

阴离子交换树脂纯化安息香总香脂酸的工艺优选

黄小燕, 夏厚林*, 宁梓君, 唐建军, 文冰杰, 李瑞煜, 胡攀
(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选阴离子交换树脂纯化安息香总香脂酸的工艺参数。方法: 采用UV测定总香脂酸含量, 检测波长223 nm。以总香脂酸的吸附量和洗脱率为考察指标, 通过静态吸附-洗脱试验考察717, D201, D301型阴离子交换树脂对安息香总香脂酸的纯化效果, 筛选大孔树脂型号, 通过单因素试验优选纯化工艺参数。结果: 717型阴离子交换树脂交换能力明显强于其他2种树脂, 最佳工艺条件为上样液质量浓度 $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样液pH 12.0, 上样量8 BV, 上样液吸附流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加水量3 BV, 加稀盐酸1 BV洗脱, 加95%乙醇5 BV洗脱, 洗脱流速 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。总香脂酸纯度达73.49%, 较纯化前26.47%增加了2.78倍。结论: 717型强碱性阴离子交换树脂对安息香总香脂酸的纯化效果较好, 优选的纯化工艺稳定可行。

[关键词] 阴离子交换树脂; 安息香; 总香脂酸; 苯甲酸

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0005-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015040005

Optimization of Purification Process of Total Balsamic Acids from Benzoinum by Anion Exchange Resin

HUANG Xiao-yan, XIA Hou-lin*, NING Zi-jun, TANG Jian-jun, WEN Bing-jie, LI Rui-yu, HU Pan
(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization for Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize technological parameters of purification process of total balsamic acids from Benzoinum by anion exchange resin. **Method:** UV was adopted to determine the content of total balsamic acids with detection wavelength at 223 nm. With adsorption capacity and eluting ratio of total balsamic acids as indexes, three types (717, D211 and D301) of anion exchange resin was selected by static adsorption-elution test, then technological parameters of purification process was optimized by single factor test. **Result:** Exchange capacity of 717 anion resin was better than the other two kinds of resins, optimal technological parameters were as follows: the concentration of sample solution $0.02 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH of 12.0, sample volume of 8 BV, adsorption flow rate of $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, removed impurities with 3 BV of water and 1 BV of dilute hydrochloric acid, eluted with 5 BV of 95% ethanol, elution flow rate of $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$. Under these conditions, purity of total balsamic acids could reached 73.49%, which increased 2.78 times by comparing with 26.47% before purification. **Conclusion:** Purification efficiency of 717 anion exchange resin for total balsamic acids from Benzoinum is good, and this optimized purification process is stable and feasible.

[Key words] anion exchange resin; Benzoinum; total balsamic acids; benzoic acid

安息香功效开窍醒神、行气活血、止痛, 临床用于治疗中风痰厥、气郁暴厥、中恶昏迷、心腹疼痛、产后血晕、小儿惊风等^[1], 具有抗炎解热^[2]、脑保护^[3-4]等活性。安息香含树脂70%~80%, 其有效部位为乙醚部位, 文献报道该部位具有抗内毒素作用, 是安息香开窍醒神治疗闭症的部分药效表征^[5],

而总香脂酸为乙醚部位的主要成分, 但尚未见相关研究报道。安息香总香脂酸主要由肉桂酸、苯甲酸、香草酸等水溶性差的弱酸组成, 在生药中以游离态和结合态存在, 根据其于碱反应生成盐而溶于水的性质, 可采用碱水溶液提取。总香脂酸盐在水中以离子形式存在, 可与阴离子树脂上的羟基交换而被吸附到树

[收稿日期] 20140528(010)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2007CB512606)

[第一作者] 黄小燕, 在读硕士, 从事药物分析研究, Tel: 18280348051, E-mail: huangxiaoyan8908@163.com

[通讯作者] *夏厚林, 博士, 教授, 从事中药质量标准及物质基础研究, Tel: 13568899011, E-mail: XHL64@163.com

脂上,达到分离的目的。本实验采用阴离子交换树脂纯化安息香总香脂酸,通过单因素试验优选工艺条件,为该部位的开发利用提供参考。

1 材料

UV-1100型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。安息香购于西南药都,经成都中医药大学药用植物教研室卢先明教授鉴定为安息香科植物白花树 *Styrax tonkinensis* 的干燥树脂;717型强碱性阴离子交换树脂,D201型大孔强碱性阴离子交换树脂,D301型大孔弱碱性阴离子交换树脂均购自成都市科龙化工试剂厂,苯甲酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号1000419-201302),水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 称取安息香药材粉末(过50目筛)适量,加入15倍量 $0.75\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液,加热回流提取1 h,过滤,减压浓缩滤液至 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,备用。

2.2 总香脂酸的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取苯甲酸对照品适量,置10 mL量瓶中,加5%碳酸氢钠溶液制成 $0.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液,备用。

