

桂枝茯苓胶囊中白芍牡丹皮共有成分 大孔树脂纯化工艺研究*

□孙永成 黄广伟 尚 强 萧 伟**

江苏康缘药业股份有限公司
(中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)
江苏省企业院士工作站

摘 要:目的:考察白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的大孔树脂纯化工艺。方法:以芍药苷为指标,考察了树脂型号、洗脱溶媒以及树脂重复使用对其吸附、解吸的影响。结果:选用 D101 大孔吸附树脂,30%乙醇洗脱,洗脱率达到 90.07%。树脂可重复使用 18 次后,再彻底进行活化再生。结论:D101 大孔吸附树脂适用于白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的富集。

关键词:芍药苷 大孔树脂 纯化

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.03.019

桂枝茯苓胶囊来源于汉代张仲景《金匮要略》中的古方“桂枝茯苓丸”,是中医药十大经典古方之一,由桂枝、茯苓、牡丹皮、白芍、桃仁 5 味药组成,有着 2000 年的临床用药历史,是历代医家治疗妇科疾病的首选良方。在现代临床上广泛应用于子宫肌瘤、子宫内膜异位症、慢性盆腔炎包块、卵巢囊肿、痛经等妇科血瘀疾病。方中白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。其性味苦、酸,微寒,归肝、脾经,具有平肝止痛,养血调经,敛阴止汗的功效。临床上多用于头痛眩晕,胁痛,腹痛,四肢挛痛,血虚萎黄,月经不调,自汗,盗汗等症。其主要成分为芍药苷(Paeoniflorin)、芍药内脂苷(Albiflorin)、氧化芍药苷(Oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷(Benzoylpaeoni-

florin), 通称芍药总苷(Total Glucosides of Paeony, TGP)^[1-2]。牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,性凉味辛、苦,归心、肝、肾经。具有清热凉血、活血化瘀功效。其主要成分为丹皮酚(Paeonol)、芍药苷(Paeoniflorin)、丹皮酚苷(Paeonoside)、丹皮酚原苷丹皮酚新苷(Apiopaeonoside)、苯甲酰芍药苷(Benzoylpaeoniflorin)、氧化芍药苷(Oxypaeoniflorin)、2,3-二羟基-4-甲氧基苯乙酮、2,5-二羟基-4-甲氧基苯乙酮、3-羟基-4-甲氧基苯乙酮、Paeonilide、挥发油及植物甾醇等^[3]。

大孔吸附树脂是 20 世纪 60 年代发展起来的一类具有大孔结构的有机高分子共聚体,因其多孔性结构而具筛选性,又通过表面吸附、表面电性或形成氢键而具有良好的吸附性能。大孔树脂具有选择性好、再生方法简便、使用周期长等特点,近 10 余年来

收稿日期:2010-06-04

修回日期:2010-09-16

* 科学技术部国家重大新药创制项目(2009ZX09313-032):创新中药中试放大研究技术平台,负责人:萧伟。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,主要研究方向:中药新制剂的研究与开发,Tel:0518-85521956,E-mail:wzhzh-nj@tom.com。

逐渐被应用于中草药化学成分的提取分离和中药新药的开发研制。本实验对白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的大孔树脂纯化工艺进行研究,为大孔树脂纯化芍药苷的产业化提供实验依据。

一、仪器与试药

Agilent 1100 液相色谱仪,配置 DAD 检测器;高速离心机(Cen2rifuge5415D 德国);白芍饮片、牡丹皮饮片(购买于安徽亳州药材市场);乙腈(HPLC 级,美国 TEDIA 公司);其余试剂为分析纯;芍药苷(中国药品生物制品检定所,批号:110736-200732)。乙腈(HPLC 级,美国 TEDIA 公司);甲醇(AR 级,南京化学试剂有限公司);D101 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司);磷酸、三乙胺、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯。

二、方法与结果

1. 含量测定方法

(1) 色谱条件。

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(色谱柱:Kromasil C₁₈, 250mm×4.6mm, 5μm);以乙腈-水-磷酸-三乙胺(14:86:0.08:0.08)为流动相;流速为 1mL·min⁻¹;检测波长为 230nm。理论板数按芍药苷峰计算,应不低于 6000。

(2) 标准曲线的制备。

称取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成浓度为 0.31mg·mL⁻¹ 的对照品储备液,分别量取一定体积上述溶液,加甲醇配制成 15.5μg·mL⁻¹、31μg·mL⁻¹、62μg·mL⁻¹、124μg·mL⁻¹、186μg·mL⁻¹、248186μg·mL⁻¹ 系列浓度的对照品溶液,进样量 10μL,以进样浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。结果表明芍药苷回归方程为 $y=13.253x-5.9663$,范围为 15.5~248μg·mL⁻¹,相关系数 $r=0.9999$ 。

