

· 制剂与工艺 ·

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊醇提物大孔树脂纯化工艺优选

刘晓亚¹, 李志慧¹, 王巍², 刘倩², 谢飞², 曹艳玲³, 韦灵玉¹, 张园园¹, 包巨太², 张玉杰^{1*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 河北联合大学中医学院, 河北唐山 063000;
3. 哈尔滨商业大学中药学院, 哈尔滨 150028)

[摘要] 目的: 优选抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊醇提物大孔树脂纯化工艺。方法: 以总皂苷、总黄酮和总木脂素含量为指标, 考察树脂的吸附和解吸能力, 筛选大孔树脂型号, 采用单因素试验对最大上样量、上样流速、洗脱溶剂等进行考察。结果: 非极性 D101 型大孔树脂效果最佳, 优选的纯化工艺条件为醇提液生药质量浓度 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 药材-湿树脂量 1:4, 吸附流速 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 3 BV 水洗除杂, 4 BV 70% 乙醇洗脱。在此工艺条件下, 总皂苷、总黄酮和总木脂素纯度分别由 5.36%, 0.3%, 2.26% 提高到 53.82%, 3.01%, 22.87%。结论: D101 型大孔树脂纯化抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊醇提物, 方法简便可行, 纯化效果好, 可推广使用。

[关键词] 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊; 总皂苷; 总黄酮; 总木脂素; 大孔吸附树脂; 净化
[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0004-03

Optimization of Purification Technology for Alcohol Extract of K-CoxB-JN by Macroporous Resin

LIU Xiao-ya¹, LI Zhi-hui¹, WANG Wei², LIU Qian², XIE Fei², CAO Yan-ling³,
WEI Ling-yu¹, ZHANG Yuan-yuan¹, BAO Ju-tai², ZHANG Yu-jie^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China;
3. School of Chinese Materia Medica, Haerbin University of Commerce, Haerbin 150028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of total saponins, flavonoids and lignins from K-CoxB-JN by macroporous resin. **Method:** Taking the contents of total saponins, flavonoids and lignins as indexes, adsorption and desorption properties of 10 kinds macroporous resins were compared, based on these, maximum sample volume, sample flow rate and elution solvent were investigated by single-factor test. **Result:** D101 macroporous resin gave good static-dynamic and adsorption-desorption characteristics for all components, optimized purification technology was: crude drug concentration of alcohol extraction solution $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, herbs-wet resin 1:4, adsorption flow rate $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, washed with 3 BV distilled water, 4 BV of 70% ethanol as elution solvent. Under these conditions, purity of total saponins, total flavonoids and total lignins were enriched from 5.36%, 0.3%, 2.26% to 53.82%, 3.01%, 22.87%. **Conclusion:** This optimum purification technology of K-CoxB-JN was simple, stable and effective with good purification effect, it could be promoted in large-scale production.

[Key words] K-CoxB-JN; total saponins; total flavonoids; total lignins; macroporous resin; purification

[收稿日期] 20111229(008)

[基金项目] 国家重大新药创制科技重大专项课题(2009ZX09103-442)

[第一作者] 刘晓亚, 在读硕士, 从事质量控制研究, Tel: 010-84738618, E-mail: xiaoyaliu01@sina.com

[通讯作者] * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价研究, Tel: 010-84738618, E-mail: zhyj227@126.com

抗柯萨奇B病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)为临床经验方,由西洋参、麦冬、五味子、黄芪等7味中药组成,具有益气养阴、补益心气、增加机体免疫功能等作用,对于治疗由柯萨奇B病毒感染而导致的心肌炎疗效稳定确切^[1],同时具有明显镇痛和抗应激作用^[2]。本课题组前期以总皂苷、总黄酮和总木脂素含量为指标,采用正交试验对全方药物的醇提工艺进行了优选,结果醇提物出膏量高达27%,为后期制剂成型带来一定困难。大孔树脂作为一种简便、实用的分离纯化材料,目前已被广泛用于药物的纯化。故本试验以总皂苷、总黄酮和总木脂素含量为测定指标,对10种大孔树脂进行筛选,同时对醇提物大孔吸附树脂纯化工艺进行优选。

1 材料

TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),BS 110S型1/万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DZ-1BC型真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),人参皂苷Re、芦丁、五味子酯甲对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为110754-200822,0081-200304,111529-200503),大孔吸附树脂(天津欧瑞生物科技有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大孔吸附树脂预处理^[3] 以95%乙醇溶液浸泡树脂2h,充分溶胀后以湿法装柱,继而用95%乙

