毛连菜总酚含量测定和纯化工艺研究

郭娜¹, 韩伟健¹, 周翎², 林晓彤¹, 许柎^{1*} (1.辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2.大连海港医院, 辽宁 大连 116101)

摘要: 目的 建立毛连菜总酚的含量测定方法, 并优选其大孔吸附树脂纯化工艺。方法 采用紫外-可见分光光度法测定毛连菜总酚的含量, 以吸附量、解吸率、解吸量等指标优选毛连菜总酚的大孔吸附树脂富集纯化工艺。结果 所建立的质量控制方法的精密度、重复性和稳定性良好, 其RSD均<3.0%。优选出了HP-20树脂对毛连菜总酚有较好的吸附、解吸性能, 最佳工艺: 上样的毛连菜水溶液总酚浓度为 $8.54 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 上样体积为1 BV, 控制流速为 $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。先用水和10%乙醇洗去杂质, 用量各4 BV, 收集4 BV的30%乙醇和3 BV的50%乙醇洗脱液, 浓缩, 即得。结论 本实验建立的质量控制方法简单、准确, 经HP-20树脂分离纯化, 毛连菜总酚的纯度可达87%以上, 且工艺稳定。

关键词: 毛连菜; 大孔吸附树脂; 总酚; 含量测定; 纯化工艺

中图分类号: R284.2; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)05-0602-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.05.019

Determination and Purification Technology of Total Phenols from *Picris Japonica* Thunb.

GUO Na¹, HAN Weijian¹, ZHOU Ling², LIN Xiaotong¹, XU Nan^{1*} (1.School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2.Dalian Harbour Hospital, Dalian 116101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the content determination and purification technology of total phenols from *Picris japonica* Thunb. **METHODS** The content of total phenols was determined by UV-visible spectrophotometry and the purification technology of total phenols by macroporous resin was optimized with extent of adsorption, adsorption rate, desorption amount and desorption rate as index. **RESULTS** The RSD of precision, reproducibility and stability of the quality control method were <3.0%. HPD-20 macroporous resin showed good purified capability to total phenols from *Picris japonica* Thunb.. Optimum technology conditions were determined as follow: 1 BV of sample solution (the content of total phenols was $8.54 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) was passed through microporous resin with elution rate of $2 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, after eluted with 4 BV of water and 4 BV of 10% ethanol, then collected 4 BV of 30% ethanol eluent and 3 BV of 50% ethanol eluent, and concentrated the combined eluent under vacuum to yield the purified total phenols. **CONCLUSION** The method established for determined the content of total phenols from *Picris japonica* Thunb. is convenient and accurate. After used HP-20 resin and the optimized technology, the purity of total phenols from *Picris japonica* Thunb. is >87%, and the process is stable.

KEY WORDS: *Picris japonica* Thunb.; macroporous resin; total phenols; content determination; purification technology

毛连菜(*Picris japonica* Thunb.)为菊科毛连菜属植物, 主要生长于我国的东北、华北等地, 在日本、蒙古等国也有分布。药用全草或地上部分, 药品名称为毛连菜, 在我国主要做蒙药用。蒙医认为毛连菜具有杀黏、止痛、清热、消肿、解毒的功效, 临床用于治瘟疫、流感、阵刺痛、发症、乳痛^[1]。现代药理学研究还揭示了毛连菜具有降血糖、调血脂等作用^[2-3]。蒙医中该药常入散剂, 多用水煎, 民间也有鲜品食用或直接捣碎敷于患处的用法。

强水溶性的酚性成分广泛存在于药用植物中, 随着学者们对酚类成分药用价值的认识和肯定。毛连菜水提成分的降血糖等作用已被证实^[2-7]。本课题组在前期研究毛连菜化学成分时首次从中

发现多酚类成分, 并发现多酚类成分有较好的抗炎和抗菌作用。由于目前尚未见对毛连菜总酚含量测定方法及纯化工艺的报道, 为深入揭示毛连菜总酚的成分组成与药效作用, 方便规模化生产, 防止药物的浪费, 本试验建立了毛连菜的总酚含量测定方法, 并选取工业上应用广泛有较好吸附性能的材料——大孔吸附树脂, 优选富集纯化工艺。

1 仪器与试剂

FA1004B型十万分之一分析天平(上海精密科学仪器有限公司); UV1750型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); 移液器(德国Eppendorf公司); HP-20型树脂(日本三菱公司); D101型树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)。

