

复合树脂法精制纯化黄香颗粒活性成分的工艺研究

刘宪勇*,孙克明,刘世军,王 岩(武警山东省总队医院,济南 250014)

中图分类号 R282.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1840-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.35

摘要 目的:优化黄香颗粒活性成分的精制纯化工艺。方法:采用AB-8树脂+聚酰胺树脂的复合树脂法,以总蒽醌及总黄酮的吸附率和解吸率为指标,优选复合树脂的组成比、上样液质量浓度、上样液量、上样液流速、洗脱剂体积分数、洗脱剂体积、洗脱流速等工艺参数,确定最优工艺并进行验证。结果:复合树脂中AB-8树脂与聚酰胺树脂组成比为1.5:1;纯化工艺为取质量浓度为0.25 g(药材)/ml的上样液,上样液量为4倍柱体积(BV),以流速为2 BV/h进行吸附;吸附后先用流速为2 BV/h的3 BV水洗脱,再用流速为1 BV/h的4 BV 70%乙醇洗脱。验证试验所得蒽醌黄酮混合物中总蒽醌含量为35.05%,收率为53.14%;总黄酮含量为45.14%,收率为52.59%。结论:采用AB-8树脂及聚酰胺树脂组成的复合树脂及相关工艺参数可用于精制纯化黄香颗粒的活性成分。**关键词** 黄香颗粒;复合树脂法;总蒽醌;总黄酮;精制纯化工艺;吸附率;解吸率

Study on Refined Purification Process of Active Ingredients from Huangxiang Granules by Composite Resin Method

LIU Xian-yong, SUN Ke-ming, LIU Shi-jun, WANG Yan (Armed Police Corps Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the refined purification process of active ingredients from Huangxiang granules. METHODS: With the indexes of adsorption and desorption rate of the total anthraquinones and total flavonoids, composite resin method (AB-8 resin and polyamide resin) was used to optimize the process parameters in respects of resin composition ratio, mass concentration of sample solution, volume of sample solution, flow rate of sample solution, elution volume fraction, elution volume and elution flow rate to determine the optimal process. Verification test was conducted. RESULTS: In the composite resin, the composition ratio of AB-8 resin and polyamide resin was 1.5:1. The purification process was as follow as 0.25 g (medicine material)/ml of sample solution, 4 times BV at the flow rate of 2 BV/h for adsorption; after adsorption, it was eluted firstly with 3 BV water at the flow rate of 2 BV/h and then with 4 BV 70% ethanol at the flow rate of 1 BV/h. Verification test showed that the content of total anthraquinone in the anthraquinone flavonoid compounds was 35.05% and yield was 53.14%; the content of total flavonoid was 45.14% and yield was 52.59%. CONCLUSIONS: Composite resin method (AB-8 resin and polyamide resin) is simple, feasible and can be used in the refined purification of active ingredients from Huangxiang granules.

KEYWORDS Huangxiang granules; Composite resin method; Total anthraquinones; Total flavonoids; Refined purification process; Adsorption rate; Desorption rate

黄香颗粒收载于国家药品标准中,标准编号为WS-10902(ZD-0902)-2002-2012Z,是由大黄、广藿香2味药材制成的制剂^[1]。在藏医中,该方主要用于三大因素平衡紊乱,龙、赤巴、培根功能失调,气血上升,血瘀痰阻所致高脂血症;中医中主要用于活血化瘀降脂,治疗痰浊湿阻所致高脂血症^[1]。广藿香中黄酮类成分是除广藿香挥发油外的另一类活性组分,但传统制备方法未对广藿香中的黄酮^[2-3]进行提取。对于含有该2味药材的药物,通常的提取方法为对各药材成分分别进行提取、精制浓缩,操作烦琐、生产周期长,因此其制备工艺有待进一步优化。故笔者在本研究中拟通过AB-8树脂及聚酰胺树脂复合树脂法,对大黄及广藿香的混合提取浓缩液进行精制纯化,以简化黄香颗粒的制备工艺,提高提取效率。

1 材料

1.1 仪器与树脂

UV-2450型紫外分光光度计、AUW220D型电子天平(日本岛津公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);聚酰胺树脂(上海摩速科学器材有限公司,目数:

30~60);LSA-21、XDA-8、D101大孔树脂(西安蓝晓科技有限公司,医用级);AB-8、ADS-17、HPD-300、NKA-9大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司,医用级)。