2.2.2 检测波长的确定 吸取对照品溶液和供试品溶液于200~400 nm扫描^[1],结果二者均在223 nm处有最大吸收峰,故选择检测波长223 nm。

2.2.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液0.2,0.25,0.3,0.35,0.4,0.45,0.5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加5%碳酸氢钠溶液定容,摇匀,在223 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 66.750C + 0.038$ ($r = 0.9991$),线性范围 $0.004 \sim 0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 树脂的预处理^[6-7] 将717,D201,D301型树脂分别用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠、盐酸浸泡转型为-OH型,水洗至中性,备用。

2.4 树脂型号筛选

2.4.1 静态吸附试验 量取处理好的717,D201,D301型树脂各5 mL,分别置于50 mL具塞锥形瓶中,各加入 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 安息香提取液25 mL,室温静态吸附24 h,过滤,按2.2项下方法测定滤液中总香脂酸含量,计算静态吸附量分别为115.32,89.10,74.87 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.2 静态洗脱试验 取2.4.1项下吸附饱和的树脂,各加入稀盐酸5 mL和95%乙醇40 mL,摇匀,室温静态洗脱24 h,过滤,按2.2项下方法测定滤液中总香脂酸含量,计算静态洗脱率依次为54.28%,

43.88%,41.74%。综合静态吸附-洗脱试验,选择717型树脂进行纯化工艺优选。

2.5 动态吸附条件考察

2.5.1 上样液 pH 量取717型树脂4份,每份5 mL,湿法装柱,径高比约1:10,各缓慢加入 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上样液50 mL,pH分别为10.5,11,11.5,12,以 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 流速通过树脂柱,收集流出液,按2.2项下方法测定流出液中总香脂酸含量,计算吸附量分别为60.09,60.17,63.02,63.76 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,故选择上样液pH 12。

2.5.2 上样液质量浓度 量取717型树脂4份,每份5 mL,湿法装柱,径高比约1:10,分别加入0.02,0.015,0.01,0.005 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 安息香样品溶液50 mL,pH均为12,控制流速 $1\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集流出液,计算吸附量分别为63.51,63.26,63.46,61.97 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,综合考虑,确定上样液质量浓度 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 吸附流速 量取717型树脂4份,每份5 mL,湿法装柱,径高比约1:10,各以 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 安息香提取液50 mL(pH 12)上柱,流速分别为1,2,3,4 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$,收集流出液,测定流出液中总香脂酸含量,计算总香脂酸吸附量分别为63.54,63.17,61.97,60.73 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,确定吸附流速 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

2.5.4 上样量 量取717型树脂5 mL,湿法装柱,径高比约1:10,缓慢加入 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 上样液(pH 12),以 $2\text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂柱,每1 BV(5 mL)流出液收集为1份,以流分为横坐标,总香脂酸质量浓度为纵坐标,绘制吸附泄漏曲线,见图1。结果显示流分9中总香脂酸质量浓度 $1.061\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,大于上样浓度的10%(泄漏点),明显表现出泄漏现象,故选择上样量8 BV,即717型树脂1 mL的最佳吸附量为生药0.16 g。

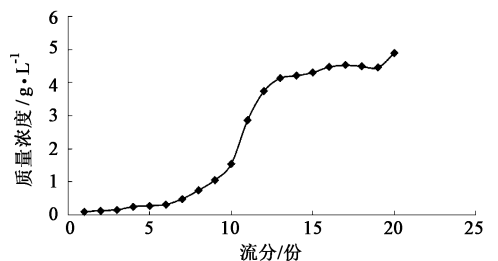


图1 717型树脂对安息香总香脂酸的吸附泄漏曲线
Fig.1 Leakage curve of 717 anion exchange resin for total balsamic acids in Benzoinum

2.5.5 树脂径高比 取3根粗细不同的树脂柱,量取717型树脂5 mL,湿法装柱,径高比分别为1:15,1:10,1:5,按上述确定的条件上样,收集流出液,计算总香脂酸吸附量分别为57.73,57.77,57.79 $\text{g}\cdot$

L⁻¹。结果表明树脂径高比对717型树脂无影响。

2.6 动态洗脱条件考察^[8,9]

2.6.1 水洗除杂用量 量取717型树脂5 mL,湿法装柱,径高比1:10,缓慢加入0.02 g·mL⁻¹安息香样品溶液40 mL(pH 12),以2 BV·h⁻¹的速度通过树脂柱,水洗除杂至流出液澄清,结果表明用水3 BV可使流出液澄清。

