

大孔吸附树脂分离纯化丹皮总苷工艺研究

潘 君¹, 余庆华¹, 桂双英^{1,2*}, 刘景标¹, 戴 敏^{1,2}

(1. 安徽中医学院药学院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽省现代中药工程技术研究中心, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的: 优选大孔吸附树脂富集纯化牡丹皮中丹皮总苷的最佳工艺参数。方法: 采用 HPLC 法测定丹皮总苷含量, 考察 D 101、D 201、D 301、D 401、AB-8、NKA-9 6 种大孔树脂对芍药苷的吸附和解吸附性能, 并进一步考察分离纯化条件。结果: D 101 大孔树脂对丹皮总苷提取液纯化最优, 上样液芍药苷浓度为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 6.5, 洗脱流速 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 分离纯化条件为: 先用 10 BV 蒸馏水洗脱, 然后用 4 BV 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 浓缩、干燥, 即得到丹皮总苷。结论: D 101 大孔树脂可用于牡丹皮水提取液中丹皮总苷的富集纯化。

[关键词] 大孔树脂; 吸附; 纯化; 丹皮总苷

[中图分类号] R286.3 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0021-04

Study on Separation and Purification Total Glycosides of Tree Peony Bark by Macroporous Resin

PAN Jun¹, YU Qing-hua¹, GUI Shuang-ying^{1,2*}, LIU Jing-biao¹, DAI Min^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Anhui College of TCM, Anhui 230031, China;

2. Anhui Key Lab. of Modernized Chinese Material, Anhui 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technical parameters of enrichment and purification of the total glycosides in tree peony bark with macroporous resin. **Methods:** HPLC method was used to analyze the content of total glycosides,

[收稿日期] 2008-09-18

[基金项目] 科技部十一五支撑计划课题(2006BAI06A18-07)

[通讯作者] * 桂双英, Tel: (0551) 5169225; E-mail: guishy0520@yahoo.com.cn

the adsorption and desorption performance of D101, D201, D301, D401, AB-8, NKA-9 were investigated, and the purification of conditions were inspected. **Results:** The best macroporous resin for purified extractive of total glycosides in tree peony bark was D101, the concentration of Paeoniflorin was $1.83 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with pH 6.5, and with the elution flow rate of $1 \text{ BV}\cdot\text{h}^{-1}$. Purification of the conditions were as follows: 10 BV water and 4 BV 70% ethanol were used as eluant of paeoniflorin, respectively. Portions of 70% ethanol were collected, concentrated, and dried. **Conclusion:** D101 resin can be used to refine the total glycosides in the water extracts of tree peony bark.

[**Key words**] macroporous resin; adsorption; purification; total glycosides of Paeonia

牡丹皮为主要含有丹皮酚、丹皮酚苷、丹皮酚原苷、丹皮酚新苷、芍药苷、芍药苷元、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷、没食子酰芍药苷、没食子酰氧化芍药苷等成分^[1]。大孔树脂适于提取分离有机化合物尤其是水溶性化合物,尤其适用于分离纯化苷类、黄酮类、皂苷类、生物碱类等成分^[2]。本研究通过筛选,确定丹皮总苷纯化的最佳树脂型号,并且对其纯化工艺条件与参数进行研究,为丹皮总苷原料药的制备提供实验依据。

1 药材、仪器与材料

牡丹皮药材;芍药苷对照品为中国药品生物制品检定所提供,(批号:110736-200423,供含量测定用);AB-8和NKA-9(南开大学化工厂);D 101、D 201、D 301、D 401(天津海光化工有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;重蒸馏水自制。

层析柱(F 1.5 cm × 30 cm, F 2.5 cm × 50 cm, F 6.0 cm × 80 cm),中国科学技术大学玻璃仪器厂;电子分析天平(AB104-N型),梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;岛津LC-10A高效液相色谱仪(日本);CQ 250超声波清洗器,上海声波仪器厂。

2 色谱条件

大连伊利特 C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;乙腈:水(14:86)为流动相;检测波长:230 nm;流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

3 方法与结果

3.1 芍药苷的含量测定^[3]

3.1.1 测定波长的选择 将芍药苷对照品溶液和牡丹皮供试品溶液分别在 200~400 nm 扫描,显示芍药苷在 230 nm 左右有最大吸收峰,因此选择 230 nm 进行检测。

