

秦皮总香豆素大孔树脂纯化工艺研究

王瑞海¹, 柏冬¹, 刘寨华¹, 包强², 叶迎¹, 刘丽梅^{1*}

1. 中国中医科学院中医基础理论研究所 中药分析室, 北京 100700

2. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050

摘要: 目的 优化大孔树脂对秦皮总香豆素的纯化工艺。方法 以秦皮总香豆素及秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素4种香豆素的吸附率、解析率、转移率为考察指标, 采用单因素方法, 考察纯化秦皮总香豆素的树脂类型, 树脂吸附、解吸附性能及纯化效果。结果 所选择的7种大孔树脂中 ADS-5 最适合秦皮总香豆素的纯化。吸附参数: 吸附容量为生药量-树脂 0.8 g/g, 上样药液质量浓度为生药 0.75 g/mL, 上样药液 pH 值为 4.0~4.3 (原药液), 上样体积流量为 2~4 BV/h; 洗脱参数: 水清洗杂质 1 BV, 洗脱溶剂 25%乙醇, 洗脱体积流量 2 BV/h, 洗脱体积 3 BV。经纯化, 秦皮总香豆素转移率达 74.27%, 4种香豆素成分转移率达 83.06%, 秦皮总香豆素提取物出膏率为 7.35%, 除杂率达 14.00%, 其中总香豆素的量为 54.72%, 4种香豆素成分的量之和为 36.01%, 总香豆素提取率为 4.02%。结论 ADS-5 对秦皮总香豆素纯化效果较好, 该纯化工艺稳定, 提取物量符合中药 5 类新药的要求。

关键词: 秦皮; 大孔吸附树脂; 总香豆素; 纯化; 秦皮甲素; 秦皮乙素; 秦皮苷; 秦皮素

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)22-3344-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.010

Purification process of total coumarin from *Fraxini Cortex* by macroporous resin

WANG Rui-hai¹, BAI Dong¹, LIU Zhai-hua¹, BAO Qiang², YE Ying¹, LIU Li-mei¹

1. Laboratory of Chinese Materia Medica Analysis, Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Gansu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To optimize the purification process of total coumarin from *Fraxini Cortex* using macroporous resin. **Methods** The single factor methods have been used to investigate the choice of type, adsorption performance, and desorption performance and the purification of the total coumarin from *Fraxini Cortex* by macroporous resin. The adsorption rate, resolution, resolution rate, and transfer rate of the total coumarin from *Fraxini Cortex*, four kinds of coumarin constituents, such as aesculin, aesculetin, fraxin, and fraxetin were used as examining indexes. **Results** The ADS-5 was the most suitable type for the purification of total coumarin from *Fraxini Cortex* among the seven kinds of macroporous resin. Adsorption parameters: Crude drug-the resin was 0.8 g/g which was the sample amount; The concentration of sample solution was 0.75 g crude drug/mL; The pH value of sample liquid was 4.0—4.3 (liquid sample); The speed of the sample through the resin column was 2—4 BV/h. Elution parameters: The volume of the water cleaning fluid impurities was 1 BV; The elution solvent was 25% ethanol; The elution speed was 2 BV/h; The elution volume was 3 BV. After the purification, the transfer rate of total coumarin from *Fraxini Cortex* was 74.27%, the transfer rate of four kinds of coumarin was 83.06%, the extract rate of total coumarin was 7.35%, the removal of impurities was 14.00%, among which the content of total coumarin was 54.72%, the contents of the four kinds of components were 36.01%, the total coumarin extraction yield was 4.02%. **Conclusion** This method to purify the total coumarin from *Fraxini Cortex* using ADS-5 can get better purification effect, the purification process is also stable.

Key words: *Fraxini Cortex*; macroporous adsorption resin; coumarin; purification; aesculin; aesculetin; fraxin; fraxetin

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 中国中医科学院自主选题课题 (YZ-1411)

作者简介: 王瑞海 (1963—), 男, 主要从事中药提取分离。Tel: (010)64014411-2592 E-mail: betterwang@163.com

*通信作者 刘丽梅, 研究员, 硕士生导师。E-mail: liulimeih@163.com

秦皮总香豆素是秦皮药材 *Fraxini Cortex* 中的主要活性物质^[1]。现代药理研究表明, 秦皮总香豆素对急性痛风性关节炎大鼠、家兔具有抗炎作用, 对正常小鼠血尿酸以及 ip 黄嘌呤造成的高尿酸小鼠血尿酸有显著降低作用^[2-3]。临床研究表明, 秦皮总香豆素对原发性急性痛风性关节炎具有一定止痛效应^[4]。对秦皮总香豆素的活性研究不断有新的发现, 所以对秦皮总香豆素的制备纯化工艺研究具有应用价值。

