

折光法在树脂精制枳实中有效成分的应用

曾文雪^{1,2}, 姚珍珍², 涂瑶生^{1,4}, 陈银芳², 宋小玲², 王跃生^{3,5*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 江西中医学院, 南昌 330006;

3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 4. 广东省中医研究所, 广州 510095;

5. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 探讨折光法在大孔树脂纯化工艺中应用的可行性。**方法:** 选取枳实提取物为研究对象, 经 AB-8 型大孔吸附树脂精制有效部位, 用水与 50% 乙醇洗脱, 间隔取样, 在线监测洗脱液的折光率并分析其变化规律, 同时以 HPLC 和 UV 检测作为参比, 判断洗脱过程中始点和终点。**结果:** 枳实有效部位精制过程中水洗终点为第 4 BV (折光率 0), 亦即 50% 乙醇洗脱始点, 50% 乙醇洗脱终点为第 9 BV (折光率 16)。**结论:** 折光法准确可靠、便捷快速, 具有较强的实践指导意义。

[关键词] 折光法; 枳实有效部位; 洗脱液始、终点; 橙皮苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0004-03

[doi] 10.11653/syjf2013080004

Application of Refractometry in Purification Technology of Active Ingredients from *Citrus aurantium* by Macroporous Resin

ZENG Wen-xue^{1,2}, YAO Zhen-zhen², TU Yao-sheng^{1,4}, CHEN Yin-fang²,
SONG Xiao-ling², WANG Yue-sheng^{3,5*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China;

3. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 4. Guangdong Provincial Institute of TCM, Guangzhou 510095, China;

5. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100070, China)

[Abstract] **Objective:** To explore application feasibility of refractometry in purification technology of macroporous resin. **Method:** Taking extract of *Citrus aurantium* as research object, active ingredients in it was

[收稿日期] 20121027(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060339)

[第一作者] 曾文雪, 博士, 讲师, 从事中药新制剂新技术研究, Tel:0791-87119831, E-mail: zengwenxue@126.com

[通讯作者] * 王跃生, 研究员, 博士生导师, 从事中药质量控制及中药制药研究, E-mail: wylw915@126.com

[2] 国家药典委员会. 卫生部药品标准中药成方制剂. 第 1 册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 48.

[3] 刘琳娜, 张琰, 徐媛, 等. 正交试验法优选小柴胡汤滴丸制备工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (9): 44.

[4] 傅秋生, 许小红. HPLC 法测定三七总皂苷中 3 种皂苷的含量 [J]. 解放军药学报, 2009, 11(1): 84.

[5] 李晓宇, 郝海平, 王广基, 等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究 [J]. 中药天然药物, 2008, 6 (5): 377.

[6] 周郁斌, 袁中文, 李海刚, 等. 用 Origin 软件计算药物溶出度 Weibull 分布参数 [J]. 医药导报, 2011, 30 (6): 721.

[7] 钟玲, 臧志和. 三七皂苷微孔渗透泵控释片体外释放度研究 [J]. 中成药, 2007, 29(6): 824.

[8] 杨荣平, 杨明, 刘小斌. 中药固体制剂及其溶出度的研究概况 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2005, 7 (2): 45.

[责任编辑 仝燕]

refined by AB-8 macroporous resin, washed with water and 50% ethanol, interval sampled, refractive ratio of eluent was monitored on line and analyzed its regularity. At the same time, HPLC and UV spectrophotometric method was used to determine hesperidin as references, and to judge initiation point and terminal point during elution. **Result:** In purification process of active ingredients from *C. aurantium*, water elution terminal point 4 BV (refractive index 0) of which was the initiation point by 50% ethanol, 9 BV (refractive index 16) of 50% ethanol elution was the terminal point. **Conclusion:** Refractometry was accurate, reliable, convenient, quickly in purification technology of active ingredients of TCM, it had a strong practical significance.

