

大孔吸附树脂纯化天麻眩晕宁合剂水提部位的工艺研究

柳小莉 曹 瑞 曹林林 郭东艳

摘 要 **目的** 优选天麻眩晕宁合剂水提部位的大孔吸附树脂纯化工艺。**方法** 以天麻素、芍药苷为指标,考察上样药液浓度、上样药液流速、径高比、洗脱剂、洗脱速度等对天麻眩晕宁合剂水提部位的影响,确定大孔树脂纯化工艺条件。**结果** 选用 HPD300 型号大孔树脂,径高比为 1:10,最大上样量为 3BV,上样药液浓度为 0.5gml/生药,以 4BV/h 的流速上样,1BV 水洗脱后,用 5BV 50% 乙醇 4BV/h 进行洗脱。**结论** 该工艺纯化天麻眩晕宁合剂水提部位中天麻素、芍药苷是稳定、可行的。

关键词 大孔吸附树脂 天麻眩晕宁合剂 纯化工艺 天麻素 芍药苷

中图分类号 R28

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.018

Purification Technology of Water – extraction Parts from Tianma Xuanyunning Mixture by Macroporous Resin. Liu Xiaoli, Cao Rui, Cao Linlin, et al. Medicine College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi 712046, China

Abstract **Objective** To optimize purification technology of water – extraction parts from Tianma Xuanyunning mixture by macroporous resin. **Methods** The gastrodin and paeoniflorin being taken as index, purification condition of water – extraction parts from Tianma Xuanyunning mixture was determined by selecting the effect of liquid concentration, flow velocity, diameter – height ratio, eluent and eluant rate. **Results** The optimum purification as follows: HPD300 Macroporous resin was fitted, the diameter – height ratio of resin column of 1:10, the sampling volume of eluting reagent of 1BV water and 5BV 50% ethanol, eluting rate of 4BV/h. **Conclusion** The optimized method is stable and feasible to purify gastrodin and paeoniflorin of water – extraction parts from Tianma Xuanyunning mixture.

Key words Macroporous resin; Tianma Xuanyunning mixture; Purification; Gastrodin; Paeoniflorin

大孔吸附树脂通过吸附性和分子筛原理,根据化合物吸附力的不同及分子质量的大小,经一定的溶剂洗脱而达到分离的目的。近年来,大孔吸附树脂在纯化中药复方的应用日益增多,高度富集复方有效成分的同时,能最大限度地粗取精,有利于中药制剂的升级换代^[1-4]。天麻眩晕宁合剂为陕西中医学院独家品种,是治疗美尼尔综合征导致的眩晕病的中药复方制剂。由天麻、钩藤、白芍等 12 味中药材组成,原采用水提醇沉工艺进行提取纯化,存在水提部位杂质含量高、工艺耗时低效、制剂不稳定的问题,为充分保留复方中有效成分、提高制剂稳定性、更好发挥药效,本实验以天麻素、芍药苷的吸附率、洗脱率为考察指标,优选天麻眩晕宁合剂的大孔吸附树脂纯化工艺条件,为开发更加高效、稳定的制剂提供实验基础。

材料与方法

1. 材料与仪器:(1)材料:天麻素对照品购自中国药品生物制品检定所,批号:110807-200205,纯度>95%,供含量测定用;芍药苷对照品购自中国食品药品检定研究院,批号:110736-201337,纯度>95%,供含量测定用;天麻、白芍、茯苓等药材购自陕西盛兴中药饮片有限公司,经检验均符合《中国药典》2010 年版一部各药材项下规定。磷酸购自天津市标准科技有限公司,批号:20040714,水为重蒸馏水,乙腈为色谱纯,乙醇为分析纯。HPD100、HPD300、HPD400、HPD600、AB-8、D101 均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司。(2)仪器:Agilent1260 高效液相色谱仪购自美国安捷伦科技公司;AL204 万分之一电子天平购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;BT25s 十万分之一电子天平购自上海天美仪器有限公司;SHZ-B 恒温水浴振荡器购自国华企业。

2. 方法:(1)样品溶液的制备:分别取残留液和洗脱液 2ml,置于蒸发皿中挥干溶剂,用稀乙醇溶解,定容至 10ml,过 0.45μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。(2)天麻素含量测定方法:①对照品溶液的制备:精密称取在 80℃ 减压干燥 1h 的天麻素对照品适量,加流动相制成每 1ml 含 56μg 的溶液,即得^[5];②色谱条件:Thermo synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 250mm,5μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水(4:96),流速

