

三黄喷雾剂中黄芩、栀子提取物的大孔吸附树脂纯化工艺

朱鹏飞¹, 冯伟红², 刘淑芝^{2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂纯化三黄喷雾剂中黄芩的工艺条件。方法: 采用 HPLC 测定黄芩苷含量, 以黄芩苷的吸附率、解吸率为考察指标, 优选大孔吸附树脂最佳纯化工艺条件。结果: 最佳大孔吸附树脂型号为 SP-825; 上样液浓度为 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 径高比为 1.7, 最大上样量为 2 BV, 洗脱剂为 70% 乙醇, 洗脱流速为 $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 洗脱剂用量为 6 BV。结论: SP-825 型大孔吸附树脂纯化黄芩、栀子提取物的最佳工艺稳定、可行。

[关键词] 大孔吸附树脂; 黄芩苷; 纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0004-03

Purification Processes of Extract of Scutellaria and Gardenia from Sanhuang Spray with Macroporous Adsorption Resin

ZHU Peng-fei¹, FENG Wei-hong², LIU Shu-zhi^{2*}

(1. School of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Institute of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate the purification processes of Scutellaria from Sanhuang spray with macroporous adsorption resin. **Method:** The content of baicalin was measured with HPLC. The adsorption rate and desorption rate were measured to evaluate the optimal macroporous adsorption resin and the optimal purification conditions. **Result:** The optimal macroporous adsorption resin was SP-825. The optimal purification condition was as follows: the sample concentration was $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; the diameter height ratio was 1.7; the sample volume was 2 BV; the eluant was 70% ethanol; the elution flow rate was $3 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$; the ethanol consumption was 6 BV. **Conclusion:** Purification process of the extract of Scutellaria and Gardenia with SP-825 macroporous adsorption resin was stable and feasible.

[Key words] macroporous adsorption resin; baicalin; purification

三黄喷雾剂由黄柏、黄芩、黄连、栀子组成, 由于黄连、黄柏中所含的小檗碱在煎煮过程中能与黄芩中的黄芩苷形成难溶性分子复合物而析出^[1]。因

此, 方中 4 味中药不宜合煎, 根据各成分的性质, 分为黄连、黄柏组和黄芩、栀子组, 分别进行提取。大孔吸附树脂^[2]是 20 世纪 60 年代末兴起的分离纯化新技术, 具有性质稳定、选择性好、条件温和、操作简便等优点, 现已广泛应用于中药的分离纯化研究。本试验通过研究大孔吸附树脂纯化黄芩、栀子提取物的工艺条件, 为三黄喷雾剂的成型工艺及质量控制提供方便。

1 仪器与试药

黄芩、栀子药材(均购自亳州市芳草堂饮片厂); SP-825、HP-20(日本三菱公司), AB-8, X-5(天津南开大学化工厂), HPD-600(沧州宝恩化工有限

[收稿日期] 20100704(004)

[基金项目] 重大新药创制(2009ZX09502-010, 2009ZX09301-005-05); 中国中医科学院自主选题项目(Z02094)

[第一作者] 朱鹏飞, 在读硕士研究生, 中药制剂专业, Tel: 15011353582, E-mail: zpfthy@126.com

[通讯作者] * 刘淑芝, 研究员, 博士生导师, 中药新剂型与质量标准研究, Tel: 010-84043227, E-mail: liushuzhi2004@sina.com

公司);黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110715-200212);Waters Alliance 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),2695 溶剂管理系统,2996 二极管阵列检测器,Empower2 色谱工作站;甲醇为色谱纯;高纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定 色谱条件^[3]: 色谱柱 Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.2% 磷酸水溶液(47:53), 检测波长 275 nm, 柱温 35 ℃, 流速 1 mL·min⁻¹。

标准曲线的绘制:精密称取黄芩苷对照品 0.52 mg, 加甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 即得对照品溶液。精密吸取对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50 μL 进样, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3 \times 10^6 X - 46362$, $r = 0.9999$ ($n = 7$), 线性范围 0.104 ~ 2.6 μg。

样品测定:将收集好的过柱液,用 70% 乙醇稀释至合适浓度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样,采用 HPLC 测定黄芩苷含量。

2.2 上样液的制备 称取黄芩药材 600 g, 栀子药材 300 g(捣碎),用 8 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h, 过滤,滤液减压浓缩至无醇味(生药量 1 g·mL⁻¹),将该药液用 4 倍量的水转溶,静置,离心 20 min(3500 r·min⁻¹),取上清液加水定容至 4500 mL,即得上样液(生药量 0.2 g·mL⁻¹,黄芩苷 21.53 g·L⁻¹)。

