

# 大孔吸附树脂富集白芍牡丹皮共有成分芍药苷的工艺研究

★ 廖正根<sup>1\*</sup> 蒋且英<sup>2</sup> 梁新丽<sup>1</sup> 王光发<sup>1</sup> (1 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 江西中医学院 南昌 330006)

**摘要:**目的:建立大孔吸附树脂分离纯化白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的工艺。方法:以 HPLC 法检测芍药苷的含量,以吸附容量和醇洗脱率为指标,研究确立纯化白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的树脂型号,用正交试验优选洗脱工艺条件。结果:D-301 大孔吸附树脂吸附药液后,先用 5BV 的纯化水、再用 12BV50% 的乙醇以 2BV/h 的速度洗脱,芍药苷的含量可由 4.62% 提高到 35.8%,精制度可达 776.4%,芍药苷的洗脱率可达 90%。结论:D-301 树脂综合性能良好,适用于白芍牡丹皮共有成分芍药苷的纯化。

**关键词:**白芍;牡丹皮;芍药苷;大孔树脂;纯化

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A

## Enrichment of Paeoniflorin in Common in *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa* by Macroporous Adsorption Resins

LIAO Zheng-gen<sup>1</sup>, JIANG Qie-ying<sup>2</sup>, LIANG Xin-li<sup>1</sup>, WANG Guang-fa<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

**Abstract:** Objective: To search for the method used in enriching paeoniflorin in common in *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa* by macroporous absorption resin. Methods: HPLC method was used to determine the concentrations of Paeoniflorin. 3 types of macroporous absorption resin were optimized, taking the absorption capacity and elution ratios as the criteria. The eluting conditions were optimized by using the orthogonal test, taking the elution ratios and product purity as the criteria. Results: The elution ratios and purity of Paeoniflorin were more than 90% and 35% respectively, following the optimized eluting conditions by the D-301 type macroporous absorption resin. Conclusion: The D-301 type macroporous absorption resin shows better comprehensive adsorption property. It is available for the enrichment of paeoniflorin in *Paeonia lactiflora* and *Paeonia suffruticosa*.

**Key words:** *Paeonia lactiflora* Pall; *Paeonia suffruticosa* Andr; Paeoniflorin; macroporous absorption resin; enrichment

白芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的干燥根,具有养血柔肝、缓急止痛之功效<sup>[1]78</sup>,芍药苷为白芍的主要成分;牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr)的干燥根皮,具有清热凉血、活血散瘀之功效<sup>[2]137</sup>。在很多常用的中成药如桂枝茯苓胶囊、明目地黄丸、十二乌鸡白凤丸中,该两味药常等量联合使用,其中桂枝茯苓胶囊已成为治疗妇科血瘀疾病的首选药。考虑到丹皮酚也是牡丹皮的主要活性成分之一,故本实验首先采用水蒸汽蒸馏法提取丹皮酚,同时本实验室前期研究表明牡丹皮药渣和白芍合提芍药苷的得率远远高于分别提取。为最大限度地除去无效成分,充分保留有效成分,以降低服用量,增加患者的顺应性

和便于中药制剂改革,本研究拟在用水蒸汽蒸馏法提取牡丹皮丹皮酚的基础上,合提牡丹皮药渣和白芍的共有成分芍药苷,并用大孔吸附树脂对该两味药的共有成分进行分离纯化。虽有以芍药苷为指标,用大孔树脂吸附法富集纯化白芍总苷、赤芍总苷、牡丹皮总苷的报道<sup>[2~8]</sup>,但这些报道均未采用多因素试验和统计学优化工艺参数,也未见有用大孔树脂吸附法分离纯化白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的文献报道,本实验旨在用统计分析技术筛选树脂型号,用正交试验设计优化大孔吸附树脂分离纯化白芍、牡丹皮共有成分芍药苷的工艺参数。

### 1 材料与仪器

\* 作者简介:廖正根,男,博士,副教授,研究方向:中药新剂型与新技术;E-mail:Lyzyg@163.com。

白芍、牡丹皮购于南昌市黄庆仁药栈,经江西中医学院张寿文副教授鉴定白芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的干燥根,牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr)的干燥根皮;芍药苷对照品(批号:0736-200118),购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用;D-101 型、D-201 型、D-301 型大孔吸附树脂,天津农药股份有限公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪。