基金项目:陕西省教育厅基金资助项目(2012JC11)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院药学院(柳小莉、曹瑞、郭东艳),制药厂(曹林林)

1.0ml/min,检测波长 220nm,柱温 25℃;③标准曲线的绘制:分别精密吸取对照品溶液(56μg/ml)2、4、6、8、10μl 注入液相色谱仪,按照优选的色谱条件进行测定,以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程 $Y = 120.45X - 1.3657$ ($R^2 = 1.000$),表明天麻素在 0.112 ~ 0.560μg 范围内与峰面积呈良好线性关系。(3)芍药苷含量测定:①对照品溶液的制备:精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 60μg 的溶液即得^[5];②色谱条件:Thermo synchronis C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水(18:82),流速 1.0ml/min,检测波长 230nm,柱温 25℃;③标准曲线的绘制:分别精密吸取对照品溶液(60μg/ml)4、6、8、10、12μl 注入液相色谱仪,按照优选的色谱条件进行测定,以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程 $Y = 217.35X + 238.38$ ($R^2 = 0.9992$),表明芍药苷在 0.24 ~ 0.72μg 与峰面积呈良好线性关系。(4)树脂处理:取适量 HPD100、HPD300、HPD400、HPD600、AB-8、D101 型大孔树脂,用 95% 乙醇浸泡 24h,用纯净水洗至无醇味,备用。(5)上样药液的制备:按天麻眩晕宁合剂处方比例,陈皮、生姜提取挥发油,余下药液另放;药渣与白芍、茯苓、甘草、竹茹加水煎煮两次,第 1 次 10 倍量水 1.5h,第 2 次 8 倍量水 1h,合并药液;天麻另煎,煎液与上述各药液合并,浓缩至适量,制成浓度为 0.5g 生药/ml 的溶液,即为上样药液,备用。(6)大孔树脂纯化工艺优选:①大孔树脂型号的筛选:称取经预处理的湿树脂 HPD100、HPD300、HPD400、HPD600、AB-8、D101 各 8.0g,至 100ml 具塞锥形瓶中,分别精密加入 0.25g 生药/ml 的药液(将上样药液稀释即得)16ml,置恒温水浴振荡器中,于 25℃,100r/min 振摇 24h,使树脂达到饱和吸附,滤过,收集残留液,依法测定残留液中天麻素及芍药苷的浓度,计算天麻素含量和芍药苷含量;②上样药液浓度和洗脱剂乙醇浓度的考察^[6]:取预处理的 HPD300 树脂,吸干表面水分,称取 4 份,每份 8.5g,置于具塞锥形瓶中,分别精密移取 15ml 浓度为 0.25g 生药/ml、0.5g 生药/ml、0.75g 生药/ml、1.0g 生药/ml 的药液,于 25℃,100r/min 下振摇 24h,滤过,收集残留液,依法测定指标成分,并计算其吸附率;将上述 0.5g 生药/ml 下的树脂吸干表面药液,均分 4 份,分别加入 30%、40%、50%、60% 乙醇 15ml,于 25℃、100r/min 下振摇 24h,滤过,收集洗脱液,依法测定指标成分;③泄露曲线的考察:称取预处理过的 HPD300 大孔树脂约 8.5g,湿法装入 15mm × 300mm 的柱内(1BV = 14ml),取 0.5g 生药/ml 上样药液以 1BV/h 的流速吸附,分别收集过柱液 15 份,每份 14ml,依法测定指标成分,以指标成分含量为纵坐标,累积上样体积(BV)为横坐标,绘制泄露曲线;④树脂径高比的考察:取 4 份经预处理的 HPD300 大孔树脂湿法装柱(15mm × 300mm),使径高比分别为 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14,取 3BV 0.5g 生药/ml 药液,以 2BV/h 的流速进行吸附,收集流出液,依法测定指标成分的含量,计算吸附率;⑤上样药液流速的考察:取 4 份经预处理的 HPD300 大孔树脂湿法装柱(15mm ×

