

大孔树脂纯化红花中羟基红花黄色素 A 的产业化探索

吴建雄^{1,2,3}, 秦建平^{1,2,3}, 万琴^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧伟^{1,2,3*}

- (1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;
3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001)

[摘要] 目的: 优选 D101 大孔树脂纯化红花中羟基红花黄色素 A 的工业化放大工艺。方法: 采用 HPLC 测定羟基红花黄色素 A 含量, 通过单因素试验考察上样液 pH、洗脱剂体积分数和用量、药材-树脂质量比对纯化工艺的影响, 通过中试及工业化生产验证优选的纯化工艺。结果: 优选的纯化工艺条件为上样液 pH 4.0, 药材-树脂质量比 1:6, 加 4 BV 水以 3 BV·h⁻¹ 的流速洗脱除杂, 用 5% 乙醇 6 BV 以 3 BV·h⁻¹ 的流速洗脱, 收集洗脱液。结论: 该工艺简单可行、分离效果好, 适用于羟基红花黄色素 A 的大生产。

[关键词] 羟基红花黄色素 A; 大孔树脂; 纯化; 产业化

[中图分类号] R284.2, R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0005-03

[doi] 10.11653/syfy2013160005

Preliminary Exploration of Industrialization for Purification of Hydroxysafflor Yellow A from *Carthamus tinctorius* by Macroporous Resin

WU Jian-xiong^{1,2,3}, QIN Jian-ping^{1,2,3}, WAN Qin^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3*}

- (1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China; 2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-technology for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize industrialization amplification process for purification of hydroxysafflor yellow A from *Carthamus tinctorius* by macroporous resin. **Method:** The content of hydroxysafflor yellow A was determined by HPLC, single factor tests were adopted to investigated effects of pH of sample solution, the concentration and amount of eluant, quality ratio of raw materials to resin on purification technology, then verified optimized technology through pilot and industrialization production. **Result:** Optimum purification conditions were as follows: ratio of crude drug to D101 resin 1:6, pH of sample solution 4.0, eluted impurity with 4 BV water at flow rate of 3 BV·h⁻¹, then eluted with 6 BV 5% ethanol at 3 BV·h⁻¹, collected eluent. **Conclusion:** This technology was simple and feasible with good separation, it could be suitable for industrialized production of hydroxysafflor yellow A.

[Key words] hydroxysafflor yellow A; macroporous resin; purification; industrialization

大孔树脂吸附技术在中药分离、纯化研究中的应用已日趋成熟, 可明显提高分离、纯化效率且操作简便, 能缩短生产周期、节约成本^[1]。红花具有活

血通经、散瘀止痛之功效。其主要药效成分为查尔酮类羟基红花黄色素 A (HSYA) 和红花黄色素等。在查阅文献基础及预试验上^[2-9], 本实验以 HSYA 含

[收稿日期] 20130206(007)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09401-097)

[第一作者] 吴建雄, 学士, 工程师, 从事中药新技术新工艺研究与开发, Tel: 13812348635, E-mail: jxwu20@gmail.com

[通讯作者] * 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士, 从事中药制剂和创新中药开发与研究, E-mail: wzhh-nj@tom.com

量为指标,采用单因素试验考察上样液 pH、洗脱剂体积分数和用量、药材-树脂质量比对 D101 型大孔树脂纯化工艺的影响,确定最佳纯化工艺,通过中试和工业化生产进行验证,为 HSYA 的大生产提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Millipore Simplicity 纯水系统(美国密理博公司), AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), DL-500B 型离心机(上海安亭仪器厂)。D101 型大孔吸附树脂(天津海光化工有限公司), 羟基红花黄色素 A 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111637-200905), 红花(产地新疆,购于安徽亳州药材市场,经康济大药房主管药师吴舟鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,羟基红花黄色素 A 质量分数 1.53%), 水为去离子水,所用试剂为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 上样液的制备 称取适量红花,加 12 倍量水 60 °C 温浸提取 3 次,每次 1.5 h,过滤,合并滤液,减压浓缩,冷却至室温,离心(2 000 r·min⁻¹, 10 min),取上清液备用。

2.2 羟基红花黄色素 A 的含量测定

2.2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini 色谱柱,流动相甲醇-0.5% 磷酸(40:60),检测波长 400 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。理论塔板数按 HSYA 峰计算不低于 3 000。

