

溶液状态下很不稳定,所以在保存时需要选取一个合适的条件,比如在高质量浓度、低pH值、低温条件下基本稳定。

随着丹参酚酸B作为一种具有心脑血管疾病治疗效果的药物的开发和应用,如何保持其在生产处理过程中的稳定性是一个越来越急迫的问题。本实验对影响溶液中丹参酚酸B稳定性的因素进行了初步探讨,所得结果虽然可满足丹参酚酸B提取

分离过程中的技术要求,但对于其水溶液制剂如何保持丹参酚酸B的稳定性还需进一步探索。

References:

- [1] Song Z Y. *Modern Research of Chinese Herbal Medicine* (中草药现代研究) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Perking Unted Medical College Unted Press, 1996.
- [2] Zhang Q W, Zhang Y, Li J P, et al. Determination of salvianolic acid B in the radix of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26(12): 849-850.

大孔吸附树脂法分离纯化虎杖中白藜芦醇的研究

向海艳,周春山*,杜邵龙

(中南大学化学化工学院,湖南长沙 410083)

摘要:目的 研究大孔吸附树脂分离纯化虎杖中白藜芦醇的工艺条件及参数。方法 以白藜芦醇的吸附量和解吸率为考察指标,从中筛选树脂,并研究大孔吸附树脂分离纯化白藜芦醇的吸附性能和洗脱参数。结果 NKA-I树脂对白藜芦醇有较好的吸附分离效果,适合于虎杖中白藜芦醇的提纯,经该树脂吸附解吸,饱和吸附量可达31.6 mg/g,解吸率达91.7%。结论 通过大孔树脂分离纯化后,终产品中白藜芦醇的纯度可达31.28%,而上柱前粗提物中白藜芦醇纯度为4.35%。说明采用本法分离纯化虎杖中白藜芦醇是可行的。

关键词:虎杖;白藜芦醇;大孔吸附树脂;分离纯化

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)02-0207-04

Separation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* by macroporous adsorption resin

XIANG Hai-yan, ZHOU Chun-shan*, DU Shao-long

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083, China)

Key words: *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.; resveratrol; macroporous adsorption resin; isolation and purification

虎杖系蓼科属多年生草本植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根,收载于《中华人民共和国药典》2000年版一部,具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰的作用。主要含有蒽醌类和萜类化合物,其中萜类成分白藜芦醇具有抗菌、抗癌、抗炎、抗过敏、降血脂和抗氧化等多方面的药理活性,是目前最有希望的抗癌剂之一^[1~3]。

大孔吸附树脂具有吸附快、解吸快、吸附容量大、易于再生、使用寿命长等优点,现已广泛应用于天然产物的分离和富集。但虎杖中白藜芦醇的大孔吸附树脂提取分离方面尚未见报道。有文献报道采用有机溶剂萃取法纯化虎杖中白藜芦醇^[4],但该法

存在有机试剂和能量消耗大,对环境污染严重等问题。本实验采用大孔树脂法取代传统的液-液萃取分离提取工艺,取得了令人满意的效果。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂: Biotronik BT8100 高效液相色谱仪(德国); DSY-1-2 恒温水浴锅(北京东震科学仪器厂); 冷冻干燥机(上海); ZD-2 型调速多用振荡器(江苏); 玻璃色谱柱(280 mm×20 mm); 树脂均购自南开大学化工厂; 色谱分析用甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。白藜芦醇(纯度>98%)对照品购自美国 Sigma 公司。虎杖药材购自湖南省九芝堂药材公司,经鉴定符合《中华人民共和国药典》2000

收稿日期: 2004-06-04

基金项目: 湖南省重点科技攻关项目(00NKY1010)