300mm),径高比 1:10,3BV 0.5g 生药/ml 药液分别上样,流速以 1、2、3、4BV/h 进行吸附,收集流出液,依法测定指标成分含量,计算吸附率;⑥水洗除杂工艺的考察:取经预处理的 HPD300 大孔树脂湿法装柱(15mm × 300mm),径高比 1:10,3BV 0.5g 生药/ml 药液以 4BV/h 上样,用纯净水洗脱,每 1 个保留体积(6ml)收集 1 份水洗液,共 10 份,依法测定指标成分含量;⑦洗脱剂用量的考察:取经预处理的 HPD300 大孔树脂湿法装柱(15mm × 300mm),径高比 1:10,3BV 0.5g 生药/ml 药液以 4BV/h 上样,1BV 纯净水洗脱除杂后,用 50% 乙醇进行洗脱,每 1BV(17ml)收集 1 份,共 10 份,依法测定指标成分含量,以乙醇洗脱累积体积为横坐标,指标成分含量为纵坐标,绘制曲线图;⑧洗脱速度的考察:取 4 份经预处理的 HPD300 大孔树脂湿法装柱(15mm × 300mm),径高比 1:10,3BV 0.5g 生药/ml 药液以 4BV/h 上样,1BV 纯净水洗脱除杂后,用 5BV 50% 乙醇分别按 1、2、3、4BV/h 的流速洗脱,收集洗脱液,依法测定指标成分含量,计算解析率。

结 果

1. 大孔树脂型号的筛选:根据下式:静态吸附率(%) = (初始含量 - 残留液含量)/初始含量 × 100%,得出各树脂静态吸附率;结果天麻素的静态吸附率分别为 81.5%、84.8%、61.2%、59.0%、78.5%、74.1%;芍药苷静态吸附率分别为 33.3%、100%、100%、98.4%、100%、100%。表明 HPD300 对天麻素与芍药苷有较高的吸附率,故选 HPD300 型号的大孔树脂。

2. 上样药液浓度和洗脱剂乙醇浓度考察:上样药液浓度结果为天麻素的静态吸附率分别为 89.2%、73.4%、73.0%、64.3%;芍药苷静态吸附率分别为 100%、100%、99.8%、99.6%。表明浓度为 0.25g 生药/ml 时,天麻素和芍药苷的吸附率高于其他浓度药液,但药液浓度相对过低,会造成上样体积太大,降低生产效率^[1]。因此,上样药液浓度选为 0.5g 生药/ml。洗脱剂乙醇浓度考察中根据下式:解析率 = 解析量/吸附量 × 100%,计算解析率;结果天麻素解吸率分别为 98.9%、91.4%、90.1%、87.8%;芍药苷解吸率分别为 56.6%、74.7%、86.3%、88.2%。表明 50% 乙醇对天麻素、芍药苷的解析率都较高,故洗脱剂选用 50% 乙醇。

3. 泄露曲线的考察:以指标成分含量为纵坐标,累积上样体积(BV)为横坐标,绘制泄露曲线,见图 1。由图 1 表明,天麻素从 3BV 后开始明显泄露,芍药苷从 5BV 后开始明显泄露,以君药中天麻素为准,故确定最大上样量为 3BV。

4. 树脂径高比考察:天麻素吸附率分别为

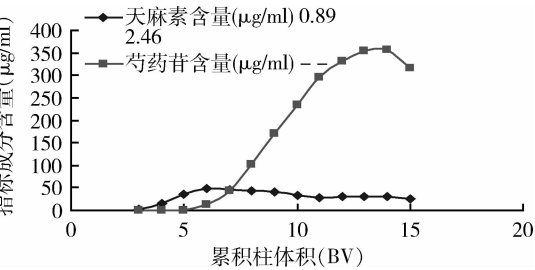


图 1 指标成分含量的泄露曲线

81.7%、59.4%、98.3%、99.9%、66.2%；芍药苷吸附率分别为 98.8%、87.2%、100%、100%、99.4%。表明径高比为 1:12 时,天麻素吸附率和芍药苷吸附率都很高,但在实际操作中,树脂柱容易产生气泡,会影响到上样流速与洗脱流速,而径高比为 1:10 时,天麻素吸附率和芍药苷吸附率也较高^[1]。因此,确定树脂径高比为 1:10。

5. 上样药液流速的考察:天麻素吸附率分别为 78.9%、92.3%、90.5%、95.5%；芍药苷吸附率分别为 95.4%、99.2%、100%、100%。上样药液流速为 4BV/h 时,天麻素吸附率和芍药苷吸附率都较高,故确定上样药液流速为 4BV/h。