[Key words] refractometry; active parts in *Citrus aurantium*; initiation point and terminal point of eluent; hesperidin

在大孔吸附树脂分离、纯化药材中有效成分的过程中,确定水洗变醇洗的转换点、接收洗脱液始点及接收洗脱液终点时,目前多根据色带原理用目测法或经验来判断,明显不科学、不严谨。同时,随树脂用量的不同及使用次数的增加,树脂吸附性能将发生改变,药物的吸附率和解吸率也会受到影响,故洗脱剂用量应根据不同情况而改变。在实际大生产过程中迫切需要一种即时、快速、准确、简便的检测方法,以提高分离、纯化效率。手持式折光仪^[1]以折光法为原理,利用药液中可溶性固形物含量与折光率在一定条件下(同一温度、压力)成正比,可通过测定药液的折光率,大致反映成分含量。枳实具有破气消化积、化痰散痞之功效^[2],临床用于治疗积滞内停,痞满胀痛,泻痢后重,大便不通,等症。本实验选取枳实有效成分的分离、纯化为研究对象,比较了折光法、UV及HPLC在精制枳实有效成分时判断洗脱始、终点的应用情况,得到的结果基本一致,说明折光法能快速、准确用于洗脱液始、终点的判断。

1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),WYT32型手持折光仪(上海精密仪器仪表有限公司),UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),带垂容色谱柱(2 cm×50 cm)。

枳实购于安徽省宣城市百草植物工贸有限公司,经江西中医学院龚千锋教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果。橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号0625-201003),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定原理及操作步骤 打开手持式折光仪盖板,用干净纱布或卷纸小心擦干棱镜玻璃面。在棱镜玻璃面上滴2滴水,盖上盖板。于水平状态,从接眼部处观察,检查视野中明暗交界线是否处在刻度

的零线上。若与零线不重合,则旋动刻度调节螺旋,使分界面刚好落在零线上。打开盖板,用纱布或卷纸将水擦干,按上法在棱镜玻璃面上滴2滴洗脱液,进行观测,读取视野中明暗交界线上的刻度,记录数值,将折光数值按下式进行放大。

$$\Phi = [\ln(X_i - A) + 10] \times 5 - C$$

式中 Φ 为放大值, X_i 为第*i*点的折光值, A 为该点的乙醇背景折光, C 为校正值(使折光曲线的基线回至零点)。描绘折光率变化曲线图,通过折光率变化,反映洗脱液成分的变化规律,从而判断洗脱始、终点。

2.2 乙醇溶液折光率的测定 分别配制体积分数为10%,15%,20%,35%,40%,45%,50%的乙醇溶液,采用手持式折光仪测定各体积分数乙醇的折光值,将折光值对乙醇体积分数进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.3246X + 0.1389$ ($r = 0.9994$),表明乙醇体积分数在10%~50%与折光值线性关系良好。

2.3 样品处理 称取枳实药材200 g,加8倍量水回流提取2次,每次1 h,合并提取液,浓缩至药材量4倍,加无水乙醇至乙醇体积分数为60%,静置过夜后滤过,滤液减压回收至无醇味,加水至800 mL。精密吸取2份,每份200 mL,分别过AB-8大孔吸附树脂柱(湿树脂40 mL,相当于28 g),用50%乙醇洗脱,每10 mL(即0.25 BV)收集1份,折光法在线检测结果见图1,2。

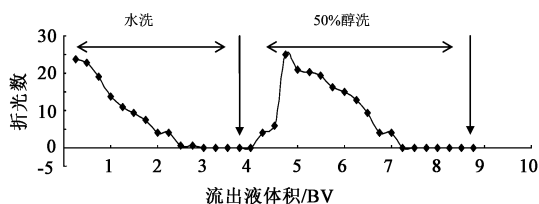


图1 枳实中有效成分洗脱液折光率变化趋势

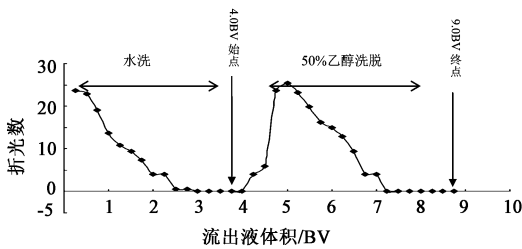


图 2 扣除乙醇背景枳实中有效成分洗脱液折光率变化趋势

由图 1,2 可知,当用水洗脱至 3 BV 时,折光率趋于 0,放大值也为 0;至 4 BV 时,折光率仍无变化,说明已水洗完全。改用 50% 乙醇洗脱后,折光率不再为 0,说明枳实有效成分洗脱开始,即为始点。当洗至第 8,9 BV 时,折光率不变化,说明洗脱已趋于结束,即为 50% 乙醇洗脱终点。

