

# 抗氧化成分白藜芦醇的树脂分离工艺研究

邓义德<sup>1</sup> 易跃能<sup>1</sup> 徐月灿<sup>1,2</sup> 陈 锋<sup>1</sup> 肖满意<sup>1</sup> 刘湘荣<sup>1</sup>

(1 湖南希尔药物研究有限公司,长沙,410205; 2 湖南希尔天然药业有限公司,永州,425000)

**摘要** 目的:研究大孔吸附树脂分离纯化虎杖中白藜芦醇的工艺条件及参数。方法:利用白藜芦醇显酸性的特点,采用碱液洗脱树脂法分离纯化白藜芦醇。考察 6 种树脂、碱的浓度以及洗脱流速等因素对白藜芦醇分离纯化的影响。结果:选择 NKA-Ⅱ树脂,NaOH 洗脱液浓度 0.5%,流速为 1 BV/h,经过去盐后,白藜芦醇纯度达到 70% 以上。结论:该工艺适用于对白藜芦醇有吸附的树脂,经过一次上柱就可以与原料中其他干扰成分分离,适合大规模生产。

**关键词** 白藜芦醇;虎杖;大孔吸附树脂;碱

## Optimization of the Purification Techniques of Resveratrol by Macroporous Adsorption Resin

Deng Yide<sup>1</sup>, Yi Yueneng<sup>1</sup>, Xu Yuecan<sup>1,2</sup>, Chen Feng<sup>1</sup>, Xiao Manyi<sup>1</sup>, Liu Xiangrong<sup>1</sup>

(1 Hunan Hill Natural Pharmaceutical Co. Ltd., Changsha 410205, China; 2 Hunan Hill Naturals Co. Ltd., Yongzhou 425000, China)

**Abstract Objective:** To explore purification techniques of Resveratrol by macroporous adsorption resin. **Methods:** As resveratrol is acidic, lye elution resin separation and purification was used. The impact of resin types, NaOH concentration, flow rate on purification results were explored. **Results:** The optimized purification techniques was: NKA-Ⅱ resin, eluent concentration of NaOH 0.5%, flow rate = 1 BV/h, after desalting, resveratrol purity > = 70%. **Conclusion:** The optimized purification techniques is applicable to adsorption resin that is resveratrol adsorbing, separation with other ingredients can be achieved by one flow, it is suitable for mass production.

**Key Words** Resveratrol; Cuspidatum; Macroporous resin; Alkali

中图分类号:R331;R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.10.032

虎杖为蓼科蓼属多年生草本植物(*Polygonum Cuspidatum* Sieb. et Zucc)的干燥根茎和根,是我国的一种传统中药<sup>[1-2]</sup>,具有祛风利湿,散瘀定痛,止咳化痰等功效。现代药理学研究证明其具有多种药理作用,主要表现在抗癌和抗心血管疾病两个方面<sup>[3-4]</sup>。虎杖中含有芪类化合物、蒽醌类化合物、黄酮类化合物、水溶性多糖、鞣质和微量元素等成分<sup>[5]</sup>,其主要活性成分白藜芦醇(Resveratrol)是一种多酚物质,生产工艺一般采用大孔吸附树脂分离纯化白藜芦醇,但易受到蒽醌类、虎杖苷等的干扰,需要用不同浓度的乙醇洗脱,重复多次地上柱。本实验根据白藜芦醇的特点,使用碱液洗脱,取得了良好的效果。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 虎杖购自长沙市高桥中药材专业市场,产自广西,经鉴定符合《中华人民共和国药典》2010 年版一部虎杖项下规定;白藜芦醇对照品为自制(含量 98.7%);酒曲(安琪酵母股份有限公司);硅胶 G<sub>254</sub>(青岛海洋化工厂分厂);S-8、NKA-9、NKA-Ⅱ、X-5、D101 树脂(天津南开大学化工厂);AB-8 树脂(西安电力树脂厂);氢氧化钾、氢氧化钠(天津市恒兴化学

试剂制造有限公司);甲醇、乙醇、盐酸等试剂为分析纯;乙腈(色谱纯),水为娃哈哈纯净水。

Agilent 1260 高效液相色谱仪;AG285 分析天平(德国梅特勒公司,精密度:d = 0.01 mg);DZF-6050 真空干燥箱(上海琅轩实验设备有限公司);EYELA SB-1100 型旋转蒸发仪;超声清洗器(宁波科生仪器厂)。