作者简介: 向海艳(1974—),女,土家族,中南大学博士研究生,主要从事天然产物活性成分的提取与分离研究。

* 通讯作者 Tel: (0731) 8879672 Fax: (0731) 8879672 E-mail: xhaiyan329@21cn.com

年版一部虎杖项下规定。

1.2 树脂的预处理:将吸附树脂用无水乙醇浸泡 24 h, 倾倒在掉上层乙醇, 然后加入吸附柱中; 待树脂装好后, 用乙醇 2 BV/h 通过树脂层, 至流出液加水不呈白色浑浊为止, 并用水以同样流速洗净乙醇, 然后用 2 BV 0.5% HCl 溶液以 2.3 mL/min 通过树脂层, 并浸泡 2~4 h 后用水以同样流速洗至流出液 pH 值呈中性; 最后用 2 BV 2% NaOH 溶液以 2.3 mL/min 通过树脂层, 并浸泡 2~4 h 后, 用水以同样流速洗至流出液 pH 呈中性。从预处理的树脂中取少量样品于 65 °C 下真空干燥 24 h 备用。

1.3 上柱液的制备:虎杖粗粉用 80% 乙醇于 85 °C 下浸提 2 h, 滤出溶液, 再加入提取剂提取 1 h, 滤过, 合并两次提取液。减压浓缩, 回收溶剂。即得。

1.4 分析方法

1.4.1 色谱条件:色谱柱: ODS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (41 : 49); 体积流量: 0.6 mL/min; 检测波长: 303 nm; 柱温: 室温。

1.4.2 标准曲线的绘制:精密称取白藜芦醇 2.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得 0.10 mg/mL 白藜芦醇对照品储备液, 备用。精密吸取对照品储备液 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度。依次取 6 μL 进样, 每个浓度重复 3 次。按上述色谱条件测定, 以 Y 表示峰面积积分值, 以 X (μg) 表示对照品进样量, 绘制标准曲线, 并计算回归方程, 其线性回归方程及相关系数为: $Y = 3\ 618\ 260\ X - 83\ 481.6$, $r = 0.999\ 8$ 。结果表明, 白藜芦醇在 0.036~0.360 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

1.5 树脂的筛选:测定 8 种树脂静态吸附量、吸附

率和解吸率, 以筛选树脂。在带塞的锥形瓶中, 加入一定量预处理好的大孔吸附树脂和浸出液于室温下振荡, 每隔 1 h 测定吸附前后白藜芦醇浓度的变化, 按下式计算各树脂的静态吸附容量和吸附率, 然后加入 60% 乙醇水溶液进行洗脱, 测定脱附液中白藜芦醇的含量, 按下式计算脱附率。

$$\text{吸附量}(\text{mg/g 干树脂}) = (C_0 - C_e) \times V_A / W$$

$$\text{吸附率} = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100\%$$

$$\text{脱附率} = C_D \times V_D / [(C_0 - C_e) \times V_A] \times 100\%$$

式中 C₀ 为吸附液起始浓度, C_e 为吸附平衡浓度, V_A 为吸附液体积, W 为树脂质量, C_D 为脱附液浓度, V_D 为脱附液体积

1.6 静态吸附实验:吸附动力学曲线:取 1 g 树脂加入 40 mL 0.80 mg/mL 白藜芦醇溶液, 在不同时刻取不量溶液分析白藜芦醇质量浓度, 绘制吸附动力学曲线。等温吸附曲线:取 1 g 树脂加入 40 mL 一系列质量浓度的白藜芦醇溶液, 进行吸附试验。测定吸附前后的溶液中白藜芦醇质量浓度, 计算树脂吸附量, 得等温吸附曲线。

1.7 洗脱剂及洗脱条件的选择:对已经吸附样品的树脂进行脱附试验, 作出脱附曲线。考察脱附剂的种类、浓度、流速等因素对树脂脱附性能的影响, 确定最佳的脱附工艺。

1.8 产品的制备:将白藜芦醇洗脱液收集浓缩, 去除溶剂, 并冷冻干燥, 得到白藜芦醇初产品, 采用高效液相色谱法测定其含量, 并按下式计算产品纯度。

$$\text{纯度} = W / W_i \times 100\%$$

式中 W 为最终产物中白藜芦醇的量 (g); W_i 为最终产物的总质量 (g)

