

•药剂•

复方柴胡汤大孔吸附树脂分离精制工艺的研究

全燕, 马振山, 王琳, 王元瑜 (中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要:以柴胡皂苷A、芍药苷、橙皮苷、甘草酸四种指标成分的含量为指标,考察复方柴胡汤大孔吸附树脂精制工艺。结果选用1倍(生药)量S型大孔树脂,以1倍量水洗,4倍(生药量)70%乙醇洗脱树脂为最佳工艺,大孔树脂反复使用40次,干膏率、橙皮苷及芍药苷含量均无下降趋势。

关键词: 复方柴胡汤; 精制工艺; 吸附树脂

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)05-0001-03

Studies on Pureparation Techniques of Compound Caihutang

TONG Yan, MA Zhen-shan, WANG Lin, WANG Yuan-yu

(Institute of Chinese Materia Medica, Beijing, 100700, China)

Abstract: The purification conditions by absorption resins were optimized by content determination of saikosaponin A, paeoniflorin, hesperidin and glycyrrhizic acid. S type synthetic absorption resin was selected. The optimal purification conditions were: specific input sample amount (ratio of weight of medical raw material to volume of resin, W/V) was one, ltime of water to clute the resin and collecting 4 times of 70% ethanol(V/W) as clution solvent. The yield and contents of paeoniflorin and hesperidin of dried extract, purified by the absorption resin used repeatedly for 40 times, was not decreased compared with the new resin.

Key words: Co. Caihutang; Purification condition; Absorption resin

复方柴胡汤是临床经验方,由柴胡、芍药、陈皮、甘草等组成,主治上呼吸道感染、发烧等,疗效肯定。“复方柴胡汤提取工艺的研究”^[1]表明,大孔树脂吸附法分离精制优于醇沉法及超滤法,大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂,具有较好的吸附性能,近年来开始应用于中草药化学成分的提取分离,是提取分离中草药水溶性成分有效的方法^[2~4],故我们采用此法提取分离复方柴胡汤饮中诸药的有效成分。本文就大孔树脂吸附型号、洗脱剂的浓度、洗脱剂用量、大孔树脂用量、水洗量等大孔树脂床吸附参数进行优选,并对树脂使用次数对吸附能力的影响进行了考察。

1 仪器与药品

岛津 LC-4A 高效液相色谱仪,岛津 CR-4A 数据处理机, ZORBAKRX-C₁₈ 色谱柱(4.6mm × 25cm); HP-100 D-101 型大孔吸附树脂(天津)。柴胡皂苷A对照品:纯度98%,由上海医药工业研究所提供,橙皮苷对照品(721-9405)、芍药苷对照品(763-9407)、甘草酸对照品(731-9403):纯度均为98%,由中国药品

生物制品检定所提供。有机溶剂均为分析纯,北京化工厂。

2 大孔吸附树脂型号的选择

在文献研究^[5]的基础上,选择弱极性的 HP-100、D-101 X S AB-8 等型号的大孔吸附树脂,使用过程中发现 HP-100 D-101 型的强度较差,AB-8 型在不同溶剂中的膨胀系数变化较大,均不利于生产,故选用强度较好的 X S 型 2 种大孔树脂,以柴胡皂苷A、橙皮苷、芍药苷、甘草酸含量为指标,考察其吸附能力。

按处方比例称取生药饮片,加水 12.8 倍(生药量),用水煮提取 2 次(1.5、1h),合并两次药液,放至室温,离心(2500rpm × 15min),上清液均分 3 份,一份为原汤剂,两份分别通过 1 倍(生药)量 S 型及 X 型大孔树脂,流出液弃去,用 5 倍量 70% 乙醇洗脱树脂床,乙醇液及原汤剂浓缩,真空干燥,分别测定干膏率及 4 种指标成分的含量,结果见表 1。

表 1 结果说明:药液通过 X S 型 2 种大孔树脂后出膏率均比汤剂降低 5~6 倍,而指标成分与汤剂相近,仅甘草酸含量有所下降,说明 2 种树脂均能吸附绝大部分指标成分,2 种树脂比较,S 吸附能力稍好,由于 S 型大孔树脂价格便宜、强度好、前处理较

