

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110301. 1647. 005

## 精制冠心方水提液的大孔树脂纯化工艺优选

吴志成<sup>1,2</sup>, 刘淑芝<sup>1\*</sup>, 李曼玲<sup>1</sup>, 杜茂波<sup>1</sup>, 康琛<sup>1</sup>, 常琳<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 研究大孔吸附树脂富集冠心膏水提液中有效成分的工艺条件及参数。方法: 以丹酚酸 B 和芍药苷为指标, 采用高效液相法进行含量测定, 优选大孔树脂纯化的最佳工艺。结果: D101 大孔吸附树脂纯化效果较好, 其最佳工艺的条件为径高比 1:7, 上样液生药质量浓度  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 药液最大上样体积为树脂量的 8 倍, 洗脱剂 40% 乙醇, 解析速率  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ , 洗脱剂用量 4 BV。结论: D101 型大孔吸附树脂纯化冠心膏水提液的最佳工艺稳定、可行。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 丹酚酸 B; 芍药苷; 纯化

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0011-04

## Study on Refine Technics of Fufang Jingzhiguanxin with Macroporous Resin

WU Zhi-cheng<sup>1,2</sup>, LIU Shu-zhi<sup>1\*</sup>, LI Man-ling<sup>1</sup>, DU Mao-bo<sup>1</sup>, KANG Chen<sup>1</sup>, CHANG Lin<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;  
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the purification processes of salvianolic acid B and paeoniflorin from Fufang Jingzhiguanxin with macroporous adsorption resin. **Method:** To measure the content of salvianolic acid B and paeoniflorin with HPLC. To evaluate the optimal macroporous adsorption resin. **Result:** The optimal macroporous adsorption resin was D-101. The optimal purification conditions: The sample concentration was  $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The diameter height ratio was 1:7. The sample volume was 8 BV. The eluant was 40% ethanol. The elution flow rate was  $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ . The ethanol consumption was 4 BV. **Conclusion:** D-101 has a good purification effect under the above conditions.

**[Key words]** macroporous adsorption resin; salvianolic acid B; paeoniflorin; purification

精制冠心颗粒处方由丹参、赤芍、川芎、红花和降香 5 味中药组成, 用于心血瘀阻之冠心病、心绞痛<sup>[1]</sup>, 能明显降低心肌耗氧量, 增加冠脉血流量, 明

显降低心肌缺血程度, 减少体内血栓形成和心肌梗塞范围, 并对心肌具有很好的保护作用, 同时也可改善心悸、气短、胸闷、烦躁等症状。原制法为水提取后直接制粒, 出膏率高, 服用量大, 患者依从性差。近年来大孔吸附树脂逐步用于中药有效成分和复方制剂的分离纯化。本研究采用大孔吸附树脂对精制冠心全方水提液进行精制, 并对精制前后进行药效比较, 在不影响药效的情况下, 降低其得膏率<sup>[2]</sup>, 使有效成分高度富集, 方便制剂。本试验以精制冠心方水提液中丹参的指标性成分丹酚酸 B 和赤芍的指标性成分芍药苷为评价指标, 研究大孔吸附树脂纯化工艺条件。

**[收稿日期]** 20110117(004)

**[基金项目]** 重大新药创制-中药研究关键技术(2009ZX09502-010); 重大新药创制-综合性中药新药研究开发技术大平台(2009ZX09301-005-05)

**[第一作者]** 吴志成, 硕士, 中药制剂专业, Tel: 15901099570, E-mail: wuzhicheng2008@163.com

**[通讯作者]** \* 刘淑芝, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 010-84043227, E-mail: Liushuzhi2004@sina.com

**[网络出版时间]** 2011-03-01 16:47

## 1 材料

丹参(山东)、赤芍(内蒙)、川芎(四川)、红花(新疆)、降香(海南)均购自亳州芳草堂饮片厂,经检验符合 2010 年版《中国药典》各药味项下的有关规定。D101,HPD100,HPD400 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司),AB-8,NKA-9 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂),HP-20 型大孔吸附树脂(日本三菱公司)。丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111562-200504),芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110736-200526),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