目前, 未见对秦皮总香豆素纯化工艺研究的文献报道, 专利由于技术的保密性限制, 其报道缺少纯化参数优化和明确的纯化工艺^[5]。本课题组在以往研究基础上, 通过对秦皮总香豆素和4种香豆素成分的吸附率、解吸率、转移率考察, 优选秦皮总香豆素纯化工艺参数, 为进一步开发秦皮奠定基础。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315B DAD 检测器, HP 化学工作站; 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent 8453 紫外-可见分光光度计, 美国安捷伦公司; CP2202S 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多; SPS202F 电子天平, 奥豪斯公司; YZN50 液体真空浓缩煎药机, 北京东华原医疗设备有限责任公司; CX-250 超声波清洗机, 天海双龙医疗设备有限公司; ZK-82B 型真空干燥箱, 上海市实验仪器总厂; UWA-K-030 电子秤, 厦门联贸电子有限公司; 3520 pH Meter 酸度计, 英国 Jenway 公司。

秦皮饮片购于北京市本草方源药业有限公司, 产地河北, 经中国中医科学院中药所胡世林研究员鉴定为木犀科植物苦枥白蜡树 *Fraxinus rhynchophylla* Hance 的干燥枝皮, 秦皮饮片含秦皮甲素 3.49%、秦皮乙素 0.04%, 合计为 3.53%, 符合《中国药典》2010 年版的规定, 另外含有秦皮苷 1.61%, 秦皮素 0.09%。大孔吸附树脂 ADS-5、AB-8 (非极性), ADS-17 (中极性), ADS-21、NKA-9 (极性), S-8、ADS-7 (强极性), 均为天津南开和成科技有限公司。秦皮甲素、秦皮乙素对照品 (批号 110740-200104、110741-200506) 购自中国食品药品检定研究院, 供定量测定用, 质量分数均>98%; 秦皮苷、秦皮素 (自制, HPLC 测定质量分数均>98%)^[6-7]; 乙腈为色谱纯 (Fisher 公司), 其他试剂为分析纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 秦皮总香豆素定量测定^[8]

2.1.1 对照品溶液制备 精密称定秦皮甲素对照品加甲醇溶解制成 288 μg/mL 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的配制 取秦皮总香豆素乙醇提取物 (秦皮饮片加 8 倍量 75% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次回流 2 h^[9]) 10 mg, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 200 Hz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 1.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下秦皮甲素对照品溶液 0.20、0.35、0.50、0.65、0.80 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。以甲醇为空白, 照《中国药典》2010 年版一部分光光度法, 在 334 nm 的波长处测定吸光度 (A) 值, 结果分别为 0.211、0.365、0.531、0.686、0.857。以秦皮甲素质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y=0.037\ 3\ X-0.007\ 7$, $r=0.999\ 9$, 结果表明秦皮甲素在 5.76~23.04 μg/mL 与 A 值有良好的线性关系。

2.2 秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷、秦皮素的定量测定^[8]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.01% 磷酸水溶液: 0~21 min, 8%~15% 乙腈; 21.0~21.1 min, 15%~80% 乙腈; 21.1~25.0 min, 80% 乙腈; 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 334 nm, 进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 取秦皮甲素、秦皮苷、秦皮乙素、秦皮素对照品, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解, 定容, 得质量浓度分别为 550.0、539.0、60.0、56.2 μg/mL 的对照品溶液, 过微孔滤膜 (0.45 μm), 取续滤液, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取秦皮总香豆素提取物适量, 粉碎, 过 80 目筛, 精密称取 10 mg 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加甲醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声 40 min (功率 250 W, 频率 200 Hz), 取出, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取秦皮甲素对照品溶液 (550.0 μg/mL) 0.1、0.5、1.5、3.0、5.0、7.0 μL,

秦皮苷对照品溶液 (539.0 $\mu\text{g/mL}$) 0.1、0.5、1.5、3.0、5.0、7.0 μL , 秦皮乙素对照品溶液 (60.0 $\mu\text{g/mL}$) 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL , 秦皮素对照品溶液 (56.2 $\mu\text{g/mL}$) 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0 μL , 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 计算回归方程为秦皮甲素 $Y=2\,111.7X+71.454$, $r=0.999\,7$; 秦皮苷 $Y=1\,563.5X-4.734\,2$, $r=0.999\,8$; 秦皮乙素 $Y=3\,313X+7.608$, $r=0.999\,9$; 秦皮素 $Y=3\,122.7X+13.715$, $r=0.999\,9$; 表明秦皮甲素在 55.0~3 850.0 ng、秦皮苷在 53.9~3 773.0 ng、秦皮乙素在 60.0~660.0 ng、秦皮素在 56.2~618.2 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 秦皮上柱药液的提取

取秦皮饮片适量, 按已优选醇提取工艺^[9] (加 8 倍量 75%乙醇, 回流提取 2 次, 每次回流 2 h) 提取药材, 提取液回收乙醇至无醇味, 加水适量, 使药液质量浓度达生药 0.75 g/mL, 放置过夜, 离心, 上清液计量体积和质量, 备用。纯化参数筛选时, 分别按“2.1”和“2.2”项下紫外分光光度法和液相色谱法测定样品的质量浓度, 计算上样药液、水清洗液、醇洗脱液中总香豆素和 4 种香豆素成分的量。