容易,因而本工艺选择 S 型大孔树脂。

表 1 不同型号大孔树脂的吸附作用

样品	生药量 (g)	干膏率 (%)	含量(mg/g 生药)			
			芍药苷	甘草酸	橙皮苷	柴胡皂苷 A
汤剂	108	27.21	10.23	2.87	2.89	0.05
S 乙醇洗脱液	108	4.78	10.60	1.52	3.71	0.04
X 乙醇洗脱液	108	4.43	9.18	1.67	2.19	0.04

3 大孔树脂床吸附参数的正交试验

3.1 正交试验设计 按 $L_9(3^4)$ 正交设计进行试验,以柴胡皂苷 A、橙皮苷、芍药苷、甘草酸含量为指标,选用 S 型大孔树脂,考察了洗脱剂的浓度、洗脱剂用量、大孔树脂用量 3 个因素,每个因素设计 3 个水平,见表 2。

表 2 试验因素水平

因素	A	B	C	D
洗脱剂浓度(%)	洗脱剂用量(倍生药)	大孔树脂量(倍生药)	空列	
1	30	4	3	
2	50	5	2	
3	70	6	1	

3.2 实验方法及数据 按处方比例称取生药饮片,加水 12.8 倍(为生药量),用水提法提取 2 次(1.5、1h),合并两次药液,滤过离心,均分成 9 份,分别过树脂床按 $L_9(3^4)$ 方案进行实验。见表 3。对柴胡皂苷 A、芍药苷、橙皮苷、甘草酸含量进行极差、方差分析。见表 4。

表 3 实验设计与结果

因素	A	B	C	D	含量(mg/g 生药)			
					干膏率(%)	柴胡皂苷 A	芍药苷	橙皮苷 甘草酸
1	1	1	1	1	2.68	0.042	2.43	3.58 1.00
2	1	2	2	2	4.20	0.042	7.63	3.28 0.36
3	1	3	3	3	5.66	0.034	9.48	3.39 0.00
4	2	1	2	3	4.65	0.047	7.09	4.09 2.93
5	2	2	3	1	6.67	0.051	10.59	4.35 3.21
6	2	3	1	2	3.69	0.020	3.30	5.45 3.13
7	3	1	3	2	6.09	0.061	9.71	4.72 3.17
8	3	2	1	3	3.42	0.056	3.65	4.87 3.09
9	3	3	2	1	4.38	0.063	6.23	3.76 3.16

3.3 结果与分析 直观分析因素主次由极差(R)大小确定,柴胡皂苷 A: A> B= C; 芍药苷: C> B> A; 橙皮苷: A> C> B; 甘草酸: A> C> B。较好因素水平: 柴胡皂苷 A $A_3C_{2B_1}$; 芍药苷 $C_3B_2A_2$; 橙皮苷 $A_3C_3B_1$; 甘草酸 $A_3C_3B_1$ 。四个指标因素主次基本相同,其中

柴胡皂苷 A、橙皮苷、甘草酸三个指标因素主次均一致,仅芍药苷主次不同,综合分析,最佳条件为: $A_3B_1C_3$ 。方差分析: 对柴胡皂苷 A 及陈皮苷,各因素对指标成分均无显著性影响。对芍药苷,因素 B、C 对指标成分有显著性影响, A 因素无显著性影响。对甘草酸,因素 A 对指标的影响较显著,其它因素的变化对指标影响不大。

