

# 丹葛滴丸大孔树脂精制工艺

郑雅楠<sup>1\*</sup>, 吕沅珊<sup>2</sup>, 任涛<sup>1</sup>

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

**[摘要]** 目的: 对大孔树脂富集纯化丹葛滴丸的工艺条件及参数进行优化。方法: 以丹酚酸 B、葛根素含量为指标, 考察大孔树脂对其的吸附性能和洗脱参数。结果: 最终确定纯化工艺为采用 AB-8 型大孔树脂, 树脂用量为药材 2 倍, 树脂径高比 1:6, 流速 1 BV·h<sup>-1</sup> 上样, 5 BV pH 4 盐酸水溶液洗脱弃去, 3 BV 50% 乙醇洗脱收集。结论: 用大孔树脂对丹葛滴丸进行精制, 工艺简单可行, 分离效果好, 减少了纯化固形物的量, 从而降低服用量。

**[关键词]** 丹葛滴丸; 丹酚酸 B; 葛根素; 大孔树脂

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0017-04

## Refining Technology of Dange Dropping Pills with Macroporous Resin

ZHENG Ya-nan<sup>1\*</sup>, LV Yuan-shan<sup>2</sup>, REN Tao<sup>1</sup>

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

2. Institute of Acute Abdominal Diseases by Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Research, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize purification technical conditions and parameters of Dange dropping pills by macroporous resin. **Method:** Investigated adsorption property and elution parameters of macroporous resins by using the content of salvianolic acid B and puerarin as indexes. **Result:** Finally, purification technology was determined as follows: AB-8 was optimal resin type. Capacity of AB-8 macroporous adsorptive resin was as much as 2 times to sample load ( $\varphi:h = 1:6$ ), flow rate of sample was 1 BV·h<sup>-1</sup>, 5 BV amount of distilled hydrochloric acid solution (pH 4) used for eluting, and 3 BV amount of 50% ethanol as desorption solvent. **Conclusion:** Optimum refining process of Dange dropping pills by macroporous adsorption resin was simple and feasible with good effect of separation. It could decrease the yield of extract, and dose of drug was decreased.

**[Key words]** Dange dropping pills; salvianolic acid B; puerarin; macroporous resins

丹葛滴丸由传统中药丹参、葛根组成, 主治缺血性脑血管疾病。葛根治疗心脑血管疾病的有效成分为葛根素<sup>[1]</sup>, 丹参治疗心脑血管疾病的有效成分为丹酚酸 B<sup>[2]</sup>。近年来用大孔吸附树脂分别精制丹参和葛根的报道很多<sup>[3]</sup>, 因此确定采用大孔吸附树脂富集中药复方丹葛滴丸中丹参、葛根的药效成分, 并以丹酚酸 B 和葛根素双指标进行质量控制, 确定该中药复

方的最佳树脂吸附洗脱工艺。

### 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (G1310A 四元液相梯度泵, G1314A VWD 检测器, N2000 色谱工作站), BP211D 型电子天平 (美国 Sartorius), AB204-N 型电子分析天平 (Mettler-Toledo), GB/20-002 型真空干燥箱 (重庆试验设备厂)。

丹参提取液、葛根提取液、丹葛提取液 (自制, 0.5 g·mL<sup>-1</sup>), 丹酚酸 B、葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110766-200619, 110752-200912)。AB-8, NKA-9 型大孔树脂 (天津南开大学), D101 型大孔树脂 (天津海光化工有限公司),

**[收稿日期]** 20110706(003)

**[通讯作者]** \* 郑雅楠, 硕士, 助理研究员, 从事中药质量标准、制剂技术研究和中药新药的开发研究, Tel: 022-23006323, E-mail: zhengyn@tjipr.com

甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 丹参含量测定

**2.1.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-乙腈-甲酸-水-(30:10:1:59), 检测波长 286 nm。理论板数按丹酚酸 B 计算不低于 2 000。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 取丹酚酸 B 对照品适量, 精密称定, 加 75% 甲醇制成 0.162 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。精确吸取上述溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加 75% 乙醇至刻度, 摇匀, 吸取不同质量浓度的对照品溶液 10 μL 进样, 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程为  $Y = 517\ 689 X - 2\ 434.2$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 线性范围为 0.032 4 ~ 0.648 μg。

**2.1.3 样品测定** 吸取样品提取液 1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 75% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

### 2.2 葛根含量测定

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 以甲醇-水-冰乙酸(25:75:1) 为流动相, 检测波长 250 nm。理论板数按葛根素计算不低于 4 000。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 称取葛根素标准品适量, 精密称定, 加 30% 乙醇制成 0.039 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。精确吸取上述溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加 30% 乙醇至刻度, 摇匀, 吸取不同质量浓度的对照品溶液 10 μL 进样, 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程  $Y = 3.0 \times 10^6 X + 4.5 \times 10^3$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 线性范围为 7.8 ~ 156.0 ng。

