

文章编号:1001-6880(2014)10-1618-07

# 牡丹籽饼粕中芍药苷类成分及其大孔吸附树脂纯化研究

秦爱霞<sup>1</sup>,纪殊晶<sup>1</sup>,毛文岳<sup>2</sup>,高 哲<sup>1</sup>,康小虎<sup>1</sup>,贾亚楠<sup>1</sup>,陈 灿<sup>1</sup>,崔 同<sup>1\*</sup><sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院,保定 071000; <sup>2</sup>菏泽尧舜牡丹生物科技有限公司,菏泽 274000

**摘要:**采用乙醇提取,树脂纯化,HPLC 制备以及 LC-MS 和<sup>1</sup>H NMR 鉴定,从牡丹籽粕的醇提物中分离纯化了 4 种主要成分,分别为 6'-O-β-D-葡萄糖芍药内酯苷、芍药内酯苷、β-gentibiosylpaeoniflorin 和芍药苷。对大孔吸附树脂法纯化芍药苷类成分的条件进行了试验,从 4 类 11 种树脂中筛选出 HPD-200A 型大孔吸附树脂,其较优的吸附分离条件为:上样液浓度(芍药苷)8.0 mg/mL,上样体积为 4.5 倍床体积(BV),流速为 1/16 BV/min,洗脱剂乙醇溶液浓度为 50% (v/v),洗脱体积为 4 BV,流速为 1/16 BV/min。此条件下所得提取物中含芍药苷 32.3%、芍药内酯苷 16.5%、6'-O-β-D-葡萄糖芍药内酯苷 8.02%、β-gentibiosylpaeoniflorin 6.63%。

**关键词:**牡丹;籽饼粕;芍药苷;芍药内酯苷;大孔吸附树脂

中图分类号:TS201.1

文献标识码:A

## Identification and Purification of Paeoniflorins in Seed Cakes of *Paeonia suffruticosa* by Macroporous Adsorption Resin

QIN Ai-xia<sup>1</sup>, JI Shu-jing<sup>1</sup>, MAO Wen-yue<sup>2</sup>, GAO Zhe<sup>1</sup>, KANG Xiao-hu<sup>1</sup>, JIA Ya-nan<sup>1</sup>, CHEN Can<sup>1</sup>, CUI Tong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;<sup>2</sup>Heze Yao and Shun Peony Biotechnology Co., LTD, Heze 274000, China

**Abstract:** Four main paeoniflorins, namely 6'-O-β-D-glucopyranosylalbiflorin, albiflorin, β-gentibiosylpaeoniflorin and paeoniflorin were isolated from the alcohol extract of seed cakes of *Paeonia suffruticosa* Andr. and identified by LC-MS and <sup>1</sup>H NMR. The purification procedure using macroporous adsorption resins was optimized. The results showed that HPD-200A resin was the most suitable resin among the 11 tested resins. The optimal procedure for the purification was as follows: the concentration of sample solution was 8.0 mg (paeoniflorin)/mL, the loading capacity was 4.5 bed volume (BV) and the flow rate was 1/16 BV/min; then eluted with 50% ethanol for 4 BV with elution flow rate of 1/16 BV/min. Under these optimal conditions, the content of paeoniflorin, albiflorin, 6'-O-β-D-glucopyranosylalbiflorin and β-gentibiosylpaeoniflorin was reached to 32.3%, 16.5%, 8.02% and 6.63%, respectively.

