

大孔吸附树脂分离纯化胡黄连中胡黄连苷Ⅱ的工艺研究

李雪春^{1,2} 杨晓宁³ 李善茂¹

(1 防化指挥工程学院,北京市昌平区阳坊,102205; 2 中国医药研究开发中心有限公司; 3 亚宝药业集团股份有限公司)

关键词 胡黄连; 大孔吸附树脂分离纯化

胡黄连为玄参科植物胡黄连(*Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell)的干燥根茎,是一味传统中药,具有清热凉血、燥湿消痞的作用,用于小儿惊痫、疳积、泻痢、骨蒸劳热、自汗、盗汗、吐血、目疾、痔瘕、疮肿等。近年来国内外研究发现,胡黄连中环烯醚萜苷类成分具有抗乙型肝炎病毒及保肝、降酶等多种药理活性^[1]。本实验旨在优选出一种适合分离胡黄连苷Ⅱ的大孔树脂,并对优选出的大孔树脂分离胡黄连苷Ⅱ的工艺条件及参数进行研究,筛选出工艺简单、方法可靠的分离纯化工艺。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);胡黄连苷Ⅱ对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111596-200301);胡黄连药材(云南药材公司);D101、D201、AB-8 和 NKA-9 大孔吸附树脂(南开大学化工厂);DB301 大孔吸附树脂(天津欧瑞生物科技有限公司)

2 方法与结果

2.1 胡黄连苷Ⅱ的含量测定方法 高效液相色谱法: Dikma Diamonsil C18 柱(250mm×4.6mm, 5μm),流动相:乙腈-水-冰醋酸(20:80:0.5),流速:1.0mL·min⁻¹,柱温:25℃,检测波长:275nm。理论板数按胡黄连苷Ⅱ峰计应不低于3000。

2.2 胡黄连提取液的制备 称取胡黄连药材粗粉1000g,每次加入70%乙醇8L热回流提取1h,提取3

次。提取液滤过、合并,减压回收乙醇后,按需要加水稀释至一定体积。

2.3 大孔树脂的预处理 将大孔树脂用95%的乙醇浸泡12h,湿法装柱,用95%的乙醇液洗脱2倍柱体积(BV),然后用水洗净乙醇,加2%的盐酸溶液浸泡、洗脱,水洗至pH值中性,加2%氢氧化钠溶液浸泡、洗脱,水洗至pH值中性,最后用95%的乙醇液洗至流出液加等量水无白色浑浊现象,再用水洗净乙醇备用。

2.4 树脂型号的筛选 取净化好的型号为NKA-9、AB-8、D201、DB301、D101型大孔吸附树脂各10g,湿法装柱。吸取相同已知胡黄连苷Ⅱ浓度的提取液各50mL,以相同流速通过树脂柱,并分别用20mL(约合1个柱体积)的水洗脱,合并相应的流出药液和水洗液,混匀,定容,备用。再分别用70%的乙醇各150mL洗脱,收集洗脱液,定容,备用。分别测定胡黄连提取液、各树脂柱流出液-水洗液样品和70%乙醇洗脱液样品中胡黄连苷Ⅱ的量,计算不同型号树脂的吸附容量和洗脱率,结果见表1。

表1 树脂型号筛选结果(n=2)

树脂型号	吸附容量/mg·g ⁻¹	洗脱率(%)
D101	65.7	97.0
D201	46.7	100.0
NKA-9	23.2	85.1
AB-8	32.4	100.0
DB301	46.2	97.7

由以上结果可以看出,以D101大孔树脂的吸附容量最大,为其他树脂型号的1.4~2.8倍,且70%乙

成;从安全、能耗、效率和效果上具有明显优势。

3.2 由表16、17可知不同生产工艺的关节止痛膏中樟脑、薄荷脑、水杨酸甲酯的含量差异较大,经分析原因,各成分的含量差异确实与制备工艺有关。目前国内药厂中药橡胶膏的生产工艺仍普遍采用溶剂法,在橡胶膏的生产过程中,使用蒸汽烘干,烘干温度较高(80℃),时间较长,挥发性成分易在加热挥去汽油等溶剂的环节中随汽油挥发而大大损失。但也有厂家通过优化橡胶膏剂的成型工艺技术烘干温度控制在40℃左右,时间短,从而大幅度减少了易挥发性成分损

失。通过保留大量挥发性成分,不仅能加快有效成分的渗透吸收,发挥活血镇痛作用,而且对提高橡胶膏剂的贴敷舒适性也有很好的效果。随着筛选新的辅料,优化基质处方,选用新型溶剂和工艺,一定会对中药橡胶膏剂这一传统剂型发挥新的作用,并使之更易于被患者接受。

参考文献

[1] 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,2010:705.