安捷伦 G1310A 高效液相色谱仪,G1314A 紫外检测器,Agilent 工作站。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

**2.1.1 色谱条件**<sup>[1]</sup> 丹酚酸 B:流动相甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59),检测波长 286 nm,柱温 25 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。芍药苷:流动相甲醇-水-冰乙酸(25:75:0.2),检测波长 230 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.1.2 线性关系考察** 精密称取丹酚酸 B 照品 3.85 mg,加 75% 甲醇定容至 50 mL,摇匀,即得 0.154 g·L<sup>-1</sup>对照品溶液。精密吸取对照品溶液 2,4,6,8,10,12,14,16 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 153.97 X - 7.0857 (r = 0.9999)$ ,线性范围 0.308 ~ 2.464 μg。精密称取芍药苷照品 1.91 mg,加甲醇定容至 10 mL,摇匀,即得 0.191 g·L<sup>-1</sup>对照品溶液。精密吸取对照品溶液 2,4,6,8,10,12 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 309.88 X - 64.173 (r = 0.9998)$ ,线性范围 0.382 ~ 2.292 μg。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 精密称取丹酚酸 B 和芍药苷对照品 0.75,1.91 mg,分别置 50,10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

**2.1.4 供试样品的测定** 丹酚酸 B:将样品液用 75% 甲醇稀释 10 倍,超声,滤过,进样 10 μL。芍药苷:将样品液用甲醇稀释 10 倍,超声,滤过,进样 10 μL。

**2.2 上样液的制备** 按优选的提取工艺,降香水蒸气蒸馏法提取挥发油,水提取液备用,药渣与丹参、川芎合并用乙醇提取,乙醇提取液备用,取药渣再与赤芍、红花合并水提取,水提取液与降香水提取液合

并,浓缩至生药量 0.1,0.2,0.3 g·mL<sup>-1</sup>,离心 20 min(3 000 r·min<sup>-1</sup>),取上清液作为上样液。0.2 g 生药/mL 上样液中丹酚酸 B 的质量浓度为 1.2 g·L<sup>-1</sup>,芍药苷的质量浓度为 1.1 g·L<sup>-1</sup>。

**2.3 大孔吸附树脂的预处理与装柱** D101,HPD100,NKA-9,HPD400,AB-8,HP-20 型大孔吸附树脂以 95% 乙醇浸泡 24 h,充分溶胀后,装柱,用 95% 乙醇洗至流出液与水(1:5)混合不呈浑浊,再用水洗至无醇味,备用。

### 2.4 大孔树脂纯化工艺考察

**2.4.1 大孔树脂型号的筛选** 选择 D101<sup>[3-6]</sup>,HPD100<sup>[7]</sup>,AB-8<sup>[8-10]</sup>,HPD400,HP-20<sup>[11]</sup>,NKA-9 6 种型号大孔吸附树脂各 20 mL,置锥形瓶中,加入 0.3 g·mL<sup>-1</sup>上样液 200 mL。浸渍 24 h(每隔 8 h 以超声波振动 1 次),滤过,用 20 mL 蒸馏水洗涤树脂,洗涤液与滤液合并,备用;向树脂柱中加入 95% 乙醇 500 mL,浸渍 24 h(每隔 8 h 振动 1 次),滤过得解析液。测定洗涤液和解析液中丹酚酸 B 和芍药苷的质量浓度,计算吸附量和解析量。测定结果见表 1。

