

大黄总蒽醌大孔树脂纯化工艺优化

王宝才,尹蓉莉*,李东芬,陈金玉,吴圣琴,赵明琴
(成都中医药大学,成都 611137)

[摘要] 目的:筛选大黄总蒽醌类成分的最佳纯化工艺。方法:以总蒽醌类成分的含量为指标,比较不同型号的大孔树脂对大黄总蒽醌类成分的吸附性能和解析能力,从而筛选出适宜的树脂类型。采用单因素考察法筛选树脂纯化工艺中的最大上样量、上样速度、洗脱剂浓度、速度、用量等参数。结果:AB-8 型大孔树脂纯化大黄的工艺,固形物收率由原来的 38.03% 下降到 12.23%,主要蒽醌类成分的洗脱率 82.96%。结论:AB-8 树脂吸附大黄总蒽醌的纯化方法是切实可行的,同时具有良好的应用前景。

[关键词] 纯化工艺;大孔树脂;大黄总蒽醌类成分;含量测定

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0016-04

Optimum Purification Technology of Total Anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei by Macroporous Resin

WANG Bao-cai, YIN Rong-li*, LI Dong-fen, CHEN Jin-yu, WU Sheng-qin, ZHAO Ming-qin
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[收稿日期] 20101026(014)

[第一作者] 王宝才,硕士研究生,研究方向:中药生产新技术和新剂型, Tel:13880141071, E-mail:wbc2004@163.com

[通讯作者] *尹蓉莉,教授,博导,从事中药新制剂,新剂型,新技术研究, Tel:028-88000762, E-mail:yinronglili@163.com

压较大,可能出现药物突释,衣膜破裂现象,因此, NaHCO₃ 用量适宜。

渗透泵型控释片的释药孔径在一定范围内对药物释放的影响并不明显;释药孔径过小,药物颗粒容易堵塞药孔,从而导致释药不完全,影响药物的释放行为;释药孔径过大,药物的释放不再以渗透压为驱动力,还包括了扩散释药,从而会影响渗透泵型控释片零级释药特征。试验中发现,一侧打孔时,由于释药前期渗透压过大,致使药物未能及时释出,并且出现药物容易堆积堵塞释药孔现象,双侧打孔可避免上述问题,且不影响制剂的体内释药行为。

缓控释制剂释放度实验方法可选用溶出度测定有关装置,主要有转篮法、浆法和小杯法,一般胶囊剂选择用转篮法,片剂选择用浆法,难溶性或低剂量规格固体制剂选用小杯法^[6]。因此,本试验选择小杯法能够满足实验方法需求。

[参考文献]

- [1] 刘勇民. 维吾尔药志(上)[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:405.
- [2] 陈志朋,朱家壁. 口服渗透泵制剂的研究进展[J]. 国外医学-药学分册,2005,32(2):87.
- [3] 潘卫三,常明,刘宏飞,等. 盐酸氨溴索渗透泵控释片的体外释放度考察[J]. 中国新药杂志,2003,12(7):543.
- [4] LU E X, JIANG Z Q, ZHANG Q Z, et al. A water-insoluble drug monolithic osmotic table system utilizing gum arabic as an osmotic, suspending and expanding agent[J]. J Controlled Release, 2003, 92(3):375.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2010:附录 85,87.
- [6] 唐星. 口服缓控释制剂[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:427.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] **Objective:** To screen out the optimum technology for purification of total anthraquinones from Radix et Rhizoma Rhei. **Method:** Adsorption performance and desorption capacity were compared with different types of macroporous resin with the content of total anthraquinones as the target, so as to select the appropriate resin category. Thus, specific parameters of greatest sample volume, sample speed and elution solution etc were selected from resin purification technology by single-factor study. **Result:** The technology for AB-8 macroporous resin to purify total anthraquinones from Rheum could not only guarantee the elution rate of 82.96% of major effective indigent, but also decrease the solid content from 38.03% to 12.23% at the same time. **Conclusion:** AB-8 had a good effect on the adsorption of total anthraquinones from Rheum and has a good application prospect.

