

大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究

李朝霞^{1*}, 李云谷²

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 利用大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸, 提高制剂中生药含量。方法: 采用酸碱浸泡的方式对大孔吸附树脂进行前处理; 采用气相色谱法对树脂洗脱液中的残留物进行检测; 采用显色反应对树脂吸附力进行判定及对洗脱条件进行优选。结果: 基本确定 D101 型大孔树脂富集、纯化丹参总酚酸工艺条件与参数。结论: 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺可行, 能够使丹参总酚酸的含量达到 50% 以上。

[关键词] 丹参总酚酸; 大孔吸附树脂; 比色法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)03-0030-02

丹参是中药常用药材, 主要含有两类有效成分: 水溶性成分和脂溶性成分, 其水溶性成分主要以酚酸类成分为主。统称为丹参总酚酸。丹参总酚酸在水中的溶解性能好, 可采用传统的水提醇沉法进行提取。根据制剂需要和生产可行性, 也可以选用适宜的精制技术如絮凝剂、醇沉、大孔树脂、超滤等精制丹参药材水提物, 富集丹参酚酸类有效部位, 从而提高制剂中生药含量。有报道认为适宜的大孔树脂精制可在保留提取液中酚酸类成分的同时, 大大降低总固形物得率, 从而提高制剂载药量^[1]。近些年应用大孔吸附树脂处理中药提取液的情况增多^[2,3], 但其吸附纯化评价标准和安全性问题尚有争议。采用大孔吸附树脂需要对树脂型号^[4]、树脂前处理、药液上柱吸附分离等进行工艺的确定, 本实验即是采用这种思路对选定的 D101 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺做了研究。

1 材料与仪器

丹参饮片: 同仁堂饮片厂提供。D101 大孔吸附树脂: 天津南开大学化工厂生产。95% 乙醇(分析纯); 10 ppm 的苯乙烯的乙酸乙酯溶液; 三氯化铁-铁氰化钾反应试剂; Molish 反应试剂。AUTO-900 型气相色谱仪, 1022 色谱工作站。Column oven 80; injection block 220; detector block 220。

2 方法与结果

2.1 大孔吸附树脂的前处理 取干树脂加 4 倍量 2.5% 的碱酒精(用 30% 的乙醇加 NaOH 配制)浸泡 48 h, 每日搅拌 3~5 次, 抽去母液, 树脂加 3 倍量的 2.5% 的碱酒精浸泡 48 h, 每日搅拌 3~5 次, 抽去母液。用水洗树脂近中性(pH 8~9)。加 3 倍量 5% 酸酒精(用 30% 乙醇加浓盐酸配制)浸泡 48 h, 每日搅拌 3~5 次, 抽去母液, 用水洗树脂至中性(pH 6), 将树脂装入树脂柱内, 用 4 倍量 95% 乙醇缓慢洗脱 24 h, 放置备用。检测: 1 份的乙醇洗脱液中加入 5 份的蒸馏水, 混合, 溶液不呈现浑浊即可^[5]。

2.2 大孔吸附树脂残留物的含量检查(GC) 按要 求对苯乙烯骨架型大孔吸附树脂通常做 6 种残留物的项目检查, 包括甲苯、二甲苯、二乙烯基苯、烷烃类、苯乙烯和苯。本试验采用气相色谱法对洗脱液中的一种主要成分苯乙烯做了检测。结果在苯乙烯标准品的位置上, 乙醇洗脱液没有出现相应的峰, 且乙醇洗脱液与空白洗脱液的峰形一致。表明大孔吸附树脂的洗脱液中不含有苯乙烯类杂质成分, 树脂洗脱完全。

色谱条件: 色谱柱 二乙烯基-乙基乙烯苯型高分子多孔小球作为载体; 载气: 高纯氮; 助燃气: H₂ 和空气。N₂ 50 mL·min⁻¹; H₂ 50 mL·min⁻¹; Air 500 mL·min⁻¹。

标准溶液: 10 ppm 的苯乙烯的乙酸乙酯溶液

样品溶液: 95% 的乙醇洗脱液(滤纸过滤)

空白溶液: 95% 的乙醇液(滤纸过滤)

2.3 大孔吸附树脂的吸附力测定 称取 20 g 的 D101 大孔树脂 3 份, 处理之后装柱。上样量分别为

[收稿日期] 2007-03-09

[通讯作者] * 李朝霞, Tel: (010) 83911635; E-mail: gmacli@sohu.com

10, 20, 30 mL(以原药材计为 10, 20, 30 g), 吸附 24 h, 水洗脱, 对洗脱液做 Molish 反应及三氯化铁-铁氰化钾显色反应。判别标准: 三氯化铁-铁氰化钾反应出现兰色沉淀表明总酚酸类成分没有被完全吸收, 如果加入三氯化铁-铁氰化钾只是使溶液变成绿色, 则表明总酚酸类成分被吸收完全。Molish 反应(即 α -萘酚反应)用于检查流出液中是否含有多糖及其苷类化合物, 见表 1。由三氯化铁-铁氰化钾显色反应可以判定当生药量与树脂的比例为 1:1 和 1.5:1 时, 总酚酸有漏出现象; 只有当生药量与树脂的比例为 0.5:1 时, 总酚酸类成分才能被完全吸附。由 Molish 反应(即 α -萘酚反应)可以判定 3 份样品反应均呈阳性结果, 表明水能够洗脱树脂上的多糖及其苷类成分。