儿茶素对照品(中国药品生物制品鉴定所, 批

作者简介: 郭娜, 女, 硕士生 Tel: (0411)85890191 E-mail: guona1991@foxmail.com
E-mail: xudanbs@163.com

*通信作者: 许柎, 女, 博士, 教授 Tel:

号: 877-200001, 供含量测定用); 毛连菜饮片购自安国药材市场(批号: 14060708), 经辽宁中医药大学王冰教授鉴定为毛连菜(*Picris japonica* Thunb.); HPD-600、HPD-450、HPD-417、DM-130型树脂(沧州宝恩化工有限公司); 水为自制双蒸水; 其他试剂均为分析纯, 购自天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 毛连菜提取液的制备 取毛连菜粗粉 20 g, 精密称定, 加 20 倍体积分数的 60%乙醇, 超声提取 2 次, 每次 0.5 h, 滤过, 合并滤液, 蒸干, 残渣加水溶解, 转移至 100 mL 量瓶, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1.1”项下的毛连菜提取液 2.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加 95%乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素对照品, 置 50 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 摇匀, 制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的储备液。精密吸取上述储备液 15 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加乙醇定容, 制成 0.06 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.4 显色反应试液的制备 ①十二烷基硫酸钠试液: 精密称取十二烷基硫酸钠 0.3 g, 加水 100 mL 使溶解, 制得 0.3% 的十二烷基硫酸钠试液; ②铁氰化钾试液: 精密称取铁氰化钾 0.45 g, 加水 50 mL 使溶解, 制得 0.9% 的铁氰化钾试液; ③三氯化铁试液: 精密称取三氯化铁化合物 0.15 g, 加水 50 mL 使溶解, 制得 0.3% 的三氯化铁试液; ④三氯化铁-铁氰化钾混合溶液: 取上述三氯化铁和铁氰化钾溶液, 按 2:1 的比例混合, 即得(临用现配)。

2.2 测定波长的选定

精密吸取上述供试品溶液、对照品溶液各 0.1 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加乙醇至 4 mL, 摇匀, 加 0.3% 的十二烷基硫酸钠溶液 0.8 mL、三氯化铁-铁氰化钾混合溶液 0.6 mL, 摇匀, 暗处放置 5 min, 加 0.1 mol 的盐酸溶液至刻度, 摇匀, 暗处放置 20 min。以相应试剂为空白溶液, 在 400~900 nm 内测定吸收曲线。结果, 供试品溶液和对照品溶液吸收曲线相近, 且均在 750 nm 处有最大吸收。故确定测定波长为 750 nm。

2.3 总酚的含量测定

2.3.1 标准曲线的建立 精密吸取儿茶素对照品

溶液 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 按“2.2”项下的方法, 自“加乙醇至 4 mL”起, 依法于 750 nm 处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标, 质量(x)为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $A=5.849x+0.0042$, $r=0.9991$ 。结果表明, 毛连菜总酚在 0.036~0.132 mg 内线性关系良好。

2.3.2 仪器精密度考察 取供试品溶液 0.1 mL, 共 6 份, 按“2.2”项下的方法, 自“加乙醇至 4 mL”起, 依法平行测定其吸光度, 6 次测定结果的 RSD 为 0.56%, 表明仪器的精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按“2.1.2”项下供试品溶液的制备方法, 平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.2”项下的方法, 自“加乙醇至 4 mL”起, 依法测定其吸光度, 结果 6 份样品吸光度的 RSD 为 0.13%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 稳定性考察 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 20, 40, 60, 90, 120 min, 按“2.2”项下方法, 自“加乙醇至 4 mL”起, 依法测定吸光度, 结果显示样品在 0~120 min 内吸光度较稳定, RSD 为 0.93%($n=6$)。故确定供试品溶液制备后在 120 min 内基本稳定。

2.3.5 加样回收率试验 取按“2.1.2”项下方法制备的供试品溶液 0.05 mL, 共 6 份, 分别精密加入儿茶素对照品溶液 0.7 mL, 按“2.2”项下方法, 自“加乙醇至 4 mL”起, 依法测定吸光度, 计算 6 份样品的平均回收率为 100.4%(RSD=1.4%), 表明所建立的方法回收率良好。

2.3.6 毛连菜总酚的含量测定 精密吸取“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 0.1 mL($n=3$), 测定方法同上, 计算供试品溶液中总酚含量为 8.54%(RSD=1.4%)。

