤药材 (福建汉堂生物制药股份有限公司, 经江西中医学院赖学文老师鉴定为卫矛科植物

[收稿日期] 20120507(017)

[基金项目] “十一五”重大新药创制项目 (2008ZX09310-005)

[第一作者] 吴德智, 在读博士, 讲师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119010, E-mail: wudezh1983@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈丽华, 博士, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119010, E-mail: chllly98@163.com

雷公藤 *Tripteryginum wilfordii* Hook. f 的干燥根),雷公藤甲素(中国药品生物制品检定所,批号 111567-200502),雷公藤吉碱(自制,纯度 > 98%),HPD100,HPD450,HPD500,HPD600,AB8,D101 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料有限公司),中性氧化铝(国药集团化学试剂有限公司),乙酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司),石油醚(60~90℃,天津市恒兴化学试剂制造有限公司),乙腈、甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 雷公藤甲素色谱条件及方法学考察^[4]

Phenomenex-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30℃,流动相乙腈-水(45:55),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 218 nm,进样量 20 μL。在上述条件下,雷公藤甲素色谱峰和供试品溶液中其他色谱峰达到了基线分离。雷公藤甲素回归方程 $Y = 41.890X + 0.0469$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.50 ~ 14.07 mg·L⁻¹,精密度试验 RSD 0.98%,稳定性试验 RSD 1.84%,平均回收率 98.14%,RSD 1.58%。

2.1.2 雷公藤吉碱色谱条件及方法学考察^[5]

Phenomenex-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30℃,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~12 min, 55%~50% A; 12~13 min, 50%~55% A; 13~20 min, 55% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 268 nm,进样量 20 μL。在上述条件下,雷公藤吉碱色谱峰和供试品溶液中其他色谱峰达到了基线分离,雷公藤吉碱回归方程 $Y = 5.190X + 3.196$ ($r = 0.9994$),线性范围 10.2 ~ 81.6 mg·L⁻¹,精密度试验 RSD 0.97%,稳定性试验 RSD 1.34%,平均回收率 96.03%,RSD 0.96%。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 雷公藤甲素供试品溶液的制备 精密量取洗脱液 50 mL 置于蒸发皿中 60℃ 水浴挥干,以混合溶剂 A(石油醚-乙酸乙酯 4:1)溶解并转移至 5 mL 量瓶中,继续添加混合溶剂 A 至刻度;以混合溶剂 A 湿法装中性氧化铝柱(10 mm × 230 mm),以上述定容后溶液上柱,以混合溶剂 A 洗脱,收集洗脱液 50 mL,弃去,以混合溶剂 B(石油醚-乙酸乙酯 1:4)洗脱,收集洗脱液 150 mL,将洗脱液置于 60℃ 水浴挥干,以甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,继续加甲醇稀释至刻度,以 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.2 雷公藤吉碱供试品溶液的制备 精密量取洗脱液 10 mL 置于蒸发皿中 60℃ 水浴挥干,以甲醇

溶解并转移至 5 mL 量瓶中,继续加甲醇稀释至刻度,以 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 雷公藤提取液的制备 取药材用 70% 乙醇浸泡 1 h 后,用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,回收乙醇,得 0.3 g·mL⁻¹ 的提取液。

2.3 静态吸附法筛选不同型号大孔树脂

2.3.1 树脂的预处理 选用 AB-8, D101, HPD100, HPD450, HPD500, HPD600 6 种型号的大孔吸附树脂,加乙醇浸泡过夜,放出浸液,用 2.5~5 倍乙醇冲洗树脂,至洗脱液在试管中加 1 倍量水稀释不浑浊,用水洗去乙醇,密封室温保存,备用。

2.3.2 不同大孔树脂的静态吸附试验 将预处理好的 6 种大孔吸附树脂各 2 g(湿重),置于具塞锥形瓶中,分别加入雷公藤提取液 25 mL,密封置于 25℃ 恒温水浴中并定时振摇,24 h 后精密吸取上清液各 2 mL,分别用 HPLC 测定雷公藤甲素、雷公藤吉碱的含量,同时测定原液(未经吸附的雷公藤提取液)中上述各有效成分的含量,计算各有效成分在大孔树脂上的相对比吸附量^[6]。结果见表 1。