**2.2.3 样品测定** 吸取样品提取液 1 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 树脂类型的选择** 用于丹酚酸 B 和葛根素富集的树脂以 AB-8 型<sup>[4-5]</sup> 和 D101<sup>[6-7]</sup> 型较多, NKA-9 型树脂也是较为常用的树脂。本文选择以上 3 种类型树脂, 对丹参、葛根单独吸附和合并吸附进行静态吸附研究。

**2.3.1 大孔树脂预处理<sup>[7]</sup>** 将 AB-8, D101, NKA-9 型大孔树脂用 95% 的乙醇浸泡 3 d, 使其充分膨胀, 湿法装柱, 然后以 95% 的乙醇洗涤, 直至流出液加

适量水后无白色浑浊现象, 再以蒸馏水洗尽乙醇, 直至流出液无乙醇为止。

**2.3.2 丹参单独静态吸附、解析考察** 取丹参提取液加入 AB-8, D101, NKA-9 型树脂 10 mL, 放置 24 h, 使其充分吸附, 测定吸附前后药液中丹酚酸 B 的含量, 计算 3 种树脂丹酚酸 B 吸附率分别为 78.27%, 73.18%, 55.59%; 将静态吸附的树脂过滤抽干, 加 30 mL 70% 乙醇解析, 每 5 min 振摇 1 次, 使其充分解析, 2 h 后分别取各解析液, 测定解析前后药液中丹酚酸 B 的含量, 计算各种树脂丹酚酸 B 解析率分别为 65.91%, 62.11%, 38.37%。结果显示, 不同树脂对丹酚酸 B 的静态吸附率 AB-8 > D101 > NKA-9, 解析率 AB-8 > D101 > NKA-9。

**2.3.3 葛根单独静态吸附、解析考察** 按 2.3.2 方法取葛根提取液加入 AB-8, D101, NKA-9 型树脂中, 计算各种树脂葛根素吸附率分别为 72.57%, 69.25%, 38.37%; 解析率分别为 66.81%, 59.53%, 30.51%。结果显示, 不同树脂对葛根素的静态吸附率 AB-8 > D101 > NKA-9, 解析率 AB-8 > D101 > NKA-9。

**2.3.4 提取液合并静态吸附、解析考察** 按 2.3.2 方法取葛根提取液加入 AB-8, D101, NKA-9 型树脂中, 计算各种树脂丹酚酸 B 的吸附率分别为 65.51%, 40.39%, 24.62%, 解析率分别为 57.81%, 36.18%, 16.02%; 葛根素的吸附率分别为 61.71%, 57.31%, 27.61%, 解析率分别为 56.41%, 34.01%, 14.84%。结果显示, 不同型号树脂对丹葛提取液丹酚酸 B、葛根素的静态吸附率 AB-8 > D101 > NKA-9, 解析率 AB-8 > D101 > NKA-9。最终选择用 AB-8 型树脂, 并可以中药复方提取液合并上柱。

### 2.4 动态吸附影响因素考察

**2.4.1 泄漏曲线的考察** 取丹葛提取液通过装有 AB-8 型树脂柱的色谱柱, 流速 1 BV·h<sup>-1</sup>, 分段收集流出液, 每 50 mL 收集 1 份, 分别测定各份流出液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 根据测定结果, 流量为横坐标, 泄漏量为纵坐标, 绘制泄漏曲线。结果见图 1, 2。

当上样液流出至 200 mL 时, 丹酚酸 B 和葛根素的泄漏量均显著增大, 说明树脂柱开始不能完全吸附药液中的丹酚酸 B 和葛根素, 故确定最大上样量为树脂比生药为 1:1。