2.4 秦皮提取液上大孔树脂前质量浓度的筛选

取秦皮饮片 400.0 g, 按优选的醇提工艺提取^[9], 药液减压回收乙醇, 得无醇味稠液, 均分 4 份, 加水, 使药液质量浓度分别为生药 2、1、0.75、0.5 g/mL, 样品冷藏过夜, 离心, 上清液减压回收乙醇, 减压干燥 (65 $^{\circ}\text{C}$), 称定质量, 计算出膏率, 测总香豆素的量, 计算总香豆素提取率, 实验结果见表 1。结果表明, 秦皮提取液过大孔树脂前, 浓缩质量浓度对样品出膏率、总香豆素的量、提取率均可产生影响, 以总香豆素提取率为指标, 秦皮提取液上大孔树脂前浓缩质量浓度为生药 0.75 g/mL 较为合适。

表 1 秦皮提取液上大孔树脂前质量浓度的筛选结果

Table 1 Extract from *Fraxini Cortex* with different concentration

样品质量浓度/ ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	出膏率/%	总香豆素/%	总香豆素 提取率/%
2.00	24.42	24.15	5.90
1.00	27.70	22.55	6.24
0.75	26.46	24.79	6.56
0.50	26.90	22.00	5.92

2.5 大孔吸附树脂型号动态筛选

根据香豆素的结构特点和不同大孔吸附树脂的吸附特性, 选择不同极性 7 种型号的大孔吸附树脂 (ADS-5、AB-8、ADS-17、ADS-21、NKA-9、S-8、ADS-7), 按说明书方法处理, 各取 100.00 g, 备用, 树脂柱规格 3 cm $\times$ 40 cm, 柱体积 (V_0) 150 cm³ (以下实验相同)。

取“2.3”项下秦皮提取液适量 (质量浓度 C_0 、体积 V_0), 均以 2 BV/h 体积流量过 7 种大孔吸附树脂柱, 收集流出液, 并用适量去离子水洗涤树脂柱至水洗液呈无色, 水洗液与流出液合并, 计量体积 (V_1), 测定其总香豆素质量浓度 (C_1); 再用适量 95%乙醇以相同的体积流量 (2 BV/h) 进行洗脱至洗脱液无色, 计量洗脱液体积 (V_2), 测定洗脱液总香豆素的质量浓度 (C_2), 按公式计算吸附率、解吸率, 上柱后总香豆素转移率, 以评价各树脂吸附和解吸附效果, 实验结果见表 2。结果表明, ADS-5 大孔树脂对秦皮总香豆素的吸附率、解吸率、转移率最高, 相对于其他树脂, ADS-5 既较好地吸附样品, 又将有效成分解吸下来, 所以确定纯化树脂选用 ADS-5。

$$\text{吸附率}=(C_0V_0-C_1V_1)/C_0V_0$$

$$\text{解吸率}=C_2V_2/(C_0V_0-C_1V_1)$$

$$\text{转移率}=C_2V_2/C_0V_0$$

表 2 不同大孔树脂动态筛选结果

Table 2 Purification of coumarin from *Fraxini Cortex* by different macroporous resins

数值型号	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%
ADS-5	98.38	99.76	98.14
AB-8	96.14	96.34	92.62
S-8	98.84	91.79	90.72
ADS-7	89.78	83.21	74.71
NKA-9	54.29	86.99	47.23
ADS-17	37.45	91.71	34.35
ADS-21	49.87	54.29	27.08

2.6 秦皮总香豆素提取物纯化参数的优化

2.6.1 吸附容量考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔树脂 50.00 g 装于玻璃柱中, 取秦皮提取液过柱 (体积流量 2 BV/h) 至药液穿透, 分段收集流出液, 每份 4 mL, 检测其 A 值, 计算总香豆素质量浓度 (C)。以单位质量树脂吸附的生药量为横坐标, 流出液与原药液中总香豆素质量浓度之比 (C/C_0) 为

纵坐标, 绘制吸附曲线, 见图 1。实验结果表明, 当上样量达到 0.45 g/g 时, 开始检测到香豆素类成分, 当上样量达 1.26 g/g 时, 上样流出液 C 与原液 C_0 之比为 0.09, 文献报道^[10]当 $C/C_0=0.1$ 时, 认为达到穿透点, 开始泄漏, 上样量应小于泄露点, 即小于 1.26 g/g。预试验发现, 按 1.20 g/g 上样, 水清洗 2 BV, 样品转移率仅为 31.48%, 发现水清洗时同时会损失一部分香豆素, 上样量、水洗体积对香豆素的转移率影响很大, 所以选择 4 个上样比例, 进一步对上样量进行考察。