1.2 药材与试剂

广藿香、大黄饮片(广东达仁堂中药饮片有限公司,批号分别为:20131211、20131205);大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度:100%)、芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:90.5%)均来源于中国食品药品检定研究院;试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大黄提取浓缩液的制备^[4]

取大黄200 g,加70%乙醇提取3次,第1次加2 000 ml,提取1 h;第2、3次加1 600 ml,各提取1 h。合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,离心(3 000 r/min,离心半径为7.3 cm)15 min,取上清液,加水至药材总质量的4倍体积,得大黄提取浓缩液800 ml。

2.2 广藿香提取浓缩液的制备^[2-3]

取广藿香200 g,用水蒸气蒸馏法^[5]提取挥发油,水提液滤

*主管药师,硕士。研究方向:药剂学。E-mail:msht28@sina.com

过,减压浓缩至50℃以下、相对密度为1.15~1.25的清膏,加乙醇使成70%体积分数,2~10℃静置24h,滤过,减压回收乙醇至无醇味,得醇沉浓缩液备用。药渣加70%的乙醇提取2次,第1次加药材总质量的8倍体积提取2h,第2次加药材总质量的8倍体积提取1h;合并提取液,减压回收乙醇至无醇味。合并上述醇沉浓缩液及醇提浓缩液,离心(3000 r/min,离心半径为7.3 cm)15 min,上清液加水至药材总质量(200 g)的4倍体积,得广藿香提取浓缩液800 ml。

2.3 大黄总蒽醌含量的测定^[6]

精密称取大黄素对照品5.0 mg,置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得大黄素对照品溶液。精密量取对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于25 ml量瓶中,加1%醋酸镁甲醇溶液稀释并定容至刻度,摇匀,放置,显色30 min,于509 nm波长处测定吸光度。以大黄素对照品质量浓度($c, \mu\text{g/ml}$)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标进行回归,绘制标准曲线方程为 $A=0.00181c+0.00334$ ($r=0.9995$),表明大黄素检测质量浓度线性范围为4~24 $\mu\text{g/ml}$ 。经方法学考察,建立的含量测定方法精密度良好($\text{RSD}=2.13\%$, $n=6$);样品溶液在6 h内基本稳定,稳定性良好($\text{RSD}=0.71\%$, $n=6$);平均回收率为100.03%($\text{RSD}=2.01\%$, $n=6$),准确度良好。

测定时吸取适量待测样品,置于25 ml量瓶中,加1%醋酸镁甲醇溶液稀释并定容至刻度,摇匀,放置,显色30 min,于509 nm波长处测定吸光度,根据回归方程计算总蒽醌含量。

2.4 广藿香总黄酮含量的测定^[7]

精密称取芦丁对照品10 mg,置于50 ml量瓶中,加70%乙醇适量,超声溶解,放冷,加70%乙醇定容至刻度,摇匀,即得芦丁对照品溶液。精密量取对照品溶液1、2、3、4、5、6 ml,分别置于25 ml量瓶中,各加水至6.0 ml,5%亚硝酸钠溶液1 ml,混匀,放置6 min;再加10%硝酸铝溶液1 ml,摇匀,放置6 min;加氢氧化钠试液10 ml,再加水定容至刻度,摇匀,放置15 min。在500 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标、质量浓度($c, \mu\text{g/ml}$)为横坐标进行回归,绘制标准曲线方程为 $A=0.01079c+0.04559$ ($r=0.9989$)。结果显示,芦丁检测质量浓度线性范围为8~48 $\mu\text{g/ml}$ 。经方法学考察,建立的含量测定方法精密度良好($\text{RSD}=1.92\%$, $n=6$);样品溶液在8 h内基本稳定,稳定性良好($\text{RSD}=0.65\%$, $n=6$);平均回收率为99.81%($\text{RSD}=1.94\%$, $n=6$),准确度良好。

测定时吸取适量待测样品,置于25 ml量瓶中,照上述方法,自“加水至6.0 ml”起,依法测定吸光度,根据回归方程计算总黄酮含量。

2.5 树脂的筛选^[8]

2.5.1 静态吸附 准确称量8种树脂各20 g,每种树脂称取2份,分别加入2种提取浓缩液各40 ml(每4 ml药液相当于1 g药材),置于摇床上振摇24 h,抽滤,测定滤液的吸光度,计算总蒽醌及总黄酮质量浓度及各树脂的吸附率^[9]: $\text{吸附率}=(\text{吸附前样品液的起始质量浓度}-\text{吸附后样品液的质量浓度})/\text{吸附前样品液的起始质量浓度}\times 100\%$ 。