**2.4.2 树脂用量考察** 取丹葛提取液通过 3 根 AB-8 型树脂柱, 树脂体积与生药用量比分别为 1:1,

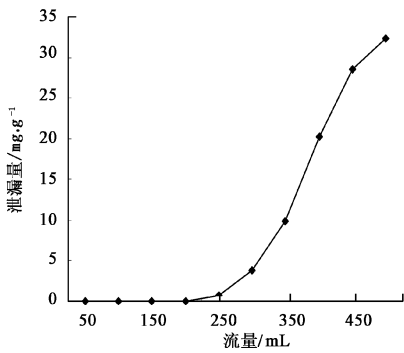


图1 丹酚酸 B 泄漏曲线

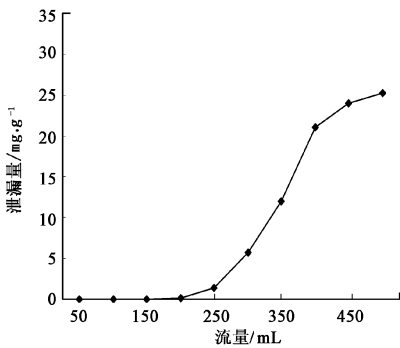


图2 葛根素泄漏曲线

1:0.75, 1:0.5, 流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 以 70% 乙醇 5 BV 洗脱, 分别测定洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 计算丹酚酸 B 转移率分别为 71.28%, 85.91%, 95.50%; 葛根素转移率依次为 68.51%, 82.73%, 92.89%。结果表明树脂用量当树脂体积:生药量为 1:0.5 时, 丹酚酸 B 和葛根素的转移率最高, 均可达 90% 以上, 因此确定树脂用量为生药量 2 倍。

**2.4.3 药液 pH 值对吸附的影响** 丹葛提取液以稀盐酸调节药液 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0(原液), 分别上 AB-8 树脂柱, 以 70% 乙醇 5 BV 洗脱, 分别测定洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 计算丹酚酸 B 洗脱转移率分别为 92.10%, 91.35%, 92.66%, 93.38%; 葛根素转移率依次为 91.59%, 92.70%, 91.52%, 92.41%。结果表明上样液调节不同 pH, 丹酚酸 B、葛根素转移率没有明显差异, 均可达到 90% 以上, 因此药液可以不调节 pH 直接上样。

**2.4.4 洗脱液 pH 对吸附的影响** 取丹葛提取液上 AB-8 树脂柱, 分别以 5 BV 蒸馏水、pH 3 盐酸水溶液、pH 4 盐酸水溶液、pH 5 盐酸水溶液洗脱后, 再以 70% 乙醇 5 BV 洗脱, 分别测定各洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 测定丹酚酸 B 洗脱转移率分别为 75.73%, 89.15%, 93.81%, 92.75%; 葛根素洗脱转移率分别为 95.52%, 97.68%, 97.97%, 96.94%。由结

果可知不同 pH 水洗脱对葛根素的转移率没有显著影响, 但对丹酚酸 B 的转移率影响较大, 用 pH 4 盐酸水溶液洗脱丹酚酸 B 的损失最小。

**2.4.5 酸水洗脱用量的考察** 取丹葛提取液上 AB-8 柱, 流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 以 pH 4 的盐酸水溶液洗脱, 再以 70% 乙醇 5 BV 洗脱, 分段收集流出液, 每 BV 收集 1 份, 分别测定各份酸水洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 计算水液洗脱损失率, 同时取洗脱液蒸干, 测定干膏重, 计算出膏率。结果见表 1。

表 1 酸水洗脱用量考察

BV	丹酚酸 B 水洗脱损失率	葛根素 水洗脱损失率	干膏率
1	0.58	0.60	5.19
2	0.89	0.64	3.73
3	1.03	1.00	1.17
4	1.16	1.01	0.53
5	1.69	1.49	0.29
6~7	7.02	5.79	0.21

结果显示 pH 4 盐酸水溶液洗脱 5 BV 时, 杂质已基本除去, 同时从第 6 份柱体积开始丹酚酸 B、葛根素均出现明显泄漏, 因此确定药液上样后以 5 BV pH 4 盐酸水溶液洗涤树脂柱除杂。

**2.4.6 洗脱液浓度及用量考察** 取丹葛提取液上 AB-8 柱, 流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 以 5 BV pH4 盐酸水溶液洗脱后, 分别用 30% 乙醇, 50% 乙醇, 70% 乙醇洗脱, 分段收集乙醇流出液, 每 BV 收集 1 份, 分别测定流出液中丹酚酸 B 和葛根素的含量, 计算洗脱转移率。结果见图 3, 4。

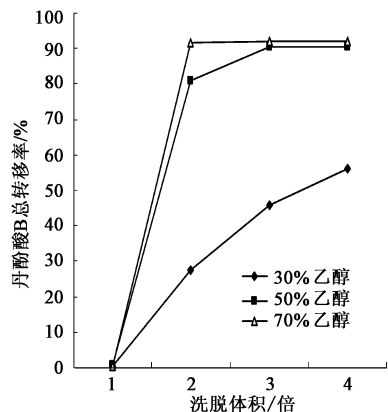


图3 不同体积分数乙醇洗脱丹酚酸 B 曲线

结果表明不同体积分数的乙醇对葛根素洗脱的影响较小, 30% 乙醇, 50% 乙醇, 70% 乙醇均可很快将葛根素洗脱下来; 不同体积分数乙醇对丹酚酸 B 洗脱的影响较大, 其中 50% 乙醇和 70% 乙醇以 3BV