2.4 不同型号树脂的筛选

2.4.1 样品溶液的制备 取毛连菜药材 40 g, 按“2.1.1”项下方法制备毛连菜提取溶液 200 mL(总酚含量为 17.08 mg·mL⁻¹), 供后续的树脂纯化实验使用。

2.4.2 树脂的预处理 取不同型号的大孔吸附树脂, 分别用 95%乙醇浸泡 24 h, 充分溶胀, 装入色谱柱, 用乙醇冲洗, 至洗脱液加水不产生浑浊为止, 用蒸馏水洗至无醇味, 取出, 用滤纸吸干, 备用。

2.4.3 静态吸附量的测定 上述 6 种大孔树脂皆按如下操作, 准确称取预处理好的湿树脂 2.0 g,

装入 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入“2.4.1”项下毛连菜提取液 2 mL(总酚含量 34.16 mg), 加 2 倍蒸馏水稀释, 室温下放置 12 h(时时振摇), 待充分吸附后, 滤过, 测定滤液(吸附液)中总酚含量, 计算静态吸附量和吸附率。结果表明, 其中 HPD-600 和 DM-130 吸附量相对较小, 其他 4 种树脂的吸附量相近, 结果见表 1。

2.4.4 静态解吸率的测定 将上述静态条件下吸附毛连菜总酚达饱和的树脂, 置于 50 mL 具塞磨口三角瓶中, 分别精密加入 95%乙醇溶液 30 mL, 于室温时时振摇 12 h, 充分解吸后, 测定解吸液中的总酚含量, 计算其解吸率和解吸量。结果表明(见表 1), HP-20 型树脂的吸附解吸性能最好。综合考虑其吸附和解吸性能, 确定 HP-20 型树脂为纯化毛连菜总酚的最佳树脂。

吸附率=(吸附前质量浓度-吸附后质量浓度)/吸附前质量浓度; 吸附量=(吸附前质量浓度-吸附后质量浓度); 解吸率=解吸液中总酚/实际吸附总酚; 解吸量=解吸液中总酚。

表 1 6 种大孔树脂对毛连菜总酚的吸附及解吸参数

Tab. 1 Absorption and desorption parameters of 6 types of macroporous resins for total phenols

树脂型号	树脂类型	吸附量/mg	吸附率/%	解吸量/mg	解吸率/%
D101	非极性	32.05	93.82	24.83	77.47
HP-20		32.10	93.97	29.55	92.06
DM-130	中极性	27.70	81.09	23.85	86.10
HPD-450		32.28	94.50	23.62	73.17
HPD-600	极性	28.91	84.63	19.32	66.83
HPD-417	氢键	31.26	91.51	21.78	69.67

2.5 HP-20 型树脂吸附毛连菜总酚工艺优化研究

2.5.1 流速的考察 取预处理好的 HP-20 型树脂 3 份, 每份 10 mL(树脂柱床体积即 BV: 10 mL, 柱体积: 5.2 mL, 干树脂重约 2 g), 分别装入 3 根规格相同的玻璃层析柱中(1.5 cm×20 cm), 水洗平衡。取“2.4.1”项下毛连菜提取液, 用蒸馏水稀释成总酚浓度分别为 8.54 mg·mL⁻¹ 的溶液 8 mL 加载于树脂柱顶端, 分别控制流速为 4, 2, 1 BV·h⁻¹。收集流出液, 测定吸光度并算出吸附率分别为 84.09%, 94.07%, 94.32%, 综合时间因素等选取流速为 2 BV·h⁻¹。

2.5.2 上样方式的考察 取预处理好的 HP-20 型树脂 4 份, 每份 10 mL, 分别装入 4 根规格相同的玻璃层析柱中, 水洗平衡。取“2.4.1”项下毛连

菜提取液 20 mL, 共 4 份, 用蒸馏水稀释成总酚浓度分别为 17.08, 12.81, 8.54, 4.27 mg·mL⁻¹ 的溶液, 分别加载于大孔吸附树脂柱顶端, 以 2 BV·h⁻¹ 的流速进行吸附, 弃去初流份(2 mL)后, 以 1 mL 为 1 个流份, 收集流出液, 测定总酚含量, 结果表明, 以总酚浓度为 8.54, 4.27 mg·mL⁻¹ 的溶液上样时, 上样量较大(总酚含量为 85.4 mg)。8.54 mg·mL⁻¹ 浓度样品的上样量为 1.5 BV 时泄露率达 20.13%, 上样量为 1 BV 时泄露率<10%, 总吸附率为 90.16%, 故选定最佳上样浓度为含总酚浓度为 8.54 mg·mL⁻¹, 最大上样量为 1 BV。