2.5.2 静态解吸附 取抽滤后的树脂,加85%乙醇50 ml进行解吸附,置于摇床上,8 h后过滤,测定滤液的吸光度,计算总蒽醌及总黄酮质量浓度及各树脂的解吸率: $\text{解吸率}=(\text{解吸附液质量浓度}\times\text{吸附液体积})/[(\text{吸附前样品液的起始质量浓度}-\text{吸附后样品液的质量浓度})\times\text{样品液体积}]\times 100\%$ 。另, $\text{收率}(\%)=\text{吸附率}(\%)\times\text{解吸率}(\%)$ 。

结果显示,以收率计,8种树脂中AB-8树脂对大黄总蒽醌富集效果最好,聚酰胺树脂对广藿香总黄酮富集效果最好,收率均接近50%,详见表1。

表1 不同型号树脂对总蒽醌、总黄酮吸附性能的比较

Tab 1 Comparison of different types of resin on the adsorption performance of the total anthraquinones and the total flavonoids

成分	树脂型号	吸附率, %	解吸率, %	收率, %
总蒽醌	聚酰胺	63.29	76.46	48.39
	LSA-21	61.42	75.89	46.61
	XDA-8	69.17	65.25	45.13
	D101	64.32	72.51	46.64
	AB-8	65.37	75.86	49.59
	ADS-17	58.93	77.27	45.54
	HPD-300	66.25	73.43	48.65
	NKA-9	60.34	72.87	43.97
	总黄酮	聚酰胺	61.32	81.34
LSA-21		60.31	81.15	48.94
XDA-8		73.39	60.85	44.66
D101		72.59	67.24	48.81
AB-8		67.45	71.54	48.25
ADS-17		59.86	71.94	43.06
HPD-300		65.72	75.01	49.30
NKA-9		56.03	81.27	45.54

2.6 树脂混合比例筛选

为了简化工艺流程,本试验将大黄及广藿香的提取浓缩液合并后,通过以不同比例AB-8树脂及聚酰胺树脂混合的复合树脂柱,筛选出2种树脂的最优混合比例,结果见表2、图1。

表2 不同比例的复合树脂吸附性能比较

Tab 2 Comparison of the adsorption performance of composite resin with different ratios

AB-8/聚酰胺	总蒽醌			总黄酮		
	吸附率, %	解吸率, %	收率, %	吸附率, %	解吸率, %	收率, %
4:1	68.97	77.35	53.35	66.01	74.36	49.09
2:1	68.34	76.88	52.54	65.27	78.45	51.21
1:1	65.57	75.64	49.60	64.68	79.34	51.32
1:2	64.29	73.42	47.20	64.27	80.19	51.54
1:4	63.72	71.67	45.67	63.97	80.85	51.72

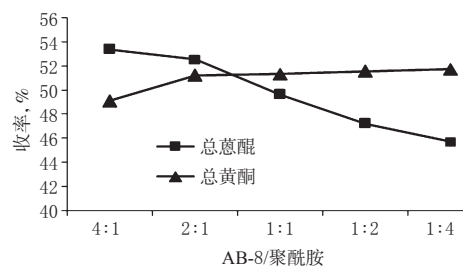


图1 不同比例的复合树脂吸附性能比较

Fig 1 Comparison of the adsorption performance of composite resin with different ratios

由表2和图1可以看出,AB-8及聚酰胺2种树脂按照不同比例混合后对大黄总蒽醌和广藿香总黄酮的收率均有影响,其中总蒽醌的收率随着复合树脂中聚酰胺比例的升高而缓慢下降,总黄酮的收率则随着复合树脂中聚酰胺比例的升高而逐渐增加。两条曲线交点对应的AB-8与聚酰胺的比例约为1.5:1,经验证,此时总黄酮和总蒽醌二者的收率均能达到

51%。因此,确定1.5:1为2种树脂最优比例。验证试验结果见表3。

表3 复合树脂组成比例验证试验结果

Tab 3 Results of verification test of composite resin composition ratio

试验次数	大黄总蒽醌			广藿香总黄酮		
	吸附率, %	解吸率, %	收率, %	吸附率, %	解吸率, %	收率, %
1	66.83	76.38	51.04	65.18	78.64	51.26
2	67.05	76.21	51.10	65.07	78.40	51.01
3	66.75	76.45	51.03	64.97	78.59	51.06

