

# 大孔吸附树脂纯化肺舒通中丹酚酸 B 的工艺研究

姚樵婷<sup>1</sup>, 李克胜<sup>2</sup>, 张 丽<sup>1</sup>, 丁安伟<sup>1\*</sup>, 袁飞龙<sup>1</sup>, 王兆龙<sup>2</sup>, 张志芬<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046;

2. 南通精华制药股份有限公司, 江苏 南通 226005)

**[摘要]** 目的: 探讨大孔吸附树脂纯化肺舒通中丹酚酸 B 的最佳工艺。方法: 通过动态吸附-解吸相结合的方法, 以丹酚酸 B 吸附量、解吸率为评价指标, 采用高效液相法进行含量测定, 综合评定最佳工艺。结果: HPD-100 大孔吸附树脂纯化效果较好, 其最佳工艺的条件为: 上样液为 90 mL, 吸附速率为  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 水洗量为 1 倍的树脂床体积, 洗脱液为 30% 乙醇 120 mL, 解吸速率为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结论: HPD-100 大孔吸附树脂纯化丹酚酸 B 的最佳工艺稳定、较好。

**[关键词]** 大孔吸附树脂; 丹酚酸 B; 纯化工艺; 中药复方

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)03-0021-03

肺舒通是由金荞麦、丹参等组方制成的口腔喷雾剂, 具有解毒化痰、宣肺平喘等功效, 临床上广泛应用于慢性阻塞性肺病疾病。处方中主要药物之一——丹参主要含有丹酚酸 B 等酚酸类及丹参酮类化合物, 其具有抑制动脉粥样硬化、减少心肌耗氧量、抗肝纤维化、抗衰老、抗肿瘤等作用<sup>[1-4]</sup>。大孔树脂能吸附大量的杂质, 有利于纯化中药提取液, 提高有效成分的含量, 非常明显。为优化肺舒通的制备工艺, 我们采用大孔树脂进行分离纯化, 并将丹酚酸 B 作为检测指标。

## 1 仪器与试剂

岛津(LG-LOAD 泵, SPD-10A 检测器), ODS-3C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), FA1104N 电子天平(精确度为万分之一), 大容量恒温摇床(太仓市实验设备厂, 型号 DHZ-C), 层析柱(2 cm × 20 cm), 真空干燥器(上海精宏实验设备有限公司, DZF-6050 型)。

丹酚酸 B(中国药品生物制品检定所, 111562-200605), 丹参(安徽, 批号 071313) 购于南京药业有限责任公司, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根。HPD-100、D-101、HPD-500、HPD-450、AB-8、NKA-9 大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司, 061013), 甲醇与乙

腈为色谱纯, 水为去离子重蒸水, 其它试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 6 种大孔吸附树脂的预处理** 6 种大孔吸附树脂用 95% 乙醇浸泡 24 h, 使之溶胀后, 弃去乙醇, 再加入 3 倍量的 95% 乙醇加热回流 2 h, 除去树脂中的扩孔剂等有机物, 装柱用时, 用蒸馏水洗至无乙醇味。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取, 丹酚酸 B 对照品 3.36 mg 置 10 mL 的量瓶中, 加甲醇稀释置刻度, 即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

**2.3.1 丹酚酸 B 供试溶液的制备** 取 1 mL 上样药液(含生药量  $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 置 10 mL 量瓶中加入甲醇至刻度, 摇匀, 取上清液 1 mL 以  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液, 即得。

**2.3.2 丹酚酸 B 样品的制备** 取 1 mL 洗脱液, 以  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液, 即得。

**2.4 色谱条件** ODS-3C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为甲醇: 乙腈: 水: 甲酸 = 30: 10: 59: 1, 流速为  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 检测波长 286 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。

**2.5 静态吸附** 分别取 6 种不同大孔树脂 2 g, 精密称定, 经活化处理后, 洗净至无乙醇味, 置 100 mL 的三角烧瓶中, 加入药材提取液 45 mL(含生药量  $0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 置摇床中, 温度 28 °C, 转速  $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 振摇 24 h 后, 取吸附后溶液, 用 HPLC 检测丹

**[收稿日期]** 2008-07-04

**[基金项目]** 江苏省高科技研究计划(医药部分)(BG2006605)

**[通讯作者]** \* 丁安伟, Tel: (025) 85811523; E-mail: awding105@

163.com

酚酸 B 的含量, 计算不同树脂的吸附量, { 吸附量 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) = [ 上样液丹酚酸 B ( $\text{mg}$ ) - 流出液丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) ] / 树脂质量 ( $\text{g}$ ) }, 结果分别见表 1。

**2.6 静态解吸** 将 2.5 中静态吸附的 6 种树脂滤干, 分别加入 70% 乙醇溶液 45 mL, 充分振摇, 置摇床中, 温度 28  $^{\circ}\text{C}$ , 转速 200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 振摇 24 h 后, 取解吸液, 用 HPLC 检测丹酚酸 B 的含量, 计算洗脱液对 6 种树脂中的指标成分的解吸率, { 解吸率 (%) = [ 洗脱液中丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) / 树脂中吸附的丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) ]  $\times$  100% }, 结果见表 1。