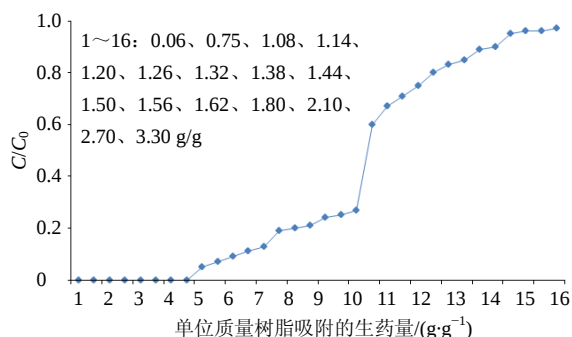


图 1 秦皮总香豆素提取液吸附曲线

Fig. 1 Adsorption curve of total coumarin extracted from *Fraxini Cortex*

称取处理合格的 ADS-5 大孔树脂(100.00 g/份) 4 份装柱, 上样量按 0.45、0.60、0.80、1.00 g/g 上样, 上样体积流量均为 2 BV/h, 收集流出液, 计量体积; 用去离子水清洗杂质, 分段接收 0.5、1、1.5、2 BV, 测各样品总香豆素的量, 计算吸附率, 结果见表 3。结果表明, 上样量愈大, 水清洗杂质时损失的香豆素越多。上样量为 1.00 g/g 香豆素损失过大; 上样量为 0.45 g/g 或 0.60 g/g 树脂利用率太低; 上样量为 0.8 g/g, 水清洗杂质为 0.5~1 BV 时, 总香豆素吸附率可达 74.47%~86.73%, 所以上样量定为生药量-树脂 0.8 g/g。

表 3 不同上样量及清洗杂质不同体积对总香豆素吸附率的影响

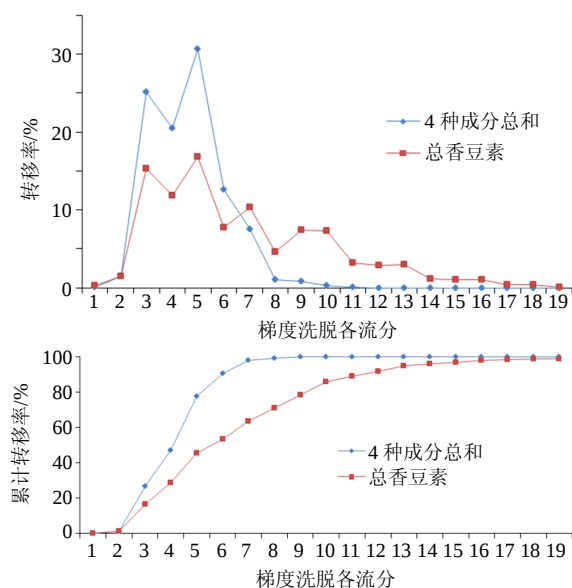
Table 3 Effect of different loading quantities and impurifying volumn on adsorption rate of coumarin

上样量/ (g·g ⁻¹)	吸附率/%			
	清洗 0.5 BV	清洗 1 BV	清洗 1.5 BV	清洗 2 BV
0.45	99.39	98.55	95.98	90.63
0.60	90.15	80.52	75.48	68.99
0.80	86.73	74.47	61.83	57.60
1.00	79.98	34.04	25.83	20.99

2.6.2 洗脱剂乙醇体积分数考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔树脂 100.00 g 装柱, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量 2 BV/h, 收集流出液, 去离子水清洗 0.5 BV, 然后依次用 5%、10%、20%、30%、40%、50%、95%乙醇洗脱 1~2 BV (各洗脱液颜色变浅即可), 分段收集, 计量体积, 各样品采用液相色谱法、紫外分光光度法进行定量测定, 计算吸附率、解吸率、转移率, 绘制洗脱曲线, 结果见图 2、图 3。结果表明, 水清洗 0.5 BV 时, 样品中总香豆素的质量分数仅为 1.23%, 4 种香豆素成分质量分数总和为 0.79% (图 3), 说明除掉的是大量的杂质。5%乙醇 1 BV 洗脱样品中总香豆素的质量分数仅为 12.09%, 说明其含杂质较多, 应该加大水洗体积, 以减少醇洗中样品的杂质质量。10%乙醇 1~2 BV、20%乙醇 1~2.5 BV 洗脱样品中总香豆素的质量分数在 66.33%~77.99% (图 3), 4 种香豆素成分累计转移率为 99.12% (图 2), 说明 4 种香豆素成分基本上全部被洗脱下来; 当洗脱剂为 30%乙醇时, 各样品中总香豆素的质量分数开始下降, 并由 49.92% 降至 33.08% (图 3), 低于 50%, 不符合 5 类新药的定量要求, 所以洗脱剂乙醇的体积分数应小于 30%; 考虑到用 20%乙醇洗脱时洗脱体积较大, 所以确定脱剂为 25%乙醇。

2.6.3 水清洗杂质体积和醇洗脱样品体积考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔吸附树脂 100.00 g 装柱, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量 2 BV/h, 收集流出液; 用去离子水清洗 0.5、0.75、1、1.5、2 BV, 至颜色变浅, 然后用 25%乙醇洗脱, 分段接收, 最后 50%乙醇洗脱至近无颜色, 计量体积; 各洗脱处理方式分别为 1#: 上样流出液 0.65 BV, 2#: 水洗 1-0.5 BV, 3#: 水洗 2-0.25 BV, 4#: 水洗 3-0.25 BV, 5#: 水洗 4-0.25 BV, 6#: 水洗 5-0.75 BV, 7#: 25%乙醇 1-0.5 BV, 8#: 25%乙醇 2-0.5 BV, 9#: 25%乙醇 3-0.5 BV, 10#: 25%乙醇 4-1.5 BV, 11#: 25%乙醇 5-1 BV, 12#: 25%乙醇 6-1 BV, 13#: 25%乙醇 7-1 BV, 14#: 25%乙醇 8-0.5 BV, 15#: 50%乙醇 1-2 BV, 16#: 50%乙醇 2-2 BV, 编号为 1~16。各样品采用液相色谱法、紫外分光光度法进行定量测定, 减压干燥, 计算吸附率、解吸率、转移率以及样品的质量分数和收率。结果见表 4 和图 4。