2.7 树脂纯化工艺的筛选

在上述结果基础上,继续以总蒽醌和总黄酮的吸附率及解吸率为指标,对影响纯化工艺的上样参数(上样液质量浓度、上样液量、上样液流速)和洗脱参数(洗脱剂体积分数、洗脱剂体积、洗脱流速)等进行了考察。

2.7.1 上样液质量浓度 合并大黄及广藿香的提取浓缩液,分别制备成0.125、0.25、0.50、0.75 g(药材)/ml的药液上样,上样液量为4倍柱体积(BV),流速为2 BV/h,计算总蒽醌及总黄酮的吸附率,结果见表4、图2。

表4 不同上样参数对吸附率的影响(%)

Tab 4 Effects of different sampling parameters on adsorption rate(%)

成分	上样液质量浓度, g(药材)/ml				上样液量, BV				上样液流速, BV/h			
	0.125	0.25	0.50	0.75	3	4	5	6	1	2	3	4
总蒽醌	71.58	70.87	65.41	61.25	67.41	70.52	70.94	71.12	71.07	70.84	67.35	63.54
总黄酮	66.64	65.71	60.80	57.59	61.25	65.92	66.06	66.15	66.13	65.92	61.74	59.26

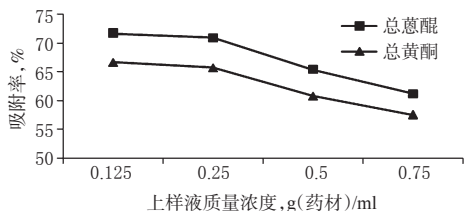


图2 不同上样液质量浓度对吸附率的影响

Fig 2 Effects of different concentrations of sample solution on adsorption rate

表4、图2结果显示,在相同上样液量和流速下,吸附率与上样质量浓度成反比,在低质量浓度下对吸附更有利;但质量浓度过低,药液体积量太大,上样周期会延长。因此综合两方面考虑确定最优上样质量浓度为0.25 g(药材)/ml药液,即上样液体积数相当于药材总质量的4倍。

2.7.2 上样液量 分别以3、4、5、6 BV的药液量上样,上样液质量浓度为0.25(g)药材/ml药液,流速2 BV/h,计算总蒽醌及总黄酮的吸附率,结果见表4、图3。

表4、图3结果显示,树脂对黄酮的吸附基本上与上样液量成正比,在4 BV时吸附曲线逐渐平缓,吸附趋于饱和,因此最优上样液量为4 BV。

2.7.3 上样液流速 分别以1、2、3、4 BV/h的流速通过树脂柱,上样液质量浓度为0.25 g(药材)/ml药液,上样液量为4 BV,计算总蒽醌及总黄酮的吸附率,结果见表4、图4。

表4、图4结果显示,随着上样液流速升高,总黄酮的吸附率不断降低,1 BV/h与2 BV/h效果相差不大,因此从节省时间的角度考虑,确定以2 BV/h作为最优上样流速。

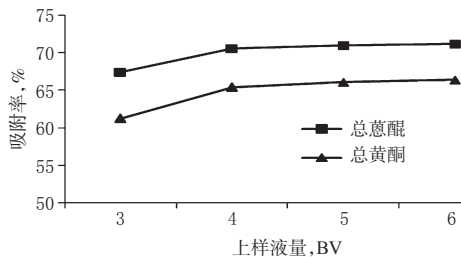


图3 不同上样液量对吸附率的影响

Fig 3 Effects of different volume of sample solution on adsorption rate

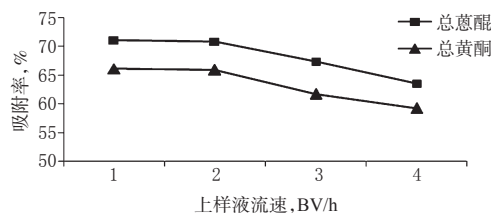


图4 不同上样液流速对吸附率的影响

Fig 4 Effects of different flow rate of sample solution on adsorption rate

2.7.4 洗脱剂体积分数 药液通过树脂柱吸附后,用3 BV水洗柱,再分别用体积分数为30%、50%、70%、85%的乙醇洗脱,每种洗脱液收集4 BV,计算总蒽醌及总黄酮解吸率,结果见表5、图5。

