

大孔树脂对赤芍总苷吸附的初步研究

陈立江¹, 段洪云¹, 张胜², 刘玉峰¹, 李丽¹, 刘洋¹(1.辽宁大学药学院, 沈阳 110036; 2.辽宁省药物研究院, 沈阳 110015)

摘要: 目的 研究 D101、X-5、HPD-722、HP-20、AB-8、DM-130、HPD-600、NKA-9 大孔树脂对赤芍总苷的吸附性能。方法 以芍药苷和芍药内酯苷为考察指标, 通过静态吸附及解析实验, 动态吸附和解析实验, 对大孔树脂纯化赤芍总苷的工艺进行筛选。结果 AB-8 大孔树脂对芍药苷和芍药内酯苷的比吸附量分别为 42.23, 53.70 mg·mL⁻¹, 比解析量分别为 32.19, 33.75 mg·mL⁻¹。结论 AB-8 大孔树脂的对赤芍总苷的分离纯化效果较好, 具有良好的应用前景。

关键词: 大孔树脂; 芍药苷; 芍药内酯苷; 吸附; 解吸

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)05-0458-05

Research on Adsorption of Total Paeony Glycoside with Macroporous Resins

CHEN Lijiang¹, DUAN Hongyun¹, ZHANG Sheng², LIU Yufeng¹, LI Li¹, LIU Yang¹(1.College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2.Liaoning Institute of Medicine, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the adsorption of total paeony glycoside by D101, X-5, HPD-722, HP-20, AB-8, DM-130, HPD-600, NKA-9. **METHODS** Through static adsorption and desorption as well as dynamic adsorption and desorption, the purification of total paeony glycoside by AB-8 macroporous resin was selected with paeoniflorin and albiflorin as investigation targets. **RESULTS** The adsorption quantity of AB-8 resin for paeoniflorin and albiflorin was 42.23, 53.70 mg·mL⁻¹, and desorption quantity was 32.19, 33.75 mg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The isolation and purification capability of AB-8 macroporous resin is the best in the eight kinds of macroporous resins and have a favourable application perspective.

KEY WORDS: macroporous resin; paeoniflorin; albiflorin; adsorption; desorption

大孔树脂是 20 世纪 60 年代发展起来的一类不含交换基团且具有大孔结构的高分子吸附剂, 具有选择性好, 吸附容量大, 安全无毒, 再生容易等优点, 目前的应用主要集中于苷类、黄酮、生物碱及其他具有一定极性的成分^[1]。大孔树脂型号不同, 其极性不同, 不同型号适用于不同有效成分或有效部位的分离纯化, 使用时必须根据情况加以选择^[2]。

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根^[3]。赤芍总苷是从中药赤芍中提取的有效部位, 为水溶性成分, 主要包括芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷等, 其中芍药苷和芍药内酯苷的含量最高^[4-6]。因此, 本试验以芍药苷和芍药内酯苷为考察指标, 采用静态吸附法和动态吸附法进行吸附和解吸附的筛选试验, 比较了 8 种大孔吸附树脂对芍药苷和芍药内酯

苷吸附的影响, 为得到实用、经济而且对赤芍总苷吸附性能好大孔吸附树脂提供实验依据, 从而为进一步研究赤芍中有效成分的纯化提供参考。

1 材料

1.1 材料与试剂

赤芍饮片购自辽宁普兰店, 经辽宁省药品检验所王维宁药师鉴定; 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110736-200934, 含量: 95.7%); 芍药内酯苷对照品(自制); D101、NKA-9、AB-8(天津南开大学化工厂); X-5(安徽三星树脂科技有限公司); HPD-722、HPD-600、DM-130(沧州宝恩化工有限公司); HP-20(日本三菱公司); 乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FW-100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); TDL80-2B 电动离心机(上海安亭科学

基金项目: 辽宁省自然科学基金(20092015); 沈阳市科学技术计划项目(F10-205-1-28); 辽宁大学“211 工程”三期建设项目-天然产物化学制药项目的资助