醇冲洗,不时检测流出液,当流出的乙醇液与水混合不呈白色混浊时,用大量水洗至无醇味,备用。

2.2 上柱样品液的制备^[4] 按处方比例称取各药材,共72g,加10倍量70%乙醇回流提取2次,每次1.5h,滤过,合并乙醇提取液,减压回收乙醇并调至生药质量浓度0.5g·mL⁻¹,即得。

2.3 总皂苷、总黄酮和总木脂素的含量测定 总皂苷、总黄酮和总木脂素含量测定分别参照文献[4-6]方法进行。

2.4 大孔树脂类型的选择 准确称取经过预处理的湿树脂2.0g,装入50mL具塞磨口三角瓶中,加入质量浓度0.2g·mL⁻¹的提取液20mL,30℃恒温振荡4h(75r·min⁻¹),充分吸附,过滤,测定滤液(吸附液)中剩余的总皂苷、总黄酮和总木脂素含量,依次按式(1),(2)计算吸附量和吸附率,以筛选最佳大孔树脂类型。

$$\text{吸附量} = \frac{(C_0 - C_1) \cdot V_0}{M} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{吸附率} = \frac{(C_0 - C_1)}{C_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中C₀为吸附前粗提液中总皂苷、总黄酮和总木脂素质量浓度;C₁为吸附后滤液中剩余总皂苷、总黄酮和总木脂素质量浓度;C₂为解吸液中总皂苷、总黄酮和总木脂素质量浓度;V₀为溶液体积;M为湿树脂质量,结果见表1。

表1 K-CoxB-JN醇提物纯化工艺树脂类型筛选

| 型号 | 性能 | 总皂苷 | | 总黄酮 | | 总木脂素 | |
|----------|-----|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | | 吸附量 /mg·g ⁻¹ | 吸附率 /% | 吸附量 /mg·g ⁻¹ | 吸附率 /% | 吸附量 /mg·g ⁻¹ | 吸附率 /% |
| DA201-C | 弱极性 | 22.68 | 61.35 | 1.00 | 42.97 | 9.20 | 54.60 |
| D101 | 非极性 | 28.52 | 77.13 | 1.17 | 50.09 | 11.32 | 67.12 |
| AB-8 | 弱极性 | 27.92 | 75.50 | 1.32 | 56.43 | 7.91 | 46.92 |
| XAD-7HP | 非极性 | 25.81 | 69.78 | 0.76 | 32.67 | 12.04 | 71.42 |
| XAD-1600 | 非极性 | 28.02 | 75.77 | 1.15 | 49.30 | 11.28 | 66.70 |
| NKA-9 | 极性 | 22.89 | 61.89 | 1.26 | 54.05 | 10.47 | 62.09 |
| D4020 | 非极性 | 26.41 | 71.42 | 1.61 | 69.11 | 10.94 | 64.86 |
| X-5 | 非极性 | 26.51 | 71.69 | 0.76 | 32.67 | 8.61 | 51.07 |
| D3520 | 非极性 | 16.34 | 44.20 | 1.04 | 44.55 | 6.84 | 40.55 |
| S-8 | 极性 | 29.13 | 78.77 | 1.21 | 51.68 | 8.91 | 52.84 |

由表1结果可知,D101型大孔树脂对总皂苷、总黄酮及总木脂素的吸附效果总体最好,故确定采用D101型大孔树脂,并对其纯化工艺进行优选。

2.5 上样量的确定 准确称取2.5,5.0,10,15,20,

25g已处理好D101大孔树脂,分别湿法装柱,精密吸取10mL质量浓度0.5g·mL⁻¹的上柱液,流速2BV·h⁻¹,收集流出液,测定总皂苷、总黄酮和总木脂素质量浓度,计算吸附量和吸附率,结果见表2。

表 2 药材-树脂比对 K-CoxB-JN 醇提物中总皂苷和总黄酮吸附率的影响

| 药材质量: | 总皂苷 | | 总黄酮 | | 总木脂素 | |
|--------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | 吸附量 /mg | 吸附率 /% | 吸附量 /mg | 吸附率 /% | 吸附量 /mg | 吸附率 /% |
| 1: 0.5 | 208.61 | 72.84 | 7.61 | 55.78 | 83.12 | 60.74 |
| 1: 1 | 225.05 | 78.58 | 8.78 | 64.30 | 86.87 | 63.48 |
| 1: 2 | 235.88 | 82.36 | 9.30 | 68.12 | 91.99 | 67.23 |
| 1: 3 | 251.29 | 87.74 | 9.95 | 72.90 | 98.50 | 71.98 |
| 1: 4 | 254.49 | 88.86 | 10.05 | 73.64 | 99.25 | 72.53 |
| 1: 5 | 254.78 | 88.96 | 10.27 | 75.22 | 99.36 | 72.61 |