实验结果表明, 水清洗杂质 0.5、0.75、1 BV 各样品中总香豆素占提取物质量分数分别为 1.34%、2.36%、9.52%, 如果水清洗体积为 0.75 BV 时, 25%



1-流出液 2-水 0.5 BV 3-5%乙醇 1 BV 4-10%乙醇 1 BV 5-10%乙醇 2 BV 6-20%乙醇 1 BV 7-20%乙醇 2 BV 8-20%乙醇 2.5 BV 9-30%乙醇 1 BV 10-30%乙醇 2 BV 11-30%乙醇 3 BV 12-40%乙醇 1 BV 13-40%乙醇 2 BV 14-40%乙醇 3 BV 15-50%乙醇 1 BV 16-50%乙醇 2 BV 17-50%乙醇 3 BV 18-95%乙醇 1 BV 19-95%乙醇 2 BV, 图3同
1-effluent 2-0.5 BV water 3-1 BV 5% ethanol 4-1 BV 10% ethanol 5-2 BV 10% ethanol 6-1 BV 20% ethanol 7-2 BV 20% ethanol 8-2.5 BV 20% ethanol 9-1 BV 30% ethanol 10-2 BV 30% ethanol 11-3 BV 30% ethanol 12-1 BV 40% ethanol 13-2 BV 40% ethanol 14-3 BV 40% ethanol 15-1 BV 50% ethanol 16-2 BV 50% ethanol 17-3 BV 50% ethanol 18-1 BV 95% ethanol 19-2 BV 95% ethanol, same as Fig. 3

图2 水和不同体积分数乙醇梯度洗脱曲线

Fig. 2 Eluting curves of gradient elution

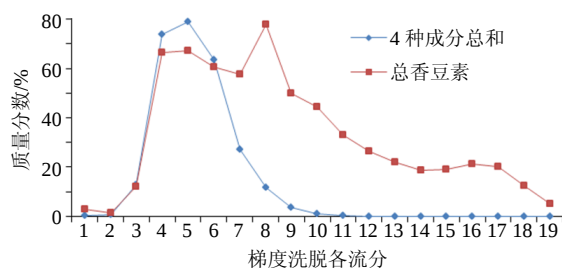


图3 各洗脱样品中4种成分及总香豆素质量分数

Fig. 3 Curves of total coumarin percentage content in four components of elution

表4 水清洗杂质1 BV和25%乙醇洗脱样品3 BV的纯化结果

Table 4 Purification parameters of impurities 1BV with water and elution 3 BV with 25% ethanol

成分	吸附率/ %	解吸率/ %	转移率/ %	质量分数/ %	收率/ %
总香豆素	92.46	79.19	73.21	57.53	4.02
4种香豆素 成分总和	91.38	98.35	89.87	41.86	2.97