6. 水洗除杂工艺考察:天麻素的含量(μg/ml)分别为 13.08、21.93、24.04、22.38、19.27、21.39、16.14、14.40、12.96、12.28,芍药苷的含量(μg/ml)分别为 0.32、0.38、0.74、0.83、0.71、0.54、0.42、0.35、0.32、0.37;第 3 个保留体积即约为 1 个柱体积时,既有利于去除杂质又能较好的保留天麻素和芍药苷,故选择 1BV 水进行洗脱^[7]。

7. 洗脱剂用量的考察:以乙醇洗脱累积体积为横坐标,指标成分含量为纵坐标,绘制曲线图,见图 2。图 2 表明 5BV 50% 乙醇洗脱时,天麻素已完全洗脱,芍药苷也基本洗脱完,故确定 50% 乙醇洗脱剂用量为 5BV。

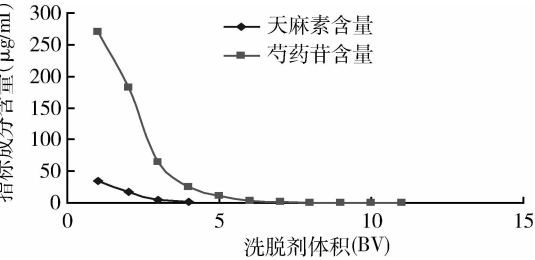


图 2 洗脱剂用量曲线图

8. 洗脱速度的考察结果:天麻素解析率分别为 77.5%、86.2%、82.3%、88.1%；芍药苷解析率分别为 87.6%、95.1%、76.6%、92.6%；表明 4BV/h 50%

乙醇洗脱时,指标成分析率较高,故确定 50% 乙醇洗脱速度为 4BV/h。

9. 验证试验:取 3 份经预处理的 HPD300 型大孔树脂湿法装柱(15mm×300mm),径高比为 1:10,3BV 0.5g 生药/ml 的药液以 4BV/h 进行上样,1BV 纯净水洗脱除杂后,用 5BV 50% 乙醇以 4BV/h 的流速洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,依法测定固形物中指标成分含量,结果见表 1。经纯化后天麻素、芍药苷含量分别为 1.647%、8.343%；固形物得率为 3.177%。说明该工艺稳定、可行。

表 1 验证试验结果(%)

分组	1	2	3	平均值	RSD
天麻素含量	1.67	1.65	1.62	1.647	1.53
芍药苷含量	8.29	8.35	8.39	8.343	0.60
固形物得率	3.15	3.14	3.24	3.177	1.73

讨 论

天麻眩晕宁合剂处方由 12 味中药材组成,其中 7 味中药材原纯化方法为水提醇沉法;本实验结合“君臣佐使”原则及药理作用以天麻素和芍药苷为考察指标^[8-10]。而君药天麻在 7 味中药材中约占 1/10,白芍约占 1/5,天麻素和芍药苷相对分子质量及含量差异较大;大孔树脂纯化过程中,对高分子物质吸附优于低分子物质,因而两者含量变化趋势相差也较大,条件筛选中主要以天麻素为主;为了使天麻素和芍药苷含量在对照品标准曲线线性范围内,样品溶液的进样量根据残留液、洗脱液情况不同而有所区别。筛选出的大孔树脂纯化条件为:选用 HPD300 型号大孔树脂,径高比为 1:10,最大上样量为 3BV,上样药液浓度为 0.5g 生药/ml,以 4BV/h 的流速上样,1BV 水洗脱后,用 5BV 50% 乙醇 4BV/h 进行洗脱;验证结果得出,天麻眩晕宁合剂水提部位纯化前固形物得率为 19.35%,经 HPD300 型号大孔树脂纯化后为 3.177%；天麻素、芍药苷纯化前含量分别为 0.47%、1.17%,经纯化后分别为 1.647%、8.343%,含量均有所提高。但是大孔树脂纯化后药效与原水提醇沉工艺药效是否一致,还有待于后期通过相关药效学实验进一步验证。

参考文献

1 从毛勉,盛方标,范鲁雁. 大孔吸附树脂在分离纯化中药复方中的应用[J]. 安徽医药, 2009,13(11):1411-1413
2 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(6):286-289

(下转第 74 页)