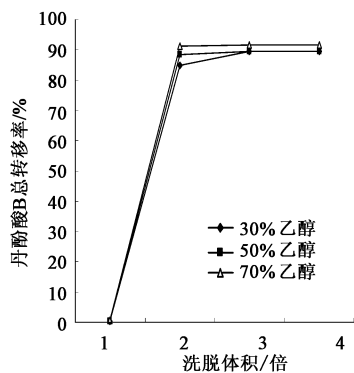


图 4 不同体积分数乙醇洗脱葛根素曲线

乙醇即可将丹酚酸 B 洗脱完全,因此确定以 3BV 50% 乙醇洗脱树脂柱。

#### 2.4.7 大孔吸附树脂使用次数及再生考察

**2.4.7.1 大孔吸附树脂使用次数考察** 取丹葛提取液,上样 AB-8 大孔树脂柱,流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,先以 5 BV pH4 盐酸水溶液洗脱,再以 3 BV 50% 乙醇洗脱,以蒸馏水洗至无醇后,重复上样吸附洗脱,连续反复制备样品,比较各批醇洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的转移率,考察大孔吸附树脂的使用次数。结果见表 2。

表 2 大孔树脂重复使用次数考察 %

次数	丹酚酸 B 转移率	葛根素转移率
1	92.74	94.95
2	93.81	92.48
3	92.66	93.84
4	93.34	93.30
5	94.51	91.18
6	88.07	90.31
7	75.59	81.83
8	61.74	73.19

结果表明大孔吸附树脂可以连续重复使用 5 次,丹酚酸 B 和葛根素转移率均可达到 90% 以上。

**2.4.7.2 树脂再生后的吸附考察** 将 2.4.7.1 项所述使用大孔树脂进行酸碱再生<sup>[8]</sup>。取丹葛提取液,上样再生处理后的 AB-8 大孔树脂柱,按照确定工艺,连续反复制备样品,比较各份洗脱液中丹酚酸 B 和葛根素的转移率。结果见表 3。

结果表明,经酸碱再生处理过的树脂,与新树脂吸附能力差异不大,该再生方法简便可行,再生后大孔树脂可反复使用。

表 3 AB-8 大孔树脂再生吸附考察 %

次数	丹酚酸 B 转移率	葛根素转移率
1	92.18	93.31
2	93.86	92.73
3	92.55	94.38
4	94.72	92.30
5	93.83	93.83

### 3 讨论

大孔树脂富集有效成分研究中,以单味中药研究为主,本试验中选用大孔树脂对中药复方丹葛滴丸的有效成分进行纯化富集,并且同时以丹参中的丹酚酸 B 和葛根中的葛根素转移率为考察指标,双指标综合评价减少有效成分丢失,对丹葛滴丸精制过程中的各影响因素进行考察。

通过试验筛选了不同类型大孔树脂对丹参、葛根单独与合并静态吸附与解析效果,研究结果表明 AB-8 大孔树脂对丹酚酸 B、葛根素吸附效果较好,并且可以合并富集丹葛滴丸提取液药效成分。

确定中药复方丹葛滴丸大孔树脂富集工艺确定为丹葛提取液提取液,上 AB-8 型树脂柱(树脂比生药 1:1),流速  $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ ,先以 5 BV pH 4 的盐酸水溶液洗脱弃去,再 3 BV 50% 乙醇洗脱收集。

### [参考文献]

- [1] 王苏静,赵新杰. 葛根素的药理作用研究进展[J]. 内蒙古中医药,2010,29(2):107.
- [2] 汪芸. 丹酚酸 B 对心脑血管疾病药理作用的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2010,35(19):4634.
- [3] 刘鄂湖,鄢丹,蔡光明,等. 大孔吸附树脂技术在中药中应用现存问题分析与探讨[J]. 中草药,2007,38(5):附 3.
- [4] 高声传,张怀,马宏达. 丹参中丹酚酸 B 纯化工艺研究[J]. 解放军药学报,2008,24(4):307.
- [5] 李键. 葛根总黄酮的研究进展[J]. 安徽医药,2008,12(12):1117.
- [6] 叶勇,施敏荣. D101 大孔树脂对丹酚酸 B 分离工艺的优化[J]. 中国药学杂志,2006,41(20):1557.
- [7] 赵映淑,董志,朱毅,等. 大孔吸附树脂纯化水黄皮根总黄酮的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):154.
- [8] 龚又明,高妮. 大孔树脂法纯化牛蒡子中有效部位的工艺[J]. 复旦学报:医学版,2010,37(4):487.

[责任编辑 仝燕]