**Key words:** *Paeonia suffruticosa*; seed cake; paeoniflorin; albiflorin; macroporous adsorption resin

牡丹籽为毛茛科芍药属灌木牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的种子,中国民间有用牡丹籽美白皮肤,缓解腰腿疼痛,治疗口腔溃疡等的记载<sup>[1]</sup>。研究表明牡丹籽中有很多活性成分,如芍药苷(图 1)、芍药内酯苷、6'-O-β-D-葡萄糖芍药内酯苷、β-gentibiosylpaeoniflorin<sup>[1-3]</sup>等。这些芍药苷类成分具有抗氧化、抗癌<sup>[4]</sup>、抗炎、抗过敏、抗凝血、免疫调节<sup>[5]</sup>、保护慢性动脉脑缺血<sup>[6]</sup>、改善记忆<sup>[7]</sup>、减缓辐射诱导的胸腺细胞<sup>[8]</sup>和肺细胞损伤<sup>[9]</sup>等很多作用,可用于开发新型药物制剂。目前芍药苷多以白芍和赤芍等为原料提取<sup>[10-12]</sup>,这种途径受种植周期和资源所限生产成本较高。

近年来富含亚麻酸和亚油酸的牡丹籽油已被批准为新食品资源<sup>[13,14]</sup>,而且高产籽用牡丹品种已大面积推广种植<sup>[15]</sup>,工业规模的超临界萃取油脂加工也已经投产。而以牡丹籽粕为原料提取药用成分芍药苷的相关研究却尚未见报道。

大孔树脂吸附法具有选择性强、吸附容量大、吸附速度快、解吸容易、成本低等优点<sup>[16]</sup>,在芍药药用成分提取分离中曾被采用<sup>[11,12]</sup>。本研究拟针对牡丹籽饼粕的特点,对其中芍药苷类成分进行定性定量分析,并通过筛选树脂、考察静态、动态吸附与解吸性能,建立一套适宜牡丹籽粕中芍药苷类成分提取纯化的新方法,为牡丹籽天然产物资源综合开发利用提供科学根据。

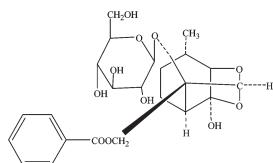


图 1 芍药苷的分子结构

Fig. 1 The structure of paeoniflorin

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牡丹籽粕由山东菏泽尧舜牡丹生物科技有限公司提供;大孔吸附树脂 HPD-100、HPD-200A、HPD-600A、D-101、D101A、HPD-750、HPD-826 以及 HPD-500 型,由沧州宝恩化工有限公司提供,ADS-7、ADS-17 和 AB-8 型由天津南开合成科技有限公司提供;氘代二甲基亚砜、四甲基硅油,北京博雅大北科技开发公司;高效液相色谱(HPLC)流动相用甲醇为色谱纯;水为三蒸水;其余试剂为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

分析型 HPLC, Agilent 1200 型(安捷伦公司,美国加州帕罗阿托市)。配用 CO-3010 柱恒温控制箱(天津美瑞泰克科技有限公司)。制备型 HPLC, LC3000 型(北京创新通恒科技有限公司),配 Sino-Chrom ODS-BP C<sub>18</sub>(300 mm × 20.0 mm id, 10 μm)色谱柱。LC-MS 系统,由 Agilent 1200 型 LC、Agilent 6310 型 MS 检测器、ESI 电离源(Agilent 公司)组成。核磁共振仪,Avance III 600 MHz 型,Bruker 公司生产。AB10X-B 恒流泵,常州飞尔林流体有限公司;玻璃中压层析柱(10 mm × 300 mm),上海楚定分析仪器有限公司。

### 1.3 对照品的制备

称取过 40 目筛的牡丹籽粕 1 kg,以料液比 1:10 加入 70% (v/v)乙醇溶液,室温下浸泡 8 h,抽滤,残渣按上述条件重复提取两次,合并滤液,在 55 ℃水浴下真空浓缩,得牡丹籽粕乙醇提取液备用。将浓缩液调整至 8.0 mg/mL,用 HPD-200A 大孔吸附树脂纯化,收集乙醇洗脱液经浓缩、过 0.45 μm 滤膜后,用制备 HPLC 制备纯化,色谱条件:流动相为甲醇:水 = 40:60 (v/v, 含 0.05% 甲酸), 流速: 10 mL/min, 检测波长: 230 nm, 柱温: 室温(25 ℃), 分别收集各色谱峰,再分别重复进样纯化,用分析型 HPLC 以峰面积百分比法检测馏分的纯度均在 95% 以上,将收集液减压浓缩,冻干,制得纯化合物用作