2.3 大孔吸附树脂纯化工工艺条件考察

2.3.1 大孔吸附树脂预处理 取 SP-825, HP-20, HPD-600, AB-8, X-55 种型号大孔吸附树脂,95% 乙醇浸泡 24 h,充分溶胀,湿法装柱,用 95% 乙醇洗脱树脂,洗脱流速为 2 BV·h⁻¹,当洗脱液与水(1:5)混合不产生浑浊为止,再用蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.3.2 大孔吸附树脂型号筛选 采用静态吸附法^[4],通过测定吸附率和解吸率进行树脂型号优选。取已处理好的 5 种树脂各 10 mL(以下均为湿树脂),置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入 8 BV 上样液,静置 24 h 使之充分吸附(每隔 8 h 超声振动 1 次),滤过,5 BV 蒸馏水洗树脂,水洗液与滤液合并,测定黄芩苷含量,计算各树脂的吸附率。再向上述树脂中各加入 8 BV70% 乙醇,静置 24 h 使之充分吸附(每隔 8 h 超声振动 1 次),滤过,测定黄芩苷含量,计算各树脂的解吸率,结果见表 1。

吸附量 = (上样液含量 - 流出液含量) / 树脂体积

吸附率 = 吸附量 / 上样液含量 × 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 5 种型号树脂对黄芩苷静态吸附和解吸附的影响

树脂类型	吸附量 /g·L ⁻¹	吸附率 /%	解吸量 /g·L ⁻¹	解吸率 /%
SP-825	68.18	52.11	60.45	88.66
HP-20	35.88	27.42	25.70	71.61
HPD-600	16.50	12.61	9.36	56.72
AB-8	35.80	27.36	26.94	75.27
X-5	29.18	22.30	23.74	81.36

结果表明:SP-825 的吸附率和解吸率均为最大值,且 SP-825 的刚性好,粒度均匀,再生能力强,综合考虑,本试验选择 SP-825 型树脂。

2.3.3 上样液质量浓度考察 量取 SP-825 型树脂 20 mL,湿法装柱,将 10 BV 不同浓度的上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速分别通过树脂柱,进行动态吸附,测定黄芩苷吸附量,确定最佳上样液质量浓度,结果见表 2。

表 2 不同浓度上样液对黄芩苷吸附的影响

上样液质量浓度 /g·mL ⁻¹	吸附量 /g·L ⁻¹
0.5	10.90
0.4	21.28
0.3	33.96
0.2	47.60
0.15	35.26
0.1	29.46

结果表明:上样液质量浓度为 0.2 g·mL⁻¹ 时,树脂的吸附量最大,因此,确定最佳上样液质量浓度为 0.2 g·mL⁻¹。

2.3.4 径高比考察 取 3 根不同粗细的层析柱,加入 SP-825 型树脂 50 mL,径高比分别定为 1:3, 1:5, 1:7。将 4 BV 上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂柱,3 BV 蒸馏水洗脱树脂,再用 5 BV70% 乙醇洗脱树脂,测定黄芩苷含量,确定最佳径高比,见表 3。

表 3 不同径高比对黄芩苷吸附和解吸附的影响

径高比	吸附量 /g·L ⁻¹	解吸量 /g·L ⁻¹	解吸率 /%
1:3	39.58	32.50	82.10
1:5	43.04	36.33	84.42
1:7	43.28	38.15	88.15

结果表明:径高比为 1:7 时,树脂对黄芩苷的吸附量和解吸率均为最大值,综合考虑,本试验选择径高比为 1:7。

2.3.5 泄漏曲线考察^[5] 取 SP-825 型树脂 100 mL, 湿法装柱, 径高比为 1.7, 将 4 BV 上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂柱, 分段收集流出液, 每段 20 mL, 测定流出液中黄芩苷含量, 绘制泄漏曲线, 泄漏曲线见图 1。由图 1 可知, 第 10 份流出液的黄芩苷含量明显增大, 故确定最大上样量为 2 BV 上样液 (0.2 g·mL⁻¹), 此时树脂的最大吸附量为 36.78 g·L⁻¹, 吸附率为 85.41%。

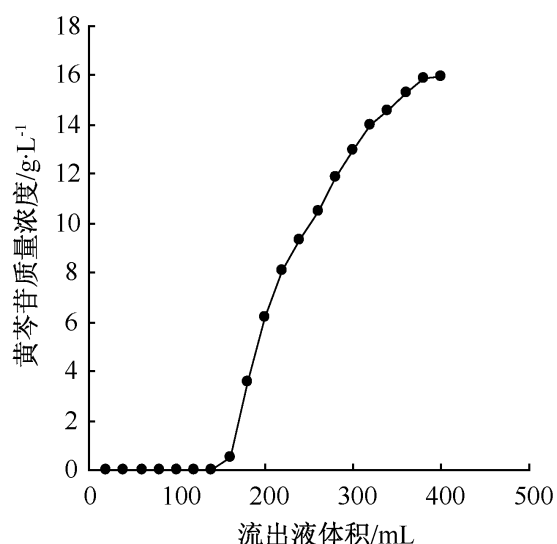


图 1 黄芩苷在 SP-825 型树脂的泄漏曲线

2.3.6 洗脱剂考察^[6] 取 5 根相同型号的色谱柱, 各加入 SP-825 型树脂 100 mL, 湿法装柱, 径高比均为 1.7。将 2BV 上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速分别通过树脂柱, 3 BV 蒸馏水洗脱树脂, 再用 5 BV 不同浓度的乙醇洗脱树脂, 测定黄芩苷含量, 确定最佳洗脱剂浓度, 结果见表 4。