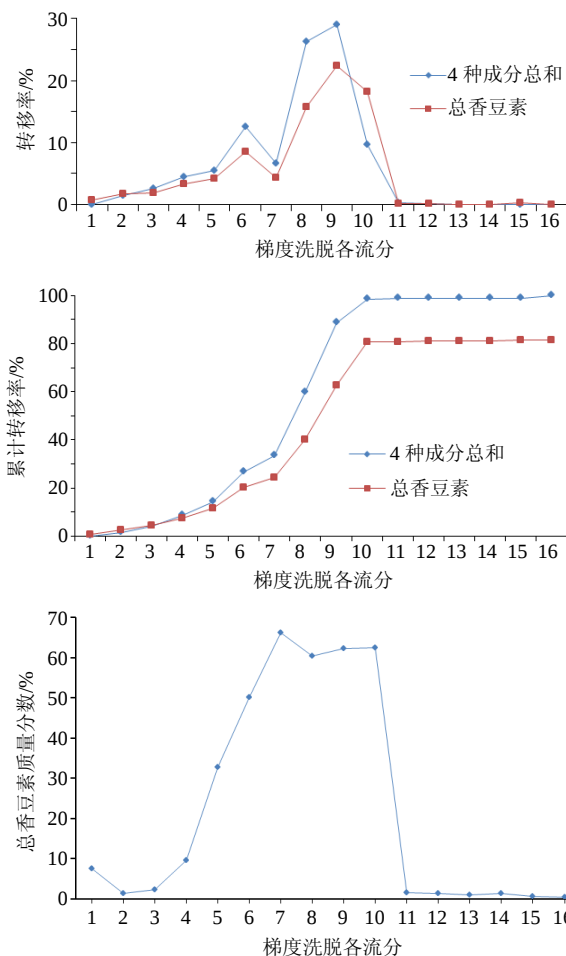


图4 清洗杂质体积和样品洗脱体积筛选曲线

Fig. 4 Transfer rates of volume of cleaning impurity and different eluent

乙醇洗脱3 BV, 得到样品中的总香豆素质量分数为47.22%, 没有达到5类新药定量要求; 如果水清洗体积为1 BV时, 25%乙醇洗脱3 BV, 得到样品中的香豆素质量分数为57.53%, 符合5类新药定量要求; 若继续水洗, 下一份水洗样品中总香豆素质量分数是32.66%, 由于香豆素损失较多, 不宜再继续水洗。所以确定水清洗杂质体积为1 BV。

25%乙醇洗脱的各样品(7#~10#)中总香豆素质量分数均大于60%。当洗脱至第3 BV(10#)时, 该样品中总香豆素质量分数为62.40%(图4), 经计算总香豆素质量分数累计占提取物的57.53%, 符合5类新药的定量要求, 此时4种香豆素成分质量分数之和为41.86%; 当洗脱至第4 BV(11#)时, 该样品中总香豆素质量分数仅为1.55%(图4), 说明香豆素成分很少, 可以不再洗脱。故确定25%乙醇洗脱3 BV。

2.6.4 上柱药液质量浓度的考察 称取处理合格的

ADS-5 大孔吸附树脂 4 份各 100.00 g, 装柱, 取秦皮提取液, 1 份保持原药液浓度 (生药 0.75 g/mL), 其他 3 份调质量浓度分别为生药 1.55、1.15、0.75、0.35 g/mL, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量 2 BV/h, 收集上样流出液, 水清洗 1 BV (体积流量为 2 BV/h), 收集水洗液与上样液合并, 计量体积; 再用 25%乙醇洗脱, 洗脱体积流量为 2 BV/h, 洗脱 3 BV, 计量体积。各样品进行定量测定, 计算吸附率、解吸率、转移率, 实验结果见表 5。结果表明, 不同质量浓度上样液 4 种香豆素成分总和的吸附率相差无几, 但随着上样质量浓度的减小, 解吸率、转移率逐渐上升并趋于平缓, 生药 0.75 g/mL 样品的转移率略高于生药 0.35 g/mL 的样品; 总香豆素成分吸附率、解吸率、转移率的变化趋势与 4 种香豆素成分总和变化趋势相同。定量测定结果显示, 上样质量浓度为生药 0.75 g/mL 时, 转移率最佳, 故确定上样质量浓度为生药 0.75 g/mL。

2.6.5 上柱药液 pH 值的考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔吸附树脂 3 份各 100.00 g, 装柱, 取秦皮提取液, 1 份保持原药液的 pH 4.0, 另外 2 份用 5% NaOH、稀 HCl 调节 pH 值分别为 7.0 和 2.0, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量 2 BV/h, 收集流出液, 水清洗 1 BV (体积流量为 2 BV/h), 收集水洗液与上样液合并, 计量体积; 再用 25%乙醇洗脱, 洗脱速度为 2 BV/h, 洗脱 3 BV, 计量体积。各样品进行定量测定, 计算吸附率、解吸率、转移率, 结果见表 6。结果表明, 随着上柱药液 pH 值降低, 总香豆素和 4 种香豆素成分转移率逐渐升高并趋于平稳, pH 2.0 药液转移率略高于 pH 4.0 的原液。考虑生产实际情况, 如果调节药液 pH 值为 2.0, 增加一道工序和成本, 且对产品的质量、收率影响不大, 而且偏酸性药液对生产产生其他影响, 所以确定上柱药液保持原液 pH 值。药液 pH 值会受温度等因素影响, 经多次测量, 原药液 pH 值在 4.0~4.3。

表 5 上柱药液质量浓度对总香豆素、4 种香豆素成分总和纯化的影响

Table 5 Effect of loading solution with different concentration on purification parameters of total coumarin and total of four kinds of components

上样质量浓度/ (生药 g·mL ⁻¹)	总香豆素			4 种香豆素成分总和		
	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%
1.55	87.64	69.02	60.49	82.18	83.94	68.98
1.15	88.67	69.39	61.53	82.51	93.19	76.89
0.75	89.42	75.45	67.47	83.96	98.87	83.01
0.35	88.74	74.74	66.33	83.38	98.01	81.72

表 6 上柱药液 pH 值对总香豆素、4 种香豆素成分总和纯化的影响

Table 6 Effect of loading solution with different pH values on purification parameters of total coumarin and total of four kinds of components

上样液 pH 值	总香豆素			4 种香豆素成分总和		
	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%
7.0	77.34	77.72	60.11	61.17	88.06	53.87
4.0 (原液)	88.78	78.57	69.75	83.98	98.00	82.31
2.0	91.54	81.18	74.32	89.05	95.30	84.86