表 1 大孔树脂对丹酚酸 B 的静态吸附与洗脱液的解吸

树脂种类	树脂质量 (g)	吸附量 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	解吸量 (mg)	解吸率 (%)
D-101	2.064 0	11.93	16.71	67.87
HPD-100	2.095 2	17.75	23.49	63.16
AB-8	2.013 3	17.32	22.94	65.81
HPD-500	2.082 2	13.93	14.95	51.52
HPD-450	2.025 9	9.856	14.12	70.77
NKA-9	1.999 5	9.376	14.06	75.01

由表 1 可知, HPD-100 大孔树脂对丹酚酸 B 的吸附量最高, 且解吸率也较高。同时, 虽然 NKA-9 和 HPD-450 大孔树脂对丹酚酸 B 的解吸率都明显高于 HPD-100, 但两者吸附量都明显低于 HPD-100, 且其他五种树脂的净解吸量都低于 HPD-100, 故综合考虑, 选择 HPD-100 大孔树脂作为实验用树脂。

**2.7 动态吸附** 取经预处理的 HPD-100 大孔吸附树脂 10 mL (湿体积) 置层析柱 (2 cm  $\times$  20 cm) 中, 径高比为 1:2。取上样液 (含生药量 0.6  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 使树脂吸附饱和, 以 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  的流速吸附, 每 10 mL 收集一份流出液, 共收集 10 份。分别测得每个流份中丹酚酸 B 的含量。以丹酚酸 B 的含量为纵坐标, 流出液的体积为横坐标, 绘制动态吸附曲线, 表明第 8 个流份为明显拐点, 而后的流份中丹酚酸 B 含量上升趋势不明显, 而第 9 个流份后几乎呈平直曲线, 故确定在该条件下的最佳上样量为 90 mL。

**2.8 饱和树脂的梯度解吸** 对 2.6 中已饱和的树脂用 20 mL 蒸馏水洗脱, 弃水液后, 依次用 10%, 30%, 50%, 70% 的乙醇溶液各 60 mL 进行洗脱, 每 20 mL 收集一份洗脱液。测得每个流份中丹酚酸 B 的含量, 结果表明, 30% 乙醇可将丹酚酸 B 洗脱完全。

**2.9 吸附速率的考察** 依上述条件, 90 mL 药液 (含

生药量 0.6  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 以不同流速上样, 20 mL 蒸馏水洗脱后, 弃去水液, 用 120 mL, 30% 乙醇进行解吸, 流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 收集洗脱液, 依据上述 2.4 色谱条件测得吸附量 { 吸附量 ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) = [ 上样液丹酚酸 B ( $\text{mg}$ ) - 流出液丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) ] / 树脂湿体积 ( $\text{mL}$ ) }, 及洗脱率 { 解吸率 (%) = [ 洗脱液中丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) / 树脂中吸附的丹酚酸 B 量 ( $\text{mg}$ ) ]  $\times$  100% }, 见表 2。

表 2 丹酚酸 B 吸附速率考察

吸附速率 ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	吸附量 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	解吸率 (%)
0.5	11.85	52.03
1.0	9.514	50.30
2.0	9.169	59.99
3.0	8.643	60.17
4.0	6.408	79.75

由表 2 可知, 吸附速率越小, 越有利于树脂吸附, 故选择吸附速率为 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.10 解吸曲线的绘制** 以 90 mL 药液 (含生药量 0.6  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 为上样液, 按 2.6 中方法, 使 10 mL (湿体积) HPD-100 树脂吸附。用 20 mL 蒸馏水洗脱, 弃水液后, 用 300 mL 的 30% 乙醇进行洗脱, 流速为 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。每 20 mL 收集 1 份洗脱液。共收集 15 份。分别测得每个流份中丹酚酸 B 的含量。结果用 120 mL 30% 乙醇可将丹酚酸 B 洗脱完全。

**2.11 水洗量考察** 依上述条件, 90 mL 药液 (含生药量 0.6  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 以 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  流速上样, 进行吸附。分别用 10, 20, 30, 40, 50 mL 蒸馏水洗脱后, 用 120 mL, 30% 乙醇进行洗脱, 流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 收集洗脱液, 依据上 2.3 色谱条件, 以丹酚酸 B 为指标, 测得树脂的吸附量, 洗脱液的解吸率, 见表 3。

表 3 丹酚酸 B 水洗量考察

水洗量 (BV)	吸附量 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	解吸率 (%)
1	5.948	46.70
2	6.051	46.99
3	5.299	40.41
4	5.531	39.66
5	5.710	38.19