对照品。

### 1.4 对照品的 LC-MS 分析

LC 分析条件:色谱柱为 Hypersil BDS C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm id, 3 μm);柱温 30 ℃;流动相为 40% 甲醇(v/v,含 0.05% 甲酸),流速 0.6 mL/min;二极管阵列检测器;检测波长 230 nm;进样量 5 μL。

MS 分析条件:ESI 离子源,阴离子检测模式,喷雾器压力:40 psi;干燥气体温度:350 ℃,流速:12 L/min;离子阱质量分析器扫描范围:*m/z* = 50 ~ 1000。

### 1.5 对照品的<sup>1</sup>H NMR 分析

称取制备的对照品各 5 mg,分别用氘代二甲基亚砜溶解,以四甲基硅油为基准试剂进行<sup>1</sup>H NMR 分析。

### 1.6 HPLC 定量方法

精密称取对照品(见 1.3),用 40% 甲醇配制成 2.0 mg/mL 储备液,取储备液适当稀释进样,峰面积外标法定量。色谱条件:色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub> (200 mm × 4.6 mm id, 5 μm);流动相:40% 甲醇水溶液(v/v);柱温:30 ℃;检测波长:230 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:5 μL。

### 1.7 静态吸附动力学曲线

准确称取预处理<sup>[16]</sup>的树脂 2.00 g(湿重)于 100 mL 具塞磨口三角瓶中,加入 30 mL 样液(按 1.3 所述方法制得的乙醇提取液),室温下以 100 rpm 频率振摇吸附,每隔 30 min 取上清液,采用 1.6 所述方法测定其中芍药苷的含量,绘制树脂的吸附量随时间变化的曲线。

### 1.8 大孔树脂纯化芍药苷的条件优化

#### 1.8.1 动态吸附条件的优化

称取适量经预处理的大孔吸附树脂湿法装柱(10 mm × 200 mm),用去离子水平衡树脂柱,上样,分管收集流出液,每 1/2 柱床体积(BV)为 1 管,用 1.6 所述方法测定芍药苷含量。当流出液中芍药苷浓度达上样浓度的 10% 时,即认为已达到吸附泄漏点,停止上样。通过计算吸附量考察样品溶液浓度、上样速度对吸附效果的影响。

#### 1.8.2 洗脱条件的优化

采用不同浓度的乙醇溶液在恒温振荡器中对吸附饱和的树脂进行解吸,并用 1.6 所述方法测定溶液中芍药苷含量计算解吸率,确定最佳洗脱液浓度并考察洗脱液用量对洗脱效果的影响。

### 1.9 树脂重复使用周期的考察

按照最优的吸附和洗脱条件,取芍药苷粗提液

在同一根树脂柱上反复进行活化、吸附、洗脱，重复操作 10 次，分别测定吸附液和解吸液中芍药苷浓度，计算吸附率和解吸率。收集洗脱液，浓缩，干燥，分别计算芍药苷的纯度，评价树脂重复使用的吸附能力和效果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化合物 1、2、3 和 4 的结构分析

采用 1.3 所述的提取和纯化方法，收集 12、14、17 和 21 min 左右的色谱馏分，精制后制得 **1**、**2**、**3** 和 **4** 号化合物（色谱图见图 2）。采用 1.4 方法对四种化合物进行 LC-MS 分析得到化合物的紫外吸收光谱和离子质荷比数据，采用 1.5 方法进行<sup>1</sup>H NMR 分析得到化合物的化学位移、偶合常数等信息，结果如下：