2.6.6 药液上柱体积流量的考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔吸附树脂 3 份各 100.00 g, 装柱, 取秦皮提取液, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量分别为 6、4、2 BV/h, 收集上样流出液, 水清洗 (体积流量为 2 BV/h) 1 BV 与上样液合并, 计量体积; 再用 25%乙醇洗脱, 洗脱体积流量为 2 BV/h, 洗脱 3 BV, 计量体积。各样品进行定量测定, 计算吸附率、解吸率、转移率, 结果见表 7。结果表明, 上

样速度对吸附率、解吸率、转移率影响不大。总香豆素转移率显示, 上样体积流量为 2 BV/h 略优于 4、6 BV/h; 4 种香豆素转移率之和显示, 上柱体积流量为 2、4 BV/h, 其值几乎相同, 略高于 6 BV/h, 从生产实际考虑, 上样体积流量可以控制在 2~4 BV/h。

2.6.7 洗脱体积流量考察 称取处理合格的 ADS-5 大孔吸附树脂 3 份各 100.00 g, 装柱, 取秦皮提取液, 按确定的吸附容量上样, 上样体积流量均为 2

BV/h, 收集上样流出液, 水清洗 (体积流量为 2 BV/h) 1 BV 与上样液合并, 计量体积; 再用 25% 乙醇洗脱, 洗脱体积流量分别为 2、4、6 BV/h, 洗脱 3 BV, 计量体积。各样品进行定量测定, 计算吸

附率、解吸率、转移率, 结果见表 8。

结果表明, 总香豆素、4 种香豆素成分之和转移率均显示, 洗脱体积流量为 2 BV/h 时, 优于 4、6 BV/h, 所以样品洗脱体积流量定为 2 BV/h。

表 7 药液上柱体积流量对总香豆素、4 种香豆素成分总和纯化的影响

Table 7 Effect of loading solution with different flow rate of macroporous resin column on purification parameters of total coumarin and total of four kinds of components

上样体积流量/ (BV·h ⁻¹)	总香豆素			4 种香豆素成分总和		
	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%
6	87.85	84.84	74.53	84.64	92.59	78.37
4	89.33	83.31	74.42	86.71	92.28	80.01
2	89.51	84.93	76.02	86.96	94.21	81.93

表 8 样品洗脱体积流量对总香豆素、4 种香豆素成分总和纯化的影响

Table 8 Effect of of different eluent flow rates of macroporous resin column on purification parameters of total coumarin

洗脱体积流量/ (BV·h ⁻¹)	总香豆素			4 种香豆素成分总和		
	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%	吸附率/%	解吸率/%	转移率/%
6	86.78	88.48	76.79	90.40	70.20	63.46
4	88.55	90.73	80.34	91.76	72.65	66.66
2	87.16	92.55	80.67	90.54	74.32	67.29

最终确定秦皮总香豆素纯化工艺: 采用 ADS-5 大孔吸附树脂, 上样量为生药-树脂 0.8 g/g, 上样液质量浓度为生药 0.75 g/mL, 以原液上样 (pH 4.0~4.3), 上柱体积流量为 2~4 BV/h; 上样后, 水清洗杂质 1 BV, 洗脱溶剂为 25%乙醇, 洗脱体积流量为 2 BV/h, 洗脱体积为 3 BV。

2.7 秦皮总香豆素提取物纯化工艺验证试验

取 3 份秦皮药材各 800.0 g, 按优选的提取工艺^[9] (加药材 8 倍量 75%乙醇, 回流 2 次, 每次回流 2 h) 提取, 回收乙醇至无醇味, 浓缩至密度 1.064 g/mL (20 °C) 时, 加水适量, 使药液质量浓度为生药 0.75 g/mL, 冷藏过夜, 离心, 上清液备用。

取处理合格的 ADS-5 大孔树脂装 3 根树脂柱 (规格 80 cm×6 cm), 每根柱载树脂量为 1.0 kg, 水

冲洗柱体积平稳后, 将提取药液按上述优选工艺进行纯化, 纯化样品回收乙醇, 减压干燥, 得干膏, 进行定量测定, 计算样品纯化工艺参数。实验结果见表 9。

工艺验证时的投料量比工艺参数筛选时放大了 10 倍。验证试验结果表明, 3 次验证试验的转移率相近, 各批次提取指标、定量指标接近, 纯化参数比较平稳, 说明该工艺稳定, 质量可控, 纯化后提取物中总香豆素质量分数大于 50%, 符合 5 类新药的申报要求。

3 讨论

本研究选择非极性 (ADS-5、AB-8)、中性 (ADS-17)、极性 (ADS-21)、强极性 (S-8、ADS-7) 大孔树脂筛选适于秦皮香豆素纯化的型号, 结果显

表 9 3 批验证试验各指标参数结果

Table 9 Each process parameter results of three batches of verification

样品	出膏率/%	除杂率/%	总香豆素			4 种香豆素成分总和		
			转移率/%	质量分数/%	提取率/%	转移率/%	质量分数/%	提取率/%
1	7.26	14.06	77.28	56.81	4.13	82.82	35.17	2.55
2	7.21	14.37	73.30	55.71	4.01	79.49	35.00	2.52
3	7.59	13.59	72.22	51.63	3.92	86.86	37.87	2.87
平均	7.35	14.00	74.27	54.72	4.02	83.06	36.01	2.65

