

祖师麻总香豆素纯化工艺优选

李开, 尹蓉莉*, 孔艳, 张立, 朱双燕, 陈柳钦

(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优化祖师麻总香豆素的纯化工艺。方法: 以总香豆素含量为指标, 采用静态和动态吸附-洗脱试验筛选大孔树脂型号, 通过单因素试验考察最大上样量、洗脱剂浓度和用量、洗脱速度对纯化工艺的影响。结果: AB-8 型大孔树脂对总香豆素的吸附性能和解析效果最佳, 其最佳纯化工艺为最大上样量 3 BV, 加去离子水洗脱杂质, 用 75% 乙醇 10 BV 洗脱, 洗脱流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结论: 优选的纯化工艺稳定可靠, 能满足祖师麻总香豆素渗透泵控释片需求。

[关键词] 祖师麻; 祖师麻甲素; 总香豆素; 纯化; 大孔树脂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0058-03

[doi] 10.11653/syfj2013120058

Optimization of Purification Technology of Total Coumarins in *Daphne giraldii*

LI Kai, YIN Rong-li*, KONG Yan, ZHANG Li, ZHU Shuang-yan, CHEN Liu-qin

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20121220 (021)

[第一作者] 李开, 硕士, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel: 13708227340, E-mail: lk13708227340@163.com

[通讯作者] * 尹蓉莉, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel: 028-68289191, E-mail: yinronglili@163.com

- [15] Meerod S, Tumcharern G, Wichai U, et al. Magnetite nanoparticles stabilized with polymeric bilayer of poly (ethylene glycol) methyl ether - poly(ϵ -caprolactone) copolymers[J]. Polymer, 2008, 49(18):3950.
- [16] Letchford K, Liggins R, Wasan K M, et al. *In vitro* human plasma distribution of nanoparticulate paclitaxel is dependent on the physicochemical properties of poly (ethylene glycol)-block-poly (caprolactone) nanoparticles[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71(2):196.
- [17] Tyrrell Z L, Shen Y, Radosz M. Fabrication of micellar nanoparticles for drug delivery through the self-assembly of block copolymers[J]. Prog Polym Sci, 2010, 35(9):1128.
- [18] Mikhail A S, Allen C. Poly(ethylene glycol)-b-poly(ϵ -caprolactone) micelles containing chemically conjugated and physically entrapped docetaxel: synthesis, characterization, and the influence of the drug on micelle morphology[J]. Biomacromolecules, 2010, 11(5):1273.
- [19] Feng R L, Song Z M, Zhai G X. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7:4089.
- [20] 赵辉鹏, 张琰, 查刘生, 等. 用 NMR 分析可生物降解的两亲性嵌段共聚物的相对分子质量和组成[J]. 分析测试学报, 2006, 25(4):6.
- [21] 张金莲, 姚冬琴, 龚千锋, 等. 多指标综合加权评分法优选马兜铃蜜制工艺[J]. 中成药, 2012, 34(2):321.
- [22] 潘艺茗, 黄岳山. 聚乳酸/聚乙二醇琥珀酸酯-姜黄素纳米粒的制备及体外评价[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):421.
- [23] Astafieva I, Zhong X F, Eisenberg A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions[J]. Macromolecules, 1993, 26(26):7339.
- [24] 刘艳华, 孙进, 王文苹, 等. 透明质酸接枝十八烷基聚合物的合成及表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20):49.
- [25] Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 65(3):259.

[责任编辑 全燕]

[**Abstract**] **Objective:** To optimize purification technology of total coumarins in *Daphne giraldii*. **Method:** With the content of total coumarins as index, model of macroporous resin was screened by static and dynamic adsorption-elution test, effect of the maximum sample volume, the concentration and amount of eluent, elution speed on purification technology was investigated by single-factor test. **Result:** AB-8 resin showed the best due to its adsorption and desorption properties, optimum purification conditions were as follows: the maximum sample volume 3 BV, added deionized water for removing impurities, and eluted with 10 BV of 75% ethanol at the flow rate of 2 BV·h⁻¹. **Conclusion:** This optimized technology was stable and reliable, which could meet requirements of total coumarins in *D. giraldii* osmotic pump tablets.