**化合物 1** UV nm  $\lambda_{\max}$  232, 274 (MeOH); (-) ESI-MS  $m/z$  687 [M + HCOO]<sup>-</sup>, 641 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz):  $\delta$  1.82 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.36 (1H, dd, *J* = 15.0, 6.4 Hz, H-3 $\beta$ ), 4.19 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-4), 2.76 (1H, m, H-5), 2.09 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.67 (1H, t, *J* = 9.3, 9.3 Hz, H-7 $\beta$ ), 4.62 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-8 $\alpha$ ), 4.56 (1H, s, H-8 $\beta$ ), 1.38 (3H, s, H-10), 4.43 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.00 ~ 3.08 (1H, m, H-2', 4', 5'), 3.28 (1H, t, *J* = 8.8, 8.8 Hz, H-3'), 4.53 (1H, dd, *J* = 4.4, 10.5 Hz H-6'  $\alpha$ ), 3.68 (1H, dd, *J* = 4.7, 11.3 Hz, H-6'  $\beta$ ), 8.02 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, H-2''), 7.56 (2H, t, *J* = 7.7, 7.7 Hz, H-3''), 7.68 (1H, t, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4''), 7.56 (2H, t, *J* = 7.7, 7.7 Hz, H-5''), 8.02 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, H-6''), 5.10 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-1'''), 3.43 (1H, m, H-2'''), 3.08 ~ 3.15 (2H, m, H-3'', 4''), 3.43 (1H, m, H-5'''), 5.13 (1H, d, *J* = 4.7 Hz, H-6'''  $\alpha$ ), 4.62 (1H, s, H-6'''  $\beta$ )。以上数据与文献<sup>[17]</sup>报道的结果吻合，鉴定为化合物 **1** 为 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷。

**化合物 2** UV nm  $\lambda_{\max}$  232, 274 (MeOH); (-) ESI-MS  $m/z$  525 [M + HCOO]<sup>-</sup>, 479 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz):  $\delta$  1.85 (1H, d, *J* = 15.0 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.30 (1H, dd, *J* = 6.6, 15.1 Hz, H-3 $\beta$ ), 4.12 (1H, t, *J* = 5.5, 5.5 Hz, H-4), 2.78 (1H, m, H-5), 1.91 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.68 (1H, dd, *J* = 7.9, 10.7 Hz, H-7 $\beta$ ), 4.56 (1H,

*d*, *J* = 7.2 Hz, H-8 $\alpha$ ), 4.64 (1H, m, H-8 $\beta$ ), 1.34 (3H, m, H-10), 4.41 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.01 ~ 3.06 (1H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.65 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-6'  $\alpha$ ), 3.39 (1H, s, H-6'  $\beta$ ), 8.02 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-2''), 7.55 (2H, dd, *J* = 8.3, 15.9 Hz, H-3''), 7.68 (1H, t, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4''), 7.55 (2H, dd, *J* = 8.3, 15.9 Hz, H-5''), 8.02 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-6'')。以上数据与文献<sup>[17]</sup>结果吻合，鉴定为化合物芍药内酯苷。

**化合物 3** UV nm  $\lambda_{\max}$  232, 274 (MeOH); (-) ESI-MS  $m/z$  687 [M + HCOO]<sup>-</sup>, 641 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz):  $\delta$  1.64 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.07 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-3 $\beta$ ), 2.43 (1H, d, *J* = 6.4 Hz, H-5), 1.93 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.39 (1H, m, H-7 $\beta$ ), 4.67 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-8 $\alpha$ ), 4.62 (1H, d, *J* = 12.2 Hz, H-8 $\beta$ ), 5.33 (1H, s, H-9), 1.28 (1H, s, H-10), 4.42 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 3.04 (1H, m, H-2''), 3.17 (1H, m, H-3'), 3.11 (1H, m, H-4'), 2.97 (1H, m, H-5'), 3.98 (1H, d, *J* = 10.9 Hz, H-6'  $\alpha$ ), 3.44 (1H, s, H-6'  $\beta$ ), 7.99 (2H, t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, H-2''), 7.56 (2H, t, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H-3''), 7.69 (1H, t, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4''), 7.56 (2H, t, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H-5''), 7.99 (2H, t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, H-6''), 4.22 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1'''), 3.04 (1H, m, H-2'''), 3.17 (1H, m, H-3'''), 3.11 (1H, m, H-4'''), 3.33 (1H, m, H-5'''), 3.68 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-6'''  $\alpha$ ), 3.48 (1H, d, *J* = 7.7, 11.6 Hz, H-6'''  $\beta$ )。与文献<sup>[18]</sup>吻合，鉴定该化合物为  $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin。

