

折光法快速判断中药柱层析过程中的始终点及其在树脂精制丹参有效部位中的应用*

★ 王跃生 王金钱 陈银芳 孙艳荣 (中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 南昌 330006)

摘要:目的:介绍运用折光原理快速判断中药柱层析过程中始终点的方法及其在大孔树脂精制丹参有效部位的应用。方法:通过丹参提取物经 AB-8 型大孔吸附树脂精制有效部位,水-30%乙醇-80%乙醇梯度洗脱,间隔取样,在线监测洗脱液折光率并分析变化规律,同时以高效液相色谱法和紫外可见分光光度法分别检测丹酚酸 B、丹参萜类成分含量作参比,判断洗脱过程的始点和终点。结果:丹参有效部位精制过程中洗脱的始终点为:水洗终点第 4BV(折光率 0),即 30%乙醇洗脱始点,30%乙醇洗脱终点第 8BV(折光率 10.5),即 80%乙醇洗脱始点,80%乙醇洗脱终点第 10.75BV(折光率 19.5)。结论:折光法准确可靠,便捷快速,在中药柱层析处理过程有很强的实践意义。

关键词:折光法;柱层析;丹参有效部位;洗脱液始终点

中图分类号:TQ 460.6 **文献标识码:**A

Refractive principle to judge the beginning point and the end point of the process of the traditional Chinese medicine filtered by colume Chromatography rapidly and their application in purification active region of Dan Shen Root with macroporous resin

WANG Yue-sheng, WANG Jin-qian, CHEN Yin-fang, SUN Yan-rong

National Pharmaceutical Engineering center For solid preparation in Chinese Herb Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Object: introduce the method applying refractive principle to judge the beginning point and the end point of the process of the traditional Chinese medicine filtered by colume Chromatography rapidly and their application in purification active region of Dan Shen Root with macroporous resin separation technique. Method: by refining the active region of Dan Shen Root with the AB-8 type of macroporous resin, gradient elution of water-30% alcohol-80% alcohol, interval sampling, monitor the refractive index of eluant on-line, analyze its regularity and judge the beginning point and the end point of the elution process. At the same time, high performance liquid chromatography and ultraviolet-spectrophotometry are used to measure the contents of salvianolic acid B and Terpene, which can be taken as a reference. Result: the beginning point and the end point of the elutropic process for the active region of Dan Shen Root: terminal point for water is 4th BV (refractive index: 0), but the beginning point for 30% alcohol, terminal point for 30% alcohol is 8th BV (refractive index: 10.5), but the beginning point for 80% alcohol, the terminal point for 80% alcohol is 11.5th BV (refractive index: 19.5). Conclusion: this method is not only accurate and reliable, but also convenient and rapid, thus it has very strong practic significance in the process of the traditional Chinese medicine filtered by colume Chromatography.

Keywords: Refractive method; colume Chromatography; active region of Dan Shen Root; the beginning point and the end point of elution

在中药制备工艺中,有效部位经柱层析分离纯化是常用而且关键的环节,其工艺科学合理准确是现代中药研究中的

重要领域。在大孔吸附树脂分离、纯化中药有效部位过程中,判断水洗变醇洗的转换点、开始接收洗脱液的始点及结

* 基金项目:“十五”国家科技攻关计划(No. 2004BA721A41)

作者简介:王跃生,教授,博士生导师,长期从事中药研究。

束接收洗脱液的终点的方法问题,仍处于粗放或盲法阶段,缺乏即时性的快速检测方法或缺乏用于判断洗脱始点和终点的方法。实际生产和科研应用中迫切需求一种实用性强、简单、快速、准确的判断始点和终点的方法与设备。

针对以上需求,本实验采用折光原理,建立了一种快速判断中药柱层析过程中洗脱液始终点的方法。本文通过介绍该方法在 AB-8 型大孔吸附树脂精制丹参有效部位的应用,实现推广该方法在柱层析中应用的目的,以增强柱层析操作过程的科学性,保障中药产品质量的稳定、均一。

1 折光法检测原理及操作方法

1.1 检测原理 利用手持式折光仪测定中药中总可溶性固形物(Total Soluble Solid, TSS)含量,可大致表示成分的含量。^[1]

光线从一种介质进入另一种介质时会产生折射现象,且入射角正弦之比恒为定值,此比值称为折光率。药液中可溶性固形物含量与折光率在一定条件下(同一温度、压力)成正比,故测定药液的折光率,可大致反映成分浓度。