## 2 方法和结果

### 2.1 芍药苷的含量测定方法

精密量取样品液适量,用 50% 甲醇适当稀释后,用微孔滤膜(0.45  $\mu$ m)滤过,作为供试品溶液;精密称取芍药苷对照品,用 50% 甲醇配成适当浓度的标准品溶液。采用高效液相色谱法测定。色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub> (250  $\times$  4.6mm);流动相:乙腈-水-磷酸-三乙胺(15:85:0.08:0.08);柱温:30℃;流速 1.0 ml/min;检测波长 232nm;进样量 10  $\mu$ l。

### 2.2 丹皮酚提取工艺

牡丹皮的药材打成最粗粉过 10 目筛,加水润湿 1.5 小时后,用流通蒸气蒸馏,收集馏出液,冷藏析晶,药渣备用。

### 2.3 白芍、牡丹皮(提取丹皮酚后的药渣)合提取液的制备与预处理

取等量的白芍、牡丹皮(水蒸气蒸馏丹皮酚后的药渣),用 80% 乙醇回流提取,提取液减压回收乙醇至无醇味,用蒸馏水调整至适当浓度,离心(5000r/min)10min,取上清液即得吸附原液,测定芍药苷含量。

表 1 不同型号大孔吸附树脂吸附与洗脱的比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 树脂(型号) | 吸附容量             | 水洗损失             | 损失率(%)            | 醇洗脱               | 醇洗脱率(%)           |
|--------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| D-101  | 20.3 $\pm$ 1.51  | 6.2 $\pm$ 0.70   | 30.8 $\pm$ 5.20   | 13.0 $\pm$ 0.30   | 64.3 $\pm$ 5.27   |
| D-201  | 13.9 $\pm$ 0.93* | 4.0 $\pm$ 0.56*  | 28.9 $\pm$ 3.87   | 9.5 $\pm$ 0.75*   | 68.7 $\pm$ 7.21   |
| D-301  | 20.1 $\pm$ 1.59  | 2.4 $\pm$ 0.26*▲ | 11.9 $\pm$ 0.40*▲ | 17.0 $\pm$ 0.53*▲ | 85.1 $\pm$ 8.42*▲ |

注:与 D-101 树脂比,\*  $P < 0.05$ ;与 D-201 比,▲  $P < 0.05$ 。

从表 1 可知,D-101 与 D-301 型树脂的吸附容量无显著性差异,均显著高于 D-201 型;D-301 型醇洗洗脱率显著高于 D-101 和 D-201 型,故选择 D-301 型大孔吸附树脂为富集白芍牡丹皮的树脂型号。

### 2.5 泄漏曲线的绘制及工作吸附量的确定

取 10.0 g D-301 型树脂处理后装柱(柱床体积约为 8 ml,即 BV=8 ml),以 2BV/h 的速度将浓度为 16.3 mg/ml 的吸附原液通过树脂柱,每 2 ml 收集一次流出液,以流出液体积与流出液浓度作图,结果见图 1。

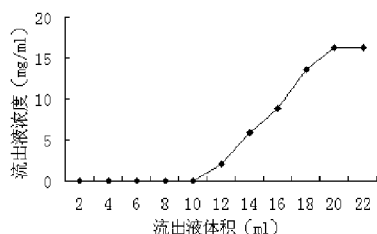


图 1 树脂泄漏曲线

由图 1 可见,当流出液体积为 10 ml 时,不出现泄漏,此

### 2.4 树脂型号的选择

2.4.1 树脂的预处理、装柱和再生 大孔吸附树脂以乙醇湿法装柱后,用乙醇洗至 254nm 波长下检测吸收度为零,并用乙醇浸泡保存,使用前,用纯化水洗至中性。再生时,先用乙醇洗至无色,换纯化水洗至无醇味,再加入 5 倍柱体积的 3% 的盐酸洗脱,以纯化水洗至中性,换 5 倍柱体积 5% 的 NaOH 溶液洗脱,水洗至中性,即可使用。

### 2.4.2 不同型号大孔吸附树脂吸附容量与洗脱率的比较

准确称取 15g 的 D-101、D-201、D-301 树脂湿法装柱,准确量取一定量的吸附原液以 2BV/h 循环吸附至过柱液中的芍药苷含量不变时,即达吸附平衡,按下式计算吸附容量(capacity C):

$$C = \frac{(M_{\text{前}} - M_{\text{后}})}{m}$$

式中  $M_{\text{前}}$  和  $M_{\text{后}}$  分别为吸附前和吸附后芍药苷质量,  $m$  为树脂质量。

吸附平衡后,先用纯化水洗至 Molish 反应阴性,再分别用 20% 乙醇,50% 乙醇各 200 ml 洗脱,测定纯化水、乙醇中的芍药苷的总量,分别用  $M_{\text{水}}$  和  $M_{\text{乙醇}}$  表示按下列公式计算水洗损失率(loss ratio Lr)和醇洗洗脱率(elution ratio Er):

