

## 二仙汤有效部位群大孔树脂纯化工艺

赵法兴<sup>1</sup>, 张亚梅<sup>1</sup>, 郝岗平<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000; 2. 泰山医学院基础医学院, 山东 泰安 271000)

**[摘要]** 目的: 研究大孔树脂纯化二仙汤有效部位群的最佳条件。方法: 以复方二仙汤中总黄酮、总生物碱、总皂苷为指标, 以动态法考察 D101, DM130, HPD100, HPD400 4 种树脂对各指标的吸附和解析性能, 优选出适宜的树脂, 并进一步优化其吸附与解析条件。结果: D101 型树脂较适宜纯化复方二仙汤有效部位群, 最佳条件为二仙汤调药液比 1:1.5, 加 NaCl 调至 1.5 mol·L<sup>-1</sup>, 以 2.5 BV 上样, 6 BV 水洗至近无色, 再用 5 BV 的 50% 乙醇洗脱, 得有效部位群。结论: D101 型树脂纯化复方二仙汤有效部位群工艺简单可行。

**[关键词]** 二仙汤有效部位群; 大孔树脂; 吸附分离

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0023-04

## Study on Adsorption and Separation of Active Ingredients in Er-xian Decotion with Macroporous Resin

ZHAO Fa-xing<sup>1</sup>, ZHANG Ya-mei<sup>1</sup>, HAO Gang-ping<sup>2\*</sup>

(1. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China;  
2. Taishan Medical University, Taian 271000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the purification condition of active ingredients in Er-xian decoction with macroporous resin. **Method:** With the total flavonoids, total alkaloids and total saponins in Er-xian decoction as parameters, the D101, DM130, HPD100, HPD400 resins were inspected by dynamic method for the adsorption and desorption performance to screen the best resin and optimize the condition of absorption and desorption for the resin. **Result:** The D101 resin was suitable to purify the active ingredients in Er-xian decoction. The optimized condition is that: The ratio of medicine to solution is 1:1.5, NaCl concentration is 1.5 mol·L<sup>-1</sup>, loading 2.5 BV medicine to D101 resin column, eluting to colourless with 6 BV water, and finally, the active ingredients were eluted by 50% ethanol (5 BV). **Conclusion:** The active ingredients in Er-xian decoction can be purified simply and practically by D101 resin.

**[Key words]** active ingredients in Er-xian decoction; macroporous resin; adsorption and separation

二仙汤是张伯讷教授 20 世纪 50 年代创制的著名方剂, 用于更年期综合症、更年期高血压等, 临床疗效确切<sup>[1]</sup>, 全方由淫羊藿、黄柏、知母、巴戟天等 6 味药组成, 主要含有总黄酮、总皂苷、总生物碱等有效成分<sup>[2]</sup>。近年来研究表明, 同一树脂可用于纯化

复方中不同有效部位<sup>[3]</sup>。用大孔树脂吸附二仙汤有效部位群鲜见报道<sup>[4]</sup>, 本文用大孔树脂对二仙汤有效部位群纯化工艺做了深入研究, 为工业化生产提供了科学依据。

### 1 材料

**1.1 仪器与试剂** 岛津 UV-2550 型紫外分光光度计 (Japan), RE-52 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。D101, DM130 (上海摩速科学器材有限公司), HPD100, HPD400 型树脂 (沧州宝恩化工有限公司)。香兰素-冰醋酸、高氯酸、95% 乙醇等试剂均

**[收稿日期]** 20110313(003)

**[基金项目]** 江西省教育厅青年基金 (GJJ10279)

**[第一作者]** 赵法兴, 从事中药化学的教学科研

**[通讯作者]** \* 郝岗平, 从事中药生物技术研究, E-mail: haogangping@163.com

为分析纯。

**1.2 药材** 二仙汤 6 味药材均为市售,经珠海市药品检验所周晓东教授鉴定,均符合《中国药典》(2005 年版)规定;对照品小檗碱(批号 110742-200507)、淫羊藿苷(批号 110743-200511)、菝葜皂苷元(批号 110744-200509)均购自中国药品生物制品检定所。