3.1.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的芍药苷对照品 4.8 mg,加甲醇溶解定容至 50 mL,得每 1 mL 含 96 μg 芍药苷的对照品溶液。

3.1.3 供试品溶液的制备 取牡丹皮药材,研碎,

取 0.5 g,精密称定,置 50 mL 容量瓶,加甲醇溶解,超声 30 min,放冷,补足定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,精密移取续滤液 4 mL 置 10 mL 容量瓶中加甲醇定容,摇匀,制成供试品溶液。

3.1.4 标准曲线的绘制 精密移取芍药苷对照品储备液 1, 2, 4, 5, 6 mL,分别加甲醇稀释至 10 mL。分别进样 20 μL,以峰面积为纵坐标、芍药苷含量为横坐标,得回归方程: $Y = 2.74 \times 10^7 X + 1.56 \times 10^4$, $r = 0.9999$,表明芍药苷在 0.192~1.152 μg 范围内具有良好的线性关系。

3.1.5 精密度试验 取同一份对照品溶液浓度为 ($48 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),重复进样 6 次,测定峰面积,计算 RSD 为 0.28%。

3.1.6 重复性试验 取同一批样品,按供试品溶液制备方法,制备 6 份供试品溶液,分别进样 20 μL,测得峰面积 RSD 为 0.17%,表明该法重复性良好。

3.1.7 样品溶液稳定性试验 取同一供试品溶液,在 0, 1, 2, 6, 12, 24 h 分别进样,按上述色谱条件测定,测得供试品溶液中芍药苷的峰面积 RSD 为 1.08%,结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性较好。

3.1.8 加样回收率试验 随机取丹皮药材,按上述方法测定含量为 0.91%,取其样品 6 份,精密称定,分别精密加入一定量芍药苷对照品溶液,依法制备供试品溶液,分别进样 20 μL 测定峰面积,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

No	称样量 (mg)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	28.87	0.2627	0.25	0.512	99.73		
2	29.22	0.2659	0.25	0.517	100.44		
3	27.75	0.2525	0.25	0.510	103.00	100.05	1.67
4	28.55	0.2598	0.25	0.506	98.48		
5	28.20	0.2566	0.25	0.507	100.16		
6	29.32	0.2668	0.25	0.513	98.48		

3.1.9 样品的含量测定 按供试品溶液制备方法制备样品溶液,精密吸取 20 μL 进样,测定芍药苷的含量,计算牡丹皮药材中芍药苷含量为 1.36%。

3.2 工艺条件与参数优化

3.2.1 丹皮有效部位的提取工艺 药材加 20 倍量水蒸馏,接收 12 倍量蒸馏液,静置冷藏滤出结晶,滤液加 5% NaCl,重蒸馏,接收 2 倍体积重蒸馏液,静置冷藏滤出结晶,合并结晶得总丹皮酚。倾出蒸馏瓶内提取液,滤渣再加 8 倍量水,回流提取 1.0 h,两次提取液合并,即得牡丹皮丹皮总苷水提液。

3.2.2 大孔吸附树脂预处理 大孔树脂先用 95% 乙醇充分浸泡溶胀,湿法装柱,用 95% 乙醇在柱上流动洗至乙醇液与水混合(1:3)不呈白色混浊为止,然后以大量水洗至无醇。

3.2.3 静态吸附与解吸 取 6 种处理好的大孔吸附树脂(D 101、D 201、D 301、D 401、AB-8 以及 NKA-9)各 5 g,分别置于 250 mL 具塞锥形瓶中,准确量取芍药苷浓度为 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牡丹皮水提液 100 mL,盖紧瓶塞,每 1 h 振摇 1 min,持续 12 h,然后静置 12 h,使其吸附达到平衡后过滤。HPLC 法测定滤液中芍药苷的含量,按下式计算比吸附量和吸附率:比吸附量 = (原液浓度 - 吸附液浓度) \times 溶液体积 / 干树脂质量; 吸附率 = (上样液浓度 - 吸附后溶液浓度) / 上样液浓度 \times 100%。对达到吸附饱和的树脂用 100 mL 70% 乙醇解吸,每 1 h 振摇 1 min,持续 3 h,然后静置 3 h,使其解吸附达到平衡后过滤,取滤液定容,HPLC 法测定滤液中芍药苷的含量,计算解吸率,解吸率 = 解吸液浓度 / (上样液浓度 - 吸附后溶液浓度) \times 100%。6 种大孔树脂对芍药苷浓度 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牡丹皮水提液经静态吸附和静态解吸,结果见表 2。