作者简介: 陈立江, 女, 硕士, 教授

Tel: (024)62202469

E-mail: chljl16@163.com

仪器厂制造); KQ-5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AL104 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo); DZF 型真空干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司); 高效液相色谱仪(莱比伦 3500G); 色谱工作站(Ezchrom Elite)。

2 方法与结果

2.1 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Thermo C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水(13:87, 磷酸调 pH=3.0)为流动相, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 25 °C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取五氧化二磷干燥 36 h 至恒重的芍药苷 2.04 mg, 芍药内酯苷 0.32 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得芍药苷和芍药内酯苷的浓度分别为 0.204 mg·mL⁻¹ 和 0.032 mg·mL⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 取上柱流出液浓缩至干, 精密称定干粉一定量, 用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶, 滤过。精密量取续滤液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 线性关系的考察 对照品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 分别精密吸取上述溶液 3, 6, 9, 12, 15 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积对进样量进行回归, 求得直线方程。芍药苷: $Y=908\ 765X-30\ 610$, $r=0.999\ 7$, 线性范围为 0.612~3.06 μg。芍药内酯苷: $Y=1\ 208\ 428X+31\ 123$, $r=0.999\ 6$, 线性范围为 0.096~0.576 μg。

2.1.5 仪器精密度试验 取上述对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱图。结果芍药苷和芍药内酯苷峰面积 RSD 分别为 1.13%和 1.24%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μL, 记录色谱图。结果芍药苷和芍药内酯苷含量的 RSD 分别为 0.81%

和 0.60%, 表明重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密吸取赤芍总苷溶液(浓度为 0.08 mg·mL⁻¹)5 mL 共 9 份置 10 mL 量瓶中。另精密称取芍药苷、芍药内酯苷对照品各 10.0, 4.0 mg 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取此对照品溶液 1.0, 1.5, 2.0 mL, 各 3 份分别加入总苷溶液的 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为进样溶液。依法测定, 以加入量和测得量计算回收率, 计算得芍药苷和芍药内酯苷的平均回收率分别为 100.2%和 101.4%, RSD 分别为 1.15%和 1.84%。

2.2 大孔吸附树脂的筛选

2.2.1 赤芍上样液的制备 取赤芍粉末 200 g, 置 2 000 mL 圆底烧瓶内, 用 1 000 mL 70%乙醇分别回流提取 2 次, 每次 2 h, 过滤, 合并提取液, 提取液在 55 °C 以下减压真空浓缩至无醇味, 加水超声溶解, 离心, 取上清液加水定容到 1 000 mL, 作为供试液(生药 0.2 g·mL⁻¹), 滤液根据情况进行适当稀释, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 用 HPLC 测定供试液中芍药苷和芍药内酯苷的含量。

2.2.2 大孔吸附树脂的处理方法^[7]

2.2.2.1 大孔吸附树脂的预处理 取大孔吸附树脂, 以 95%乙醇浸泡 24 h, 除去悬浮物及杂质, 湿法装柱, 用 95%乙醇洗至洗脱液与水(1:5)混合不产生浑浊, 再用水洗至无醇味, 备用。

2.2.2.2 大孔吸附树脂的再生 用 95%乙醇洗脱至无色, 再用 2%盐酸浸泡, 用水洗至中性, 再用 2% NaOH 浸泡 12 h 用水洗至中性。再生后树脂可反复进行使用, 若停止不用时间过长, 可用大于 10%的 NaCl 溶液浸泡, 以免细菌在树脂中繁殖。一般纯化某一品种的树脂, 当其吸附量下降 30% 以上不宜再使用。