吸附量 = (上样液中成分总量 - 流出液中成分总量) / 树脂体积

吸附率 = 吸附量 / 上样液中成分总量 × 100%

解吸量 = 洗脱液质量浓度 × 洗脱液体积 / 树脂体积

解吸率 = 解吸量 / 吸附量 × 100%

表 1 6 种树脂对芍药苷和丹酚酸 B 的吸附量和解析率

树脂型号	丹酚酸 B			芍药苷		
	吸附量 /g·L <sup>-1</sup>	解析量 /g·L <sup>-1</sup>	解析率 /%	吸附量 /g·L <sup>-1</sup>	解析量 /g·L <sup>-1</sup>	解析率 /%
D101	5.40	4.02	74.4	7.54	5.21	69.1
AB-8	4.95	2.56	51.7	5.37	3.67	68.3
HPD100	5.12	2.95	57.5	6.12	4.11	67.1
HP-20	4.32	2.44	56.5	5.79	3.49	60.2
HPD400	5.63	4.26	75.6	7.02	4.27	60.8
NKA-9	1.99	1.43	72.0	3.39	1.10	32.4

结果表明: D101 大孔树脂对芍药苷和丹酚酸 B 的吸附和解析均好于其他树脂,由此选择 D101 型大孔树脂作为精制冠心病水提液的树脂。

**2.4.2 上样药液质量浓度的选择** 取 3 根相同规格的柱子,加入 50 mL 已经处理好的 D101 型大孔树脂,使其径高比为 1:3。分别加入 10 倍树脂量,药液质量浓度 0.1,0.2,0.3 g·mL<sup>-1</sup> 的精制冠心病水提液,流速 2.5 mL·min<sup>-1</sup> (3 BV·h<sup>-1</sup>),测定流出液中丹酚

酸 B 和芍药苷的质量浓度,计算吸附量。测定结果见表 2。

综合考虑吸附量和吸附率 2 个方面,选择  $0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  作为上柱液的质量浓度。

表 2 上样液浓度对吸附性能的影响

上样液质量 浓度 $/\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	药液相对 密度	丹酚酸 B		芍药苷	
		吸附量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附率 $\%$	吸附量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	吸附率 $\%$
0.1	1.012	6.48	100	4.49	100
0.2	1.022	10.53	81.27	8.60	95.81
0.3	1.036	10.01	71.52	10.34	76.81

**2.4.3 径高比的考察** 选择 50 mL 树脂量下 3 种径高比分别为 1:3, 1:5, 1:7 的树脂柱,以  $2.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ ) 的流速,上样  $450 \text{ mL } 0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  药液,收集流出液,测定其中丹酚酸 B 和芍药苷的质量浓度。然后用 95% 乙醇 250 mL 洗脱,收集醇洗液,测定其中丹酚酸 B 和芍药苷的质量浓度。测定结果见表 3。

表 3 不同径高比对丹酚酸 B 和芍药苷吸附的影响

径高比	丹酚酸 B			芍药苷		
	吸附量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率 $\%$	吸附量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率 $\%$
1:3	9.59	5.41	56.44	8.21	6.99	85.11
1:5	9.53	5.20	54.49	8.25	7.49	90.73
1:7	9.63	5.47	56.75	8.27	7.83	94.71

由表 3 可以得出径高比对丹酚酸 B 和芍药苷吸附影响不大,随径高比的增加吸附与解析呈增加趋势,综合考虑选择径高比 1:7。

**2.4.4 泄漏曲线的绘制** 将已经处理好的 D101 型大孔树脂 100 mL 装柱,树脂柱的径高比为 1:7,取 2000 mL 供试药液 ( $0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 上样,流速  $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$ ,分段收集泄漏液,每段 100 mL,分别过微孔滤膜,测定其中丹酚酸 B 和芍药苷的质量浓度,绘制泄漏曲线。见图 1。

从图 1 看出,从第 7 段以后丹酚酸 B 泄漏量显著增大,从第 9 段以后芍药苷显著增大,故设定 800 mL 为泄漏点,据此确定药液最大上样体积为树脂量的 8 倍(质量浓度  $0.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),即生药量:树脂量为 1.6:1。