[Key words] purification; macroporous resin; total anthraquinones; determination

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎,主要有效成分为蒽醌类衍生物^[1]。大黄具有胃黏膜保护作用,能促进胃黏膜前列腺素(PEG)生成,增强胃肠黏膜屏障功能。在治疗与幽门螺杆菌(HP)相关的胃炎及消化性溃疡方面,大黄中的游离蒽醌类衍生物对HP有抑制作用,大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸等对幽门螺杆菌均有抑制作用,是抗HP引起的胃炎及胃溃疡的主要活性成分。大黄素可抑制幽门螺杆菌的生长及其所致的DNA损伤^[2-4]。

近年来大孔树脂广泛运用于中药制剂纯化精制领域,其特点是吸附容量大,再生简单,效果可靠,尤其适合于从水溶液中分离化学成分,大孔树脂在精制蒽醌类、黄酮类、皂苷类、生物碱类等大类中药有效成分能取得了良好分离效果的同时,还能显著降低固形物收率,进一步减少服用剂量^[5-6]。

1 材料

Shimadzu LC-20 Atvp 高效液相色谱仪;低速大容量离心机;BUG25-12 型超声波清洗机;BP211S 型电子天平(德国赛多利斯公司)。S-8, HPD-100, AB-8, X-5 型大孔树脂(沧州宝恩化工有限公司,医用级)。甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂、试药均为分析纯。大黄购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经本校生药教研室卢先明教授鉴定符合《中国药典》2010 年版一部大黄项下相关要求;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品均购于中国药品生物制品检定所(批号分别为 110795-200806, 110757-200206, 110756-200110, 110796-200311, 110758-200611)。

2 方法与结果

2.1 上柱药液的制备 称取大黄药材 200 g,用

60% 乙醇浸泡 24 h,以 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的渗漉速度收集 10 倍量,回收乙醇至无醇味,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清液加水适量,配成含生药 $0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液备用。

2.2 大黄总蒽醌类成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱 DIKMA C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.1% 磷酸(85:15);检测波长 254 nm;流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

2.1.2 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品溶液(含芦荟大黄素 $18.60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大黄酸 $17.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大黄素 $17.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大黄酚 $16.40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 大黄素甲醚 $8.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2, 4, 6, 8, 10, 16, 20 μL 进样测定,分别以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的进样量(μg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标绘制标准曲线。回归方程为芦荟大黄素 $Y_1 = 5 \times 10^6 X - 2.3 \times 10^4, r = 0.9997 (n = 7)$;大黄酸 $Y_2 = 4 \times 10^6 X - 2.1 \times 10^4, r = 0.9998 (n = 7)$;大黄素 $Y_3 = 3 \times 10^6 X - 1.3 \times 10^4, r = 0.9999 (n = 7)$;大黄酚 $Y_4 = 5 \times 10^6 X - 2.2 \times 10^4, r = 0.9999 (n = 7)$;大黄素甲醚 $Y_5 = 3 \times 10^6 X - 7.7 \times 10^3, r = 0.9999 (n = 7)$ 。结果表明,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样质量分别在 0.033 1 ~ 0.331 2 μg , 0.034 4 ~ 0.334 0 μg , 0.034 7 ~ 0.347 2 μg , 0.032 8 ~ 0.032 8 μg , 0.017 1 ~ 0.171 1 μg 与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3 大孔树脂型号的筛选

2.3.1 静态吸附 准确称取经过预处理的 5 种型号的树脂各 10 g(吸干其表面水分),置于 150 mL 的具塞锥形瓶中,各加入 80 mL 大黄提取液,每 10 min 振摇 1 次,振摇 2 h,静置过夜,使达饱和吸附。分别取各树脂吸附后的溶液测定总蒽醌的含量。按下式

计算各树脂的吸附量和吸附率,结果见表 1。

吸附量 = $(C_0 - C_r) \times V/W$

吸附率 = $(C_0 - C_r) / C_0 \times 100\%$

式中, C_0 为原液质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); C_r 为吸附后浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); V 为吸附液体积 (mL); W 为树脂质量 (g)。