表 1 大孔吸附树脂吸附力的测定

药材(g): 树脂(g)	三氯化铁-铁氰化钾	α -萘酚
0.5:1	-	+
1:1	+	+
1.5:1	+	+

2.4 洗脱条件的优选 采用优选出的药物与树脂的用量配比装柱上样, 水洗脱至 α -萘酚反应成阴性结果(水洗脱用量大约为生药量的 12 倍), 再分别用 50%、70%、90% 浓度的乙醇进行有效部位的洗脱(醇洗脱用量大约为生药量的 3~4 倍), 显色剂三氯化铁-铁氰化钾判断洗脱终点。以浸膏的得量和总酚酸在浸膏中的含量为考察指标优选出最佳的洗脱条件。结果见表 2。由表上的数据可以看出随着乙醇洗脱浓度的增加, 浸膏的得量也增加, 而总酚酸在浸膏中的含量却在下降, 并且总酚酸的得量(以原药材计)差别不大, 所以选用 50% 的乙醇洗脱, 能将样品中已吸附的酚酸类成分洗脱完全。

表 2 树脂洗脱条件的优选

乙醇的洗脱浓度(%)	提取物得量(g)	总酚酸含量以提取物计(%)	总酚酸含量以生药计(%)
50	0.1417	56.66	1.606
70	0.1881	43.33	1.63
90	0.2002	41.25	1.65

2.5 比色法测定丹参总酚酸及其方法学考察

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶醛标准品 1 mg 置于 1 mL 的容量瓶中, 加少量甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2.5.2 样品溶液的制备 精密称取丹参总酚酸提取物 1 mg, 置于 1 mL 容量瓶中, 加入少量的甲醇溶

解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。

2.5.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品溶液 10, 20, 30, 40, 50 μ L, 置于 25 mL 的容量瓶中, 加入无水乙醇 5.0 mL, 摇匀; 加入 0.3% 的十二烷基硫酸钠 2.0 mL, 2% 三氯化铁-1% 铁氰化钾(1:0.9)显色剂 1.0 mL, 暗处放置 5 min, 再加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸至刻度, 摇匀, 暗处放置 20 min, 同时制备空白液。在 730 nm 处测定吸收值。以吸光值 X 为横坐标, 浓度 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线 $Y = 0.3244X + 7.8 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$ 丹参总酚酸在(11~55) μ g 范围内线性关系良好。

2.5.4 样品的含量测定 精密吸取样品溶液 30 μ L, 按照标准曲线项下进行测量, 测定丹参总酚酸的含量(以原儿茶醛计), 分别为 69.21%、68.54%、69.78%, RSD 为 0.90%。

2.5.5 稳定性实验 精密吸取对照品溶液, 按照标准曲线项下进行显色, 间隔一定时间测定 1 次, 持续 2 h。测得吸光值分别为 0.924, 0.931, 0.938, 0.955, 0.976, RSD 为 2.21%。

2.5.6 加样回收率实验 精密称取已知含量的样品适量, 加入不同量的原儿茶醛对照品溶液, 按供试品溶液的制备方法制样, 依标准曲线项下的方法进行测定, 计算加样回收率, 分别为 95.13%, 105.07%, 101.15%, 100.40%, 97.07%, 平均回收率 99.76%, RSD 为 3.86%。

3 讨论

本实验采用常规的大孔树脂预处理方法, 应用气相色谱仪对残留物(苯乙烯)进行检查, 证明此种前处理方法可行。应用 Molish 化学反应对大孔树脂的吸附力进行判定简单有效。对 D101 型大孔树脂富集、纯化丹参总酚酸工艺条件进行研究, 探索其工艺流程, 建立质量控制体系, 从而确立了富集、纯化丹参总酚酸的可行方法。

[参考文献]

- [1] 张军, 刘璐. 丹参制剂的研究现状及其开发的几点思考[J]. 中草药, 2001, 32(10): 954-955.
- [2] 王志平, 范晋勇, 刘玉强, 等. D301 树脂吸附丹参有效成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 854-858.
- [3] 房信胜, 谭晓梅. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的定性定量分析[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1331-1334.
- [4] 李文春, 李吉良. 不同型号的吸附树脂对丹参水溶性成分的影响[J]. 黑龙江医药, 1999, 12(4): 193-194.