2.2.3 大孔吸附树脂的类型 大孔吸附树脂的型号及物理结构参数^[8]见表 1。

表 1 八种大孔吸附树脂的物理结构参数

Tab 1 The physical structure parameters of eight macroporous adsorption resins

树脂型号	极性	树脂结构	平均孔径	比表面积	外观
D101	非极性	苯乙烯	90~100	≥400	白色不透明球状颗粒
X-5	非极性	聚苯乙烯	290~300	500~600	乳白色不透明球状颗粒
HPD-722	弱极性	苯乙烯	130~140	485~530	白色不透明球状颗粒
HP-20	弱极性	聚苯乙烯基苯	280~300	600	白色不透明球状颗粒
AB-8	弱极性	聚苯乙烯型	130~140	480~520	乳白色不透明球状颗粒
DM-130	中极性	苯乙烯	90~100	500~550	白色不透明球状颗粒
HPD-600	极性	苯乙烯	80	550~600	白色不透明球状颗粒
NKA-9	极性	聚苯乙烯	155~165	250~290	乳白色不透明球状颗粒

2.2.4 大孔吸附树脂的静态吸附和解析实验^[9-10]

2.2.4.1 静态吸附实验 取已处理好的 D101、X-5、HPD-722、HP-20、AB-8、DM-130、HPD-600、NKA-9 八种型号树脂各 10 mL 置于干净的 100 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 供试液, 静置 24 h 使之充分吸附(每隔 8 h 超声振动 1 次), 滤过, 用 2 倍树脂体积量的水洗脱树脂, 洗脱液合并至滤液中, 精密量取滤液的体积, 记录滤液的总体积。滤液根据情况进行适当稀释, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 用 HPLC 测定滤液中芍药苷和芍药内酯苷的含量, 计算各树脂的静态吸附率, 计算公式如下: 静态吸附量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)=(上样液浓度-吸附剩余液浓度) \times 上样液体积/树脂体积; 吸附率=静态吸附量/上样液含量 $\times 100\%$, 结果见图 1。

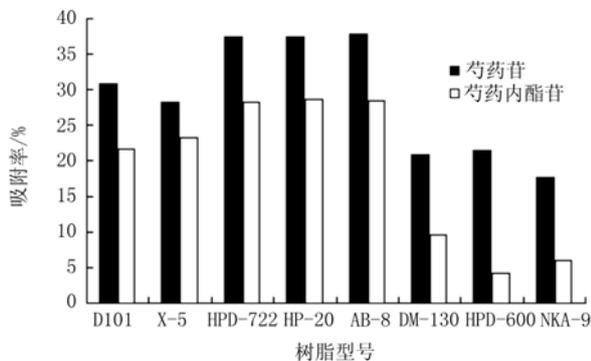


图 1 八种型号大孔树脂对芍药苷和芍药内酯苷的静态吸附结果

Fig 1 The results of static adsorption for eight macroporous adsorption resins

2.2.4.2 静态解吸实验 将八种饱和的树脂饱和吸附后滤出, 精密加入 95%乙醇 150 mL 使之解吸, 每隔 8 h 超声振动 1 次, 过滤, 精密量取滤液的体积, 记录滤液的总体积。滤液根据情况进行适当稀释, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 用 HPLC 测定滤液中芍药苷的含量, 计算各树脂的静态解析率, 计算公式如下: 静态解吸量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)=(洗脱液浓度 \times 洗脱液体积)/树脂体积; 解吸率=静态解吸量/静态吸附量 $\times 100\%$ 。结果见图 2。

从图 1 和图 2 可知, HPD-722、HP-20、AB-8 型大孔吸附树脂对芍药苷和芍药内酯苷不仅都具有较大的吸附率, 而且具有较高的解吸率, 因此需要进一步实验进行树脂的筛选。

2.2.5 大孔吸附树脂的动态吸附实验^[11] 由于静态吸附中 3 种弱极性大孔吸附树脂 HPD-722、HP-20、AB-8 的吸附性能相差不大, 而静态吸附