2.2.2 溶液的制备 精密称取 60 °C 干燥至恒重的 HSYA 对照品适量,加水制成 0.2 g·L⁻¹ 的对照品储备液,备用。精密称取供试品约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水制成 1 g·L⁻¹ 供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取对照品储备液适量,加水稀释成系列质量浓度的对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标, HSYA 质量为横坐标,得回归方程 $Y = -2.065 \times 10^5 + 5.141 \times 10^5 X$ ($r = 0.9991$),线性范围 0.82 ~ 4.08 μg。

2.2.4 精密度试验 精密量取供试品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,连续进样 6 次,结果 HSYA 峰面积的 RSD 2.87%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密量取供试品溶液 10 μL,分别于 0,1,4,8,12,24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测

定,结果 HSYA 峰面积的 RSD 2.55%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.2.6 重复性试验 精密量取供试品溶液 10 μL,平行 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果 HSYA 峰面积的 RSD 2.39%。

2.2.7 加样回收率试验 分别称取供试品 6 份,每份约 5 mg,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,各准确加入 1.02 g·L⁻¹ HSYA 对照品溶液 1 mL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果平均回收率 98.10%,RSD 0.61%。

2.3 大孔吸附树脂的预处理 在预试验基础上,取 D101 型大孔吸附树脂,湿法装柱(1.5 cm × 30 cm),柱体积 10 mL,确定径高比 1:7,加 70% 碱性乙醇溶液(含 5% 氢氧化钠)2 BV 浸泡 2 h,以 2 BV·h⁻¹ 流速洗脱,加 95% 乙醇 4 BV 以 4 BV·h⁻¹ 流速洗脱,用水洗至中性且无醇味,备用。

2.4 实验室小试工艺优选

2.4.1 上样液 pH 考察 取同一上样液(pH 5.0, HSYA 质量浓度 3.90 g·L⁻¹)5 份,用 0.5 mol·L⁻¹ 的盐酸分别调 pH 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,另取等质量已处理的 5 份树脂,加入上样液静态吸附 24 h,测定吸附液中 HSYA 含量,计算静态吸附量分别为 12.63,12.28,10.01,9.85,6.23 mg·g⁻¹,故确定上样液 pH 4.0。

2.4.2 水洗脱用量考察 取适量已处理好的树脂湿法装柱,加适量 pH 4.0 的上样液,静置 1 h,以 2 BV·h⁻¹ 加 6 BV 水洗脱,收集各流份(每 1 BV 为 1 流份),测得 HSYA 质量浓度分别为 0,0,0,0,0.5,1.0 mg·L⁻¹,含固量依次为 0.38,0.19,0.06,0.03,0.02,0.01 mg,结合大生产实际考虑,选择加 4 BV 水洗除杂。

2.4.3 乙醇体积分数考察 取 4 份等量已处理好的 D101 型树脂,药材-树脂(1:7)湿法装柱,加 pH 4.0 的上样液 8 mL,静置 1 h,用 4 BV 水以 2 BV·h⁻¹ 洗脱,弃去洗脱液,依次用体积分数 5%,10%,15%,20% 的乙醇溶液各 8 BV 以 2 BV·h⁻¹ 洗脱,分别收集各体积分数乙醇洗脱液,测定,结果各洗脱液中 HSYA 质量分别为 29.45,2.95,0.26,0.02 mg,洗脱率依次为 82.72%,8.29%,0.73%,0.05%,纯度分别为 20.87%,19.23%,20.01%,18.73%,故选用 5% 乙醇。

2.4.4 洗脱剂用量考察 取已处理好的 D101 型树脂(7 倍生药量),湿法装柱,加 pH 4.0 的上样液 8 mL,静置 1 h,用 4 BV 水以 2 BV·h⁻¹ 洗脱,弃去洗

脱液,加 5% 乙醇 8 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集各流份(每 1 BV 为 1 流份),测定,结果各流份中 HSYA 质量浓度分别为 0.181 3,0.122 1,0.083 4,0.050 5,0.025 8,0.019 3,0.000 8,0.000 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,累积洗脱率分别为 30.71%,51.39%,65.52%,74.07%,78.40%,81.67%,81.81%,81.88%,故确定 5% 乙醇用量 6 BV。