2.5.3 洗脱溶剂的筛选及除杂溶剂的用量 取预处理好的 HP-20 型树脂 10 mL, 湿法装柱, 水洗平衡, 以上述确定总酚浓度的毛连菜提取液上样, 控制流速为 2 BV·h⁻¹, 依次用 5 BV 的水、10%, 30%, 50%, 70%, 90%乙醇, 以每 1 BV 为 1 个流份, 收集洗脱液, 测定总酚含量, 分别计算洗脱率。结果可见, 水和 10%乙醇的洗脱部分的总酚洗脱率仅为 2.03%和 2.05%。30%和 50%乙醇的洗脱部分的总酚洗脱率则分别为 52.31%和 35.59%, 总量达 87.9%。70%和 90%乙醇的洗脱部分总酚含量分别只有 5.60%和 2.42%。且 30%乙醇的第 5 个柱床体积洗脱率只有 0.57%, 50%乙醇的第 5 柱床体积的洗脱率也只达到 0.40%。由此可见, 4 BV 的 30%和 50%乙醇可洗脱大部分总酚(洗脱率=洗脱液中酚类含量/最大吸附量×100%)。

综上所述, 确定以 HP-20 型大孔树脂纯化毛连菜提取液总酚的最佳工艺条件为: 以含总酚浓度为 8.54 mg·mL⁻¹ 的毛连菜提取液上样, 最大上样量为 1 BV, 控制流速为 2 BV·h⁻¹, 先用 4 BV 的水和 10%的醇分别洗去杂质, 收集 4 BV 的 30%乙醇和 3 BV 的 50%乙醇洗脱液。将所得洗脱液合并, 减压浓缩即得。所得浸膏中总酚含量为 88.5%。

2.5.4 工艺验证实验 取已处理好的 HP-20 型大孔树脂 3 份, 每份 10 mL, 湿法装柱, 水洗平衡。分别上样 1 BV 含总酚为 8.54 mg·mL⁻¹ 的毛连菜提取液, 控制流速为 2 BV·h⁻¹, 先用水和 10%乙醇各 4 BV 去杂质, 收集 4 BV 的 30%乙醇和 3 BV 的 50%洗脱液, 浓缩。结果浸膏中总酚含量分别为 87.3%, 88.7%, 88.1%, 由此说明该优化工艺条件稳定可行。

(下转第 664 页)

现或预测医嘱中存在或潜在的药物相互作用而导致药物不良反应的可能, 并提醒临床调整药物治疗方案, 以减少或避免药物不良反应的发生, 最终保障了患者治疗的安全、有效及合理, 同时也使临床药师的自身工作价值得到了体现。

REFERENCES

- [1] ZHANG W J, LI Q H, WANG Y, et al. Epidemiological analysis of cutaneous anthrax in China between 2007 and 2011 [J]. *Mil Med Sci(军事医学)*, 2013, 37(12): 892-895.
- [2] HICKS C W, SWEENEY D A, CUI X, et al. Eichacker PQ: An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38(7): 1092-1104.
- [3] RUSSELL L, PEDERSEN M, JENSEN A V, et al. Two anthrax cases with soft tissue infection, severe oedema and sepsis in Danish heroin users [J/OL]. *BMC Infect Dis*, 2013(13): 408. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/408>.
- [4] 李梦东, 王宇明. 实用传染病学[M]. 北京, 人民卫生出版社, 2005: 903-908.
- [5] BOSSI P, TEGNELL A, B AKA A, et al. Bichat guidelines for the clinical management of anthrax and bioterrorism related anthrax [J]. *EURO Surveill*, 2004, 9 (12): 1-7.
- [6] INGLESBY T V, O'TOOLE T, HENDERSON D A, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management [J]. *JAMA*, 2002, 287(17): 2236-2252.
- [7] 李文竹, 涂晨. 皮肤炭疽 2 例[J]. *中国皮肤性病学杂志*,

2011, 25(2): 154.