2 结果与讨论

2.1 树脂的筛选结果:在相同试验条件下, 测得各树脂的静态吸附及脱附结果见表 1。

表 1 8 种树脂的物理结构参数及对白藜芦醇的吸附、脱附性能

Table 1 Construction parameter of eight resins and their adsorption and desorption properties on resveratrol

树脂型号	粒径/mm	比表面积/(m ² · g ⁻¹)	平均孔径/nm	外观	极性	吸附量/(mg · g ⁻¹)	吸附率/%	脱附率/%
S-8	0.3~1.25	100~120	28.0~30.0	微黄色	极性	30.1	83.4	43.8
聚酰胺	0	120~360		白色	极性	21.2	63.2	58.6
NKA-9	0.3~1.25	250~290	15.0~16.5	乳白色	极性	27.0	57.9	46.1
NKA-Ⅰ	0.3~1.25	160~200	14.5~15.5	红棕色	极性	31.6	84.3	91.7
AB-8	0.3~1.25	480~520	13.0~14.0	乳白色	弱极性	20.4	58.6	50.7
X-5	0.3~1.25	500~600	29.0~30.0	乳白色	非极性	22.3	72.1	80.3
D-140	0.1~0.3	490~600	—	白色	非极性	12.7	60.5	83.4
D-101	0.2~0.6	400~600	10.0~12.0	白色	非极性	10.6	64.1	79.2

树脂的吸附性能对白藜芦醇的纯化影响很大, 大孔吸附树脂的吸附原理主要是物理吸附, 本质是吸附剂与吸附质间的范德华力。树脂吸附性能的优劣是由其化学和物理结构决定的, 树脂的极性和空间结构(主要指孔径、比表面积及孔容等)是影响吸

附性能的重要因素。一般来讲, 极性稍强的树脂对极性强的分子有较强的吸附作用; 非极性树脂对非极性分子的吸附作用较强; 孔径较大的树脂易于吸附分子体积较大的物质; 树脂的比表面积越大, 其吸附容量也越大。白藜芦醇分子带有 3 个酚羟基, 具有多

酚的结构,显弱极性,可以作为一个良好的氢键供体,有利于弱极性和极性树脂的吸附。相对来说,非极性树脂对白藜芦醇的吸附偏小。另外,在某些情况下,吸附作用力强,解吸起来就会困难,因此,生产上希望树脂不仅吸附量大,还要求解吸率高,以保证有效成分最大限度回收。由此可见,解吸率测定是树脂实验的重要环境。如 S-8、NKA-9 树脂吸附量大,但解吸率很低,树脂不易再生,不适用于分离;聚酰胺树脂不易再生。综合考虑吸附与解吸性能,选用 NKA-Ⅱ 树脂来分离纯化虎杖中白藜芦醇。

2.2 NKA-Ⅱ 树脂静态吸附速率曲线:取 1 g 树脂加入 40 mL 0.8 mg/mL 白藜芦醇溶液,在不同时刻取少量溶液分析白藜芦醇浓度,绘制吸附动力学曲线,见图 1。可见,NKA-Ⅱ 树脂在起始阶段吸附速率较大,150 min 开始,吸附量增加缓慢。

