

羌活-独活合提液中总香豆素的大孔吸附树脂纯化工艺优选

王蓉蓉, 杨素芳, 王英豪, 谢惠艳, 邱颂平*

(福建中医药大学药学院, 福州 350108)

[摘要] **目的:** 优选羌活-独活合提液中总香豆素的大孔吸附树脂纯化工艺条件。**方法:** 采用UV测定总香豆素含量, 检测波长300 nm。通过静态吸附-洗脱试验比较不同型号大孔树脂对总香豆素的分离纯化能力, 以总香豆素含量为指标, 利用单因素试验考察上样液质量浓度、上样量、洗脱剂体积分数及用量对羌活-独活合提液中总香豆素纯化工艺的影响。**结果:** D101型树脂对总香豆素具有较好的吸附和解吸附性能, 最佳工艺条件为上样液质量浓度 $1.089\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 吸附流速 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 上样量2.5 BV, 加4.5 BV水洗脱, 弃去洗脱液, 加80%乙醇2.5 BV洗脱, 收集洗脱液; 总香豆素吸附率、洗脱率及纯度分别为91.03%, 84.80%, 63.65%。**结论:** D101型树脂对羌活-独活合提液中总香豆素具有较好的分离纯化效果, 优化的纯化工艺操作简单、稳定可行。

[关键词] 总香豆素; 大孔吸附树脂; 羌活; 独活; 静态吸附-洗脱试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0025-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014150025

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1536.007.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:36

Optimization of Purification Process for Total Coumarins from Combined Extract of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and *Angelicae Pubescentis Radix* by Macroporous Resin

WANG Rong-rong, YANG Su-fang, WANG Ying-hao, XIE Hui-yan, QIU Song-ping*

(School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification process of total coumarins from combined extract of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and *Angelicae Pubescentis Radix* by macroporous resin. **Method:** UV was employed to determine the content of total coumarins with detection wavelength at 300 nm. Types of resin for separation and purification of total coumarins were screened by static adsorption-elution test, taking the content of total coumarins as index, single factor tests were adopted to optimize purification conditions with the concentration of sample solution, sample volume, eluent concentration and amount as factors. **Result:** D101 macroporous resin had adsorption and desorption ability for total coumarins, optimum purification conditions were as follows: the concentration of sample solution $1.089\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, adsorption flow rate of $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$, sample volume of 2.5 BV, eluted with 4.5 BV of water and 2.5 BV of 80% ethanol; adsorption rate, desorption rate and purity of total coumarins were 91.03%, 84.80% and 63.65%, respectively. **Conclusion:** Total coumarins from from combined extract of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and *Angelicae Pubescentis Radix* could be purified effectively with D101 resin, this optimized process was simple, stable and feasible.

[Key words] total coumarins; macroporous resin; *Notopterygii Rhizoma et Radix*; *Angelicae Pubescentis Radix*; static adsorption-elution test

[收稿日期] 20140306(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173573);福建省科技厅项目(2012D006)

[第一作者] 王蓉蓉,在读硕士,从事新药开发与药性研究, Tel:18630815060, E-mail:493835304@qq.com

[通讯作者] *邱颂平,教授,硕士生导师,从事比较中药学教学与研究, Tel:13906909545, E-mail:qiu-songping@163.com

羌活具有解表散寒、祛风胜湿和止痛的功效^[1]。独活功效祛风湿和止痛^[1]。二者药性相同,均为辛、苦、温,归肝、肾、膀胱经。前者作用强烈,主治上半身风寒湿痹、太阳经头痛及项背痛;后者药力较缓,主治腰以下风寒湿痹及少阴伏风头痛。两药合用于治疗风湿痹痛始于宋代,《圣济总录》中便有记载。现代药理研究证实羌活、独活均具有明显的镇痛作用^[2-4],香豆素类的 5'-羟基香柑素和紫花前胡苷^[5]为二者镇痛作用的主要有效成分。本实验以总香豆素含量为评价指标,通过单因素试验优选羌活-独活合提液的大孔树脂纯化工艺,为含二者的复方制剂生产工艺参数的确定提供参考。