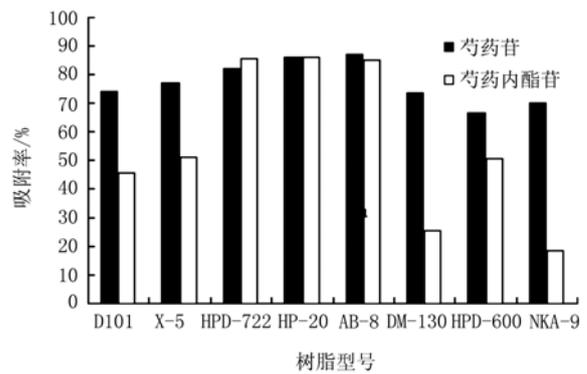


图 2 八种型号大孔树脂对芍药苷和芍药内酯苷的静态解吸结果

Fig 2 The results of static desorption for eight macroporous adsorption resins

与实际的树脂纯化有一定的差异, 采用大孔吸附树脂纯化赤芍总苷, 实际上是一个动态的过程, 考虑到实际生产的需要, 因此采用动态吸附法对树脂型号进行进一步的筛选和确认。

分别称取 HPD-722、HP-20、AB-8 大孔吸附树脂各 10 mL, 用水湿法装柱, 将生药浓度为 0.2 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的赤芍提取液上样 100 mL, 以 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速进行动态吸附, 用 2 BV 水洗柱, 再用 95%乙醇 150 mL 使之充分解吸, 用 HPLC 测定滤液中芍药苷和芍药内酯苷的含量, 计算比上柱量、比吸附量、比洗脱量, 计算公式如下: 比上柱量=(上样液浓度-吸附剩余液浓度) \times 上样液体积/树脂体积; 比吸附量=[(上样液浓度-吸附剩余液浓度) \times 上样液体积-水洗液的浓度 \times 水洗液体积]/树脂体积; 比洗脱量=(洗脱液浓度 \times 洗脱液体积)/树脂体积。结果见表 2。由表可知, AB-8 对芍药苷和芍药内酯苷的比吸附量和比洗脱量都较大, 结合静态的分析结果, 初步确定选用 AB-8 型号的大孔吸附树脂对赤芍总苷进行纯化。但是, 单用树脂的吸附量和解析量评价其吸附性能是不全面的, 合适的树脂除了具有较大的吸附量和较高的解析率外, 同时应具有较快的吸附速率^[12], 因此对 AB-8 的吸附动力学进行了研究。

2.3 吸附动力学研究

吸附动力学特征反映的是随时间的延长, 树脂对样品分子吸附量的变化趋势^[13]。以吸附时间 (t) 为横坐标, 分别以芍药苷和芍药内酯苷的吸附量($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为纵坐标作吸附动力学曲线, 结果见图 3。由图可知, 2 h 内曲线急速上升, 表明在这段时间内 AB-8 树脂吸附芍药苷和芍药内酯苷的

表 2 三种大孔吸附树脂对芍药苷和芍药内酯苷的动态筛选结果

Tab 2 The results of dynamic selection for peoniflorin and albiflorin with three macroporous adsorption resins

树脂型号	比上柱量/mg·mL ⁻¹		比吸附量/mg·mL ⁻¹		比洗脱量/mg·mL ⁻¹	
	芍药苷	芍药内酯苷	芍药苷	芍药内酯苷	芍药苷	芍药内酯苷
HPD-722	33.63	24.31	24.57	21.29	53.64	18.92
HP-20	43.42	38.38	38.29	30.79	40.01	27.72
AB-8	59.44	38.45	42.23	32.19	53.70	33.75

速度快, 3 h时吸附速度逐渐减慢, 4 h后曲线开始趋于平缓, 说明树脂基本达到吸附平衡, 此时随着时间的延长, 吸附速度和吸附量增量迅速减少, 因此本试验选择4 h作为上柱液静态吸附时间, 此时大孔树脂的吸附量已达到饱和和吸附量的95.7%。

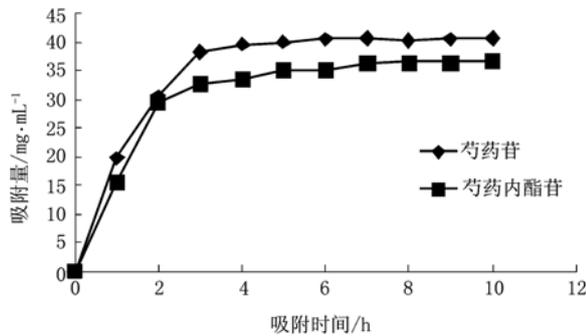


图 3 室温条件下 AB-8 树脂吸附动力学曲线
Fig 3 The adsorption kinetic of AB-8 resin at room temperature