## 2 方法与结果

**2.1 含量测定** 总黄酮的测定以淫羊藿苷为对照品,三氯化铝络合显色<sup>[5]</sup>,于波长 413 nm 测定,线性方程  $A = 0.01723C - 0.00730$  ( $r = 0.9994$ );总生物碱的测定按酸性染料显色法<sup>[6]</sup>,小檗碱为对照品,溴甲酚绿显色,420 nm 处测定,回归方程  $A = 0.04259C + 0.06354$  ( $r = 0.9998$ );总皂苷的测定以菝葜皂苷元为对照品,香兰素-冰醋酸和高氯酸显色,600 nm 处测定,回归方程  $A = 0.02046C - 0.02086$  ( $r = 0.9996$ )。

**2.2 二仙汤供试液制备** 二仙汤诸药粉碎成最粗粉,10 倍量 60% 的乙醇回流提取 3 次,每次 1 h(每克生药提取液中含总黄酮 14.90 mg、生物碱 2.29 mg、总皂苷 16.59 mg)<sup>[7]</sup>,合并提取液,减压浓缩,醇沉过夜,离心抽滤除杂,浓缩至药液比 1:1,稀释至不同浓度(药液比 1:1.5,1:2,1:2.5,1:3)备用。

**2.3 大孔树脂动态吸附解析筛选**<sup>[8]</sup> 预处理的 D101,DM130,HPD100,HPD400 树脂分别装柱 30 mL(对应干树脂重 D101 6.38 g,DM130 5.95 g,

HPD100 6.64 g,HPD400 6.11 g,树脂柱规格均为 2.0 cm × 30 cm)。取二仙汤药液 70 mL 上柱(药液过量,药液比 1:1.5,上样量总黄酮 693.70 mg、总生物碱 106.61 mg、总皂苷 773.50 mg),预吸附 1 h,过柱流出液重吸附 1 次,后用足量的水洗脱除杂,计算比吸附量  $A = (M_{上} - M_{残} - M_{水}) / M$  ( $M_{上}, M_{残}, M_{水}$  分别为指标成分上样的量、过柱后剩余的量、水洗脱的量,  $M$  表示干树脂的量),再用足量梯度乙醇(30%, 50%, 70%, 95%)依次洗脱。计算各段比脱量  $E = M_{洗脱} / M$ ,并得出解析率。

**2.4 树脂上柱条件优化** 考察药液质量浓度、NaCl 浓度及不同 pH 条件下,最优树脂对有效部位的吸附承载能力,用比上柱量  $S$  表示,  $S = (M_{上} - M_{残}) / M$ ,得出使有效部位吸附量最大的上样条件。

**2.5 树脂上柱量计算及解析条件** 按最优条件上样,计算各指标对应的上柱量,取最小的上柱量上样,以保证有效部位不被泄露;上样后,通过比较得出洗脱大孔树脂适宜的醇浓度及醇用量。

**2.6 各树脂对各成分动态吸附解析效果** 树脂的吸附能力以比吸附量  $A$  为参考,洗脱能力以 30% 和 50% 乙醇段解析率之和为参考(各成分大部分在 30%, 50% 乙醇段被洗脱)。由表 1 可知,HPD400, D101 型对总黄酮比吸附量都较大,解析率 D101 型最高。D101 型较适合总黄酮的富集纯化;总生物碱含量较低,结果显示,4 种树脂吸附解析性能差别不大,均有良好的吸附效果,解析能力偏低, D101 和

表 1 各树脂对各有效成分动态吸附及解析

指标	树脂型号	$M_{上}/\text{mg}$	$M_{残}/\text{mg}$	$M_{水}/\text{mg}$	比吸附量 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	不同体积分数乙醇液比洗脱率/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$				解析率/%	
						30%	50%	70%	95%	1 <sup>1)</sup>	2 <sup>2)</sup>
总黄酮	D101	693.70	50.97	35.19	95.22	54.26	22.31	6.03	5.69	80	93
	DM130	693.70	106.95	50.25	90.16	34.24	13.39	2.52	6.38	53	63
	HPD100	693.70	87.9	77.70	79.54	35.76	15.70	3.32	9.15	65	80
	HPD400	693.70	66.00	45.90	95.22	39.82	13.75	3.51	10.1	56	71
总生物碱	D101	106.61	6.33	-	15.72	8.34	3.50	-	-	75	75
	DM130	106.61	12.24	-	15.86	7.76	1.26	-	-	57	57
	HPD100	106.61	10.21	-	14.52	7.87	2.43	-	-	71	71
	HPD400	106.61	5.55	-	16.54	9.87	1.74	-	-	70	70
总皂苷	D101	773.50	217.52	95.94	72.11	30.48	29.23	2.67	6.08	83	95
	DM130	773.50	282.30	81.00	71.46	28.66	23.62	3.08	5.32	73	85
	HPD100	773.50	208.65	75.00	73.77	27.11	31.01	3.98	6.15	79	93
	HPD400	773.50	241.05	51.45	78.72	31.06	26.29	4.94	7.85	73	89