## 1.2 方法

1.2.1 上柱液的制备<sup>[6-10]</sup> 称取虎杖粉末,加入药材重的 0.5% 酒曲,用 0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 5,于 40 °C 下酶解 3 h。酶解后加入 10 倍量 80% 乙醇,70 °C 回流提取 2 次,2 h/次,过滤液回收乙醇,剩余液备用。

## 1.2.2 分析方法<sup>[11-13]</sup>

1.2.2.1 色谱条件 Agilent C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(25:75);检测波长 307 nm;流速为 1 mL/min;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

1.2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取 7.5 mg 白藜芦醇对照品,加无水甲醇 50 mL 配制成 0.15 mg/mL 的标准储备液。精密吸取标准储备液 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 置 10 mL 容量瓶中,无水甲醇定容

至刻度。依次取 10 μL 进样,每个浓度重复 3 次,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度(X)为横坐标,得回归方程  $y = 238\ 722x - 459\ 7$ ,  $r = 0.999\ 7$ ,线性范围为白藜芦醇 0.15 ~ 0.75 μg。

1.2.3 大孔吸附树脂的选择<sup>[14-22]</sup> 树脂的吸附性能对白藜芦醇的纯化影响很大,不同的树脂纯化效果有较大差别。试验测定了 6 种树脂静态吸附量、吸附率和解吸率,比较他们的吸附率和解吸率,选择出较为理想的树脂。精确称取经预处理的一定质量的 6 种树脂,置于具塞的锥形瓶中,加入 40 mL 的虎杖上柱液,于室温下连续振荡 24 h,转速为 130 r/min,测定吸附前后白藜芦醇浓度的变化,按下式计算各树脂的静态吸附容量和吸附率,然后用 60% 乙醇水溶液进行洗脱,测定脱附液中白藜芦醇的含量,按下式计算解吸率。

$$\text{吸附量 (mg/g 干树脂)} = (C_0 - C_e) \times V_A / W$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100\%$$

$$\text{解吸率} = C_D \times V_D / [(C_0 - C_e) \times V_A] \times 100\%$$

式中  $C_0$  为吸附液起始浓度,  $C_e$  为吸附平衡浓度,  $V_A$  为吸附液体积,  $W$  为树脂质量,  $C_D$  为脱附液浓度,  $V_D$  为脱附液体积。

1.2.4 静态吸附实验 取 1 g 树脂加入 40 mL 0.92 mg/mL 白藜芦醇溶液,在不同时刻取少量溶液分析白藜芦醇质量浓度,以吸附时间为横坐标,吸附量为纵坐标做出树脂的吸附动力学曲线。取 1 g 树脂加入 40 mL 系列质量浓度的白藜芦醇溶液,进行吸附试验,测定吸附前后的溶液中白藜芦醇质量浓度,计算树脂吸附量。

1.2.5 解吸条件的选择 对已经吸附样品的树脂进行脱附试验,作出解吸曲线。考察碱液浓度、流速等因素对树脂脱附性能的影响,确定最佳的工艺条件。

## 2 结果

2.1 树脂的筛选结果 在相同试验条件下,测得各树脂的静态吸附及脱附,结果见表 1。根据表 1 综合树脂对白藜芦醇吸附和解吸性能的考虑,选用 NKA - II 树脂来考察分离纯化虎杖中白藜芦醇的工艺。

2.2 静态吸附动力学过程 配制浓度为 0.92 mg/mL 白藜芦醇溶液 40 mL,加入已处理好的 1gNKA - II 树脂,在不同时刻取少量溶液分析白藜芦醇浓度,绘制吸附动力学曲线,结果见图 1。可见,开始阶段,随吸附时间增加吸附率快速增加,吸附时间越长,吸附越接近平衡,150 min 开始,吸附量增加缓慢。

2.3 上样浓度对吸附效果的影响 配制 6 份不同浓度的上柱液,每份均超树脂的饱和吸附量,结果见图

2。可见,随着溶液中白藜芦醇浓度的增加,树脂的吸附量增加很快,当浓度  $\geq 800$  mg/L 后,吸附量趋于平稳。

表 1 6 种树脂对白藜芦醇的吸附、解吸性能

树脂型号	极性	吸附量/(mg · g <sup>-1</sup> )	吸附率/%	解吸率/%
S - 8	极性	29.7	83.2	43.6
NKA - 9	极性	28.4	60.1	46.7
NKA - II	极性	31.8	83.9	90.4
AB - 8	弱极性	20.3	58.1	51.7
X - 5	非极性	20.9	71.2	81.2
D101	非极性	13.3	66.3	80.7