根据方差分析,选择最佳工艺为: $A_3B_1C_3$,即洗脱剂乙醇浓度为 70%,洗脱剂用量为 4 倍(生药量),大孔树脂用量为 1 倍(生药量)。

表 4 极差、方差分析

指标	柴胡皂苷 A(mg/100g 生药)				芍药苷(mg/g 生药)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	11.8	15.0	11.8	15.6	19.52	19.27	9.39	19.25
K_2	11.8	14.9	15.2	12.3	20.99	21.85	20.93	20.60
K_3	18.0	11.7	14.6	13.8	19.60	19.02	29.79	20.23
R	2.1	1.17	1.13	2.02	0.492	0.944	6.86	0.448
S	8.61	2.61	2.38	2.40	0.454	6.798	69.79	0.098
f	2	2	2	2	2	2	2	2
F	3.58	1.09	0.99		4.610	68.84*	706.64**	

指标	橙皮苷(mg/g 生药)				甘草酸(mg/g 生药)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	10.26	16.08	13.89	11.69	1.63	7.10	7.21	7.33
K_2	13.89	12.50	11.13	17.05	9.27	6.66	6.45	6.66
K_3	17.05	12.60	16.16	12.34	9.41	6.28	6.38	6.02
R	2.259	1.204	1.685	1.815	2.67	0.274	0.281	0.437
S	7.70	2.778	4.242	5.926	13.212	0.121	0.143	0.155
f	2	2	2	2	2	2	2	2
F	1.303	0.469	0.716		85.24*	0.781	0.920	

注: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

3.4 大孔吸附树脂水洗量的选择 复方柴胡汤药液 5 份,分别通过 5 根 1 倍生药量的树脂柱,流出液弃去,吸附树脂柱 1 根不经水洗,4 根分别用 1~ 4 倍(生药)量水洗,用 70% 乙醇洗脱树脂床,收集乙醇洗脱液,浓缩、真空干燥。结果见表 5。

表 5 数据说明: 药液通过树脂柱后,水洗可使干膏率逐步降低,而 4 种指标成分含量并未降低,说明 4 倍量水洗对指标成分的含量无影响,1 倍量与 3 倍量水洗干膏率接近,故选择 1 倍量水洗为宜。

3.5 大孔吸附树脂床吸附能力的考察 根据正交优选结果,树脂用 1 倍(生药)量稍优于 2 倍、3 倍(生药)量,指标成分芍药苷、陈皮苷、甘草酸的含量均以 1 倍(生药)量的树脂最高,仅柴胡皂苷 A2 倍(生药)

量树脂稍优于 1 倍(生药)量树脂。因而选用 1 倍(生药)量的树脂,与不经过树脂的原汤剂比较,考察药液通过树脂床的流出液、水洗树脂床流出液及 70% 乙醇洗脱液中陈皮苷的含量,进一步考察树脂的吸附能力。见表 6。

表 5 不同水洗量对指标成分含量的影响

样品	生药量	干膏量	干膏率	含量(mg/g 生药)			
	(g)	(g)	(%)	芍药苷	甘草酸	橙皮苷	柴胡皂苷 A
不经水洗	216	14.08	6.52	11.09	1.62	3.48	0.029
1 倍量水洗	216	10.35	4.79	10.91	1.62	3.26	0.030
2 倍量水洗	216	10.07	4.66	11.24	1.60	3.43	0.026
3 倍量水洗	216	9.98	4.62	10.39	1.83	4.11	0.032
4 倍量水洗	216	9.79	4.53	11.86	1.65	3.43	0.030

表 6 1 倍(生药)量树脂吸附能力的考察

样品	生药量	干膏率	含量(mg/g 生药)			
	(g)	(%)	芍药苷	甘草酸	橙皮苷	柴胡皂苷 A
原汤剂	108	27.21	10.23	3.07	2.89	0.071
药液过树脂流出液	108	20.07	未检出	未检出	未检出	未检出
水洗树脂床流出液	108	2.22	未检出	未检出	0.42	未检出
70% 乙醇洗脱液	108	4.78	10.60	3.25	3.71	0.076

药液经过树脂床后,流出液中未检出指标成分,表明指标成分均被全部吸附,树脂水洗脱液(1 倍生药量)几乎不含指标成分,并可以明显降低干膏率;70% 乙醇(4 倍生药量)可将绝大部分指标成分洗脱下来。