**2.4.5 洗脱溶剂的考察** 按上述确定的吸附条件,取最大上样液量 800 mL,以  $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  流速通过 4 根

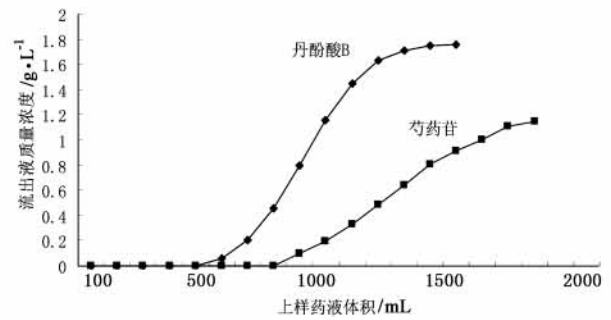


图 1 精制冠心水提液大孔树脂泄漏曲线

树脂柱,进行动态吸附。选择 4 种体积分数的乙醇为洗脱剂,分别为:40%,55%,70%,90%。以  $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  洗脱,收集洗脱液,适当稀释,过微孔滤膜,测定其中丹酚酸 B 和芍药苷的含量。结果见表 4。

表 4 乙醇浓度对丹酚酸 B 和芍药苷洗脱的影响

乙醇体积 分数/ $\%$	丹酚酸 B		芍药苷	
	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率 $\%$	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率 $\%$
40	6.95	71.88	8.34	74.44
55	6.77	69.97	6.65	59.33
70	6.50	67.14	7.59	67.76
90	6.94	71.75	8.51	75.94

由表 4 可以得出 40% 乙醇,90% 乙醇对丹酚酸 B 和芍药苷的洗脱效果较好,且数据接近,考虑成本等因素,确定 40% 乙醇作为最佳洗脱溶剂。

**2.4.6 洗脱流速的考察** 根据上述确定的吸附及洗脱条件,取 100 mL D101 型大孔树脂 4 份,分别湿法上柱,上样量 800 mL,水洗后,用  $3 \text{ BV } 40\%$  乙醇洗脱;4 根柱子的流速分别为 1,2,3,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,收集洗脱液,适当稀释,测定其中丹酚酸 B 和芍药苷含量。测定结果见表 5。

表 5 洗脱流速对丹酚酸 B 和芍药苷解析率的影响

洗脱流速 $/\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$	丹酚酸 B		芍药苷	
	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率/ $\%$	解析量 $/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	解析率/ $\%$
1	6.74	68.77	7.44	85.22
2	6.32	64.46	7.32	83.78
3	6.76	68.96	7.52	86.09
4	6.71	68.43	7.42	85.02

由表 5 可知,流速  $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  时对丹酚酸 B 和芍药苷的洗脱效果较好,因此确定流速  $3 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$  作为最佳洗脱流速。

**2.4.7 洗脱曲线的考察** 按上述确定的吸附和洗脱条件,湿法上柱 100 mL D101 型大孔树脂,以 3 BV·h<sup>-1</sup> 上样 800 mL 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 药液,用 100 mL 水洗,然后用 800 mL 40% 乙醇洗脱,分段收集洗脱液,每份 50 mL,共收集 16 份,测定丹酚酸 B 和芍药苷的含量,绘制洗脱曲线。见图 2。

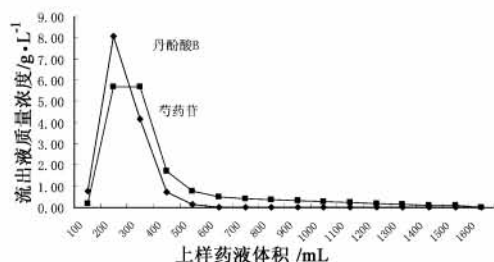


图 2 精制冠心病水提液大孔树脂纯化洗脱曲线

从图 2 看出丹酚酸 B 在第 6 份样时洗脱完全,芍药苷在第 8 份样时基本洗脱完全,故确定最佳洗脱溶剂用量为 400 mL,即 4 BV。

**2.4.8 验证试验** 根据确定的大孔树脂精制条件进行验证实验,湿法上柱 100 mL D101 型大孔树脂,以 3 BV·h<sup>-1</sup> 流速上样 800 mL 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 药液(含丹酚酸 B 1.34 g·L<sup>-1</sup>,芍药苷 1.25 g·L<sup>-1</sup>),用 100 mL 水洗,然后用 400 mL 40% 乙醇洗脱。测定洗脱液中丹酚酸 B 和芍药苷含量及含固量,计算解析量、解析率,及干浸膏的纯度,结果见表 6。