表5 不同洗脱参数对解吸率的影响(%)

Tab 5 Effects of different elution parameters on desorption rate(%)

成分	洗脱剂体积分数, %				洗脱剂体积, BV				洗脱流速, BV/h			
	30	50	70	85	2	3	4	5	1	2	3	4
总蒽醌	62.06	70.74	76.17	77.05	65.34	72.65	76.06	76.62	76.28	74.29	71.34	67.14
总黄酮	61.87	70.27	79.51	79.82	69.48	74.61	80.45	81.04	80.12	77.34	75.48	71.64

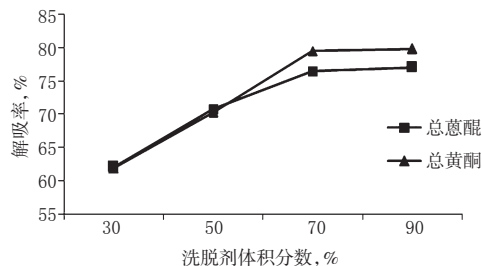


图5 不同洗脱剂体积分数对解吸率的影响

Fig 5 Effects of different elution volume fraction on desorption rate

表5、图5结果显示,随着乙醇体积分数的不断增加,两者解吸率不断上升;当到达70%后,解吸率增加不明显,即乙醇体积分数再增大时对总蒽醌及总黄酮的解吸影响不大。因此从节省原料的角度考虑,选取70%为洗脱剂的最优体积分数。

2.7.5 洗脱剂体积 药液通过树脂柱吸附后,用3 BV水洗柱,再用70%乙醇(2、3、4、5 BV)分别以1 BV/h的流速进行洗脱,每种洗脱液各收集1 BV,计算总蒽醌及总黄酮的解吸率,结果见表5、图6。

表5、图6结果显示,当洗脱剂体积为4 BV时,已基本达到解吸平衡,此时再增加洗脱剂体积对两者解吸率影响不大,因

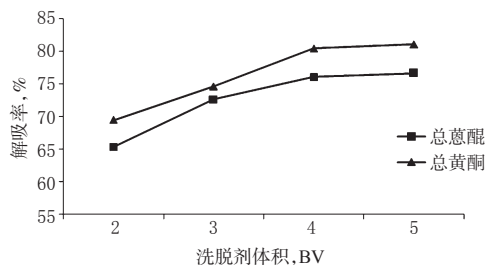


图6 不同洗脱剂体积对解吸率的影响

Fig 6 Effects of different elution volume on desorption rate

此选定4 BV 作为优选的洗脱剂体积。

2.7.6 洗脱流速 药液通过树脂柱吸附后,用3 BV水洗柱,再用4 BV、70%乙醇分别以1、2、3、4 BV/h 的流速进行洗脱收集洗脱液,计算总蒽醌及总黄酮解吸率,结果见表5、图7。

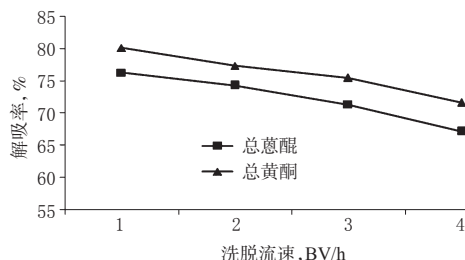


图7 不同洗脱流速对解吸率的影响

Fig 7 Effects of different elution flow rate on desorption rate

表5、图7结果显示,洗脱流速越快,两者解吸率越小,1 BV/h 时的解吸率最大,因此确定以1 BV/h 为最优洗脱流速。

综合上述结果可知,以0.25 g(药材)/ml 药液质量浓度、4 BV 上样液量、2 BV/h 的流速通过复合树脂柱进行吸附时效果较好;以4 BV 的70%乙醇、1 BV/h 的流速进行洗脱时效果较好。

2.8 验证试验

根据以上试验结果,最终确定树脂纯化工艺为:以1.5:1 的AB-8树脂与聚酰胺树脂组成复合树脂柱;药液质量浓度为0.25 g(药材)/ml,上样液量为4 BV,其以2 BV/h 的流速通过复合树脂柱进行吸附;吸附后先用3 BV 的水洗脱,流速为2 BV/h,弃去水洗液,再用4 BV 的70%乙醇洗脱,洗脱流速为1 BV/h。所得蒽醌黄酮混合物中总蒽醌含量为35.05%,收率为53.14%;总黄酮含量为45.14%,收率为52.59%,具体见表6。