[**Key words**] *Daphne giraldii*; daphnetin; total coumarins; purification; macroporous resin

祖师麻又名祖司麻,具有祛风湿、活血止痛的功效,用于治疗风湿痹痛,关节炎,类风湿性关节炎^[1]。祖师麻甲素为其主要成分,具有消炎止痛、镇静、镇痛和抗炎作用^[2]。早在20世纪70年代,祖师麻制剂已被临床广泛应用于镇静镇痛和祛风除湿,如祖师麻片、祖师麻胶囊、祖师麻注射液、祖师麻关节止痛膏等,其中祖师麻止痛关节膏采用醇提法,其他品种均采用水处理工艺^[3]。由于祖师麻甲素在水中不易溶解^[4],甲醇、乙醇中微溶,但在沸水中溶解,因此上述工艺不尽合理。本实验以祖师麻总香豆素含量为指标,采用单因素试验对大孔树脂种类及其纯化工艺进行筛选,为确定生产工艺参数提供实验依据。

1 材料

UV-1102型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),DGG-9240型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司),S2-93A型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

祖师麻(购于安国市金草饮片有限公司,批号0310300006,经本校生药教研室卢先明老师鉴定为瑞香科瑞香属植物黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche. 的干燥茎皮和根皮),祖师麻甲素对照品(中国药品生物制品检定所,批号110900-200405),甲醇为分析纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。X-5, HPD100, HPD400, D101, AB-8型大孔吸附树脂(安徽三星树脂科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 总香豆素含量测定 采用紫外分光光度法测定,将祖师麻甲素对照品溶液和供试品溶液于200~400 nm扫描,结果发现祖师麻甲素和祖师麻总香豆素在327 nm左右有最大吸收,故确定检测波长327 nm。

2.2 上柱液的制备^[5] 取祖师麻0.5 kg,加14倍65%乙醇溶液充分浸渍24小时后,以1 mL·s⁻¹的流

速进行渗漉,得祖师麻提取液。回收乙醇至无醇味,加入适量去离子水,配成含生药0.1 g·mL的溶液,即得。

2.3 大孔树脂的前处理 将大孔树脂用95%乙醇浸泡24 h,使其充分膨胀,湿法装柱,用95%乙醇洗至流出液加适量纯水无白色浑浊现象,再用去离子水洗净乙醇,直至流出液无浑浊为止。

2.4 大孔树脂型号筛选

2.4.1 静态吸附-洗脱试验 准确称取已处理好的5种大孔树脂(X-5, HPD100, HPD400, D101, AB-8)各10 g,置于具塞锥形瓶中,分别加入上柱液100 mL,密塞,置于水浴振荡器中,震荡频率60 r·min⁻¹,振摇2 h,静置过夜,使其达到饱和吸附,测定各树脂吸附后溶液中总香豆素含量,计算各树脂的吸附量分别为1.15, 0.71, 1.07, 0.95, 1.20 mg·g⁻¹; 吸附率分别为31.50%, 19.45%, 29.32%, 26.03%, 32.88%。

$$\text{树脂吸附量} = (C_0 - C_r) \times V/W;$$

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

式中 C_0 为上柱液质量浓度, C_r 为吸附后质量浓度, V 为吸附液体积, W 为树脂质量。

取上述吸附饱和的树脂,置于具塞锥形瓶中,用去离子水洗涤后,分别加入65%乙醇100 mL,密塞,置于水浴振荡器中,震荡频率60 r·min⁻¹,振摇2 h,静置过夜,滤过,收集续滤液,测定总香豆素含量,计算洗脱率分别为6.96%, 11.27%, 21.50%, 13.68%, 23.33%。

$$\text{洗脱率} = C_d \times V_d / [(C_0 - C_r) \times V] \times 100\%$$

式中 C_d 为洗脱液质量浓度, V_d 为洗脱液体积。

由以上结果可知,HPD-400, AB-8, X-5型大孔树脂对祖师麻总香豆素的吸附量明显高于其他树脂,同时HPD-400, AB-8型树脂的洗脱率明显大于X-5型树脂,故选择HPD-400, AB-8型树脂进行下一步动态试验。

2.4.2 动态吸附-洗脱试验 取 HPD-400, AB-8 型树脂各 10 g (约 15 mL), 湿法装柱。分别量取上柱液 100 mL 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 用 6 BV 水以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 再用 65% 乙醇 10 BV 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱, 收集洗脱液, 分别测定流出液及 65% 乙醇洗脱液中祖师麻总香豆素含量, 计算大孔树脂的动态吸附量分别为 $1.31, 1.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 洗脱率依次为 29.01%, 30.35%, 故选择 AB-8 型大孔树脂。

2.5 上样量考察 取 AB-8 型湿树脂 10 g 装柱, 取上柱液以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 上样, 按柱体积 (每份 15 mL) 收集流出液, 依次标号, 测定祖师麻总香豆素含量, 绘制泄漏曲线, 见图 1。结果发现, 祖师麻总香豆素在第 3 份时有微量泄漏, 故确定最大上样量为 3 BV。