示, ADS-5、AB-8、S-8 对秦皮香豆素的吸附、解吸性能良好, 而聚苯乙烯型非极性吸附树脂更适合于纯化秦皮香豆素。在筛选时发现, 兼具表面吸附和氢键吸附双重作用的 ADS-17, 对秦皮香豆素的吸附率(37.45%)较低, 而解吸率(91.71%)很高; 具有吸附酚类物质特性的 ADS-21, 并没有显示出对香豆素吸附的优势, 吸附率仅为 49.87%。因为每种中药所含成分不同, 多方面因素都会影响树脂对药液的纯化效果, 所以在筛选树脂类型时, 尽可能考虑各种类型的树脂^[10-11]。

在采用大孔树脂纯化样品时, 杂质去除通常有 2 种途径: 一是采用水清洗树脂柱除去部分杂质, 一是采用适宜体积分数的乙醇洗脱样品后, 让部分杂质留在树脂柱上, 这样使样品得以纯化。从本实验可以看出, 水清洗杂质体积和上样量共同影响样品纯化效果。不能仅从上样流出液占原药液的 10%^[12]来决定水清洗杂质体积。由于有些有效成分在树脂柱上吸附的不够牢固, 水清洗杂质时, 一部分有效成分将会被冲洗下来, 造成一定量有效成分的损失。如果是同样的上样量, 水清洗杂质的体积越多, 有效成分吸附率越低; 如果是同样的清洗体积, 上样量越大, 有效成分吸附率越低。所以要选择合适的上样量, 同时控制好水清洗杂质的体积, 保证最大限度地去除杂质, 而又使有效成分丢失最少。本实验中如果选择 0.45 g/g 的上样量, 树脂的利用率太低, 势必增加生产成本; 如果选择 1.00 g/g 的上样量, 则不利于有效成分的吸附, 造成有效成分的大量损失。故有些中药的纯化, 在完成吸附曲线实验后, 在渗漏点^[12]附近, 有必要进一步筛选合适的吸附比例, 以满足被纯化样品的纯度需求。

本研究在不同树脂筛选时, 各型号树脂上样量均控制在最低量, 所以 ADS-5 在筛选时的吸附率(98.38%) 高于工艺筛选时的吸附率(92.46%), 其原因就在于上样量的不同。

从实验结果可知, 对于香豆素类偏酸性成分, 在筛选上柱药液 pH 值时, 因为香豆素的 α -吡喃酮环具有 α 、 β 不饱和和内酯, 在碱液中易水解, 香豆素开环, 生成顺邻羟桂皮酸盐, 使游离的香豆素减

少, 筛选上柱药液 pH 值时, 设计中性和偏酸性 pH 值参数即可, 不必考察碱性 pH 值的数值。本实验结果也证实了这一点, 在偏碱性条件下 (pH 9.5), 样品的吸附率(34.61%)、解吸率(58.39%)、转移率(20.21%) 3 个指标与酸性药液的指标相比大大降低, 故本实验中只考虑了酸性至中性药液 pH 值对吸附的影响。

参考文献

- [1] 陈琳, 刘丽梅, 王瑞海, 等. HPLC 测定不同品种秦皮药材中香豆素类成分 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2858.
- [2] 曹世霞, 祝捷, 张三印, 等. 秦皮总香豆素对急性痛风性关节炎大鼠模型 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 的影响 [J]. 四川中医, 2011, 29(3): 68-70.
- [3] 赵军宁, 邓治文, 戴瑛. 秦皮总香豆素对实验性痛风性关节炎及尿酸代谢的影响 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(10): 751-753.
- [4] 罗玫, 刘芳, 邹建东, 等. 秦皮总香豆素对原发性急性痛风性关节炎止痛效应的探索性临床试验 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(4): 475-478.
- [5] 杨东安, 赵军宁. 秦皮总香豆素的制备方法及其在制药中的应用: 中国, 1398861A [P]. 2003-02-26.
- [6] 刘丽梅, 陈琳, 王瑞海, 等. 秦皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1073-1074.
- [7] 刘丽梅, 王瑞海, 陈琳, 等. 秦皮化学成分的研究 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 889-890.
- [8] 叶迎, 柏冬, 包强, 等. 秦皮提取物 UV、HPLC 含量测定方法研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(8): 83-87.
- [9] 王瑞海, 柏冬, 刘寨华, 等. 秦皮总香豆素不同提取工艺的对比研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(10): 86-90.
- [10] 周秋月, 李琪, 李慧敏, 等. 大孔树脂分离复方黑骨藤药物有效成分工艺的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3098-3104.
- [11] 李晨, 狄留庆, 赵晓莉, 等. 大孔吸附树脂分离纯化消癥丸提取液工艺研究 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3266-3270.
- [12] 董江涛, 李燕, 徐慧强, 等. HPD-722 大孔树脂纯化葎草总黄酮的工艺研究 [J]. 辽宁农业科学, 2010(3): 11-15.