表 7 树脂多次使用对干膏率的影响

样品	干膏率 (%)	样品	干膏率 (%)	样品	干膏率 (%)
1 次树脂(新)	4.37	14 次树脂	4.57	27 次树脂	4.23
2 次树脂	5.04	15 次树脂	4.21	28 次树脂	4.36
3 次树脂	5.00	16 次树脂	4.63	29 次树脂	4.03
4 次树脂	4.74	17 次树脂	4.81	30 次树脂	4.33
5 次树脂	4.83	18 次树脂	4.16	31 次树脂	5.06
6 次树脂	4.67	19 次树脂	4.47	32 次树脂	4.76
7 次树脂	4.66	20 次树脂	4.38	33 次树脂	4.42
8 次树脂	4.10	21 次树脂	4.47	34 次树脂	4.85
9 次树脂	5.04	22 次树脂	4.68	35 次树脂	5.06
10 次树脂	4.66	23 次树脂	4.66	36 次树脂	4.83
11 次树脂	4.53	24 次树脂	4.77	38 次树脂	4.90
12 次树脂	5.06	25 次树脂	4.59	39 次树脂	4.28
13 次树脂	4.18	26 次树脂	4.43	40 次树脂	4.72

4 树脂使用次数对吸附能力的影响

将同批药液均分 40 份,在同一树脂床上反复按优选的制备工艺使用 40 次,每次之间用水洗至流出液含醇量为 0(酒精比重计显示)。测定每个样品的干膏率,见表 7;抽样测定橙皮苷及芍药苷的含量,结果见表 8。

表 8 树脂多次使用对指标成分的影响

树脂使用次数	生药量(g)	橙皮苷含量(mg/g 生药)	芍药苷含量(mg/g 生药)
1	27	2.45	—
2	27	2.62	14.00
35	27	2.36	15.34
38	27	2.55	13.74

以上结果表明:树脂不经处理反复使用 40 次,干膏率无下降趋势,橙皮苷及芍药苷含量均较高,也未发现下降趋势。

5 讨论

大孔吸附树脂是近年来开始应用于中草药化学成分提取分离,尤其是分离水溶性成分的有效方法,我们对复方柴胡汤组成药物主要有效成分的性质进行了分析,所含水溶性成分较多,且主成分的性质相近,采用大孔树脂对该复方的有效成分进行提取分离,通过实验研究,证明此法是可行的。

大孔树脂进行分离时,需要配合做一定的处理工作,如树脂和提取药液的预处理,以达到最佳的吸附效果,避免有效成分的损失。

影响大孔吸附树脂分离的因素较多,为了达到较好的分离效果,我们采用正交实验法对洗脱溶媒乙醇浓度,洗脱溶媒用量及大孔树脂用量进行考察,结果表明:洗脱溶媒乙醇浓度为 70%,洗脱溶媒用量为 4 倍(生药量),树脂用量为 1 倍(生药量)。树脂不经处理反复使用 40 次,干膏率无下降趋势,橙皮苷及芍药苷含量均较高,也未发现下降趋势。树脂硬度较好,未发现有树脂破碎现象。由于此项考察为长期工作,可在生产过程中逐步完善,建议生产厂家在树脂使用 40 次以后,应监控橙皮苷的含量,如含量下降至质量标准规定的下限,应对树脂进行再生处理。有关大孔树脂处理、再生及有机残留物检查的研究将另文报告。

参考文献:

- [1] 马振山,全燕,王琳,等.复方柴胡汤提取分离的研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,(4):1.
- [2] 李伯庭,王湘,李小进.大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J].中草药,1990,21(8):42-44.
- [3] 唐第光.大孔吸附树脂法提取三七总皂苷工艺探讨[J].中成药,1990,12(8):5-6.
- [4] 宓晓黎,杨焱,成恒嵩,等.大孔吸附树脂技术应用于复方中成药制备工艺的研究[J].离子交换与吸附,1997,13(6):594-598.
- [5] 马振山.大孔吸附树脂在药学领域中的应用[J].中成药,1997,19(12):40-41.