$$Lr = \frac{M_{\text{水}}}{C \cdot m} \times 100\%$$

$$Er = \frac{M_{\text{乙醇}}}{C \cdot m} \times 100\%$$

结果见表 1。

时,树脂的工作吸附量为 16.3 mg/g 树脂,约为最大吸附量的 80%。

### 2.6 洗脱溶剂的选择

吸取吸附原液 15 ml 上柱,依次用纯化水 200 ml,10% 乙醇 150 ml,20% 乙醇 300 ml、50% 乙醇 150ml 梯度洗脱,洗脱液流速为 2BV/h,试验结果表明:芍药苷主要集中在 10% 和 20% 乙醇洗脱液中,占全部醇洗脱液中芍药苷的 94.10%,二者所占百分比比例分别为 38.15%、55.95%,在用 10% 和 20% 的乙醇洗脱后,仍有部分芍药苷被 50% 乙醇洗脱出来。因此,本试验重点考察 20%、50% 乙醇的洗脱效果。

吸取吸附原液 30 ml,分取 15 ml 上柱,一根树脂柱分别用纯化水 200 ml,20% 乙醇 200 ml 梯度洗脱,另一根树脂柱分别用纯化水 200 ml,50% 乙醇 200 ml 梯度洗脱,洗脱流速均为 2BV/h,两实验纯化水分别每 50 ml 收集 1 份、20% 乙醇或 50% 乙醇分别每 20 ml 收集一份,分别各收集 14 份,测定芍药苷含量,结果见图 2、图 3。结果表明 20% 乙醇的洗脱曲线平缓,洗脱溶剂量为 200 ml(即 17BV)时洗脱率为 70.3%;而 50% 乙醇的洗脱曲线呈双曲线型,洗脱溶剂量为 140 ml,即 12BV 时,洗脱率便可达 87.6%,故确定最终的洗脱溶剂

为 12BV 的 50% 乙醇。

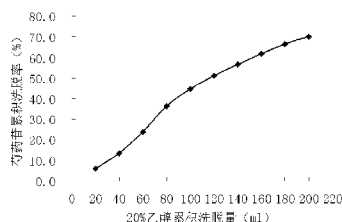


图 2 20% 乙醇芍药苷洗脱曲线

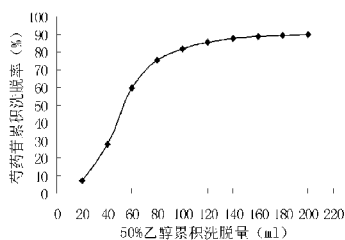


图 3 50% 乙醇芍药苷洗脱曲线

## 2.7 洗脱条件的优选

根据影响洗脱效果的一般因素,选择洗脱溶剂用量、洗脱流速、柱径高比三个较为重要的因素,以洗脱率和总固形物中芍药苷含量综合评分值为指标进行正交试验(见表 2、3)。

方差分析结果表明,洗脱流速、柱径高比三个因素均对洗脱效果有显著影响。而且由表 3 可知,  $A_1 < A_3 < A_2$ ,  $B_3 < B_2 < B_1$ ,  $C_3 < C_2 < C_1$ , 故我们选择柱径比为 8.3:1, 洗脱流速为 2BV/h, 洗脱溶剂用量为 5BV 的纯化水、12BV 的 50% 乙醇。

表 2 因素水平表

| 水平 | 因素     |                            |                       |
|----|--------|----------------------------|-----------------------|
|    | 柱径比(A) | 洗脱流速(B)/BV·h <sup>-1</sup> | 洗脱溶剂用量(C)/BV          |
| 1  | 5:1    | 2                          | 5 倍纯化水, 12 倍 50% 乙醇   |
| 2  | 8.3:1  | 3                          | 7.5 倍纯化水, 12 倍 50% 乙醇 |
| 3  | 10:1   | 4                          | 10 倍纯化水, 12 倍 50% 乙醇  |