2.3.2 静态洗脱 取上述吸附饱和的树脂用去离子水洗洗后,分别加入 50% 乙醇 50 mL,每 10 min 振荡 1 次,振荡 2 h,静置过夜,滤过,收集续滤液,分别测定其中总蒽醌的含量。按下式计算洗脱率,结果见表 1。

洗脱率 = $CD \times VD / [(C_0 - C_r) \times V] \times 100\%$

式中, CD 为洗脱液浓度, VD 为洗脱液体积, C_0, C_r, V 同上。

表 1 不同型号树脂对大黄总蒽醌的静态交换吸附

树脂型号	吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	吸附率/%	洗脱率/%
S-8	7.08	44.47	32.21
HPD-100	10.21	64.15	38.56
AB-8	10.54	66.27	42.16
聚酰胺	5.07	31.88	41.60
X-5	10.33	64.94	37.78

由表 1 结果可知,HPD-100,AB-8,X-5 型树脂对大会总蒽醌的吸附量明显大于其他树脂,且三者的洗脱率都比较接近,故选择 HPD-100,AB-8,X-5 型树脂进行下一步动态筛选。

2.3.3 动态吸附-洗脱 取 HPD-100,AB-8,X-5 型树脂各 10 g,湿法装柱(柱体积大约 15 mL)。分别取 80 mL 上柱药液以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,先用 4 BV 水以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,再用 4 BV50% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 洗脱,收集洗脱液,分别测定流出液及 50% 乙醇洗脱液大黄总蒽醌的含量,计算大孔树脂的动态吸附量及洗脱率,结果见表 2。

表 2 3 种型号树脂对大黄总蒽醌的吸附量与洗脱率比较

树脂型号	吸附量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	洗脱率/%
HPD-100	9.62	42.72
AB-8	10.07	51.20
X-5	9.41	43.91

由表 2 结果可知,在动态吸附-洗脱试验中,AB-8 型树脂的吸附与解脱性能要优于 S-8 和 HPD-100 型树脂,故最终选择 AB-8 型树脂来分离精制大黄。

2.4 AB-8 型树脂分离精制大黄醇提液的具体参数优化

2.4.1 最大上样量的考察 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 15 mL,湿法装柱,取上柱液以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,按柱体积(每份 15 mL)收集流出液,依次标号,测定其中大黄总蒽醌的含量,再绘制泄漏曲线。结果见图 1。

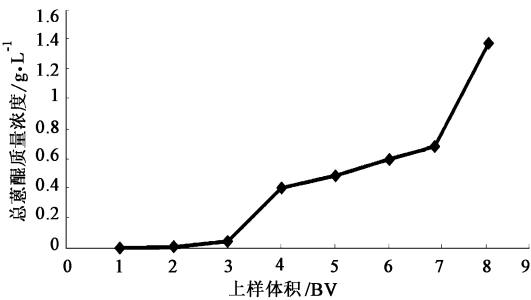


图 1 大黄总蒽醌的泄漏曲线

由结果可知,大黄总蒽醌在第 3 份时有微量泄漏,所以确定最大上样量为 3 BL,即 45 mL。

2.4.2 洗脱剂浓度的考察 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 15 mL,湿法装柱,取上柱液 45 mL 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,先用 4 BV 的水洗脱后,再分别用 6 BV 的 30% 乙醇,50% 乙醇,60% 乙醇,70% 乙醇,80% 乙醇,95% 乙醇以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的速度洗脱,收集洗脱液,测定其中大黄总蒽醌的含量,计算洗脱率,结果大黄总蒽醌洗脱率分别为 17.27%, 59.26%, 59.57%, 68.29%, 70.25%, 72.14%。

由结果可知,随着乙醇体积分数的升高,对大黄总蒽醌洗脱率有增大的趋势,但 70% 乙醇的洗脱率与 95% 乙醇的差别不大,为节省成本,确定洗脱剂为 70% 乙醇。

2.4.3 洗脱速度的考察 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 15 mL,湿法装柱,取上柱液 60 mL 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,先用 4 BV 的水洗脱后,再用 6 BV 的 70% 乙醇分别按 1,2,3,4,5 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,收集洗脱液,测定其中大黄总蒽醌的含量,计算二者的洗脱率,结果大黄总蒽醌洗脱率分别为 71.05%, 68.29%, 63.92%, 59.58%, 51.99%。