1 材料

UV-9100 型紫外-可见分光光度仪(北京瑞利分析仪器公司),FA2004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),DV215CD 型 1/10 万电子天平(美国奥豪斯公司)。

羌活、独活均购自福建中医药大学国医堂,经福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定,分别为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 的干燥根茎和根,伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根;D101,HPD-600,AB-8 型大孔树脂均购自上海摩速科学器材有限公司,香豆素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 D1218035),层析柱(15 mm×300 mm,上海达丰玻璃仪器厂),水为自制超纯水或去离子水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总香豆素的含量测定 精密称取香豆素对照品 19.3 mg,置于 50 mL 量瓶中,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得储备液。精密量取储备液 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加乙醇定容,以乙醇为空白对照,于 300 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $A = 32.050C + 0.014$ ($r = 0.9995$),表明总香豆素在 3.86 ~ 23.2 mg·L⁻¹ 与 A 线性关系良好。

2.2 大孔吸附树脂的预处理 准确称取树脂,加 95% 乙醇 5 BV 浸泡 24 h,湿法装柱,加 95% 乙醇洗脱,收集洗脱液至洗脱液-水(1:5)混合后不显白色混浊为止,加水洗脱至水洗液无醇味为止。

2.3 上样液的制备 称取羌活、独活药材各 25 g,加 10 倍量 75% 乙醇浸泡 0.5 h,回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取液,减压回收至无醇味,加热加水定容至

1.50 L,超声处理 30 min 使其分散均匀,得 30.75 g·L⁻¹ 溶液,按 2.1 项下方法测得总香豆素质量浓度 1.089 g·L⁻¹,纯度 12.87%,置于 80 °C 热水中备用。

2.4 大孔吸附树脂的选择^[6-7]

2.4.1 静态吸附试验 准确称取 D101, AB-8, HPD 600 型大孔树脂各 2.0 g,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,经预处理后,精密加入上样液 30 mL,置于 80 °C 恒温水浴锅中,每隔 10 min 振摇 20 s,持续 3 h,静置 1 h,使其达饱和吸附,吸取上层液按 2.1 项下方法测定总香豆素含量($n = 3$),计算树脂饱和和吸附量分别为 13.00, 12.70, 12.94 mg·g⁻¹,吸附率依次为 80.95%, 79.90%, 79.59%。

2.4.2 静态吸附-洗脱性能试验 准确称取 D101, AB-8, HPD 600 型大孔树脂各 2.0 g,分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中,按 2.2 项下方法进行预处理,上样液经静态饱和吸附后滤出,吸干表面水分,精密加入 95% 乙醇 20 mL,每隔 10 min 振摇 20 s,持续 3 h,静置 1 h,使其洗脱完全,按 2.1 项下方法测定洗脱液中香豆素含量,计算洗脱率分别为 73.51%, 53.89%, 67.57%。综合分析,D101 型大孔树脂综合性能最佳。

2.5 单因素试验考察

2.5.1 上样液质量浓度 准确称取 D101 型树脂(1 BV = 9 mL,下同)5.0 g,按 2.2 项下方法进行预处理,加 0.569, 1.089, 2.087, 3.276 g·L⁻¹ 上样液各 1.5 BV 过柱,吸附、洗脱流速控制在 1 BV·h⁻¹,收集流出液,每 0.5 BV 为 1 份,计算吸附率。结果表明上样液质量浓度对香豆素吸附率具有明显影响,在 0.5 ~ 1 g·L⁻¹ 间随质量浓度的增大而增大;在 1 ~ 3 g·L⁻¹ 间随质量浓度的增大呈下降趋势,可能由于质量浓度较大时,物质扩散速度降低,香豆素类成分未能及时吸附,滞留在树脂间,导致吸附率较低,故选择上样液质量浓度 1.089 g·L⁻¹。

2.5.2 上样量 准确称取预处理好的 D101 型树脂 5.0 g,加 1.089 g·L⁻¹ 上样液过柱,吸附、洗脱流速控制在 1 BV·h⁻¹ 内,以 0.5 BV 为单位收集流出液,当流出液中总香豆素质量浓度达上样液质量浓度的 1/10 时,停止上样,此时树脂已泄漏,结果发现第 6 个流份已出现泄漏现象,故收集 6 份,按 2.1 项下方法测得每份流出液中总香豆素质量浓度分别为 0.007, 0.038, 0.059, 0.074, 0.090, 0.109 g·L⁻¹,以第 5 份时上样量为较佳水平,即上样量 22.5 mL,相当于香豆素质量 24.5 mg,即生药量 692 mg,确定