注:“-”表示紫外检测为 0; 1<sup>)</sup>表示 30% 与 50% 醇解析率之和; 2<sup>)</sup>表示总解析率。

HPD400 较好;HPD400 对皂苷的比吸附量稍高,但 D101 型解析率高,D101 型即可富集纯化总皂苷。综上所述,D101 型树脂较适宜富集纯化二仙汤有效部位群。

## 2.7 D101 型树脂上柱条件优化

### 2.7.1 药液质量浓度对有效成分吸附效果影响

由表 2 可知,药液比 1:1 时,皂苷、黄酮吸附量最大,但过于黏稠,难以操作;药液比 1:1.5 时易操作,也利于生物碱的吸附,因此取药液比 1:1.5 上样操作较为适宜。

表 2 药液浓度对有效成分吸附效果的影响

药液比 /g:mL	比上柱量 S/mg·g <sup>-1</sup>		
	总黄酮	总生物碱	总皂苷
1:1	115.32	12.29	107.52
1:1.5	99.67	15.52	87.34
1:2	100.37	15.10	65.87
1:2.5	95.27	14.95	54.31
1:3	77.76	14.64	43.11

**2.7.2 NaCl 浓度的影响** 从表 3 可知,取药液比 1:1.5 的二仙汤,加入 NaCl,各成分吸附效果明显改善,1.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl 即可明显改善成分的吸附量。

**2.7.3 pH 影响** 由表 4 可知,pH 对黄酮、生物碱影响较小,过酸过碱均能增加皂苷的吸附量,但考虑到对树脂有一定的破坏作用,pH 不予调节,5~6 即可。

表 3 NaCl 浓度对二仙汤有效成分吸附的影响

NaCl/mol·L <sup>-1</sup>	比上柱量/mg·g <sup>-1</sup>		
	总黄酮	总生物碱	总皂苷
0.0	99.67	15.52	87.34
1.0	110.70	16.46	112.31
1.5	134.01	18.14	153.42
2.0	133.66	18.41	161.32
2.5	132.84	19.09	170.91
3.0	139.69	19.56	179.22

表 4 pH 对二仙汤有效成分吸附的影响

pH	比上柱量/mg·g <sup>-1</sup>		
	总黄酮	总生物碱	总皂苷
2~3	95.68	15.32	105.78
4~5	102.48	15.78	85.35
6~7	99.67	15.52	87.34
8~9	96.67	16.19	89.82
10~11	101.35	16.86	100.56

**2.8 树脂上柱量的考察** 最佳上柱条件下(药液比 1:1.5,NaCl 1.5 mol·L<sup>-1</sup>),总黄酮、总生物碱、总皂苷上柱量分别为 2.87,2.53,2.95 BV,为保证各成分不被泄漏,上柱量取 2.5 BV。

**2.9 树脂解析条件优化** 从表 5 可知,50% 乙醇洗至 5 BV 时,各成分基本解析完毕,单用 50% 乙醇解析效果较好,与表 1 中 30% 与 50% 乙醇解析率和差别不大,取 50% 乙醇 5 BV 洗脱。

表 5 50% 乙醇洗脱用量考察

指标	2.5 BV 比上柱量 /mg·g <sup>-1</sup>	50% 乙醇比解析率/mg·g <sup>-1</sup>				总比解析率	总解析率/%
		3 BV	4 BV	5 BV	6 BV		
总黄酮	116.77	87.58	5.49	1.40	-	94.47	80.9
总生物碱	17.95	12.94	-	-	-	12.94	72.1
总皂苷	130.02	91.40	7.15	2.34	-	100.89	77.6

**2.10 二仙汤纯化前后组分变化比较** 由表 6 可知,经树脂纯化后,大部分杂质被除去(干物质与干浸膏比较),解析前后总黄酮、总生物碱、总皂苷比例由 1:0.15:1.11 变为 1:0.14:1.07,比例变化不大,各指标的转移率均在 70% 以上,3 种有效部位之和占干物质(有效部位群)重的 53%,富集度较高,巴戟天、当归、仙茅中的有效成分经薄层检视均有不同程度保留。