表 3 正交试验结果表

| 实验号            | 因素     |        |        |        | 洗脱率 (%) | 洗脱总固形物中芍药苷含量 (%) | 综合评分   |
|----------------|--------|--------|--------|--------|---------|------------------|--------|
|                | A      | B      | C      | D      |         |                  |        |
| 1              | 1      | 1      | 1      | 1      | 85.06   | 35.02            | 120.08 |
| 2              | 1      | 2      | 2      | 2      | 83.47   | 34.87            | 118.34 |
| 3              | 1      | 3      | 3      | 3      | 81.88   | 34.40            | 116.28 |
| 4              | 2      | 1      | 2      | 3      | 87.51   | 35.44            | 122.95 |
| 5              | 2      | 2      | 3      | 1      | 86.20   | 35.21            | 121.41 |
| 6              | 2      | 3      | 1      | 2      | 85.47   | 35.39            | 120.86 |
| 7              | 3      | 1      | 3      | 2      | 85.62   | 34.21            | 119.83 |
| 8              | 3      | 1      | 1      | 3      | 86.12   | 34.82            | 120.94 |
| 9              | 3      | 3      | 2      | 1      | 84.23   | 34.03            | 118.26 |
| K <sub>1</sub> | 354.70 | 362.86 | 361.88 | 359.75 |         |                  |        |
| K <sub>2</sub> | 365.22 | 360.69 | 359.55 | 359.03 |         |                  |        |
| K <sub>3</sub> | 359.03 | 355.40 | 357.52 | 360.17 |         |                  |        |
| R              | 10.52  | 7.46   | 4.36   | 1.14   |         |                  |        |

表 4 方差分析表

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | 方差  | F 值 | 显著性        |
|------|-------|-----|-----|-----|------------|
| A    | 18.6  | 2   | 9.3 | 93  | $P < 0.05$ |
| B    | 9.9   | 2   | 5.0 | 50  | $P < 0.05$ |
| C    | 3.2   | 2   | 1.6 | 16  |            |
| D    | 0.2   | 2   | 0.1 |     |            |

2.8 验证试验结果 验证试验结果见表 5。结果表明:按照上述实验筛选出的最佳条件进行验证放大实验,重现性较好,三次实验的洗脱率均在 90% 以上,成品中芍药苷的含量均在 35% 以上,芍药苷的平均精制度达到 776.4%。

表 5 大孔树脂吸附法富集、纯化芍药苷工艺参数考察实验数据

| 测定指标                      | 试验 1  | 试验 2  | 试验 3  | $\bar{x} \pm s$   |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------------------|
| 上柱样品液总固形物/g               | 353   | 353   | 353   | 353               |
| 上柱液总固形物中芍药苷百分含量 (%)       | 4.62  | 4.62  | 4.62  | 4.62              |
| 蒸馏水洗脱液总固形物/g              | 221.1 | 222.0 | 222.6 | $222.0 \pm 0.59$  |
| 50% 乙醇洗脱液总固形物/g           | 41.3  | 41.9  | 42.3  | $41.8 \pm 0.50$   |
| 50% 乙醇洗脱液中芍药苷含量/g         | 15.3  | 14.8  | 14.8  | $15.0 \pm 0.34$   |
| 50% 乙醇洗脱液总固形物中芍药苷百分含量 (%) | 37.0  | 35.0  | 35.3  | $35.8 \pm 1.09$   |
| 芍药苷精制度 (%) *              | 801.9 | 757.3 | 764.5 | $774.6 \pm 23.90$ |

注: \* 芍药苷精制度 = (50% 乙醇洗脱液总固形物中芍药苷百分含量 / 上柱液总固形物中芍药苷百分含量)  $\times 100\%$

## 3 讨论

不同型号的大孔树脂因本身的极性和比表面积不同,对化学成分的吸收量与吸附力有差异,本实验选用的 D-101、D-301、D-201 型树脂极性依次增加,比表面积依次减少,其比吸收量依次下降,显示芍药苷的吸收量与吸附剂的比表面积成正相关。芍药苷是一个中等极性的化合物,具有一定极性的 D-301 型树脂对其具有较强的吸附力,而极性较大的 D-201 型树脂和无极性的 D-101 型树脂对其的吸附力则依次减少,因此,吸附完成后,用一定流速的水冲洗损失的量依次增加。本研究结果表明宜选用 D-301 型树脂对白芍、牡丹皮合提液中的芍药总苷进行纯化,与文献报道的选用 D-201<sup>[7]</sup>、D-101<sup>[8]</sup> 型树脂的结果不一致,其可能的原因是文献报道的均是对单味药材的芍药总苷进行纯化,而本项目是对两味药材的芍药总苷进行纯化,复方背景下中药的其它成分对芍药总苷的吸附和洗脱存在一定的影响。

中药用药的主要形式是复方,在中药制剂制备过程中,常依据药材所含目标成分溶解性的不同,将目标成分溶解性相似的药材合并提取,本实验根据白芍、牡丹皮的活性成分均是芍药苷类化合物的特点采用合并提取方案,实验研究也表明芍药苷合提的得率远远高于分提。