2.4.5 药材-树脂质量比考察 取已处理的 D101 型树脂 5 份,分别按药材-干树脂质量比 1:4,1:5,1:6,1:7,1:8 加入 pH 4.0 的上样液,静置 1 h,用 4 BV 水以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液,测得 HSYA 质量分别为 78.56,14.21,0,0,0 mg;用 5% 乙醇 6 BV 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液,计算 HSYA 质量分别为 256.44,252.57,222.02,182.50,149.44 mg,得率依次为 75.08%,92.43%,94.50%,93.50%,87.50%,纯度分别为 13.82%,18.90%,23.52%,24.57%,23.90%,故选定药材-树脂质量比 1:6。

2.4.6 验证试验 取 3 份已处理好的 D101 型树脂,湿法装柱(1.5 cm × 30 cm),柱体积 10 mL,按优选的工艺进行上样和洗脱,收集洗脱液,减压浓缩并干燥,计算 HSYA 得率分别为 90.89%,87.26%,97.61%,纯度依次为 20.54%,24.87%,19.66%,说明优选的工艺较稳定。

2.5 中试试验 在小试基础上进行 3 批中试试验,称取红花 3 份,每份 5 kg,分别按 2.1 项下方法制备上样液,柱体积 44 L(20 cm × 200 cm),根据实际情况适当调整了流速,上样流速 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$,静置 1 h,加 4 BV 水以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,弃去水洗液,加 5% 乙醇 6 BV 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,分段收集洗脱液,每 1 BV 为 1 份,结果 HSYA 得率分别为 83.75%,83.42%,84.12%,纯度依次为 20.63%,21.15%,19.84%,表明实验室小试优选的参数可行。

2.6 工业化放大试验 在中试试验基础上进行 3 批工业化放大试验,称取红花 3 份,每份 32.7 kg,分别按 2.1 项下方法制备上样液,树脂柱为 38 cm × 266 cm,柱体积约 300 L,工艺参数保持不变,分段收集 5% 乙醇洗脱液,每 1 BV 为 1 份,结果 HSYA 洗脱率分别为 97.3%,95.5%,96.7%,得率依次为 80.34%,81.25%,81.65%,纯度分别为 19.26%,

19.58%,20.03%,表明大生产各批次间参数稳定,优选的工艺参数可行。

3 讨论

随试验规模的逐步放大,D101 型大孔树脂的平均洗脱率呈逐步提高的趋势,原因可能是随试验规模的放大,树脂增多会导致流速有所减慢,尤其在用乙醇洗脱时,树脂会有不同程度的溶胀,从而增加了孔内扩散时间;同时用乙醇替换水解吸时,乙醇溶于水属于放热过程^[10-11],在一定程度上也促进了解吸。HSYA 得率和纯度有所下降,初步推测重要因素之一可能是树脂吸附量,在后续生产中可适当增加树脂量或降低上样量,以提高目标成分的收率和纯度。

[参考文献]

- [1] 屠鹏飞,贾存勤,张洪全.大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J].世界科学技术——中医药现代化,2004,6(3):22.
- [2] 徐如英,童树鹏.红花的化学成分及药理作用研究进展[J].中国药业,2010,19(20):86.
- [3] 王若菁,杨滨.红花的化学成分及质量标准研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(5):65.
- [4] 于国峰,丁嘉信,王超,等.红花总黄酮大孔树脂纯化工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):39.
- [5] 施峰,王光忠,刘焱文.大孔树脂分离纯化红花黄色素的研究[J].湖北中医学院学报,2007,9(1):47.
- [6] 刘晶,张会宗,邸子真,等.大孔吸附树脂纯化红花黄色素研究[J].中成药,2009,31(6):867.
- [7] 陈雪英,徐翔,陈勇,等.红花提取物纯化过程的近红外光谱快速测定方法研究[J].中国中药杂志,2012,37(20):3062.
- [8] 赵维亮,孙明珍,石秀伟.大孔树脂纯化红花黄色素的影响因素考察[J].中成药,2008,30(10):1557.
- [9] 陈雪英,徐翔,陈勇,等.红花提取物纯化过程的近红外光谱快速测定方法研究[J].中国中药杂志,2012,37(20):3062.
- [10] 张英,赖爱芬.大孔树脂型号与规格的规范化探讨[J].高分子通报,2009,22(11):44.
- [11] 张珠,陈小平.大孔树脂提取中药有效成分的放大研究[J].烟台大学学报,2005,18(1):55.

[责任编辑 仝燕]