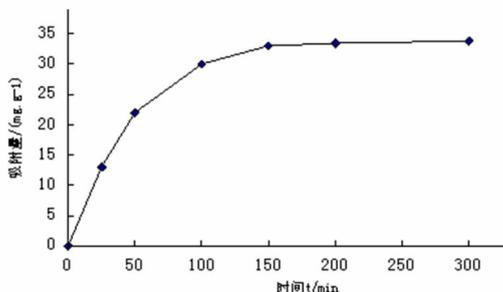


图 1 静态吸附动力学过程曲线

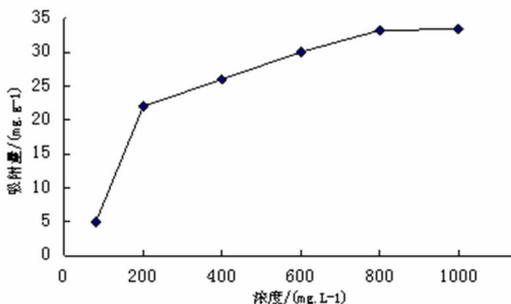
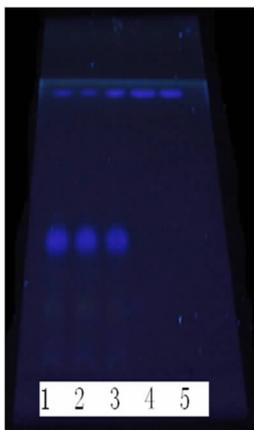


图 2 上样浓度对吸附效果的影响曲线

2.4 洗脱剂浓度对 NKA - II 树脂动态脱附性能的影响 实验室前期试验发现,用特定浓度强碱溶液洗脱,可以很好地分离蒽醌类、白藜芦醇苷等干扰成分。将已吸附好样品的树脂用 5 个 NaOH 梯度浓度进行洗脱,检测洗脱液的白藜芦醇浓度,计算洗脱率,结果见表 2、图 3。从表 2 数据、图 3 可以看出,当 NaOH 洗脱浓度  $\geq 0.5\%$  时,白藜芦醇的洗脱率有很大程度的提升,也减少了洗脱溶剂;同时白藜芦醇与其他干扰成分得到分离,提高了产品中白藜芦醇的纯度,考虑到碱浓度大对生产设备的损耗,确定将 0.5% 的 NaOH 溶液作为洗脱液。

表 2 洗脱剂浓度对洗脱性能的影响

碱液浓度	0.1%	0.3%	0.4%	0.5%	0.7%
床体积	9BV	7BV	6BV	3.5BV	3BV
洗脱率/%	58.5	69.8	70.2	91.7	92.0



注:1. 0.1% NaOH 洗脱物;2. 0.3% NaOH 洗脱物;3. 0.4% NaOH 洗脱物;4. 0.5% NaOH 洗脱物;5. 白藜芦醇标准品(氯仿:丙酮:乙酸:水 = 4:4:0.5:0.2 为展开剂,在 365 nm 下观察荧光斑点)

图 3 不同 NaOH 洗脱浓度得到的样品 TLC 图谱

2.5 洗脱液流速的确定 平行装 4 支 NKA - II 树脂柱,用 3.5BV 0.5% NaOH 洗脱液按不同流速进行洗脱,收集洗脱液,测定白藜芦醇浓度,计算解吸率,结果见图 4。表明低流速有利于提高白藜芦醇的解吸率,在 1.0 BV/h 的流速下,洗脱率达到 91.7%,从提高生产效率出发,确定洗脱流速为 1.0BV/h。

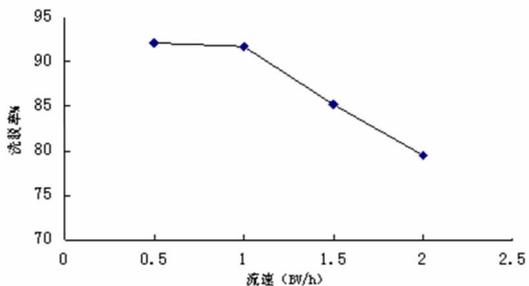


图 4 洗脱流速对洗脱率的影响

2.6 产品纯度的测定 按优选工艺条件,收集碱洗脱液,用稀盐酸调 pH 值至 5,对水透析 24 h,浓缩、真空干燥,经高效液相色谱测定产品中白藜芦醇纯度为 79.1%,见图 5 - C。