- [8] 王娟, 贾雪松, 王海霞, 等. 皮肤炭疽 1 例 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2013, 27(6): 639.
- [9] 高峰. 皮肤炭疽病诊治方法探讨[J]. *中国误诊学杂志*, 2009, 9(30): 7384.
- [10] 抗菌药物临床应用指导原则(2015年版)[S]. 2015.
- [11] 张跃新, 禹康. 炭疽感染与治疗研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26(20): 1594-1597.
- [12] LIU Q J, LIN W, JIN H Y, et al. Multiple nerve root disease induced by intramuscular injection of benzathine penicillin: a case report [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(8): 1017.
- [13] 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会药品风险管理学组. 超说明书用药专家共识[J]. *药品不良反应杂志*, 2015, 17(2): 101-103
- [14] ZHANG L C, GAO L H, XI Y Y, et al. Progress in Structure and function of anthrax toxin receptors [J]. *Prog Mod Biomed(现代生物医学进展)*, 2013, 13(19): 3775-3781.
- [15] Fox J L. Anthrax drug first antibacterial mAb to win approval [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 8. Doi: 10.1038/nbt0113-8
- [16] QIN Y, YANG Y, GONG X L, et al. Study on the safety and pharmacodynamics of sodium aescinat micro-emulsion injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2013, 30(10): 1043-1047.
- [17] 中华医学会感染病学分会, 肝脏炎症及其防治专家共识专家委员会. 肝脏炎症及其防治专家共识[J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 34(2): 152-163.
- [18] ANDERSON P D, BOKOR G. Bioterrorism: pathogens as weapons [J]. *J Pharm Pract*, 2012, 25(5): 521-529.

收稿日期: 2015-10-24

(上接第 604 页)

3 讨论

实验中暗处放置时间、光线、瓶中残留物对试验结果都有一定影响, 为避免以上因素产生干扰, 应严格控制反应条件, 以确保测试结果真实可靠。反应时间加长会使测得的吸光度加大, 测得结果比实际高。在浓度本身过高或放置时间过久的情况下, 测试液中络合物不断聚集形成沉淀, 还可能造成测得结果较实际偏小, 因此妥善计算好测定的时间及反应时间, 尽可能避免测试时间对药品的影响。

本试验采用三氯化铁-铁氰化钾为显色剂, 确定以二者比例为 2:1 的混合液共 0.6 mL 作为显色剂, 显色灵敏。各类试剂与用药现用现配, 所加显色试剂也应准确测量确保用量一致。

大孔吸附树脂作为高吸附性能聚合材料在工业生产中应用广泛, 尤其是对水溶性成分的富集和纯化效果较好, 不但操作简单, 而且可以再生使用以降低成本^[8]。本试验显示, HP-20 型大孔吸附树脂对毛连菜中总酚成分有较好的富集纯化能力, 其所得总酚纯度可达 87%以上, 且操作简单, 稳定可行, 适合富集毛连菜中总酚成分及工业化生产。

REFERENCES

- [1] ZHU Y M. *Nei Monggol Medicinal Flora* [M]. Hohhot: Inner Mongolia People's Press, 2000: 298-301.
- [2] XI X H, GE R, GAO J P. Study on the hypoglycemic and hypolipidemic effect of part eluated by water from *Picris japonica* Thunb. [J]. *China Med Her(中国医药导报)*, 2011, 8(13): 34-36.
- [3] XI X H, YANG F R, LIU E, et al. Screening of hypoglycemic and immunological activity of *Picris japonica* Thunb.[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2011, 29(10): 2360-2362.
- [4] SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005, 45(4): 287-306.
- [5] RIETHMÜLLER E, TÓTH G, ALBERTI A, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of *Corylus colurna* [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(5): 679-682.
- [6] ZHANG X M, NI Y, LI X R. Advances in study on pharmacological effects of tea polyphenol [J]. *Drug Eval Res(药物评价研究)*, 2013, 36(2): 157-160.
- [7] MICHALSKA K, KISIEL W. The first guaian-12-oic acid glucopyranosyl ester and other constituents from *Picris rhagadioloides* (L.) Desf. (Asteraceae)[J]. *Molecules*, 2008, 13(2): 444-451.
- [8] LÜ H, TENG J H, CHEN J, et al. Study on purification technology and antioxidant activity of total flavonoid from *Eriobotryae Folium* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2014, 31(1): 40-44.

收稿日期: 2015-09-19