表 4 不同体积分数乙醇对黄芩苷解吸附的影响

乙醇体积分数 / %	吸附量 / g·L ⁻¹	解吸量 / g·L ⁻¹	解吸率 / %
50	21.39	19.06	89.09
60	18.19	17.08	93.85
70	22.18	21.44	96.65
80	20.85	19.70	94.47
95	21.21	11.92	56.19

结果表明: 70% 乙醇对黄芩苷的解吸附能力最强, 因此, 确定最佳洗脱剂为 70% 乙醇。

2.3.7 洗脱流速考察 取 4 根相同型号的层析柱, 各加入 SP-825 型树脂 100 mL, 湿法装柱, 径高比均为 1.7。将 2 BV 上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速分别通过树脂柱, 3 BV 蒸馏水洗脱树脂, 再用 5 BV 70% 乙醇以不同的流速洗脱树脂, 测定黄芩苷含量, 确定最佳洗脱流速, 结果见表 5。

2.3.8 洗脱曲线考察 取 SP-825 型树脂 100 mL, 湿法装柱, 径高比为 1.7, 将 2 BV 上样液以 2 BV·h⁻¹ 的流速通过树脂柱, 3 BV 蒸馏水洗脱树脂, 再用 8 BV 70% 乙醇以 3 BV·h⁻¹ 的流速洗脱树脂, 分段收

表 5 不同洗脱流速对黄芩苷解吸附的影响

洗脱流速 / BV·h ⁻¹	吸附量 / g·L ⁻¹	解吸量 / g·L ⁻¹	解吸率 / %
1	12.00	10.45	87.11
2	12.83	10.39	80.92
3	15.97	14.45	90.47
4	16.64	14.15	85.03

集洗脱液, 每段 50 mL, 测定洗脱液中黄芩苷含量, 绘制洗脱曲线, 洗脱曲线见图 2。由图 2 可知, 到第 12 份洗脱液时, 黄芩苷已基本洗脱完全, 故确定最佳洗脱剂用量为 6 BV。

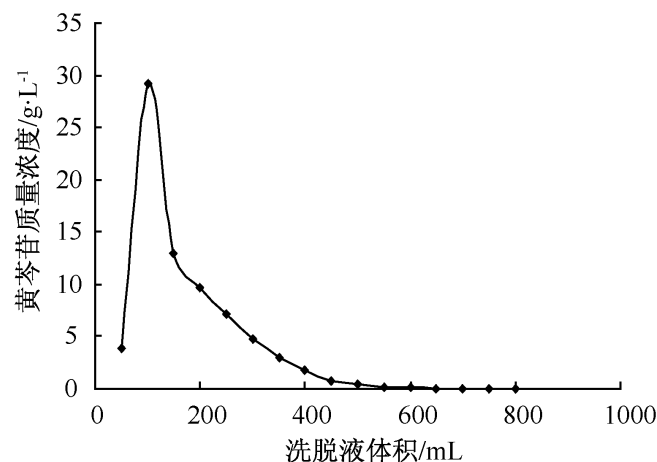


图 2 黄芩苷在 SP-825 型大孔树脂的洗脱曲线

结果表明: 洗脱流速为 3 BV·h⁻¹ 时, 树脂对黄芩苷的解吸附能力最强, 因此, 确定最佳洗脱流速为 3 BV·h⁻¹。

3 讨论

中药复方成分复杂, 杂质较多, 通过现代中药纯化技术, 可使中药复方的纯度提高, 从而提高疗效, 降低不良反应。本试验采用大孔吸附树脂法纯化中药提取物, 使有效成分高度富集, 为中药喷雾剂的成型工艺及质量控制提供方便。

[参考文献]

- [1] 肖崇厚. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 143.
- [2] 赵丽恋, 刘韶, 罗杰英. 大孔吸附树脂-超声波辅助解吸附法纯化淫羊藿中的总黄酮[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 702.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2005: 211.
- [4] 刘永刚, 金向群, 叶瑾, 等. 大孔树脂纯化赤芍总苷的研究[J]. 中药材, 2005, 28(3): 195.
- [5] 杜茂波, 金日显, 李军红, 等. X-5 型大孔树脂纯化黄连巴布膏中黄连的工艺研究[J]. 中成药, 2009, 31(1): 140.
- [6] 金日显, 郭春燕, 刘淑芝, 等. 大孔吸附树脂法富集栀子中栀子苷的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(3): 2.

[责任编辑 仝燕]