表 2 不同大孔吸附树脂对芍药苷的静态比吸附量和解吸率

树脂种类	比吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	解吸附率(%)
D101	7.032	96.79
D201	6.014	90.82
D301	5.986	93.17
D401	6.675	85.56
AB-8	6.407	87.35
NKA-9	5.328	96.03

3.2.4 动态吸附 将 5 份浓度为 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品水溶液分别缓慢加入装有 D 101 大孔吸附树脂的层析柱(树脂床体积为 10 mL),控制流速分别为

1, 2, 3, 4, 5 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 每 5 mL 收集 1 次流份,TLC 检测,选择不同流份定量进 HPLC 色谱仪,测定芍药苷的含量,计算转移率,转移率 = 解吸率 \times 吸附率 \times 100%,结果见表 3。

表 3 洗脱流速的考察

洗脱流速($\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$)	含量(mg)	转移率(%)
1	55.79	95.71
2	48.72	83.58
3	44.08	75.63
4	39.98	68.58
5	36.99	63.46

由表 3 可知,洗脱流速为 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时,转移率最高为 95.71%,所以选择洗脱流速为 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。在此流速下动态吸附曲线见图 1。图 1 显示:第 15 流份开始,树脂开始有泄漏,泄露前的比吸附量为 $6.245 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

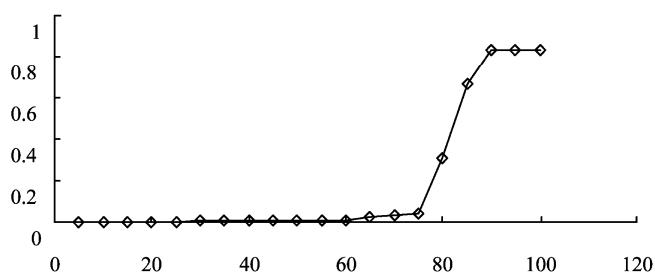


图 1 芍药苷泄漏曲线

3.2.5 上样液浓度的确定 用浓度不同的牡丹皮提取物水溶液进行吸附实验。结果见表 4。由表 4 可知芍药苷浓度是影响树脂吸附性能的重要因素之一,从表可以看出,将提取液直接上样,吸附率和转移率最高,分别为 97.91% 和 95.71%,但是和稀释或浓缩一倍无较大差别。考虑到工业化生产节能降耗的需要,所以选择丹皮药材水提液直接上样。

表 4 药液浓度考察结果

上样浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	吸附率(%)	洗脱芍药苷量(mg)	转移率(%)
0.208 1	96.96	55.30	94.87
0.416 3	97.57	55.66	95.49
0.832 7(原液)	97.91	55.79	95.71
1.665 4	97.43	55.43	95.10
3.330 8	93.54	52.87	90.70

3.2.6 pH 值对大孔树脂吸附的考察 取芍药苷含量为 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牡丹皮提取液 70 mL,用 10 g 树脂进行静态吸附和静态解吸实验,考察不同 pH 条

件下树脂的吸附和解吸附情况, 提取液 pH 约为 6.5, 再取提取液用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液调 pH 值为 1~ 2(1.5) 3~ 4(3.5) 5~ 6(5.5) 7~ 8(7.5) 9~ 10(9.5), 比较转移率, 结果见表 5。由表 5 可以看出, 药液 pH 为 6.5 值时, 转移率最高, 故确定上样液 pH 值为 6.5。

表 5 上样液 pH 对大孔树脂吸附情况考察结果

pH 值	吸附率 (%)	转移率 (%)
1.5	35.40	23.12
3.5	59.52	54.11
5.5	90.87	81.67
6.5	98.03	95.38
7.5	93.28	88.78
9.5	62.34	57.68