D101 型树脂与药材质量比 7.22:1。

2.5.3 洗脱剂浓度 取预处理好的 D101 型树脂 5.0 g 湿法装柱,取 $1.089 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 2.5 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速吸附,吸附饱和后,加水 4.5 BV 冲洗,弃去洗脱液,依次用 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 的乙醇溶液各 3 BV 洗脱,洗脱流速控制在 $0.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 内,分别收集洗脱液,计算不同体积分数乙醇的总香豆素洗脱量分别为 2.207, 2.817, 9.525, 5.554, 2.477, 0.929 mg,说明 20% 乙醇对总香豆素的洗脱无明显洗脱峰,40% 乙醇存在明显的洗脱峰,但并未洗脱完全,80% 乙醇可洗脱完全,故确定最佳洗脱溶剂为 80% 乙醇。

2.5.4 洗脱剂用量 准确称取预处理好的 D101 型树脂 5.0 g 湿法装柱,取 $1.089 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 2.5 BV 以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 流速吸附饱和,加水 4.5 BV 冲洗,弃去洗脱液,加 80% 乙醇 4.5 BV 控制在 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 内洗脱,以每 0.5 BV 为单位收集流出液,计算各洗脱液中香豆素累积质量分别为 1.27, 9.53, 15.21, 17.36, 18.57, 18.87, 19.30, 19.66, 19.90 mg。结果显示在 0~2.5 BV 时,随洗脱剂用量的增大,总香豆素洗脱率逐渐增大,达 2.5 BV 后,洗脱剂体积对洗脱率的影响不明显,故选择洗脱剂用量约 2.5 BV。

2.6 验证试验 准确称取预处理号的 D101 型大孔树脂 5.0 g 湿法装柱,量取 $1.089 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上样液 3 份,每份 2.5 BV,按优选的工艺条件进行纯化,计算总香豆素吸附率依次为 90.85%, 91.19%, 91.06%, 洗脱液中总香豆素质量分别为 18.66, 19.13, 18.95 mg,洗脱率分别为 83.83%, 85.63%, 84.93%, 纯度分别为 63.81%, 61.92%, 65.23%,

说明优选的纯化工艺稳定可行。

3 讨论

香豆素类成分微溶于水,易溶于乙醇和热水,故试验过程中上样液保存于 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中,可大大增加大孔树脂的吸附能力。静态吸附-洗脱试验与动态吸附-洗脱试验的结果不同,原因可能是静态和动态吸附时,药液与树脂的接触时间和接触面积有差别;动态和静态吸附过程中树脂的膨胀和伸展状态不一样,通过静态吸附解析试验筛选出比吸附量、吸附率和洗脱率较高的树脂用于动态吸附-洗脱试验。

[参考文献]

- [1] 高学敏,王永炎,颜正华. 中药学[M]. 2版. 北京:中国中医药出版社,2007:59.
- [2] 周毅,蒋舜媛,马小军,等. 川产羌活基源及镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床,2003,19(6):22.
- [3] 王一涛,杨奎,王家葵,等. 羌活的药理学研究[J]. 中药药理与临床,1996,12(4):12.
- [4] 范莉,李林,何慧凤. 独活挥发油抗炎、镇痛药理作用的研究[J]. 安徽医药,2009,13(2):133.
- [5] Okuyama E, Nishimura S, Ohmori S, et al. Analgesic component of *Notopterygium incisum* Ting. [J]. Chem Pharm Bull,1993,41(5):926.
- [6] 刘江波,傅婷婷,吕秀阳. 大孔树脂分离纯化三叶青总黄酮的工艺研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(4):287.
- [7] 万志敏,许沛虎,张雪琼,等. 大孔吸附树脂纯化草木犀总香豆素工艺研究[J]. 中成药,2010,32(4):681.

[责任编辑 刘德文]