结果表明, 随着水洗量的增加, 洗脱液对丹酚酸 B 的解吸率降低, 可能是由于在蒸馏水能洗脱部分指标成分。故选择 10 mL 的蒸馏水置换树脂间的药

液,使丹酚酸 B 的损失尽量降低,并洗去药液中的糖类及盐类物质。

### 3 工艺验证

取经预处理的 HPD-100 大孔吸附树脂 10 mL(湿体积)置层析柱(2 cm × 20 cm)中,径高比为 1:2。取上样液(含生药量 0.6 g·mL<sup>-1</sup>) 90 mL 以 0.5 mL·min<sup>-1</sup> 吸附速率上柱吸附,之后用 10 mL 蒸馏水冲洗,再用 120 mL 30% 乙醇以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的速率洗脱。分别收集吸附后液体和洗脱液,用 HPLC 测定丹酚酸 B 的含量,计算吸附量和解吸率。另外,分别取原液和洗脱液,各 3 份,每份 10 mL 放入真空干燥箱中干燥,称重,得 10 mL 药液干燥所得的干膏重,计算纯化前后干膏中丹酚酸 B 的含量, {干膏中丹酚酸 B 含量(g/100 g 干膏) = [HPLC 测定的丹酚酸 B 含量(g·mL<sup>-1</sup>) × 药液体积(mL)] / 干膏重(g) × 100 g 干膏}。以上实验重复 3 次,结果见表 4,表 5。

表 4 以丹酚酸 B 为指标的工艺验证

实验次数	吸附量(mg·mL)	转移率(%)	RSD
1	11.356 8	61.93	1.11
2	9.773 3	62.84	
3	10.901 8	64.68	
平均	10.677 3	63.15	

表 5 纯化前后丹酚酸 B 的纯度比较

实验次数	纯化前		纯化后	
	干膏得率(g/100 g 生药)	丹酚酸 B 的含量(g/100 g 干膏)	干膏得率(g/100 g 生药)	丹酚酸 B 的含量(g/100 g 干膏)
1	30.001 7	1.4161	2.531 1	5.145 7
2	30.205 0	1.400 3	1.646 7	6.906 9
3	30.023 3	1.421 5	2.133 3	6.120 8
平均	30.076 7	1.412 6	2.103 7	6.057 8

由表 4 可知,丹酚酸 B 平均解吸率为 63.15%, RSD 为 1.11%,故可认为该优化工艺合理可行。由表 5 可知,纯化前干膏中丹酚酸 B 的含量平均为 1.412 6 g/100 g 干膏,经此工艺纯化后,干膏中丹酚酸 B 的含量平均为 6.057 8 g/100 g 干膏,是原来的

4.3 倍,说明该工艺确实对复方中丹酚酸 B 有较好的富集纯化作用。

### 4 树脂再生考察

对“工艺验证”实验中吸附后树脂进行树脂再生考察。分别用 50%、70% 和 90% 乙醇各 100 mL 以 1 min·mL<sup>-1</sup> 的流速冲洗树脂柱,之后用蒸馏水冲洗直至无醇味。以验证后的最佳工艺纯化肺舒通上样液,3 次实验结果见表 6。

表 6 以丹酚酸 B 为指标的树脂再生

实验次数	吸附量(mg·mL <sup>-1</sup> )	转移率(%)
1	9.773 3	62.84
2	9.683 5	69.74
3	7.152 2	88.10
平均	8.869 7	73.56

由表 6 可知,树脂再生后对丹酚酸 B 的吸附量略有下降,而转移率则未下降,表现出了良好的吸附性能。

### 5 结论与讨论

经过工艺筛选得到的最佳工艺为:10 mL(湿体积)HPD-100 大孔吸附树脂,径高比为 1:2,肺舒通上样液(含生药量 0.6 g·mL<sup>-1</sup>) 90 mL,吸附速率 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,1 BV 水置换后,120 mL,30% 乙醇洗脱,解吸速率为 1 mL·min<sup>-1</sup>。

在本实验中,有效成分丹酚酸 B 的纯化转移率一直不高(小于 80%)。可能是由于复方提取液成分含量多而复杂,要单独的对某一化学成分进行纯化,以提高纯度,难度大。故通过两个化学成分为指标,综合考察,相互补充,以达到最佳的纯化工艺。

### [参考文献]

- [1] 高堂玲,李群英,陈云凤.慢性阻塞性肺病诊治进展[J].现代临床医学,2007,(33)2:194-196.
- [2] 廖茂梁,张铁军,高文远,等.大孔吸附树脂纯化达原滴丸处方提取液的工艺研究[J].中草药,2008,(39)1:54-57.
- [3] 涂盛辉,邱俊明,邱祖民,等.大孔吸附树脂精制中药栀子中栀子苷的研究[J].南昌大学学报·工科版,2007,(29)4:307-309.
- [4] 付辛芳,刘晓红.丹参的药理作用与临床应用研究进展[J].中国药师,2006,15(1):76-77.