表6 精制纯化工艺验证试验结果(%)

Tab 6 Results of verification test of refined purification process(%)

试验编号 及均值	总蒽醌				总黄酮			
	吸附率	解吸率	收率	含量	吸附率	解吸率	收率	含量
1	70.12	75.89	53.52	35.46	65.87	80.06	52.74	45.69
2	69.77	75.02	52.34	34.67	66.32	80.59	53.45	45.02
3	70.27	76.22	53.56	35.02	65.21	79.12	51.59	44.72
平均值			53.14	35.05			52.59	45.14
RSD			1.30	1.12			1.78	1.11

3 讨论

根据文献[9-10],大黄的主要功效成分为总蒽醌,广藜香的主要功效成分为挥发油和总黄酮。2味药材均是处方中的

常用药材,临床应用广泛,但针对二者的混合提取方法目前还未见文献报道。笔者将处方中2味药材提取后混合,再通过特选的复合树脂柱及优选的工艺参数,使总蒽醌及总黄酮同时得到最大程度的富集纯化。

本试验以总蒽醌及总黄酮含量作为考察指标,分别选用大黄素及芦荟作为对照品。为了能简便、快捷地进行工艺筛选,以分光光度法进行了含量测定,故其中大黄素的测定未参照《中国药典》中常采用的高效液相色谱法,而是参照了文献[6]方法测定;芦荟则参照《中国药典》中山楂叶的含量测定项下方法进行。

本试验选择了非极性树脂D101、HPD-300,中性树脂AB-8、ADS-17,极性树脂XDA-8、LSA-21、NKA-9,共7种大孔树脂,以及氢键吸附的聚酰胺树脂,比较不同类型树脂对大黄总蒽醌和广藜香总黄酮吸附率、解吸率及收率的影响。结果表明,AB-8树脂对大黄总蒽醌纯化效果较好,聚酰胺树脂对广藜香总黄酮纯化效果较好。

筛选树脂的混合比例时,本试验以AB-8树脂/聚酰胺树脂(4:1~1:4)的范围进行筛选,在此较大的比例跨度内,以总蒽醌和总黄酮的收率为指标,制作趋势线,以两者的交叉点作为最优比例,在此比例下两者的收率相当。但此比例下是否达到较优的药理活性,还需通过药理实验来验证。

在树脂工艺的优化过程中,不同参数对总蒽醌及总黄酮的影响基本一致,说明两者的吸附、解吸机制相似,此复合树脂法可用于这2类成分的精制纯化。但其他类的成分是否也可用此种方法精制纯化,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. WS-10902(ZD-0902)-2002-2012Z 黄香颗粒[S]. 2012.
- [2] 丁文兵,刘梅芳,魏孝义,等.广藜香大极性化学成分的研究[J].热带亚热带植物学报,2009,17(6):610.
- [3] 庞贺,杨明,胡丽萍,等.聚酰胺柱层析:紫外分光光度法测定广藜香叶总黄酮的含量[J].中华中医药学刊,2008,26(3):602.
- [4] 金汝城,谢伟雪,逢艳.大孔吸附树脂对大黄总蒽醌类物质的吸附纯化[J].兰州大学学报:医学版,2008,34(1):47.
- [5] 冉蓉,李君洁.水蒸气蒸馏法与有机溶剂法提取广藜香挥发油的比较[J].理科爱好者:教育教学版,2012(3):19.
- [6] 柯颖川,吴文康.紫外分光光度法测定骨伤康复外洗颗粒中大黄总蒽醌含量[J].中国医药导报,2010,7(18):61.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:30.
- [8] 赵忠海,张小晶.正交实验法优选大孔树脂再生工艺[J].世界中西医结合杂志,2009,4(5):327.
- [9] 郭志伟,刘琳娜.大黄及其有效成分的药理研究概况[J].中国药房,2006,17(22):1741.
- [10] 李春龚,吴友根,林尤奋,等.广藜香化学成分的研究进展[J].江苏农业科学,2011,39(6):498.

(收稿日期:2014-08-27 修回日期:2014-12-15)

(编辑:刘萍)