- 5 Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, *et al.* Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia [J]. JAMA, 2001, 286: 3106 – 3114
- 6 Solomon D, Schiffman M, Tarone R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93: 293 – 299
- 7 Priebe AM. 2012 cervical cancer screening guidelines and the future role of HPV testing [J]. Clin Obstet Gynecol, 2013, 56: 44 – 50
- 8 Dillner J. Primary human papillomavirus testing in organized cervical screening [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2013, 25: 11 – 16
- 9 Murphy J, Kennedy EB, Dunn S, *et al.* HPV testing in primary cervical screening: a systematic review and meta – analysis [J]. J Obstet Gynaecol Can, 2012, 34: 443 – 452
- 10 Dijkstra M, van Niekerk D, Rijkaart D, *et al.* Primary hrHPV DNA testing in cervical cancer screening: how to manage screen positive women? A POBASCAM Trial sub study [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23: 55 – 63
- 11 Richardson H, Kelsall G, Tellier P, *et al.* The natural history of type – specific human papillomavirus infections in female university students [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12: 485 – 490
- 12 Bulkman NW, Berkhof J, Bulk S, *et al.* High – risk HPV type – specific clearance rates in cervical screening [J]. Br J Cancer, 2007, 96: 1419 – 1424
- 13 Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH, *et al.* Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 infections in young women: an evaluation from multiple analytic perspectives [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16: 709 – 715
- 14 Naucler P, Ryd W, Tornberg S, *et al.* HPV type – specific risks of high – grade CIN during 4 years of follow – up: a population – based prospective study [J]. Br J Cancer, 2007, 97: 129 – 132
- 15 Syrjanen K. Mechanisms and predictors of high – risk human papillomavirus (HPV) clearance in the uterine cervix [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2007, 28: 337 – 351
- 16 Shew ML, Fortenberry JD, Tu W, *et al.* Association of condom use, sexual behaviors, and sexually transmitted infections with the duration of genital human papillomavirus infection among adolescent women [J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2006, 160: 151 – 156
- 17 Giuliano AR, Sedjo RL, Roe DJ, *et al.* Clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection: effect of smoking (United States) [J]. Cancer Causes Control, 2002, 13: 839 – 846
- 18 Castle PE, Rodriguez AC, Burk RD, *et al.* Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study [J]. BMJ, 2009, 339: b2569
- 19 Kjaer S, Hogdall E, Frederiksen K, *et al.* The absolute risk of cervical abnormalities in high – risk human papillomavirus – positive, cytologically normal women over a 10 – year period [J]. Cancer Res, 2006, 66: 10630 – 10636
- 20 Stany MP, Bidus MA, Reed EJ, *et al.* The prevalence of HRHPV DNA in ASC – US Pap smears: A military population study [J]. Gynecol Oncol, 2006, 101: 82 – 85
- 21 卞美璐, 陈庆云, 张小燕. 对宫颈细胞学诊断意义未明的不典型鳞状细胞患者的临床管理 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86: 2339 – 2342
- 22 Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, *et al.* Persistence and load of high – risk HPV are predictors for development of high – grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study [J]. Int J Cancer, 2003, 106: 396 – 403
- 23 Rousseau MN, Costes V, Konate I, Nagot N, *et al.* Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV – 1 – infected and uninfected women in Burkina Faso [J]. J Med Virol, 2007, 79: 766 – 770

(收稿日期: 2015 – 09 – 30)

(修回日期: 2015 – 10 – 10)

(上接第 69 页)

- 3 刘玥. 大孔吸附树脂在中药提取纯化中的应用进展 [J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 232 – 234
- 4 王欣, 罗维早, 王爱平, 等. 补肾益寿胶囊水提液的精制工艺 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(4): 334 – 338
- 5 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 39, 69
- 6 何迅, 迟明艳, 庞秀清, 等. 大孔吸附树脂分离精制莲菊感冒胶囊工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(15): 1262 – 1266
- 7 陈超, 陈国芹, 陈阿丽, 等. AB – 8 型大孔吸附树脂纯化复方通脉

颗粒有效部位的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 4 – 6

- 8 曹立明. 美尼尔氏综合症的中医认识及治疗进展 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(14): 119 – 120
- 9 莫礼滨. 天麻素注射液穴位注射治疗美尼尔氏病临床观察 [J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(4): 537
- 10 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100 – 102

(收稿日期: 2015 – 04 – 04)

(修回日期: 2015 – 05 – 12)