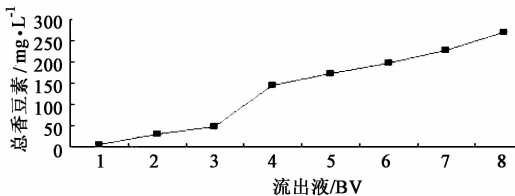


图 1 AB-8 型大孔树脂吸附祖师麻总香豆素的泄露曲线

2.6 洗脱剂考察 取 AB-8 型湿树脂 10 g 装柱, 取上柱液 45 mL 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 用 6 BV 水洗脱, 再分别用体积分数 35%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% 的乙醇溶液 6 BV 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 速度洗脱, 收集洗脱液, 测定祖师麻总香豆素含量, 计算洗脱率分别为 15.17%, 20.69%, 34.48%, 51.03%, 54.52%, 56.86%。说明随乙醇体积分数的升高, 对祖师麻总香豆素洗脱率有增大的趋势, 结合生产成本考虑, 确定选择 75% 乙醇。

2.7 洗脱速度考察 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 10 g 装柱, 取上柱液 45 mL 以 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 用 6 BV 水洗脱后, 再用 75% 乙醇 6 BV 分别按 1, 2, 3, 4, 5 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 收集洗脱液, 测定祖师麻总香豆素含量, 计算洗脱率分别为 81.92%, 79.52%, 71.08%, 60.24%, 30.12%。说明随洗脱流速的增大, 对祖师麻总香豆素的洗脱有减弱的趋势, 为节省时间提高效率, 确定洗脱速度 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.8 洗脱剂用量考察^[6] 取处理好的 AB-8 型湿树脂 10 g, 湿法装柱, 取上柱液 45 mL 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 用 6 BV 水洗脱后, 再用 75% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱, 按树脂柱体积数收集流出液, 依次标号, 测定祖师麻总香豆素含量, 绘制洗脱曲

线, 见图 2。结果表明当洗脱剂用量为 10 BV 时, 祖师麻总香豆素基本洗脱完全。

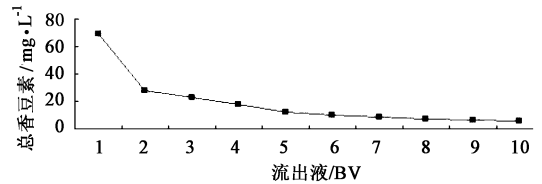


图 2 AB-8 型大孔树脂吸附祖师麻总香豆素的洗脱曲线

2.9 验证试验 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 3 份, 每份 10 g, 湿法装柱, 取上柱液 45 mL 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样, 先用 6 BV 水洗脱, 再用 75% 乙醇 10 BV 按 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱, 测定洗脱液中祖师麻总香豆素含量, 结果平均洗脱率 81.23% (RSD 1.64%), 洗脱液浓缩后固形物的平均收率 6.30% (RSD 1.17%), 表明采用 AB-8 型大孔树脂纯化祖师麻总香豆素的工艺稳定可行。

3 讨论

经大孔树脂纯化后, 所得干膏中有效成分含量明显高于提取液直接干燥。本实验选用的 5 种大孔树脂, 皆为聚苯乙烯型, 包括非极性的 (D101, HPD-100, X-5)、弱极性 (AB-8) 和中极性 (HPD-400), 结果发现 AB-8 型树脂对祖师麻总香豆素的吸附和洗脱能力最强, 可能是由于祖师麻总香豆素极性较大, 所以对 AB-8 和 HPD-400 型树脂具有较大的亲和力。

[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: 化工工业出版社, 1977: 445.
- [2] 管玉珠, 余兰, 毕凌. 祖师麻中瑞香素提取工艺比较[J]. 兰州医学院学报, 2000, 26(2): 9.
- [3] 李才堂, 虞金宝, 余良忠. 祖师麻提取纯化工艺考察[J]. 医学导报, 2010, 29(2): 235.
- [4] 许海琴, 许列琴, 许江苇. 常用天然提取物标准参考手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 157.
- [5] 王宝才, 尹蓉莉, 李东芬, 等. 大黄总蒽醌大孔树脂纯化工艺优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 16.
- [6] 盛华刚, 朱立俏, 王远国, 等. 大孔树脂纯化祖师麻中香豆素类成分的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 14.

[责任编辑 仝燕]