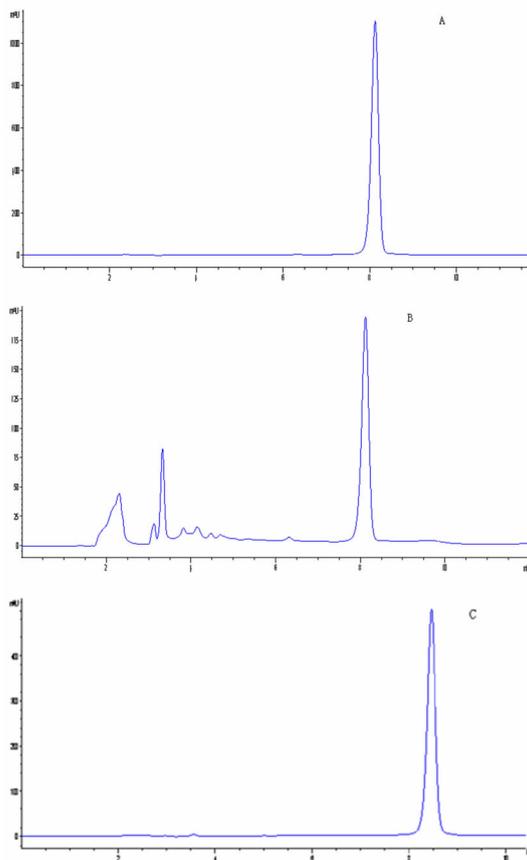
### 3 结论

1) 本实验利用白藜芦醇的显酸性的特点,通过试验的筛选,确定在 0.5% 浓度的 NaOH 溶液洗脱条件下,产品中白藜芦醇纯度为 79.1%。该工艺具有一次上柱与其他干扰成分分离的效果,在提高白藜芦醇纯度的同时,简化了生产工艺。

2) 达到一定的碱浓度下,对考察的其他 5 种树脂也做了优选工艺条件的验证试验,白藜芦醇均能与干扰物质分离,达到较高的纯度。

3) 关于洗脱原理有待进一步的研究,可能与改变

树脂的吸附性能有关,但与碱液降低树脂的吸附能力又有差异,因为在选择的碱液浓度下,虎杖苷及蒽醌类物质并没有洗脱下来,针对性比较强。



注:图 A 为白藜芦醇标准品图谱,图 B 为 0.1% NaOH 洗脱部分图谱,图 C 为 0.5% NaOH 洗脱部分的图谱

图 5 产品的 HPLC 图谱

### 参考文献

- [1] Song JH, Yang TC, Chang KW, et al. In vitro effects of a fraction separated from Polygonum cuspidatum root on the viability, in suspension and biofilms, and biofilm formation of mtlarls streptococci [J]. Ethnopharmacology, 2007, 112(3) : 419 - 425.
- [2] Kim KW, Ha KY, Park Cs, et al. Polygonum cuspidatum compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase - 2 gene expressions in RAW264.7 macrophages [J]. Vascular Pharmacology, 2007, 47(2 - 3) : 99 - 107.
- [3] 邵海燕, 于震宇, 陈杭君, 等. 白藜芦醇功能和作用机理研究进展 [J]. 中国食品学报, 2006, 6(1) : 411 - 414.
- [4] 史丽, 刘燕, 许现辉. 白藜芦醇的生物活性研究进展 [J]. 食品与药品, 2006, 8(11) : 5 - 8.
- [5] 任彦荣, 吴洪斌. 白藜芦醇的检测手段及药理作用 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2) : 788 - 790.
- [6] 孙勇民, 岳鹏, 王芄. 复合酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2013, 17(34) : 34 - 37.

形与竹节参相似,但 HPLC 谱图中不含有上述特征峰,经显微鉴别发现这些批次药材粉末中无草酸钙簇晶,不属于人参属植物,应为伪品;7 批竹节参药材检测结果表明,湖北恩施(S7)所产竹节参药材样品出峰较多,含有巨花雪胆皂苷 B、cynarasaponin C 等皂苷,其主要色谱峰的峰面积也与其他样品相差较大,相似度较低(0.702),可能与竹节参产地的生态环境、栽培年限、采收加工等因素有关<sup>[8-10]</sup>。以上结果说明市售的竹节参药材存在一定的质量差异和掺伪情况,因此,亟需建立相应的质量控制方法。

4) 本实验建立了竹节参药材皂苷类成分的 HPLC 指纹图谱分析方法,并对其主要色谱峰进行了指认,结果表明竹节参药材中主要皂苷类成分在色谱图中分离度良好,方法的稳定性、重复性、精密度符合要求,特征性及专属性强,可用于竹节参药材的质量控制。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 129.