(2011-02-21 收稿)◎

醇洗脱率可以达到 97%, 洗脱效果较好, 故选用 D101 大孔树脂。

2.5 洗脱剂的考察 取净化好的 D101 大孔树脂约 100g, 装柱, 通过相同已知胡黄连苷 II 浓度的胡黄连提取液 100mL, 并水洗至无色, 收集水洗液, 混匀, 备用。继续分别用 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的乙醇分别洗至无色, 收集各乙醇浓度的洗脱液, 混匀, 备用。分别测定以上洗脱液中胡黄连苷 II 的含量和固形物量, 结果见表 2。

表 2 洗脱剂筛选结果($n=2$)

洗脱剂	胡黄连苷 II 量/mg	固形物量/g	胡黄连苷 II 纯度/%
水	1.35	5.23	0.0258
10% 乙醇	—	0.264	—
20% 乙醇	1.74	0.561	0.310
30% 乙醇	2470	4.73	52.2
40% 乙醇	346	1.78	19.4
50% 乙醇	7.29	0.399	1.82
60% 乙醇	0.510	0.0960	0.531
70% 乙醇	—	0.0735	—
80% 乙醇	—	0.0465	—
合计	2830	13.2	21.4

由以上结果可以看出, 胡黄连苷 II 主要集中在 30% 乙醇的洗脱液中, 占总洗脱量的 87.3%, 胡黄连苷 II 的纯度为 52.2%。若采用 40% 的乙醇洗脱, 洗脱率虽然高, 但胡黄连苷 II 纯度下降到 43.2%, 直接影响到后续纯化结晶的收率。因此, 选用 30% 的乙醇为洗脱剂, 并采取先水洗, 20% 的乙醇洗, 然后 30% 乙醇洗脱, 收集 30% 洗脱液。

2.6 上柱药液浓度考察 取净化好的等量 D101 大孔树脂装柱, 分别以相同流速通过稀释的不同浓度的胡黄连提取液。提取液中药材(g)与体积(mL)比例分别为 1:1、1:2、1:3、1:4(药材/g: 体积/mL)。上样后分别用 20mL 的水洗脱, 合并相应的流出药液和水洗液, 测定其中胡黄连苷 II 的含量, 计算树脂的吸附容量, 结果见表 3。

表 3 上柱药液浓度对吸附性能的影响($n=2$)

药液比例浓度	1:1	1:2	1:3	1:4
吸附容量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	55.0	57.5	58.0	56.8

以上结果可以看出, 药液浓度对树脂吸附容量的影响不是很大, 从数据直观分析, 选用药液比例浓度为 1:2 的药液, 即选中药材浓度为 $0.5\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液上样。

2.7 吸附流速的考察 取净化好的等量 D101 大孔树脂分别装柱备用。取相同已知胡黄连苷 II 浓度的药

液(药材与体积比为 1:2)分别以 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $2\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $3\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $4\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、 $5\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过树脂, 并分别用 20mL 的水洗脱, 合并相应的流出药液和水洗液, 测定其中胡黄连苷 II 的含量, 计算树脂的吸附容量, 结果见表 4。

表 4 吸附流速考察结果($n=2$)

流速/ $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$	吸附容量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	43.8
2	44.2
3	45.0
4	36.1
5	36.5

以上结果可以看出, 上柱药液流速对树脂吸附影响较为明显, 从数据结果来看, 上柱的最佳流速为 $3\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

2.8 柱径比的考察 取不同直径的树脂柱, 分别装入净化好的 D101 大孔树脂, 树脂柱的柱径比分别为 3:1、5:1、7:1、9:1、11:1、13:1, 以相同流速通过相同已知胡黄连苷 II 浓度的药液(药材与体积比为 1:2), 并以 4 倍树脂体积的水洗至洗脱液无色, 合并相应的流出液和水洗液, 测定其中胡黄连苷 II 的量, 计算树脂的吸附容量, 结果见表 5。

表 5 柱径比考察结果($n=2$)

柱径比	吸附容量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
3:1	22.5
5:1	24.5
7:1	27.1
9:1	27.6
11:1	30.9
13:1	24.7

由以上结果可以看出, 柱径比例越大, 树脂相应的吸附容量越高, 从上述数据结果结合生产实际考虑, 柱径比例为 7:1 时较为合适。

表 6 药材与树脂比例考察结果($n=2$)

药材与树脂比例/g:g	胡黄连苷 II 泄漏量/mg
1:2	186
1:4	6.71
1:6	—
1:8	—

2.9 药材与树脂比例考察 取净化好的等量的 D101 大孔树脂分别装柱, 以相同流速分别通过相同已知胡黄连苷 II 浓度的药液(药材与体积比为 1:2), 通过树脂柱药液含胡黄连药材和树脂的比例分别为 1:2、1:4、1:6、1:8, 继续用同体积的水洗至流出液无色, 合并

相应的流出液和水洗液,测定其中胡黄连苷Ⅱ的量,结果见表6。

由以上结果可以看出,当药材和树脂比例达到1:4时,胡黄连苷Ⅱ的泄漏量不足1.5%。当药材和树脂比例达到1:6时,在上柱流出液和水洗液中检不出胡黄连苷Ⅱ。考虑到实际操作过程和试验之间存在的差异和树脂柱的反复使用,为安全起见,药材和树脂的比例选用1:6。