表 1 不同大孔树脂静态吸附试验

树脂型号	树脂极性	雷公藤甲素		雷公藤吉碱	
		比吸附量 /μg·g ⁻¹	解吸附率 /%	比吸附量 /μg·g ⁻¹	解吸附率 /%
AB-8	弱极性	42.04	79.33	855.01	65.94
D101	非极性	44.25	85.63	835.74	71.69
HPD100	非极性	42.90	92.75	902.28	84.85
HPD450	弱极性	44.09	59.98	945.75	78.69
HPD500	极性	42.22	91.12	929.91	64.88
HPD600	极性	41.38	63.48	830.02	73.15

$$A = (M_1V - M_2V) / W$$

式中 A 为比吸附量, M_1 为起始浓度; M_2 为剩余浓度; V 为溶液体积; W 为树脂质量。

2.3.3 不同大孔树脂的静态解吸附试验 将上述静态吸附试验中已吸附饱和的 6 种大孔树脂滤出,于滤纸上吸干样液,分别加入 80% 乙醇 10 mL,置于 25℃ 水浴中,振摇,静置 24 h,分别取上清液 1 mL 稀释至 10 mL,测定含雷公藤甲素、雷公藤吉碱的含量,计算解吸附量与解吸附率。结果见表 1。

$$\text{解吸附率} = \text{解吸附量} / \text{吸附量} \times 100\%$$

由表 1 结果可知,HPD450 型大孔树脂对雷公藤甲素和雷公藤吉碱相对比吸附量最高,但解吸附率较低,而 HPD100 型树脂对雷公藤甲素和雷公藤吉碱的吸附量、解吸附率均较高。

2.4 动态吸附法筛选不同型号大孔树脂 精密吸取雷公藤提取液(含生药量 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 6 份, 每份 25 mL, 分别以 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速上柱 ($2 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$, 各树脂干重 50 g) 预吸附 1 h, 上样流出液重吸附 1 次, 收集过柱残液。用 20% 乙醇洗至洗脱液无色, 收集洗脱液, 用 90% 乙醇洗脱至洗脱液基本无色, 控制洗脱流速 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 收集乙醇洗脱液。分别测定上柱液、过柱残液、乙醇洗脱液中雷公藤甲素、雷公藤吉碱的含量, 计算比吸附量和解吸附率, 结果见表 2。

表 2 雷公藤甲素动态吸附筛选结果

树脂型号	树脂极性	雷公藤甲素		雷公藤吉碱	
		比吸附量 $/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	解吸附率 /%	比吸附量 $/\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	解吸附率 /%
AB-8	弱极性	3.36	80.59	100.69	83.08
D101	非极性	3.36	75.97	101.18	77.51
HPD100	非极性	3.37	92.95	99.17	90.02
HPD450	弱极性	3.31	80.87	101.98	81.26
HPD500	极性	3.37	75.96	98.88	75.68
HPD600	极性	3.47	82.73	101.22	79.86

由表 2 结果可知, 在筛选的 6 种树脂中, HPD100 型非极性树脂对雷公藤甲素和雷公藤吉碱的比吸附量及解吸附率均较高。

3 讨论

大孔吸附树脂作为一种新型非离子型高分子聚合物吸附剂已广泛应用于中药材的分离纯化工艺, 对于中药(复方)提取液, 不同组分在大孔树脂上的吸附量、解吸附率均存在较大的差异。因此, 选择适宜型号(极性)的大孔树脂对于中药活性成分的分离纯化具有广泛意义。雷公藤甲素作为雷公藤的活性成分之一, 有明显的抗炎作用, 对风湿、类风湿性

关节炎有非常好的疗效; 雷公藤吉碱是雷公藤提取物中含量较高的成分之一, 毒性远低于雷公藤甲素等二萜类成分, 且具有明显的免疫抑制、抗肿瘤及抗生育等作用。本试验选用雷公藤甲素和雷公藤吉碱作为活性成分筛选适宜型号的大孔树脂。

静态吸附和动态吸附法对 6 种型号的大孔树脂的筛选结果表明, HPD100 型树脂在吸附量、比解吸附量及解吸附率均优于其他型号树脂, 为合理确定雷公藤制剂提取物的大孔树脂分离纯化工艺条件提供试验依据。后续试验将对 HPD100 型树脂纯化雷公藤提取物的工艺条件如吸附流速、上样浓度、pH、上样量等吸附条件及水洗量、乙醇体积分数和乙醇用量等解析条件作进一步考察。

[参考文献]

- [1] 李春庆, 孙伟, 邵家德, 等. 雷公藤减毒研究述评[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 263.
- [2] 陈俊元, 夏志林, 邓福孝. 雷公藤内酯醇提取工艺改进[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(5): 195.
- [3] 王侍宏, 杨祥良, 韩定献, 等. 超临界二氧化碳萃取雷公藤中有效成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(11): 641.
- [4] 张聪聪, 黄建明, 俞媚华, 等. HPLC 法测定雷公藤提取物中雷公藤甲素及两种生物碱的含量[J]. 复旦学报: 医学版, 2009, 36(3): 333.
- [5] 陈列忠, 王开金, 陈建明, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地雷公藤根皮中 3 种生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 191.
- [6] 颜红, 夏新华, 罗堃, 等. 5 种大孔树脂对舒胸片 6 种成分的吸附-解吸附性能研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 5.

[责任编辑 全燕]