**化合物 4** UV nm  $\lambda_{\max}$  231, 274 (MeOH); (-) ESI-MS  $m/z$  525 [M + HCOO]<sup>-</sup>, 479 [M-H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz):  $\delta$  1.82 (1H, d, *J* = 10.7 Hz, H-3 $\alpha$ ), 2.06 (1H, t, *J* = 10.4, 10.7 Hz, H-3 $\beta$ ), 2.44 (1H, t, *J* = 10.1, 10.1 Hz, H-5), 1.65 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.38 (1H, dd, *J* = 6.8, 10.6 Hz, H-7 $\beta$ ), 4.65 (2H, m, H-8), 5.35 (1H, d, *J* = 23.6 Hz, H-9), 1.24 (3H, m, H-10), 4.39 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, H-1'), 2.93 ~ 3.15 (1H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.39 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-6'  $\alpha$ ), 3.65 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-6'  $\beta$ ), 7.99 (2H, t, *J* = 7.8, 7.8 Hz, H-2''), 7.55 (2H, dd, *J* = 8.6, 16.3 Hz, H-3''), 7.69 (1H, t, *J* = 7.4, 7.4 Hz, H-4''),

7.55 (2H, dd,  $J = 8.6, 16.3$  Hz, H-5'), 7.99 (2H, t,  $J = 7.8, 7.8$  Hz, H-6')。<sup>1</sup>H NMR 数据与文献<sup>[19]</sup>报道的芍药苷数据吻合, 鉴定该化合物结构为芍药苷。

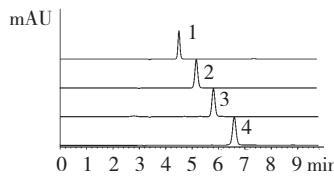


图 2 纯化的 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷(1)、芍药苷内酯(2)、 $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin(3)及芍药苷(4)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of purified 6'-O- $\beta$ -D-glucopyranosylalbiflorin (1), albiflorin (2),  $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin (3) and paeoniflorin (4)

## 2.2 牡丹籽粕粗提液成分分析

按 1.3 所述方法对牡丹籽粕进行乙醇提取, 得到浓缩液 480 mL。用 1.6 所述方法对提取液成分进行 HPLC 分析, 结果如图 3 所示, 1~4 号色谱峰分别为 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷、芍药苷内酯、 $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin 和芍药苷, 以芍药苷含量最高, 占提取物干重的 8.36% (按 1.6 方法计算), 其余 3 种成分含量分别为 3.43%、3.92% 和 2.50%。因此本文试验以芍药苷为评价指标, 采用树脂吸附法对牡丹籽粕粗提物进行纯化。

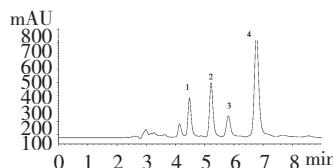


图 3 牡丹籽饼粕醇提取物的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of crude extract of seed cakes of *P. sufruticosa*

1: 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷; 2: 芍药苷内酯; 3:  $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin; 4: 芍药苷

1: 6'-O- $\beta$ -D-glucopyranosylalbiflorin; 2: albiflorin; 3:  $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin; 4: paeoniflorin

## 2.3 树脂的筛选

树脂的极性和空间结构是影响其吸附特性的重要因素<sup>[20]</sup>。本试验考察了极性、中极性、弱极性的 11 种大孔吸附树脂对芍药苷的静态吸附与解吸性能, 结果见表 1。由表 1 可以看出, 随着树脂极性的逐渐增强, 其对芍药苷的吸附能力会很有规律的逐