2.6.2 洗脱剂用量 量取717型树脂4份,每份5 mL,湿法装柱,径高比1:10,按上述确定的条件上样、水洗除杂,分别加稀盐酸1,2,3,4 BV洗脱,加95%乙醇10 BV洗脱,控制流速1 BV·h⁻¹,收集洗脱液,计算洗脱率分别为79.64%,76.63%,80.54%,78.56%。选择加稀盐酸1 BV洗脱。

2.6.3 乙醇体积分数 量取717型树脂4份,每份5 mL,湿法装柱,径高比1:10,按上述确定的条件上样、水洗除杂,加稀盐酸1 BV洗脱,分别加55%,70%,85%,95%的乙醇溶液10 BV洗脱,控制流速1 BV·h⁻¹,收集洗脱液,减压回收乙醇,测定洗脱液中总香脂酸含量,计算洗脱率分别为77.69%,79.41%,81.33%,87.98%,故选择95%乙醇洗脱。

2.6.4 乙醇用量 量取717型树脂5 mL,湿法装柱,径高比1:10,按上述确定的条件上样、水洗除杂、洗脱,加入95%乙醇洗脱,控制流速1 BV·h⁻¹,收集洗脱液,每1 BV收集为1份,计算洗脱率分别为20.59%,37.58%,12.43%,4.97%,3.13%,1.98%,0.80%,结果表明乙醇用量为6 BV时能将总香脂酸成分基本洗脱完全。

2.6.5 洗脱流速 量取717型树脂3份,每份5 mL,湿法装柱,径高比1:10,按上述确定的条件上样、水洗除杂、洗脱,乙醇洗脱时流速分别为1,2,3 BV·h⁻¹,收集乙醇洗脱液,计算洗脱率分别为81.67%,77.02%,70.10%,故选择洗脱流速1 BV·h⁻¹。

2.7 验证试验 量取717型树脂3份,每份5 mL,湿法装柱,径高比1:10,按最佳纯化工艺条件操作,收集乙醇洗脱液,按2.2项下方法测定总香脂酸含量。分别精密移取适量洗脱液水浴蒸干,置于减压干燥器中干燥至恒重,称定质量,计算总香脂酸纯度。结果表明经717型树脂纯化后,总香脂酸纯度达73.49%,较纯化前26.47%增加了2.78倍,说明该树脂纯化效果较好。

3 讨论

安息香总香脂酸为弱酸,故选择阴离子交换树脂对其进行纯化。研究发现717型强碱性阴离子交换树脂适应性较好。通过对717型树脂纯化总香脂

酸的动态交换条件进行系统考察,确立了最佳纯化工艺的各项参数。验证试验表明经717型树脂纯化后,安息香总香脂酸纯度较纯化前有大幅度提高,且重复性良好^[10-11]。

安息香总香脂酸由苯甲酸、肉桂酸、香草酸等芳香酸组成,这些成分的母核结构相似,其中以苯甲酸含量最高,故本文选择苯甲酸为对照品,采用UV测定总香脂酸含量。前期试验已建立了安息香总香脂酸的含量测定方法,并将该法与2005年版《中国药典》中质量法相比,结果表明二者结果一致,无显著性差异。安息香总香脂酸常以结合态(芳香酸酯)和游离态(芳香酸)存在于生药中^[12]。安息香经碱水提取后,用离子交换树脂纯化,最终得到的是总游离态香脂酸。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:138,附录30.
- [2] 雷玲,王强,白筱璐,等. 安息香的抗炎解热作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):109-110.
- [3] 倪彩霞,曾南,汤奇,等. 芳香开窍药对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及其机制初探[J]. 中药药理与临床,2010,26(5):64-66.
- [4] 刘岩,王建,姚宏斌,等. 开窍药对缺血缺氧损伤PC12细胞的影响及其作用机制[J]. 中药药理与临,2012,26(4):35-38.
- [5] 梁珂,曾南,唐永鑫,等. 芳香开窍药对D-氨基半乳糖敏化小鼠内毒素致死性攻击的影响[J]. 中药药理与临床,2011,27(1):58-60.
- [6] 孙静,张明,张小飞. 延胡索总生物碱纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):40-43.
- [7] 李娜,金敬红,姜洪芳,等. 宣木瓜总有机酸的纯化及镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):113-116,119.
- [8] 亢炎,佟继铭. 阴离子交换树脂分离纯化赤菟果中的总有机酸[J]. 承德医学院学报,2009,26(3):237-239.
- [9] 尹莲,杨大凯,裘颖儿. 加味四妙丸中总有机酸总量测定及分离纯化研究[J]. 中成药,2006,28(4):552-554.
- [10] 彭颖,夏厚林,周颖,等. 安息香不同提取方法的GC-MS研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):73-76.
- [11] 王峰,方振峰. 安息香化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):89-92.
- [12] 陈胜璜,杨德俊,黄志超. 安息香树叶中总香脂酸的含量测定[J]. 中国医药导报,2007,4(12):108.

[责任编辑 刘德文]