2.4.4 洗脱剂用量的考察 取经预处理的 AB-8 型湿树脂 15 mL,湿法装柱,取上柱液 45 mL 以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速上样,先用 4 BV 的水洗脱后,再用 70% 乙醇,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速洗脱,按树脂床体积数(即每份 15 mL)收集洗脱液,依次标号,测定其中葛根素及黄芩苷的含量,再绘制洗脱曲线,结果见

图 2。

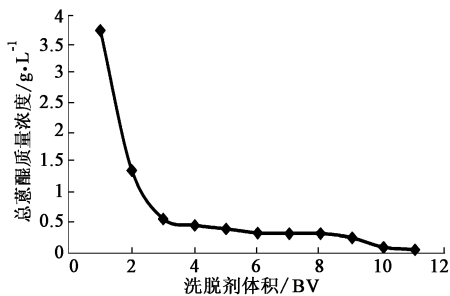


图 2 大黄总蒽醌的洗脱曲线

由结果可知,当洗脱剂用量为 10 BV 时,大黄总蒽醌基本洗脱完全,因此,确定,洗脱剂的用量为 10 BV,即 150 mL。

2.5 AB-8 型树脂纯化大黄工艺的验证试验 按上述筛选出的工艺参数安排验证试验,结果如表 5。

表 5 树脂纯化工艺验证试验结果 %

No.	大黄总蒽醌		固形物	
	洗脱率	RSD	收率	RSD
1	82.13	0.89	11.73	1.94
2	83.66		12.30	
3	83.19		12.63	

由验证试验可知,AB-8 型大孔树脂纯化大黄的工艺,固形物收率由原来的 38.03% 下降到 12.23%,主要蒽醌类成分的洗脱率 82.96%,为后面的成型工艺打下基础。最终确定大孔树脂纯化大黄的工艺为:取上柱液(相当于 0.2 g 生药/mL)上 AB-8 型大孔树脂,上样速度 2 BV·h⁻¹,最大上样量为 3 BV,洗脱剂 70% 乙醇,洗脱速度 2 BV·h⁻¹,洗脱剂用量 10 BV。

3 讨论

本试验选择了 5 种大孔树脂,考察其对大黄总蒽醌的吸附率和解吸率,最终选择 AB-8 大孔树脂,

进而考察了 AB-8 型大孔树脂上样量,洗脱剂浓度、体积、流速等因素对大黄总蒽醌成分的富集纯化效果的影响。

大黄提取液经过 AB-8 大孔树脂富集纯化后,干膏收率为 12.23%,大黄总蒽醌的转移率达到 80% 以上。作者查阅相关文献发现,大黄经过大孔树脂富集纯化后,干膏得率一般小于 10% (甚至可以达到 6%),是因为仅选择了大黄总蒽醌中的少数成分作为考察纯化工艺的指标。在本试验中,若以大黄素、大黄酚等作为考察纯化工艺的指标成分,最大上样量可达到 6 BV,而大孔树脂吸附固形物的能力是一定的,通过粗略计算,干膏收率远远小于 10%。因此,本试验以大黄总蒽醌的含量为指标,虽然干膏收率略大于文献报道,但从保留大黄有效成分的角度考虑,更为科学合理。

[参考文献]

[1] 李敏,李丽霞,刘渝,等. 大黄研究进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(4):34.

[2] 丁艳,黄志华. 大黄素药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):236.

[3] Wang H H, Chung J G. Emodin——induced inhibition of growth and DNA damage in the *Helicobacter pylori* [J]. Curr Microbiol,1997,35 (5): 262.

[4] 张瑞雪. 浅谈大黄泻下以外的功效[J]. 中国中医药现代远程教育,2008,6(10):1217.

[5] 李琛. 大孔树脂在中药成份分离中的应用进展[J]. 湖北中医杂志,2007,29(10):64.

[6] 陈强. 大孔吸附树脂在中药新药制备工艺研究中的应用[J]. 福建中医学院学报,2009,19(2):67.

[责任编辑 全燕]