

D₁₀₁ 型树脂对芍药苷吸附分离性能的研究

桂双英*, 周亚球, 柯仲成

(安徽中医学院药学院药剂教研室, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂分离富集赤芍中芍药苷的性能。方法: 采用 HPLC 法测定芍药苷的含量; 考察大孔吸附树脂对芍药苷的吸附性能以及洗脱参数。结果: D₁₀₁ 大孔吸附树脂对提取液中芍药苷的最佳分离条件为: 上柱液浓度为 2.5mg/mL, 流速为 3.6BV/h, 芍药苷比吸附量达 32.2mg/g, 20% 乙醇洗脱率为 91.25%, 芍药苷纯度可达 73.70%。结论: D₁₀₁ 大孔吸附树脂可用于赤芍中芍药苷的分离富集。

[关键词] 大孔吸附树脂; 赤芍; 芍药苷; 吸附; 分离

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0025-03

Adsorption and Separation Properties of D₁₀₁ Resin for Purification of Paeoniflorin

GUI Shuang-ying, ZHOU Ya-qiu, KE Zhong-cheng

(School of Pharmacy, Anhui College of TCM, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To study the separation effect of D₁₀₁ macroporous resin for the purification of Paeoniflorin in *Radix Paeonia*. **Methods:** HPLC was used to analyze the content of Paeoniflorin, and the adsorption performance and the elution parameters were investigated. **Results:** The optimal separation conditions were as follows: the concentration of Paeoniflorin was 2.5mg/mL with a flow rate of 3.6BV/h, and 20% alcohol was used as eluant. The adsorption of Paeoniflorin was 32.2mg/g, and the elution ratio of Paeoniflorin was 91.25%, and the purity of Paeoniflorin reached 73.70%. **Conclusion:** D₁₀₁ resin can be used to refine the Paeoniflorin in the extraction of *Radix Paeonia*.

[Key words] Macroporous resin; *Radix Paeoniae Rubra*; Paeoniflorin; Adsorption; Separation

赤芍为常用中药, 具有清热凉血, 散瘀止痛之功效, 其主要有效成分为芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷等单萜类化合物, 简称赤芍总苷^[1]。大孔吸附树脂为一种有机高聚吸附剂, 具有选择性好、吸附容量大、解吸容易、再生简便等优点, 应用于苷类、黄酮类等成分的富集纯化有较好的效果^[2]。已有报道^[1,3]将这一技术用于芍药苷的纯化, 但本法技术条件要求较高, 其吸附效果易受上样液浓度、流速、洗脱剂等的影响^[4]。本实验旨在通过对 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂富集、纯化芍药苷工艺条件与参

数的研究, 探索其工艺流程, 建立质量控制体系, 从而确立富集、纯化芍药苷的可行方法。

1 仪器与材料

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(日本); 赤芍药材为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根(购于合肥和义堂饮片公司, 经安徽中医学院中药鉴定教研室潘鲁敏副教授鉴定), 芍药苷对照品由中国药品生物制品检定所提供; D₁₀₁ 型大孔吸附树脂(天津骨胶厂); 重蒸水自制, 甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

2 色谱条件

VP-ODS 4.6mm × 150mm 色谱柱(日本); 甲醇-0.5mol/L 磷酸二氢钾(40:65)为流动相; 检测波长 230nm; 流速 0.80mL/min。

[收稿日期] 2005-03-07

[通讯作者] 桂双英, Tel: (0551) 5169222; E-mail: guishy0520@

sohu.com

3 方法与结果

3.1 芍药苷的含量测定^[5]

3.1.1 对照品溶液的制备 精密称取减压干燥 (60℃) 至恒重的芍药苷 17.5mg, 加甲醇溶解定容至 10mL, 精密移取 1mL, 用赤芍流动相稀释至 25mL, 得每 1mL 含 70μg 芍药苷的对照品溶液。

3.1.2 供试品溶液的制备 称取赤芍饮片 100g, 以 70% 乙醇, 6 倍量回流提取 3 次, 每次 1h, 合并提取液, 减压回收乙醇, 真空干燥得赤芍提取物。取提取物约 10mg, 精密称定, 加甲醇溶解后滤过, 定容至 100mL, 制成供试品溶液。