渐下降, 其中非极性的 HPD-200A 对芍药苷的静态吸附量最高, 氢键型的 ADS-17 最低。95% 乙醇对各树脂的解吸能力差别较大且没有明显规律, 其中 HPD-200A 和 HPD-750 的解吸率较高达到 90% 以上, 而 AB-8 和 ADS-17 两种树脂的解吸率较低, 不足 30%。综合吸附量和解吸率的结果, 选用 HPD-200A 树脂用于芍药苷纯化的后续试验。

表 1 各种树脂的类型、吸附量及解吸率

Table 1 Type, adsorption capacity and desorption rate of the 11 investigated resins

树脂型号 Resins	树脂类型 Resin type	吸附量 Adsorbance (mg/g · ww)	解吸率 Desorption rate (%)
HPD-200A	非极性	47.8	93.0
HPD-100	非极性	43.1	86.7
D-101	非极性	38.9	58.3
D-101A	非极性	40.9	88.1
AB-8	弱极性	37.1	23.4
HPD-750	中极性	36.1	92.9
HPD-500	极性	33.1	87.6
HPD-600	极性	29.5	46.7
ADS-7	极性	29.2	62.9
HPD-826	氢键	19.1	83.8
ADS-17	氢键	18.3	29.4

## 2.4 静态吸附动力学曲线

以吸附时间为横坐标, 吸附量为纵坐标作图, 得到 HPD-200A 大孔吸附树脂对芍药苷的静态吸附动力学曲线, 如图 4 所示。由图 4 可见, HPD-200A 大孔吸附树脂可快速吸附芍药苷, 30 min 内变化迅速, 1 h 达到吸附平衡。

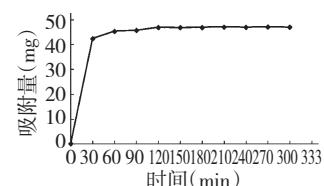


图 4 HPD-200A 树脂对芍药苷的静态吸附动力学曲线

Fig. 4 The kinetic curve of static adsorption of HPD-200A resin

## 2.5 大孔树脂纯化条件的优化

### 2.5.1 上样浓度对吸附效果的影响

分别以浓度为 4.0、6.2、7.4、8.5 和 9.6 mg/mL 的芍药苷粗提液以 1/16 BV/min 的流速上样进行动态吸附, 每 1/2 BV 收集一管, 测定其中芍药苷的浓

度,考察上样浓度对吸附效果的影响。以收集管数为横坐标、流出液中芍药苷浓度与上样液中芍药苷浓度之比为纵坐标,绘制吸附透过曲线,结果见图5。

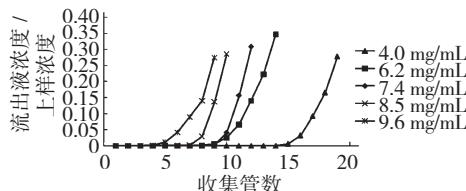


图5 不同浓度的芍药苷样液在HPD-200A树脂柱上的吸附透过曲线

Fig. 5 The adsorption breakthrough curve of different concentrations of paeoniflorin solutions on HPD-200A resin column

由图5可知,随着上样浓度的增加,穿透点逐渐提前,在浓度高于8.5 mg/mL时,流出液中芍药苷浓度随上样量的增大快速增加,而浓度低于6.2 mg/mL时,流出液中芍药苷浓度增加缓慢。上样浓度过低,树脂出现泄漏点缓慢,达到吸附饱和时所需时间较长;浓度过高,树脂的泄漏点出现较早,树脂未能充分吸附,使其利用率降低。因此,综合以上因素本试验选择8.0 mg/mL作为上样液的浓度,上样体积为4.5倍柱体积。

## 2.5.2 流速对吸附效果的影响

将浓度为8.0 mg/mL的提取液分别以0.5、1、1.5、2、2.5 mL/min流速进行动态吸附,比较不同流速对吸附效果的影响,绘制吸附透过曲线,结果见图6。由图6可知,随着流速增加泄漏点的出现会逐渐提前,经计算其树脂的吸附量会逐渐减少,这是因为流速过大时上样液中的芍药苷未能被树脂充分吸附,造成吸附效率降低。较小的流速虽然有利于芍药苷的充分吸附,但操作时间会相应延长,生产效率低。综合考虑工作效率和吸附效果,我们推荐采用1 mL/min的上样速度较为适合,大约相当于1/16 BV/min。