2.4 UV 检测黄酮类化合物^[3] 以橙皮苷为对照,于 280 nm 检测吸收度,计算黄酮类成分含量,描绘 UV 检测黄酮类含量变化趋势图(图 3)。结果表明枳实有效成分从水洗至 4 BV 时,含量趋向于 0,即水洗终点,同时为 50% 乙醇洗脱始点;至第 9 BV 时,含量趋向于 0,说明洗脱结束,即为 50% 乙醇洗脱终点。

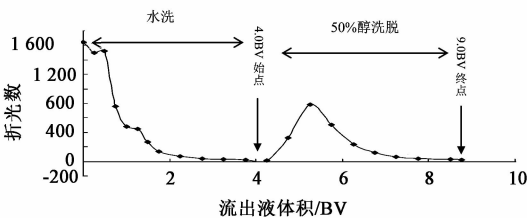


图 3 UV 检测枳实中黄酮类含量变化趋势

2.5 HPLC 检测橙皮苷含量^[4] 迪马 C₁₈ 色谱柱(柱号 8032165),流动相甲醇-1% 冰醋酸(34:66),检测波长 283 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。精密吸取样品液 4 mL,加水至 50 mL,作为提取液检测。50% 乙醇洗脱液每 1 BV 收集 1 份,加 50% 乙醇定容至 50 mL,滤过,检测。在第 5,6,7 BV 时,橙皮苷质量分别为 50.59,80.84,22.74 mg,洗脱液为第 4,8,9 BV 时,未检测到,见图 4。结果说明枳实有效成分从水

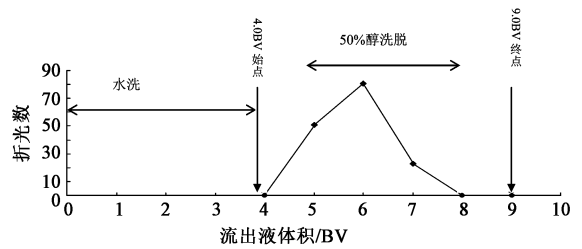


图 4 枳实过 AB-8 树脂 HPLC 检测橙皮苷含量变化

洗至 4 BV 开始解吸附,即为 50% 乙醇洗脱始点,至第 9 BV 则为 50% 乙醇洗脱终点。

枳实提取液过 AB-8 型树脂,采用水-50% 乙醇洗脱,以折光法检测,判断 4 BV 水即可将杂质基本洗脱完全,5 BV 50% 乙醇即可将有效成分基本洗脱完全;同时以 UV, HPLC 检测作参比,三者结果相近。说明折光法可作为快速判断枳实有效成分洗脱始终点的方法。

3 讨论

折光法检测可反映中药有效成分进行大孔树脂柱纯化工艺时,可根据洗脱液始、终点反映有效成分的整体变化规律,而 UV 检测只能反映一类成分的变化规律, HPLC 检测仅反映单个成分的变化规律,相对于后两者,折光法灵敏度虽不高,但更能反映有效成分的整体性。折光仪小巧轻便,具有快速、简便和廉价等优点,在制药工程中应用具有重大意义,可快速判断柱层析时洗脱液始终点,节约劳动成本,缩短时间,提高效率,同时可实现在线监测功能。

[参考文献]

- [1] 黄宏,蔡晓辉,汤腊梅.手持式智能折光仪设计[J].中国仪器仪表,2002,22(4):8.
- [2] 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,2010:230.
- [3] 贺丽娜,叶华,郭方道.橙皮苷分析方法研究[J].广州化工,2012,40(14):126.
- [4] 吕英超,李代晓,秦婷,等.高效液相色谱法测定新健胃片中橙皮苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):124.

[责任编辑 全燕]