3.1.3 标准曲线的绘制 精密移取芍药苷对照品溶液 1.2.3.4.5mL, 分别加流动相稀释至 10mL。分别进样 20μL, 以峰面积为纵坐标, 芍药苷量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程: $Y = 3754125.4X - 7435.7$, $r = 0.9999$, 表明芍药苷在 0.14μg~ 0.70μg 范围内具有良好的线性关系。

3.1.4 精密度试验 取同一份对照品溶液(浓度 21μg/mL), 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算其 RSD 为 0.37%。

3.1.5 重复性试验 按 3.1.2 项下取同一批赤芍提取物 6 份, 制备样品溶液, 分别进样 20μL, 测得峰面积 RSD 为 1.15%, 表明该法重复性较好。

3.1.6 样品溶液稳定性试验 取供试品溶液, 在 12h 内每隔 3h 进样测定 1 次, 测得供试品溶液中芍药苷的峰面积 RSD 为 0.98%, 结果表明在 12h 内样品溶液稳定性较好。

3.1.7 加样回收率试验 精密称取已知芍药苷含量的赤芍提取物约 5mg, 精密加入芍药苷对照品 (0.175mg·mL⁻¹) 5mL 适量, 依法制备供试品溶液, 分别进样 20μL 测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率实验测定结果

No.	已知量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
1	0.911	0.875	1.773	98.51		
2	0.854	0.875	1.740	101.26		
3	0.920	0.875	1.799	100.46	99.41	1.38
4	0.908	0.875	1.771	98.63		
5	0.868	0.875	1.727	98.17		

3.1.8 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 20μL 进高效液相色谱仪, 测定芍药苷含量, 计算芍药苷纯度为 18.36%。

3.2 工艺条件与参数优化

3.2.1 大孔吸附树脂预处理 大孔吸附树脂用 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 (1:2) 不呈白色混浊为止, 然后以大量水洗至无醇。

3.2.2 静态吸附与解吸 精密称取 D₁₀₁ 型干树脂 1.0g 于 100mL 锥形瓶中, 准确量取芍药苷浓度为 2.3mg/mL, 样品水溶液 10mL, 盖紧瓶塞, 每隔 5min 振摇 10s, 持续 3h, 然后静置 24h, 使其吸附达到平衡后过滤, HPLC 法测定滤液中芍药苷含量, 按下式计算比吸附量: 比吸附量 = (原液浓度 - 吸附液浓度) * 溶液体积 / 干树脂质量。对达到吸附饱和的树脂用 10mL 70% 乙醇解吸, 于 25℃ 在恒温振荡器中振荡 5h, 过滤, 取滤液定容, HPLC 法测定滤液中芍药苷含量, 计算解吸率 (%)。结果见表 2。

表 2 D₁₀₁ 大孔吸附树脂对芍药苷的静态比吸附量和解吸率

No.	比吸附量 (mg/g)	解吸率 (%)
1	85.63	92.14
2	82.69	92.56
3	84.38	93.17
平均	84.23	92.62

3.2.3 动态吸附 将 3 份浓度为 2.3mg/mL 的样品水溶液分别缓慢加入装有 D₁₀₁ 大孔吸附树脂的层析柱 (树脂床体积为 10mL), 控制流速分别为 0.3、0.6、0.9mL/min, 每 10mL 收集一次流份, 测定每个流份的芍药苷含量, 计算 D₁₀₁ 树脂对芍药苷的动态比吸附量, 结果见表 3。

表 3 流速对树脂吸附量的影响

No.	流速 (mL/min)	吸附量 (mg)
1	0.3	336.32
2	0.6	334.91
3	0.9	317.26

由表 3 可知, D₁₀₁ 树脂对芍药苷的吸附以 0.6mL/min 的流速即 3.6BV/h 为较佳, 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, 泄漏前的比吸附量为 32.2mg/g。

3.2.4 上样液浓度的确定 用浓度不同的赤芍提取物水溶液进行吸附实验。结果见图 2。由图 2 可知芍药苷浓度是影响树脂吸附性能的重要因素之一, 样品溶液中芍药苷浓度为 2.5mg/mL 为宜。