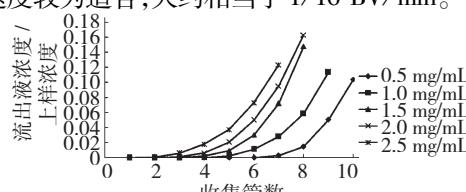


图6 不同上样流速下芍药苷在HPD-200A树脂柱上的吸附透过曲线

Fig. 6 The adsorption breakthrough curve of paeoniflorin solutions with different flow rates on HPD-200A resin column

## 2.6 大孔吸附树脂洗脱条件的优化

### 2.6.1 乙醇浓度对洗脱效果的影响

向吸附平衡的树脂中分别加入浓度为30%、40%、50%、60%、70%、80%、95%的乙醇溶液30 mL,按1.9所述方法充分解吸,测定洗脱液中芍药苷的含量,比较不同浓度乙醇溶液的解吸效果。结果如图7。由图中可见,当乙醇浓度在40%以下时解吸不够完全,50%~70%的乙醇可以达到很高的解吸率,继续提高乙醇浓度解吸率不再提高。考虑生产成本和安全性的因素,最终选用50%的乙醇溶液为洗脱液。

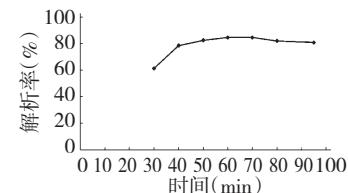


图7 乙醇浓度对洗脱效果的影响

Fig. 7 The effect of ethanol concentration on desorption

### 2.6.2 洗脱液用量的确定

按2.3确定的最优吸附条件上样,吸附之后用2 BV去离子水淋洗树脂柱以除去水溶性杂质。再用50%乙醇溶液以流速1.0 mL/min进行洗脱。收集洗脱液(每1/2 BV为1管),测定含量并绘制解吸曲线,如图8所示。由图8可见,当洗脱体积为2~3 BV时,洗脱液中的芍药苷含量达到最大值,并且洗脱峰相对集中、无明显拖尾现象,约4倍柱体积洗脱液可将芍药苷基本洗脱完全,解吸率为93.0%。

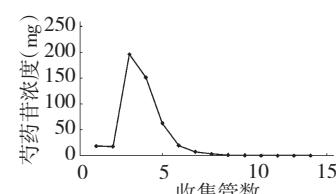


图8 芍药苷动态洗脱曲线

Fig. 8 The dynamic elution curve of paeoniflorin

## 2.7 树脂重复使用周期的考察

HPD-200A树脂的重复使用结果如表2所示。由表中可以看出,吸附率和解吸率首次最高,分别为84.9%和94.3%,之后渐渐下降,到第四次后基本保持稳定,而芍药苷的纯度无明显下降。说明树脂柱对芍药苷的死吸附很少,树脂可重复使用多次而

不需要再生。重复吸附解吸 10 次,收集液的干物质中芍药苷的平均含量为 32.3%,同时 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷,芍药内酯苷和  $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin 的平均含量分别为 8.02%、16.5% 和 6.63%。

表 2 HPD-200A 树脂柱重复使用的性能变化

Table 2 Changes of adsorption properties of HPD-200A resin with repeated usage

重复次数 Repeated times	吸附率 Adsorption rate (%)	解吸率 Desorption rate (%)	含量 <sup>a</sup> Purity <sup>a</sup> (%)
1	84.9	94.3	32.8
2	79.6	93.8	32.5
3	78.4	93.5	32.4
4	77.1	91.5	32.7
5	77.3	92.5	32.6
6	77.2	92.5	32.2
7	77.4	93.4	32.9
8	77.3	92.1	32.6
9	77.2	93.7	30.7
10	77.1	92.9	32.0
平均值	78.4	93.0	32.3

a:仅指芍药苷的含量。

a:only refers to the content of paeoniflorin.