表 6 大孔树脂精制条件验证试验(n=3)

No	丹酚酸 B			芍药苷		
	解析量 /g·L <sup>-1</sup>	解析率 /%	干浸膏 纯度/%	解析量 /g·L <sup>-1</sup>	解析率 /%	干浸膏 纯度/%
1	9.70	90.26	15.04	7.96	79.42	12.53
2	9.41	87.56	14.88	8.10	80.76	13.29
3	9.73	90.52	14.93	7.78	77.65	13.12

由表 6 可知,丹酚酸 B 和芍药苷解析率 RSD 均小于 5%,表明该大孔精制工艺稳定可靠。

### 3 结论与讨论

经过工艺筛选得到的最佳工艺为:径高比 1:7,上样液生药质量浓度为 0.2 g·mL<sup>-1</sup> 药液的最大上

样体积为树脂量的 8 倍,洗脱剂为 40% 乙醇,解析速率为 3 BV·h<sup>-1</sup>,洗脱剂用量为 4 BV。该条件下 D101 型大孔树脂最大吸附量为丹酚酸 B 10.7 g·L<sup>-1</sup>,芍药苷 10.0 g·L<sup>-1</sup>,解析率丹酚酸 B 89.4%、芍药苷 79.3%。通过大孔树脂纯化,精制冠心病水提液的出膏率由原来的 29% 降为 3.4%,干浸膏丹酚酸 B 纯度由原来的 2.3% 变为 15%,芍药苷纯度由原来的 1.4% 变为 13%。

丹参为方中君药,丹酚酸 B 是其水溶性有效成分,芍药苷为处方中水提部分赤芍的主要药效成分。本研究以此两种成分作为工艺优选的考察指标,较单一成分考察更能全面的体现中药复方的药效物质基础。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:653,52.
- [2] 胡军,周跃华.大孔吸附树脂在中药成分精制纯化中的应用[J].中成药,2002,24(2):127.
- [3] 叶勇,施敏荣.D101型大孔树脂对丹酚酸B分离工艺的优选[J].中国药学杂志,2006,41(20):1557.
- [4] 张霄翔,邵胜男.大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺.研究[J].中成药,2007,29(9):1288.
- [5] 于波涛,姜云平,张勤,等.大孔树脂分离治伤灵口服液中芍药苷的研究[J].西南军医,2009,11(2):169.
- [6] 汤建成,王溶溶,冯瑛等.大孔树脂富集坤怡宁颗粒中芍药苷的工艺研究[J].中成药,2007,26(6):640.
- [7] 姚棋婷,李克胜,张丽,等.大孔吸附树脂纯化肺舒通中丹酚酸B的工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(3):21.
- [8] 高声传,张怀,马宏达.丹参中丹酚酸B纯化工艺研究[J].解放军药学学报,2008,24(4):307.
- [9] 于红宇,张军,詹丽玲,等.赤芍药材提取液的大孔树脂精制工艺研究[J].中药材,2004,27(11):871.
- [10] 刘爱玲,张盛,王坤波,等.芍药苷和白芍苷纯化工艺研究[J].湖南中医药大学学报,2008,28(3):37.
- [11] 王妍妍,朱靖博,李琳,等.大孔吸附树脂纯化5种丹酚酸类化合物的吸附分离特性[J].中国中药杂志,2008,33(9):1004.

[责任编辑 全燕]