3.2.7 洗脱溶剂的确定 按上述条件将已吸附好样品的树脂依次用水、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇洗脱, 测定洗脱液中芍药苷浓度, 计算洗脱率。结果水洗脱液中几乎检不出芍药苷, 10% 乙醇洗脱液中芍药苷含量也很低, 20%、30% 乙醇洗脱液中芍药苷含量最高, 而后的 40%~ 90% 乙醇洗脱液中几乎检不出芍药苷。但对各洗脱液 TLC 检查时发现 40%、70% 乙醇洗脱液中有其他苷类成分, 考虑到为了较好的保留牡丹皮药材中的苷类成分, 故确定 70% 乙醇为洗脱溶剂。

3.2.8 洗脱溶剂用量的考察 按上述所确定的吸附和洗脱条件, 精密吸取芍药苷含量为 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牡丹皮提取液 70 mL 上样, 用蒸馏水洗脱至 Fehling 试剂检测显阴性为止, 共用蒸馏水 10 BV。再用 70% 乙醇 10 BV 洗脱, 洗脱曲线如图 2。由图可知: 4 BV 洗脱液中芍药苷含量明显降低, 可认为树脂柱上吸附的芍药苷已洗脱完全, 故确定洗脱剂用量为 4 倍树脂体积。

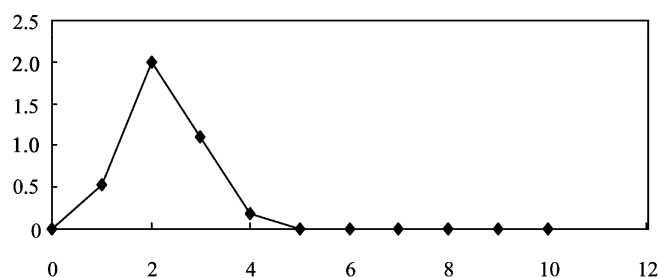


图 2 芍药苷洗脱曲线

3.2.9 树脂重复使用次数的考察 按上述确定吸附、洗脱条件, 取 $0.8327 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 样品溶液进行上

柱吸附和洗脱, 在同一根柱子上重复操作 6 次, 分别计算芍药苷吸附量, 6 次芍药苷比吸附量分别为 5.695, 5.647, 5.258, 4.821, 3.687, 3.228 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由此可见, 树脂重复使用 4 次后, 对芍药苷吸附量明显下降。

3.2.10 验证试验 取 3 批 100 g 牡丹皮药材, 按上述优选好的提取、D 101 大孔树脂分离纯化条件, 做验证试验, 结果见表 6。本方法简便可行, 可以用于丹皮总苷的纯化。

表 6 验证试验考察结果

批次	纯化前		纯化后	
	干膏率 (%)	芍药苷含量 (%)	干膏率 (%)	芍药苷含量 (%)
1	21.38	5.314	5.414	19.71
2	21.47	5.297	5.395	19.56
3	21.52	5.281	5.386	19.62
平均值	21.46	5.297	5.398	19.63
RSD (%)	0.33	0.31	0.265	0.385

4 讨论

采用 D 101 大孔吸附树脂分离提纯牡丹皮提取物中丹皮总苷是可行的。当上样液芍药苷浓度为 $0.83 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ pH 6.5 洗脱流速 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 时, D 101 树脂对芍药苷的吸附效果良好, 比吸附量达 $6.245 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 4 BV 的 70% 乙醇可将吸附在树脂上的丹皮总苷洗脱下来, 解吸率达到 91.25%。通过该工艺, 可以有效去除糖类等水溶性杂质及脂溶性杂质, 选择性地保留有效成分, 芍药苷含量由纯化前的 5.297% 上升为 19.63%。该产品颜色较浅, 吸潮性较低, 有利于制成各种制剂。

与静态吸附相比, 动态吸附的比吸附量偏低, 这可能与动态吸附过程中药液在树脂上停留时间大大缩短有关, 从而影响了树脂的吸附效果。

[参考文献]

- [1] 王祝举, 唐力英, 赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用[J]. 国外医药·植物药分册, 2006, 21(4): 155-159.
- [2] 孙言才, 沈玉先, 孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. 中成药, 2004, 26(7): 579-582.
- [3] 解飞, 封宇飞, 胡欣, 等. HPLC 法测定消银片中丹皮酚和芍药苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 460-462.