2.10 洗脱流速 屠鹏飞等^[2]建议洗脱流速采用全流速。而且在用30%乙醇洗脱时,全流速不足水洗脱全流速的20%,因此洗脱流速不作考察,采用全流速。

2.11 收集洗脱液量的考察 取已知吸附胡黄连苷Ⅱ量的大孔树脂柱(经20%乙醇洗脱后,树脂体积约为60mL),用30%乙醇洗脱,每洗脱120mL收集1个样品,测定样品中胡黄连苷Ⅱ的含量,计算洗脱率,结果显示,当洗脱液收集到树脂体积的6倍量时,洗脱率已经可以达到94%,继续洗脱收效甚微,浪费工时,因此收集洗脱液的量为树脂的6倍体积即可。

2.12 放大试验 取净品级的D101大孔树脂18Kg,装柱($\Phi=18\text{cm}$),柱径比为7:1,用乙醇洗脱至洗液与水1:4混合,不产生浑浊,继续用水洗至洗液不含醇,备用。

取3Kg胡黄连药材的提取液6L(胡黄连苷Ⅱ的浓度为46.7mg/mL)。将药液以 $3\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过大孔树脂柱,并分别以水和20%乙醇洗脱至洗脱液近无色,分别收集,备用。以30%乙醇洗脱,收集30%乙醇洗脱液200L(约计6倍树脂体积),减压浓缩至小体积备用。

分别测定水洗液、20%乙醇洗脱液和30%乙醇洗

脱液中胡黄连苷Ⅱ的量,计算洗脱率。取30%乙醇洗脱浓缩液适量,测定固形物,计算胡黄连苷Ⅱ纯度。结果见表7。

表7 放大试验结果

洗脱液	洗脱率	纯度
水	—	—
20%乙醇	6.30	—
30%乙醇	85.5	68.2

由以上结果可以看出,总洗脱率达到91.8%,其中30%乙醇洗脱液中胡黄连苷Ⅱ的量占上样总量的85.5%,因在药液的浓缩过程中胡黄连苷Ⅱ也会有小部分的损失,因此认为洗脱过程较为完全,此树脂分离纯化工艺可行。

3 讨论

本试验以吸附容量和洗脱为指标,采用动态吸附法对大孔吸附树脂分离纯化胡黄连苷Ⅱ的工艺进行了系统地筛选考察,最终确定的工艺为:取净化好的D101大孔吸附树脂装柱,柱径比为7:1,上柱药液浓度为1:2(药材/g:体积/mL),上样量与树脂的比例为1:6(药材量/g:树脂量/g),以 $3\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速通过大孔树脂柱,分别用水、20%的乙醇洗脱至流出液近无色,再用30%乙醇洗脱,收集6倍树脂体积的30%乙醇洗脱液即可。

参考文献

- [1] 黄林清,张恩娟,王军,等. 胡黄连的研究进展.《中国药业》,2007,16(7):1-2.
- [2] 屠鹏飞,贾存琴,张洪全,等. 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》,2004,6(3):22-28.

(2011-01-21 收稿)◎

《世界中医药》杂志第一届理事会名单

名誉理事长:余靖、朱庆生、张凤楼

理事长:李振吉(常务)、房书亭、于文明

副理事长(按姓氏笔划排列):于生龙、于淑芳、马西姆(意大利)、王国才、王志勇、王振邦、王忠和、王超群(加拿大)、王炳岐、方明金、乌兰、韦波、龙致贤、田景福、孙塑伦、孙庆涪(南非)、邓良月、邓小川、申长虹、田小明(美国)、甘培尚、任德权、吕玉波、朱征明、安迪(奥地利)、帕尔哈提·克力木、沈志祥、沈堂彪、李怀荣、李俊德、李维衡、阮诗玮、苏荣彪、吴坤平、孟长征、严朝君、里根(比利时)、张洪魁、张奇、杨殿兴、周然、邱德亮、阿尔甫、杨鸿生、陈抗生、陈可冀、林日初、林子强(澳大利亚)、拉蒙(西班牙)、赵英杰(新加坡)、罗伯逊(巴西)、姜再增、姜在阳、贺兴东、郑守曾、施杞、钟清(阿根廷)、诸国本、高思华、徐志伟、索天仁、夏祖昌、袁长津、高鹤亭(日本)、曹洪欣、黄立成、梅万方(英国)、屠英(美国)、程四林、喜乐、谢阳谷、彭炜、程兆盛、董德刚、董明培、董志林(荷兰)、蔡宝德(葡萄牙)、塔基娅娜·波塔波娃(俄罗斯)、鄢卫东、戴维(美国)

常务理事(按姓氏笔划排列):于连云、马其江、王奎、文渊、丛丹江、冯东、朱岷、冷荣久、季伟平、刘金生、刘品、刘希伟、林秀明、张重刚、罗建、郑伟达、赵勇、曹礼忠、黄更荣、黄维忠、崔庆荣、韩同彪、彭跃刚、靳万庆、廖利平、戴伟杰

秘书长:姜再增(兼)

副秘书长:王炳岐(兼)

万方数据