1.2 操作方法 打开折光仪盖板,用干净的纱布或卷纸小心擦干棱镜玻璃面。在棱镜玻璃面上滴 2 滴蒸馏水,盖上盖板。于水平状态,从接眼部处观察,检查视野中明暗交界线是否处在刻度的零线上。若与零线不重合,则旋动刻度调节螺旋,使分界线面刚好落在零线上。打开盖板,用纱布或卷纸将水擦干,然后如上法在棱镜玻璃面上滴 2 滴洗脱液,进行观测,读取视野中明暗交界线上的刻度,记录,将折光数值经以下公式放大:

$$\Phi = (\text{Ln}(Xi - A) + 10) \times 5 - C$$

Φ 为放大值, Xi 为第 i 点的折光值, A 为该点的乙醇背景折光, C 为校正值(使折光曲线的基线回至零点)。

描绘折光率变化曲线图,通过折光率变化,反映洗脱液成分的变化规律,以之判断洗脱的始点和终点。

2 丹参有效部位的精制和检测过程

丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎,气微,味微苦涩,具有祛瘀止痛,活血通经,清心除烦之功效。^[3]主要含有丹酚酸类和萜类等成分,是治疗心血管疾病之良药,^[4]天津天士力药业将丹参有效部位精制,制成滴丸剂,市场效应颇高。

2.1 仪器与试剂 带垂容层析柱(2 cm × 50 cm), WYT32 手持折光仪, 岛津 UV-2550 紫外可见分光光度计, Agilent 高效液相色谱仪(DAD 检测器), 丹参(中国亳州京皖中药饮片厂)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品处理 取丹参药材 80 g, 分别加水 10 倍量提取 2 次, 每次 1 小时, 滤过, 减压浓缩(70 ℃)至 200 mL。精密吸取提取液 50 mL, 动态上 AB-8 型大孔吸附树脂(湿树脂 40 mL, 相当于 28 g), 水-30% 乙醇-80% 乙醇梯度洗脱,^[5]洗脱液每 0.25 BV 收集, 在线检测各 0.25 BV 点的折光率, 并且 HPLC 法检测丹酚酸 B, UV 法检测丹参萜类成分含量作参比。

2.2.2 折光法检测结果 将各洗脱液检测的折光率值代入

公式计算放大值, 得数据见表 1。

表 1 折光法检测数据

洗脱液	洗脱体积(BV)	折光率	放大值
—	0	15.5	—
30% 乙醇	5.5	11	8.53
蒸馏水	0.25	15.8	25.8
30% 乙醇	5.75	11	8.53
蒸馏水	0.5	15.8	25.8
30% 乙醇	6	10.8	5.98
蒸馏水	0.75	9.6	23.31
30% 乙醇	6.25	10.6	0.49
蒸馏水	1	5	20.05
30% 乙醇	6.5	10.6	0.49
蒸馏水	1.25	2.6	16.78
30% 乙醇	6.75	10.6	0.49
蒸馏水	1.5	1.4	13.68
30% 乙醇	7	10.6	0.49
蒸馏水	1.75	0.8	10.88
30% 乙醇	7.25	10.5	0
蒸馏水	2	0.6	9.45
30% 乙醇	7.5	10.5	0
蒸馏水	2.25	0.2	3.95
30% 乙醇	7.75	10.5	0
蒸馏水	2.5	0.1	0.49
30% 乙醇	8	10.5	0
蒸馏水	2.75	0	0
80% 乙醇	8.25	10.5	0
蒸馏水	3	0	0
80% 乙醇	8.5	10.6	0.49
蒸馏水	3.25	0	0
80% 乙醇	8.75	10.8	5.98
蒸馏水	3.5	0	0
80% 乙醇	9	11.4	11.47
蒸馏水	3.75	0	0
80% 乙醇	9.25	17.2	21.51
30% 乙醇	4	0	0
80% 乙醇	9.5	19.2	22.82
30% 乙醇	4.25	0.2	3.95
80% 乙醇	9.75	19.5	22.99
30% 乙醇	4.5	4	18.93
80% 乙醇	10	19.6	0.49
30% 乙醇	4.75	9.8	23.41
80% 乙醇	10.25	19.6	0.49
30% 乙醇	5	11.4	11.47
80% 乙醇	10.5	19.5	0
30% 乙醇	5.25	11.2	10.22
80% 乙醇	10.75	19.5	0

2.2.3 绘制折光率变化曲线 将洗脱的柱床体积和对应的放大值作图, 如图 1。

从折光率变化趋势图中明显看出成分浓度随洗脱液柱床体积的变化而变化, 水洗过程中 2.75BV 洗脱液折光率(及表观放大值)趋于零, 至 4 BV 洗脱液折光率无变化, 说明该过程中水洗完全; 以该点作为 30% 乙醇洗脱的始点, 洗脱至 6.25 BV, 折光率经抛物线变化过程后趋于零, 至 8BV 时洗脱液折光率无变化, 表观放大值为 0, 即该点为 30% 乙醇洗脱的终点, 同时为 80% 乙醇洗脱的始点; 80% 乙醇洗脱至