由表 2 可知,当药材与湿树脂质量比 1:3 ~ 1:4 时,提取物中总皂苷和总木脂素吸附几乎达到饱和,总黄酮饱和程度稍差,由于总黄酮含量与总皂苷及总木脂素含量相比所占比例较少,故确定药材量-湿树脂量 1:4。以下考察中仅选总皂苷和总木脂素作为考察指标。

2.6 上样流速的确定 吸取样品液 10 mL 上柱,树脂量 20 g,分别以 1,2,3 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂柱,树脂柱用 3 BV 水洗脱至无色,洗脱液不显 Molish 反应。继以 4 BV 70% 乙醇解吸,收集乙醇解吸液,按含量测定方法分别测定总皂苷和总木脂素含量,结果总皂苷解吸率依次为 95.14%,95.79%,93.02%;总木脂素解吸率分别为 72.63%,72.79%,71.81%。故选择吸附流速 2 BV·h⁻¹。

$$\text{解吸率} = \frac{C_2 \times V_1}{M \times \text{吸附量}} \times 100\%$$

式中 C₂ 为解吸液中总皂苷或总木脂素浓度;V₁ 为解吸液体积;M 为湿树脂质量。

2.7 树脂洗脱条件的选择

2.7.1 水洗量的确定 取 D101 型大孔树脂 20 g,吸取 0.5 g·mL⁻¹ 样品液 10 mL 上柱,用水以 1.0 mL·min⁻¹ 速度洗脱,收集洗脱液,每 1 BV 收集 1 份,以 Molish 反应检测水洗脱液的糖类化合物。结果水洗脱用量为 3 BV 时已无糖类阳性反应,故确定水洗量 3 BV。

2.7.2 乙醇体积分数考察 上述用水洗脱的树脂柱,分别用体积分数为 30%,50%,70%,90% 的乙醇 4 BV 解吸,测定解吸液中总皂苷和总木脂素的含量,结果总皂苷解吸率分别为 27.82%,50%,15.55%,6.63%;总木脂素依次为 32.07%,42.34%,17.63%,7.96%。故确定用 70% 乙醇作

为洗脱剂进行洗脱。

2.7.3 乙醇用量考察 取 D101 型大孔树脂 20 g,吸取 0.5 g·mL⁻¹ 样品液 10 mL 上柱,用 3 BV 水洗,用 70% 乙醇洗脱,每 1 BV 收集 1 份洗脱液,测定解吸液中总皂苷和总木脂素的含量,结果乙醇用量为 2,4 BV 时总皂苷洗脱率分别为 6.53%,93.46%;总木脂素分别为 7.26%,92.74%。故确定洗脱体积为 4 BV。

用 D101 大孔树脂按优选工艺对 K-CoxB-JN 醇提物进行纯化,依照含量测定方法分别测定纯化前后总皂苷、总黄酮、总木脂素的纯度分别由 5.36%,0.3%,2.26% 提高到 53.82%,3.01%,22.87%。说明该纯化效果较好,同时该优选工艺稳定可行。

3 讨论

由于总皂苷、总黄酮和总木脂素的化学性质存在一定差别,采用 1 种规格的大孔树脂进行净化处理存在一定困难。由试验结果可知,各类型树脂对皂苷类成分吸附的差别不甚明显;黄酮类在非极性树脂 D4020 有较好的吸附。由于本处方中皂苷类成分占的含量较少,综合考虑树脂成本等因素,最终确定采用 D101 型树脂。试验结果表明,采用 D101 型树脂纯化 K-CoxB-JN 醇提物,与纯化前相比,含量成分的含量大幅提高,说明该方法可行,纯化效果好。

[参考文献]

- [1] 邢纪萍,包巨太,李志田,等. 抗柯萨奇 B 中药胶囊治疗病毒性心肌炎的临床疗效评价[J]. 中国临床药理学与治疗学,2003,8(6):701.
- [2] 张博男,韩淑英,李洁,等. 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方水提物的镇痛和抗应激作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):133.
- [3] 孙亮,汪涛,鹤鸣. 1300 大孔吸附树脂分离通窍鼻炎片中总黄酮总皂苷的工艺研究[J]. 药学实践杂志,2007,25(4):215.
- [4] 沈蒙,刘起华,康玉玲,等. 益髓生血颗粒质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):47.
- [5] 高丽萍,刘华,封云芳. 人参总皂苷含量测定[J]. 浙江工程学院学报,2002,19(3):171.
- [6] 田圣志,杨玉涛,张振凌,等. 黄芪药材主、侧根中黄酮类成分含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):92.
- [7] 刘旭,林森,赵余庆. 北五味子不同部位总木脂素的含量测定[J]. 中国现代中药,2009,11(5):39.

[责任编辑 全燕]