在白芍与牡丹皮共用的成方制剂中,也有部分制剂将牡丹皮提取丹皮酚后药渣与白芍合并提取,如桂枝茯苓胶囊<sup>[1]559~560</sup>,但提取后未对共提液进行纯化,故本实验采用树脂吸附技术对白芍、牡丹皮的共有成分进行纯化,结果表明 D-301 型树脂用于富集牡丹皮、白芍合提液中的芍药苷,可使芍药苷的纯度提高近 8 倍,干膏得率降低 8.4 倍。本实验为此类制剂提取精制芍药苷时提供参考;该工艺可满足大生产需要。

# 阿胶补血颗粒多糖提取工艺的研究

★ 简晖<sup>1,2\*</sup> 刘帅英<sup>1</sup> 龚建平<sup>2</sup> 罗晓健<sup>2</sup> 胡鹏翼<sup>1</sup> 张国松<sup>2</sup> 肖雄<sup>1\*\*</sup> (1. 江西中医学院 南昌 330006; 2. 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:确定阿胶补血颗粒(当归、黄芪、大枣)中多糖的理想提取工艺。方法:以多糖提取率、提取浸膏得率为指标,采用单因素考察提取溶媒,以溶媒量(A)、提取次数(B)和提取时间(C)为考察因素,采用正交设计法优化提取工艺。结果:确定提取溶媒为水,B因素和C因素对多糖含量的影响有显著性意义,A因素的影响不大。结论:理想提取工艺为 $A_3B_2C_3$ ,即提取2次,每次2h,加水量为10倍量。

**关键词:**阿胶补血颗粒;多糖;正交设计法;提取工艺

**中图分类号:**R 284.2 **文献标识码:**A

## Study on Extracting Craft of Polysaccharides in Ajiabuxue Granula

JIAN Hui<sup>1,2</sup>, LIU Shuai-ying<sup>1</sup>, GONG Jian-ping<sup>2</sup>, LUO Xiao-jian<sup>2</sup>, HU Peng-yi<sup>1</sup>, ZHANG Guo-song<sup>2</sup>, XIAO Xiong<sup>1</sup>

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

2. National Center of Pharmaceutical Engineering Research, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

**Abstract:** Objective: To fix optimum extracting craft of polysaccharides in Ajiabuxue Granula. Methods: The orthogonal design was used and menstruum capacity(A), extraction time(B) and refluxing time(C) were defined as factors of the design. Results: Ensure water as menstruum, B factor and C factor had notabled influence on the content of polysaccharides. Conclusion: Optimum extracting craft was defined as follows:  $A_3B_2C_3$ .

**Key words:** Ajiabuxue Granula; Polysaccharides; Orthogonal test; Extracting craft

阿胶补血颗粒处方由阿胶、当归、黄芪、大枣、葡萄糖酸 亚铁五味药组成,符合中国传统补血养生习惯,中西医结合,

\* 作者简介:简晖,男,副教授,主要从事中药复方新型制剂的研究。

\*\* 通讯作者:肖雄,男,讲师, Tel:13970953086。

本实验研究中曾研究了药液浓度、盐离子浓度对吸附容量的影响实验,发现药液浓度、盐离子浓度在较大的范围内对吸附容量影响不大,且 D-301 型树脂用于富集芍药苷具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、再生简便的特点,因而具有工业应用推广价值。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 化学工业出版社, 2005.
- [2] 金继曙, 都述虎, 种明才. 用大孔吸附树脂分离白芍总甙[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 31.
- [3] 姜焕荣, 裴旭红, 胡海伟, 等. 大孔吸附树脂用于赤芍总甙分离方

法的探索[J]. 中成药, 1999, 21(12): 644.

- [4] 裴晓玉, 尚诚, 王雅亮, 等. 大孔吸附树脂分离白芍中药药苷实验研究[J]. 中成药, 2005, 27(3): 350 - 351.
- [5] 刘永刚, 金向群, 叶瑾, 等. 大孔树脂纯化赤芍总苷的研究. 中药材, 2005, 28(3): 195 - 196.
- [6] 滕坤, 张莲珠, 张海丰, 等. HPLC 考察 DA201 大孔树脂对芍药苷的吸附容量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4): 871 - 872.
- [7] 桂双英, 周亚球, 柯仲成, 等. D101 型树脂对芍药苷吸附分离性能的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 25 - 27.
- [8] 刘成红, 程斌, 曹红, 等. 大孔树脂吸附法精制牡丹皮总苷的研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(10): 807 - 809.

(收稿日期:2007-03-20)