10.75 BV 时,表观放大值经抛物线变化过程后为 0,故该点为 80%乙醇洗脱的终点。

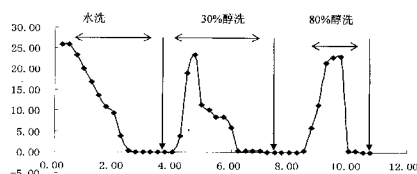


图 1 检测折光率变化趋势图

2.2.4 UV 检测和 HPLC 检测做参比 (1)UV 检测丹参萜类:以丹参酮 II A(浓度:0.01998 g/mL)为对照,在 270 nm^[6]下检测每 1 BV 样品的吸收值,以外标一点法计算丹参萜类成分含量,描绘洗脱液柱床体积和对应的丹参萜类成分含量变化趋势图,如图 2。

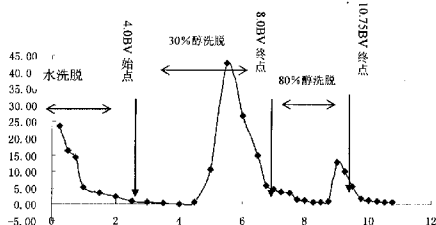


图 2 洗脱液中丹参萜类成分含量变化图

由图 2 分析,水洗至 4 BV 时,丹参萜类成分含量趋于零,该点为水洗的终点,同时为 30%乙醇洗脱的始点,至第 8 BV 时,萜类成分含量经抛物线变化过程后趋于零,即该点为 30%乙醇洗脱的终点,同时为 80%乙醇洗脱的始点,洗脱至 10.75 BV 时,萜类成分含量为零,即 80%乙醇洗脱的终点。

(2) HPLC 检测丹酚酸 B

检测方法:于每 1 BV 洗脱液中精密吸取样品 2 mL,置 50 mL 容量瓶中,加水至刻度,即得供试品溶液,过 0.25 μ L 滤膜,检测。

检测条件:迪马 C₁₈ 柱,甲醇-乙腈-甲酸-水(32-8-1-59),波长:283 nm,流速 1.0 mL/min。^[7]

从 HPLC 检测分析,第 3 BV 时丹酚酸含量低于检测线,第 5 BV 时含量最高,第 8 BV 时丹酚酸含量趋于零,说明第 8 BV 时丹酚酸 B 刚好洗脱完全,即为 30%乙醇洗脱的终点。

2.2.5 结果 从以上三个趋势图比较分析,丹参药材过 AB-8 型大孔吸附树脂水-30%乙醇-80%乙醇洗脱,以折光法检测判断水洗 0~4 BV,30%乙醇洗 4~8 BV,80%乙醇洗

8~10.75 BV 有效成分基本洗脱完全,以 UV 法和 HPLC 法检测作参比,结果相近。

表 2 HPLC 法检测丹酚酸 B 含量数据表

洗脱体积(BV)	峰面积	含量	吸附量/mg	解吸率(%)
3	0	0.00	457.39	87.29
4	1778.6	80.68		
5	4687	212.60		
6	1258.8	57.10		
7	870.3	39.48		
8	207.5	9.41		
丹参水提液	2333.7	583.01		
水洗液	1902.45	47.53		
流出液	1563	78.09		

3 讨论

(1)中药经柱层析分离纯化是常用而且关键的环节,目前判断始终点的方法有紫外、红外法。紫外法是可行的方法之一,但会受到被分离纯化物有无紫外吸收条件的限制,应用面受到一定的制约;近红外法是一种应用于化学工业生产过程的在线检测的成熟方法,由于仪器设备昂贵,尚未应用到中药制药工业。

(2)折光原理测定洗脱液折光率判断柱层析洗脱液始终点的方法在国内外尚属首例,与 UV 法、HPLC 法比较它具有以下特点:①简单、快速、成本低、准确、科学以及实用;②能控制中药整体成分,反映中药整体成分变化的全貌(UV 法仅反映一类成分,HPLC 法只反映单个成分)。

(3)本方法适用实验室或工业生产中,能对不同柱层析(树脂柱、硅胶柱、凝胶柱、聚酰胺柱层析等)精制中药成分洗脱液的起始点和终点进行判断。

参考文献

- [1]黄宏,蔡晓辉,汤腊梅.手持式智能折光仪设计[J].中国仪器仪表.2002(4):8~10
- [2]国家药典委员会主编.中华人民共和国药典(一部)[S].北京:化学工业出版社,2005.608
- [3]郭茂明等.丹参的药理、制剂与临床进展[J].重庆医学,1998,27(5):308~309
- [4]房信胜.大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究[J].中草药,2006,37(10):1502~1504
- [5]杨静.高效液相色谱法测定丹参软胶囊中丹参酮 II-A 的含量[J].辽宁医药,2006(1):28~30
- [6]密静英.不同厂家复方丹参片中丹酚酸 B 的含量比较[J].江西中医学院学报,2006,18(5):40

(收稿日期:2007-03-20)

欢迎投稿! 欢迎订阅!