## 3 小结与讨论

从以上试验结果可知,二仙汤提取液,预处理后浓缩至药液比 1:1.5,加 NaCl 调至 1.5 mol·L<sup>-1</sup>,用时取 2.5 BV 药液上 D101 树脂柱,预吸附 1 h,6 BV 水洗至近无色,后用 5 BV 50% 乙醇洗脱,浓缩干燥得棕黄色干物质即为有效部位群。

本试验在树脂筛选方面采用了动态法综合考察其吸附量和解析率,因为动态法能真实反映实际操

表 6 二仙汤纯化前后成分含量比较

指标	纯化前			转移率/%	纯化后		
	质量分数 /mg·g <sup>-1</sup>	比例	干浸膏得率/%		质量分数 /mg·g <sup>-1</sup>	比例	干物质得率/%
总黄酮	14.90	1		80.9	12.05	1	
总生物碱	2.29	0.15	26.7	72.1	1.65	0.14	5.0
总皂苷	16.59	1.11		77.6	12.87	1.07	

注：“干浸膏”是二仙汤经提取后直接浓缩干燥所得，“干物质”是二仙汤经树脂纯化干燥后所得有效部位群。

作的情况。树脂性能主要考察极性和空间结构,除此以外,还与成分的体积大小等有关,树脂孔径适宜,比表面积才能发挥作用。二仙汤总黄酮主要是淫羊藿来源的黄酮,该黄酮类具有多酚结构和糖苷链,属中等偏大极性物质,其分子体积较大,D101型虽是非极性树脂,但有较大的比表面积,较适合总黄酮的吸附和纯化;甾体皂苷元为憎水性,能被非极性树脂吸附,试验中孔径较大D101非极性树脂较为适宜,与文献多有报道相符<sup>[9]</sup>;纯化生物碱时,大孔树脂可避免传统阴离子交换树脂中酸或碱洗脱带来的不便<sup>[10]</sup>。本试验中,大孔树脂对小檗碱类季氨碱有较好的富集作用。

影响有效成分吸附的因素有药液质量浓度、盐浓度、pH、温度等因素。药液质量浓度高时利于有效成分吸附,但浓度过高易堵塞树脂柱,影响树脂寿命。含盐药液由于盐析作用,可降低有效成分的溶解度,显著增加树脂对其的吸附量,操作简便实用,且无机盐作为杂质先被水洗下,不会影响产品质量。树脂吸附为一放热过程,低温利于吸附,但室温范围内(20~40℃)对吸附量影响一般较小<sup>[11]</sup>,操作中温度控制也不易实施,可以将药液冷藏后上样。中药液经大孔树脂纯化后除杂效果好,有效成分流失少,成分比例变化不大,且醇洗脱液易浓缩干燥,所得有效部位群富集度高,几无吸湿性,服用量少,可填制成硬胶囊制剂,但其临床复方等效性等需进一步探讨。

### [参考文献]

[1] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:300.

[2] 年华. 二仙汤抗骨质疏松的物质基础研究[D]. 上海:第二军医大学,2006:129.

[3] 王高森,侯世祥,朱浩,等. 大孔树脂吸附纯化中药复方特性研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(15):1237.

[4] 年华,郑汉臣,张巧艳,等. 大孔吸附树脂对复方二仙汤提取物吸附性能的考察[J]. 药学服务与研究,2006,6(4):260.

[5] 赵丹. 中药复方二仙汤中总黄酮和总皂苷的含量测定[J]. 东南国防医药,2005,7(3):189.

[6] 程华,余龙江,胡琼月,等. 分光光度法测定岩黄连不同部位总生物碱的含量[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):260.

[7] 赵法兴,郝岗平. 复方二仙汤有效成分提取工艺的研究[J]. 泰山医学院学报,2009,30(12):927.

[8] 侯世祥,朱浩,孙毅毅,等. 影响大孔吸附树脂吸附纯化黄连提取液因素的初步考察[J]. 中国中药杂志,2000,25(11):666.

[9] 梁少玲,蔡宇,杨燕霞,等. 大孔树脂吸附在黄酮及皂苷类成分分离纯化中的应用[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):277.

[10] 孙彩华,陈水英. 大孔吸附树脂在中药有效成分研究中的应用[J]. 黑龙江医药,2006,19(3):205.

[11] 周忻. 大孔吸附树脂分离纯化中药有效成分的影响因素[J]. 中国药物应用与监测,2006,(2):50.

[责任编辑 全燕]