### 3 结论

采用制备 HPLC 等方法从牡丹籽粕醇提物中分离纯化了 4 种主要成分,经 UV、MS、NMR 分析鉴定其分别为 6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷,芍药内酯苷, $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin 和芍药苷,其中以芍药苷含量最高。通过静态吸附、解吸试验从 11 种备选树脂中筛选出 HPD-200A 型大孔吸附树脂,其对牡丹籽中芍药苷的较佳纯化工艺参数为:样液浓度 8.0 mg/mL,上样速度 1/16 BV/min,上样体积 4.5 BV,洗脱液乙醇浓度 50%,洗脱流速 1/16 BV/min,洗脱体积 4 BV。在此条件下树脂重复使用 10 次其吸附率、解吸率以及所得产品纯度无明显下降。经树脂分离纯化的提取物中含有芍药苷 32.3%,芍药内酯苷 16.5%,6'-O- $\beta$ -D-葡萄糖芍药内酯苷 8.02%, $\beta$ -gentiobiosylpaeoniflorin 6.63%。

### 参考文献

- Chunnian He, Yong Peng, Wei Xiao, et al. Determination of chemical variability of phenolic and monoterpene glycosides in the seeds of Paeonia species using HPLC and profiling analysis. *Food Chem*, 2013, 138:2108-2114.
- He CN(何春年), Xiao W(肖伟), Li M(李敏), et al. Chemical constituents from seeds of *Paeonia suffruticosa*. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 2010, 6:1428-1431.
- Sarker SDW, Pensri DL. Identification and ecdysteroid antagonist activity of three resveratrol trimers (suffruticosols A, B and C) from *Paeonia suffruticosa*. *Tetrahedron*, 1999, 55: 513.
- Kim HJH, Sang C, Choi SW. Inhibition of tyrosinase and lipoxygenase activities by resveratrol and its derivatives from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Nutraceuticals and Food*, 2002, 7:447.
- Cheng Yushan, Peng Cheng, Wen Feiyan, et al. Pharmacokinetic comparisons of typical constituents in white peony root and sulfur fumigated white peony root after oral administration to mice. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129:167-173.
- Xiao L, Wang YZ, Liu J, et al. Effects of paeoniflorin on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of transientmiddle cerebral artery occlusion in rats. *Life Sci*, 2005, 78:413.
- Sun R(孙蓉), Lv LL(吕丽莉), Liu GQ(刘国卿). Effects of paeoniflorin on learning and memory ability in mice. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med*(中医药理与临床), 2006, 22:23-25.
- Li CR, Zhou Z, Zhu D, et al. Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:426-438.
- Yu J, Zhu XY, Qi X, et al. Paeoniflorin protects human EA.hy926 endothelial cells against gamma-radiation induced oxidative injury by activating the NF-E2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway. *Toxicol Lett*, 2013, 218:224-234.
- Liu J, Jin DZ, Xiao L, et al. Paeoniflorin attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced learning dysfunction and brain damage in rats. *Brain Res*, 2006, 1089:162-170.
- Liu SY(刘帅英), Xu WZ(徐文铮), Li YF(李水福). Purification of paeoniflorin from radix paeoniae rubra with macroporous resin. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, 41:1480-1482.
- Liu H(刘虹), Wang M(王萌), Hao Y(郝彧), et al. Study on the purification technology of radix paeoniae rubra extract by macroporous resin. *J Tianjin Univ Trad Chin Med*(天津中医药大学学报), 2009, 28:142-145.
- Zhou HM(周海梅), Ma JQ(马锦琦), Miao CY(苗春雨), et al. Physicochemical indexes and fatty acid composition of peony seed oil. *China Oils Fats*(中国油脂), 2009, 34:72-74.

(下转第 1646 页)