3 讨论

文献报道上样药液的澄清度对大孔吸附树脂的吸附影响很大^[14], 如果药液中沉淀过多会堵塞树脂柱影响吸附, 因此本实验采用对上样液离心, 离心时间为 30 min, 转速为 6 000 r·min⁻¹。

通过对 D101、X-5、HPD-722、HP-20、AB-8、DM-130、HPD-600、NKA-9 八种大孔吸附树脂的吸附性能的比较, 初步筛选出, 弱极性大孔吸附树脂 AB-8 纯化赤芍总苷效果最好, 而且是从适用性、生产性及经济性等方面予以综合考虑, 国产的 AB-8 也是一种性能良好的赤芍总苷的纯化树脂。

本试验对分离纯化赤芍总苷的大孔树脂型号进行了筛选, 为了更科学合理的利用大孔树脂分离纯化赤芍总苷, 还需要考察最佳的纯化工工艺条件, 如原液浓度、流速对吸附影响、水洗用量的影响、不同乙醇浓度对解吸效果的影响、乙醇用

量的影响等等, 这些进一步的纯化研究工作正在进之中。

REFERENCES

- [1] HU J, ZHOU Y H. Application of macroporous resin in the purification of Chinese herbs [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 24(2): 127-130.
- [2] WANG H W, LIU Y Q. Recent advances in the application of macroporous resins [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 28(4): 3532-3561.
- [3] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 年版. 二部)[S]. 2005: 109.
- [4] RUAN J L, ZHAO Z X, ZENG Q Z. Recent advances in study of components and pharmacological roles of Radix Paeoniae Rubra [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2003, 19(9): 965-670.
- [5] KANEDA M, IITAKA Y, SHIBATA S. Chemical studies on the oriental plant drugs XXXIII. The structures of paeoniflorin albiflorin oxypaeoniflorin and benzoyl-paeoniflorin isolated from Chinese paeony root [J]. Tetrahedron, 1972, 28(10): 4309-4317.
- [6] NOBUTOSHIM, MASSAM I S, HIRPM I S, et al. New bioactive monoterpene glycosides from Paeoniae radix [J]. Chem Pharm Bull, 1996, 44(6): 1279-1281.
- [7] LIU B G, GUO W Y, ZHONG L, et al. Application of macroporous resin in the traditional Chinese medicine preparation [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2003, 6(9): 453-455.
- [8] GUO L B, WANG L. Application condition and the main parameters of common macroporous adsorption resins [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2006, 8(4): 27-32.
- [9] LOU Y Y, HANG Q, SHI S L, et al. Choice of the purification of breviscapine with macroporous resin by static adsorption method [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊), 2006, 24(6): 1129-1131.
- [10] LIU Y, WEI Y F, JIANG W, et al. Preliminary study on adsorption of radix scutellariae flavonoids with macroporous resins [J]. J Hubei Coll TCM (湖北中医学院学报), 2005, 7(2): 28-29.
- [11] ZHONG M M, CHEN F H, YUAN L P, et al. Study on the property of adsorption and separation of the macroporous resins for total flavonoids of *Bidens bipinnata* L [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2006, 30(3): 338-341.
- [12] REN L, GU X H, TAO G J, et al. Study on absorption and isolation of the macroporous resin for the phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight [J]. Food Sci(食品科学), 2005, 26(8): 327-330.
- [13] NIU X C, ZHANG S Q, WANG C Z, et al. Study on absorption and isolation of the macroporous resin for the

phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight [J]. Food Res Develop(食品研究与开发), 2007, 28(4): 36-39.

- [14] ZENG Y E, WANG F Y, JIANG B, et al. Influencing factors of static adsorbing process of extract of herba artemisiae

scopariae with macroporous resin [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 30(3): 199-202.

收稿日期: 2010-07-29