(3) 供试品溶液的制备。

取得测液适量,置 50mL 量瓶中,加 50%乙醇 40mL,超声(250W,40KHZ)30min,放冷,用 50%乙醇补足至刻度,摇匀即得。

(4) 稳定性试验

取白芍、牡丹皮药材粉末各 0.3g,精密称定,置 25mL 量瓶中,加 50%乙醇

20mL,超声处理(功率 250W,频率 40kHz)30min,放冷,用 50%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 2mL,置 10mL 量瓶中,用 50%乙醇稀释至刻度,摇匀,作供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10μL,分别第 0、2、4、8、12h 进样一次,共进样 5 次,测得峰面积积分值,计算 $RSD=1.3\%$ 。结果表明芍药苷在 12h 内基本稳定。结果见表 1。

2. 大孔吸附树脂的处理^[4-5]

(1) 大孔树脂的预处理。

将新购进的大孔吸附树脂 D101、D201、D301 大孔吸附树脂乙醇湿法装柱,用乙醇浸洗,2h 循环一次,用 3 倍量乙醇洗脱树脂柱,至乙醇洗脱液紫外分光光度法 254nm 波长下检测无吸收时,预处理结束。

(2) 再生。

将使用后的大孔吸附树脂,用 95%乙醇洗脱至无色,加入高于树脂层 10cm 的 95%乙醇浸泡 2h 后,然后用 95%乙醇通柱淋洗,当通柱淋洗完 5 倍柱体积后,用净水淋洗,直到洗至无醇味,即可。

3. 纯化工艺实验

(1) 白芍、牡丹皮浓缩液的制备。

取等量的白芍、牡丹皮饮片用 8 倍 70%乙醇提取 2 次,每次 2h,药液滤过,合并,减压浓缩至每毫升药液相当于生药 1g,离心,离心液备用。

(2) 树脂型号的选择。

称取预处理后的 D101、D201、D301 树脂各 15g,置烧杯中,加入白芍、牡丹皮浓缩液 100mL,搅拌吸附 30min,静置 24h,滤过,取续滤液制备供试品溶液,测定芍药苷含量,计算静态饱和吸附量。将上述 3 种吸附后的树脂用 95%乙醇在索氏提取器中抽提 8h,取提取液制备供试品溶液,测定芍药苷含量,计算解吸率。结果见表 2。

表 1 稳定性考察表

测定时间(h)	0	2	4	8	12	RSD(%)
峰面积积分值(Y)	398.9	402.0	399.7	400.4	411.9	1.3

表 2 不同型号大孔吸附树脂吸附容量与解吸率的比较

树脂型号	浓缩液中芍药苷总量(mg)	吸附残液中芍药苷总量(mg)	树脂吸附总量(mg)	树脂吸附容量(mg·g ⁻¹)	解吸率(%)
D101	2519.00	2164.40	354.60	23.64	90.18
D201	2519.00	2268.95	250.05	16.67	88.40
D301	2519.00	2251.10	267.90	17.86	91.72

由表 2 可知,各不同型号树脂吸附容量差异明显,D101 型大孔吸附树脂吸附容量最大,解吸效果较好,因此我们选用 D101 大孔吸附树脂进行纯化工艺研究。

(3) 静态吸附实验验证。

称取预处理后的 D101 树脂 15g,置烧杯中,加入白芍、牡丹皮浓缩液 100mL,搅拌吸附 30min,静置 24h,滤过,取续滤液制备供试品溶液,测定芍药苷含量,计算静态饱和和吸附量。结果见表 3。

(4) 洗脱溶媒的选择。

取白芍、牡丹皮浓缩液适量上柱,依次用纯化水 200mL、10%乙醇 150mL、30%乙醇 300mL、50%乙醇 150mL 梯度洗脱,洗脱液流速为 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,纯化水、50%乙醇洗脱液每 50mL 收集一份,共 7 份,10%、30%乙醇,每 25mL 收集一份,共 18 份,测定芍药苷含量,以容量编号(X)和芍药苷总量(Y)为坐标绘制洗脱曲线。见图 1。

洗脱曲线显示:芍药苷主要集中在 10%和 30%乙醇洗脱液中,占全部醇洗脱液中芍药苷的 90.07%,二者所占百分比分别为 38.15%、51.92%。且 30%乙醇洗脱的解吸速度比 10%乙醇快,故确定洗脱条件为先用纯化水洗去水溶性杂质,再用 30%乙醇洗脱芍药苷,收集 30%乙醇洗脱部分。

(5) 使用次数对树脂吸附率影响。

为保证大生产过程中产品质量的稳定,防止有效成分流失,考察了 D101 大孔吸附树脂再生后,吸附率的变化趋势,以确定 D101 大孔吸附树脂重复使用次数。本次 D101 大孔树脂共使用 18 次,芍药苷的变化趋势结果见图 2。

由图 2 可知,在上述工艺条件下,D101 大孔吸附树脂重复使用 18 次吸附率下降约 29%,暂定树脂可重复使用 18 次。

三、讨 论

本实验选用非极性(D-101)、极性(D-201)、中极性(D-301)3 种型号大孔树脂对白芍、牡丹皮中共有成分芍药苷的吸附、解吸情况进行考察。结果表明,D101 型树脂吸附容量大,解吸效果较好。