3.2.5 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%、

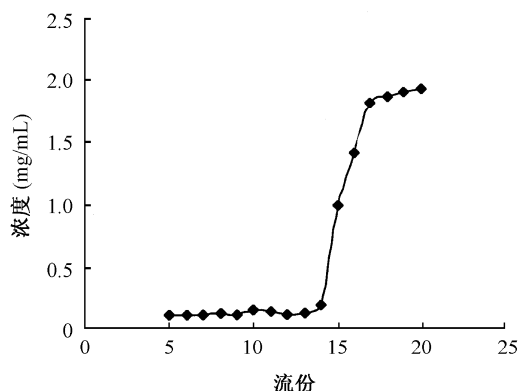


图 1 D₁₀₁树脂对芍药苷的动态吸附率

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%乙醇洗脱液中芍药苷含量最高,5倍柱体积的20%乙醇可以洗出91.25%的芍药苷。故确定20%乙醇为最佳洗脱溶剂。

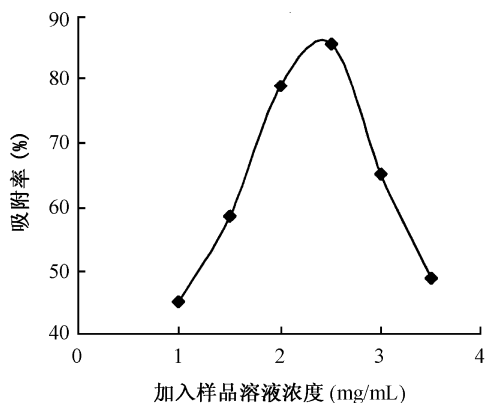


图 2 上样液浓度与吸附率的关系

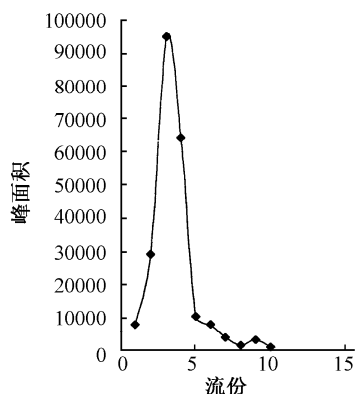


图 3 D₁₀₁树脂的洗脱曲线

3.2.6 洗脱曲线的考察 按上述所确定的吸附和洗脱条件,取样品水溶液进行上柱、吸附,先用水洗脱除去水溶性的杂质,再用20%乙醇洗脱,分段收集20%乙醇洗脱液。每个树脂体积(湿体积)收集1份,共收集10份。分别测定芍药苷含量,结果绘制洗脱曲线见图3。图3结果显示:第5份洗脱液中芍

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5倍树脂体积。

3.2.7 树脂重复使用次数的考察 按上述确定吸附、洗脱条件,取2.5mg/mL样品溶液进行上柱、吸附和洗脱,在同一根柱子上重复操作4次,分别计算芍药苷吸附量,4次芍药苷比吸附量分别为32.9mg/g、29.8mg/g、28.8mg/g、21.6mg/g。由此可见,树脂重复使用3次后,对芍药苷吸附量明显下降,需要再生才可继续使用,故树脂可重复使用3次。

3.2.8 验证试验 精密吸取2.5mg/mL样品溶液100mL依法上柱,平行3份,分别用4BV水、5BV20%乙醇洗脱,收集20%乙醇洗脱液,测定芍药苷含量和固形物重量,结果见表4。

表 4 验证试验结果

No.	芍药苷量(mg)	固形物量(mg)	芍药苷纯度(%)
柱 1	213.72	292.12	73.16
柱 2	212.35	286.50	74.12
柱 3	215.26	291.65	73.81
平均	213.78	290.09	73.70

4 讨论

采用D₁₀₁大孔吸附树脂分离提纯赤芍提取物中芍药苷是可行的。当上样液芍药苷浓度为2.5mg/mL,流速3.6BV/h时,D₁₀₁树脂对芍药苷的吸附效果良好,比吸附量达32.2mg/g;5BV的20%乙醇可将吸附在树脂上的芍药苷洗脱下来,解吸率达到91.25%。通过该工艺,可以有效去除糖类水溶性杂质及脂溶性杂质,选择性地保留有效成分,使芍药苷的含量由原提取物的18.36%提高到73.70%。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] 马双成, 邓少伟. 赤芍总苷的生产工艺条件研究[J]. 中草药, 1998, 29(10): 664-667.
- [2] 李伯庭, 王湘, 李小进. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药, 1990, 21(8): 42-44.
- [3] 金继曙, 都述虎, 种明才. 用大孔树脂分离白芍总甙[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 31.
- [4] 刘斌, 石任兵, 余超. 影响大孔吸附树脂分离中药化学成分的因素[J]. 中草药, 2002, 33(5): 475-476.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 125.