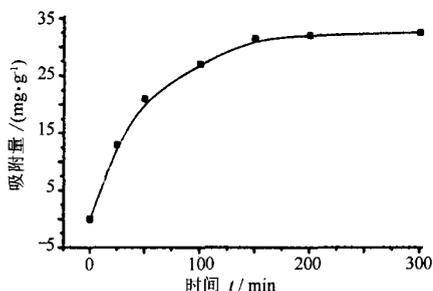


图 1 白藜芦醇静态吸附速率曲线

Fig. 1 Static adsorption rate curve of resveratrol

2.3 NKA-Ⅱ 树脂吸附等温线:分别配制不同浓度的白藜芦醇上柱液,称取一定量的 NKA-Ⅱ 树脂在常温下作吸附等温线,见图 2。可见,随着溶液中白藜芦醇浓度的增加,树脂的吸附量首先增加很快,但当浓度达 800 mg/L 后,增长缓慢。

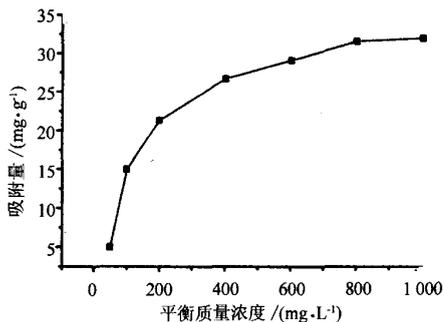


图 2 白藜芦醇等温吸附曲线

Fig. 2 Isothermal adsorption curve of resveratrol

2.4 洗脱体系的确定:最常用的洗脱剂是水、甲醇、乙醇、丙酮、醋酸乙酯以及它们的混合液等。实验表明,采用甲醇-水、乙醇-水、丙酮体系对白藜芦醇均

有较好的洗脱效果。考虑到甲醇的毒性,丙酮的易挥发性等因素,以及实际工作中的安全、成本等问题,确定以乙醇-水体系作为洗脱剂。先以大量水洗脱除去无机盐、蛋白质、多糖等杂质,再用不同体积分数的乙醇-水进行洗脱。

2.5 洗脱剂浓度对 NKA-Ⅱ 树脂动态脱附性能的影响:将已吸附好样品的树脂用一系列不同体积分数的乙醇-水进行洗脱,测洗脱液浓度,计算洗脱率。结果见表 2。可见,10%、30%乙醇洗脱率很低,并且洗脱剂用量较大;50%乙醇洗脱,洗脱率不高;60%~95%乙醇的洗脱率较高,且洗脱剂用量少,起到了浓缩的效果。考虑到随着洗脱剂浓度的增加,洗脱液洗下脂溶性杂质也会增多,故选择 60%乙醇作为洗脱剂。

表 2 洗脱剂浓度对动态脱附性能的影响

Table 2 Effects of eluent concentration on dynamical elution property

洗脱剂浓度/%	10	30	50	60	80	95
床体积	10	9	6	4	4	3
洗脱率/%	31.9	42.6	65.3	91.7	92.4	93.6

2.6 最佳脱附条件下的洗脱曲线:在常温下,用 60%乙醇作为脱附剂,以 0.2 mL/min 的洗脱速率对已吸附了样品的树脂进行洗脱,得到洗脱曲线,见图 3。

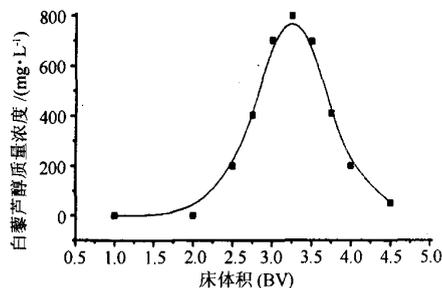


图 3 白藜芦醇脱附曲线

Fig. 3 Desorption curve of resveratrol

2.7 树脂的再生性实验:吸附树脂除了吸附目标产物之外,还会吸附杂质,而这些杂质会毒化树脂,必须在下一次使用时再生树脂。因此,考察了树脂的再生性能,结果见表 3。可见,NKA-Ⅱ 树脂在连续使用 4 次后吸附率下降比较明显,因而应该每使用 4 次进行一次再生。NKA-Ⅱ 树脂的再生是用无水乙醇洗脱,然后用蒸馏水洗至中性。