[2] 林先明, 谢玲玲, 由金文, 等. 竹节参名称及基原考[J]. 中药材, 2007, 30(6): 742 - 743.

[3] 王林, 何宗琴, 郑在, 等. 酶法提取虎杖中白藜芦醇的工艺优化[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(8): 3339 - 3340.

[4] 彭源德, 朱作华, 刘正初, 等. 酵母发酵虎杖提取白藜芦醇技术初步研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4929 - 4931.

[5] 邓梦茹, 刘韶, 朱周颀, 等. 酶法提取虎杖中的白藜芦醇[J]. 中南药学, 2011, 9(9): 669 - 672.

[6] 许南儿, 罗榴彬, 梅建凤, 等. 生物转化法提高虎杖中白藜芦醇的含量[J]. 药物生物技术, 2012, 19(5): 411 - 413.

[7] 张明, 鞠楷, 孙琴, 等. 西南 5 个产区虎杖中虎杖苷和白藜芦醇含量比较[J]. 中国药房, 2012, 23(39): 3723 - 3725.

[8] 邢琪昌, 卢昊, 付晓, 等. 高效液相色谱法测定虎杖中白藜芦醇和白藜芦醇苷的含量[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(3): 33 - 35.

[9] 周雅琴, 樊溪源, 周小雷, 等. 不同产地虎杖中白藜芦醇与白藜芦醇苷含量测定[J]. 医药导报, 2012, 31(5): 632 - 634.

[10] 刘丹, 唐海峰, 张三七, 等. 虎杖中有效成分提取方法的研究[J]. 中药材, 2007, 29(4): 516 - 521.

[11] 王彦春, 许汉林, 傅琴, 等. 虎杖白藜芦醇及其脂质体剂型对帕金森

病模型大鼠黑质细胞保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1060.

[12] 李春艳, 张杰, 李劲平, 等. 竹节参化学成分与药理活性研究进展[J]. 中医药导报, 2012, 18(4): 68 - 70.

[13] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(6): 1023 - 1025.

[14] 贺海波, 许佳, 王洪武, 等. 竹节参不同提取部位预处理对冠脉结扎诱导大鼠急性心肌缺血损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1462 - 1466.

[15] 吴兵, 陈新, 张长春, 等. 竹节参化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(8): 1051 - 1054.

[16] 贾放, 陈平, 王如锋, 等. 竹节参药材不同部位皂苷成分的分析研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1682 - 1684.

[17] 童学飞, 尹文仲, 陈科力. 栽培和野生竹节参中人参皂苷含量比较[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1919 - 1920.

[18] 李玉洲, 何毓敏, 孙志伟, 等. 不同栽培年限竹节参中主要成分含量的动态变化[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20411 - 20413.

[19] 关乔, 张海滨, 毛帅, 等. 鄂西竹节参野生品与栽培品的比较研究[J]. 中药材, 2013, 36(2): 171 - 175.

(2014 - 04 - 14 收稿 责任编辑: 曹柏)

(上接第 1363 页)

[15] 王彦春, 许汉林, 傅琴, 等. 虎杖白藜芦醇及其脂质体剂型对帕金森病模型大鼠黑质细胞保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(8): 1060.

[16] 刘树兴, 程丽英, 高连周, 等. 大孔吸附树脂法分离纯化白藜芦醇的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 265 - 268.

[17] 向海燕, 周春山, 杜邵龙, 等. 大孔吸附树脂法分离纯化虎杖中白藜芦醇的研究[J]. 中草药, 2005, 36(2): 207 - 210.

[18] 李燕, 刘军海. 大孔树脂对虎杖白藜芦醇的静态吸附动力学研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 82 - 86.

[19] 田娜, 周达力, 曹佩琴, 等. 大孔吸附树脂对虎杖中白藜芦醇的分离纯化研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(22): 147 - 151.

[20] 田凤, 徐德生, 冯怡, 等. 虎杖药渣中白藜芦醇的提取和纯化[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(10): 824 - 826.

[21] 周建军, 曹亮. 大孔树脂分离纯化虎杖中蒽醌类化合物工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1267 - 1269.

[22] 王辉, 董悦生, 秦建全, 等. 虎杖发酵液中白藜芦醇的分离纯化工艺研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 223 - 227.

(2013 - 11 - 12 收稿 责任编辑: 曹柏)