本实验中图 2 芍药苷大孔树脂吸附

率变化曲线数据第 2 次有吸附率上升趋势,原因为大孔树脂静态吸附药液后,供试品处理过程中的操作误差造成的,对大孔树脂吸附率的总体变化规律不会产生根本性的影响。本实验根据文献资料及大孔树脂生产厂家提供方法进行大孔树脂的活化再生^[5],为生产中常规再生方法,树脂的再生工艺应能保证再生后树脂性能的相对稳定。一般情况下,纯化同一种药物的大孔树脂,当其吸附量下降

表 3 静态饱和和吸附量验证

浓缩液中芍药苷总量(mg)	吸附残液中芍药苷总量(mg)	树脂吸附总量(mg)	树脂吸附容量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
2519.00	2166.05	352.95	23.53

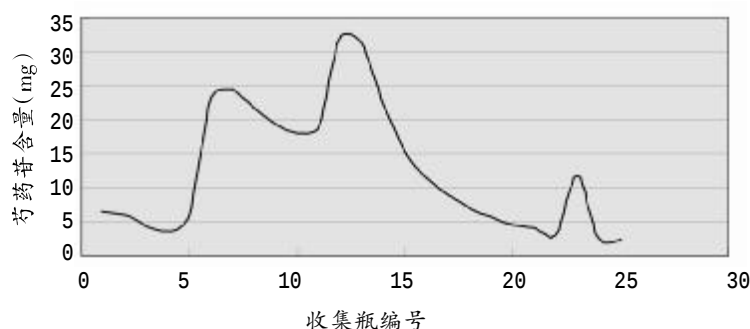


图 1 芍药苷洗脱曲线

使用次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
吸附率($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	22.05	23.66	21.11	21.25	21.16	20.63	20.97	20.24	19.76
使用次数	10	11	12	13	14	15	16	17	18
吸附率($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	19.72	19.68	19.34	18.91	18.29	17.75	17.16	16.83	15.50

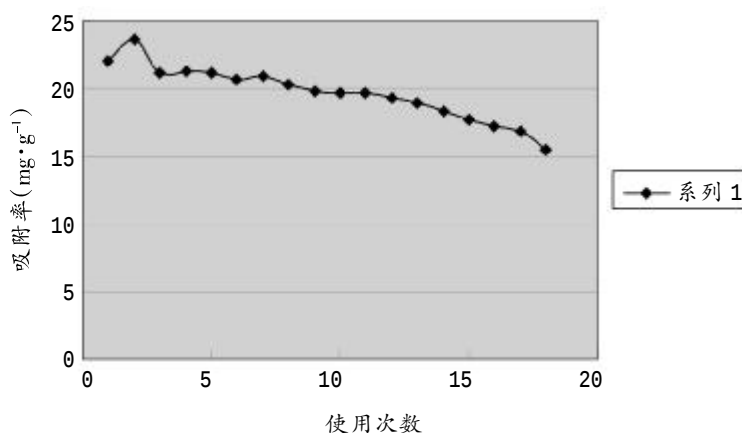


图 2 芍药苷大孔树脂吸附率变化曲线

30%以上时,则应视为不宜再用^[6]。本实验考察了树脂再生次数对吸附性能的影响,为大孔树脂的产业化应用提供数据支持。

参考文献

- 1 张云. 白芍药材产地加工工艺初探. 中国中药杂志, 2007, 32 (10): 993-995.
- 2 李越峰, 严兴科, 李廷利, 等. 白芍高效液相色谱指纹图谱的研究. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2473-2474.
- 3 李方军. 牡丹皮化学成分及药理作用研究进展. 安徽医药, 2004, 8(1): 9-10.
- 4 刘虹, 王萌, 郝彧, 等. 大孔树脂纯化赤芍提取物的工艺考察. 天津中医药大学学报, 2009, 28(3): 142-145.
- 5 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 4(3): 22-28.
- 6 聂晓玉, 尚诚, 王雅亮, 等. 大孔吸附树脂分离白芍中芍药苷实验研究. 中成药, 2005, 27(3): 350-351.

Study on the Purification Technology of Macroporous Resin from Both Radix Paeoniae Alba and Cortex Mouta in Guizhi-Fuling Capsules

Sun Yongcheng, Huang Guangwei, Shang Qiang, Xiao Wei

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study aimed to evaluate the purification technology on macroporous resin, which existed both in Radix Paeoniae Alba and Cortex Moutan. Paeoniflorin is used as an index for the evaluation of resin model, elution solvent and adsorption and desorption effects of reused resin. The results showed that the elution rate of using D101 macroporous resin and 30% ethanol elution is 90.07%. And after 18 times repetitive using, the resin can be thoroughly activated and regenerated. It is concluded that the D101 pocket polymeric adsorbent is suitable for the concentration of paeoniflorin in both Radix Paeoniae Alba and Cortex Moutan.

Keywords: Paeoniflorin, macroporous resin, purification

(责任编辑:李沙沙, 责任译审:王 晶)