2.8 产品纯度的测定:将洗脱液浓缩,除去溶剂,并冷冻干燥,得到白藜芦醇初产品,经 HPLC 测定分析,产品纯度达 31.28%。对上柱液也进行浓缩干燥处理后,测定其纯度为 4.35%。

表 3 NKA-Ⅱ 树脂使用次数对吸附率的影响
Table 3 Effects of usage times of NKA-Ⅱ resin on its adsorption efficiency

使用次数	吸附率/%
1	84.3
2	83.8
3	83.2
4	83.0
5	75.3
6	72.1
7	61.4

3 结论

3.1 采用大孔吸附树脂分离提纯虎杖提取液中白藜芦醇是可行的。NKA-Ⅱ 树脂是良好的吸附树脂,对白藜芦醇的吸附量可达 31.6 mg/g;4.5 倍床体积的 60%乙醇可将吸附在树脂上的样品洗下,解吸率达 91.7%。

3.2 吸附树脂用于虎杖中白藜芦醇的分离,省去了传统溶剂萃取法的烦琐工艺,仅吸附-脱附一步工艺即可得到高含量的白藜芦醇,并且收率高、成本低(树脂可再生,溶媒用量少)、操作简便、可推广应用。

References:

- [1] Yan J, Wang Z Y, Liu D N, et al. Progress in the bioactivity study of resveratrol and its glucoside [J]. *J Chin Tradit Med* (中医药学报), 2000 (2): 39-41.
- [2] Feng Y H, Xu S B. Progress in the pharmacology study of resveratrol [J]. *World Phytomed* (国外医药·植物药分册), 1996, 11(4): 155-157.
- [3] Zhao X, Lu Y, Chen Z N. Progress in the chemistry and pharmacology study of resveratrol [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(12): 837-839.
- [4] Chen L, Yang F Q, Zhang T Y, et al. Separation and analysis of resveratrol and piceid in *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2000, 19(4): 60-62.

苦苣粉针剂的冷冻干燥工艺研究

程建明, 郭 萌*

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究苦苣粉针剂的冷冻干燥制备工艺。方法 以产品的外观、溶化时间、含水量为指标,对预冻方法、冻干添加剂及其用量、升华温度、解析干燥时间等工艺参数进行优选。结果 最佳工艺为采用快冻法,加入 6%羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD),升华温度为 25℃,解析干燥 8 h。结论 该工艺稳定、可行。

关键词:苦苣粉针剂;冷冻干燥;制备工艺

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)02-0210-03

Lyophilizing procedure of Kuqin Powder Injection

CHENG Jian-ming, GUO Meng

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Key words: Kuqin Powder Injection; lyophilization; preparation procedure

苦苣冻干粉针是以苦参、黄芩为主药经提取、分离、精制而制成的注射用冻干粉针,具有清热燥湿、保肝降酶作用,临床用于治疗急慢性肝炎。苦苣冻干粉针采用冷冻干燥法,因此本实验以产品的外观、溶化时间、含水量为指标,对预冻方法、冻干添加剂及其用量、升华温度、解析干燥时间等工艺参数进行优选,并根据结果绘制了产品的冻干曲线图,为日后批量生产提供了可靠的依据。

1 仪器与试剂

美国 Labconco 公司 77530-01 型冷冻干燥机, AET-40SM 型十万分之一电子天平。乳糖、甘露醇、葡萄糖(南京中医药大学植物药研究与新药开发中心),羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)江苏泰兴新鑫辅料有限公司,批号:010805。

2 方法与结果

2.1 冻干添加剂及其用量的选择:由于注射液浓度偏低,如将注射液直接冷冻干燥,则不易成型,需添加适宜的赋形剂^[1]。根据粉针剂对赋形剂的要求,选

收稿日期:2004-04-04

作者简介:程建明(1966-),男,江苏淮安人,硕士,助理研究员,主要从事中药制备工艺研究。

Tel: (025) 86798393 E-mail: ming5666@sina.com

* 南京中医药大学中药专业 97 级实习生