

大孔树脂纯化赤芍提取物的工艺考察^{*}

刘虹,王萌,郝彧,朱晓月,拓小瑞,张德芹

摘要 [目的] 考察赤芍提取物的大孔树脂纯化工艺。[方法] 以芍药苷为指标,进行了树脂型号的选择,考察了上样量、洗脱溶剂的浓度及用量、树脂重复使用次数、再生后吸附力的恢复等。[结果] 选择 D101 大孔树脂,上样量为树脂体积:生药=1:1g(v/w),洗脱溶剂 4 倍量为 70%乙醇。[结论] 工艺经济简单实用,可以应用于纯化赤芍提取物。

关键词 赤芍;大孔树脂;芍药苷

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1673-9043(2009)03-0142-04

Study on the purification technology of radix paeoniae rubra extract by macroporous resin

LIU Hong, Wan Meng, HAO Yu, et al

(Research institute of Tianjin University of TCM, Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Prescription, Ministry of Education, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the purification technology of Radix Paeoniae Rubra extract by macroporous resin. [Methods] Taking peoniflorin as the index constituent, the type of resin was chosen. The sampling amount and elution solvent were decided and the times for repeated use and recovery capacity after regeneration were studied. [Results] D101 was chosen for purification, the suitable sampling ratio of resin volume to raw material was 1:1. The elution solvent was 4-fold 70% ethanol. [Conclusion] The technology is economic, simple and practical and can be used to purify Radix Paeoniae Rubra extract.

Key words: Radix Paeoniae Rubra; macroporous resin; peoniflorin

赤芍系毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的干燥根。赤芍的药理作用广泛,可以抗凝、抗血栓、抗血小板聚集、对缺血性损伤有保护作用、抗动脉粥样硬化等^[1]。课题组在预实验中发现,赤芍水提液出膏率高达 32.7%,因此需要进行纯化以降低患者的服用量。近年来已有关于大孔树脂纯化赤芍提取物的文献报道^[2-5],但是缺乏对实际工业化生产具有指导性的、操作性强的实验研究。实验的工艺研究着眼于生产实际,以赤芍的主要活性成分之一芍药苷为指标,对赤芍的大孔树脂纯化工艺进行考察。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 液相色谱系统(VWD 检测器);乙腈(色谱纯,美国天地);芍药苷对照品(中国药品生

物制品检定所,批号 110736-200525);赤芍药材(购自亳州永刚饮片厂,经天津中医药大学中医药研究院郭俊华副研究员鉴定)。D101 大孔树脂(天津市海光化工有限公司,净品型)。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件^[6] Phenomasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,乙腈-水(14:86)为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 25℃,检测波长 230 nm。

2.1.2 标准曲线的绘制 取芍药苷对照品适量,精密称定,用甲醇配成 4.92、19.68、39.36、59.04、78.72、98.40 mg/L 系列浓度的对照品溶液,进样量 10 μL。以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得芍药苷回归方程为 $Y=1\,252.17X+2.58$,线性范围为 0.049 2~0.984 μg,相关系数 $r=0.999\,9$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备 赤芍药材中芍药苷含量测定供试品溶液:参照 2005 年版《中国药典》^[6]。工艺考察中各部分供试品的制备:适度稀释后,以 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 赤芍的提取 赤芍饮片用水提取 2 次,第 1 次

^{*} 基金项目:教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(706013)。

作者单位 300193 天津中医药大学中医药研究院,教育部方剂学重点实验室

作者简介 刘虹(1967-),女,副研究员,研究方向为中药新药研发。

10 倍量,第 2 次 8 倍量,2 min/d。

2.3 大孔树脂上样液的制备 赤芍水提液浓缩后非常黏稠,无法过滤和上样,因此必须进行预处理。对水提液采用醇沉的预处理方法,对醇沉浓度进行了考察。

水提取液减压浓缩至约 1:0.5(v/w),取浓缩液,每份 100 mL,分别加 1、2、3 倍量的 80%乙醇,使乙醇浓度为 40%、53%、60%,搅拌后醇沉过夜;抽滤后,测定每份醇沉液中芍药苷的总量,计算芍药苷自浓缩液到醇沉液的转移率,结果见表 1。

表 1 赤芍浓缩液醇沉浓度考察 mg			
醇沉浓度 (%)	浓缩液中芍药苷量	醇沉液中芍药苷量	芍药苷自浓缩液到醇沉液转移率(%)
40	1 428	1 229.50	86.10
53	1 428	1 370.32	95.96
60	1 428	1 402.83	98.24

由表 1 可见,醇沉浓度为 53%时,芍药苷自浓缩液到醇沉液转移率较高且较节省乙醇。因此确定赤芍水提液预处理方法为:将赤芍水提取液减压浓缩至约 1:0.5(v/w),加 2 倍量 80%乙醇醇沉,搅拌后放置过夜,抽滤,将滤液浓缩至无醇味,加适量水至浓度为 500 g/L,即得大孔树脂上样液。

2.4 大孔树脂纯化工艺考察

2.4.1 大孔树脂预处理 将新购大孔树脂经醇洗→水洗→5%盐酸(HCl)洗→水洗至中性→5%氢氧化钠(NaOH)洗→水洗至中性,备用。

2.4.2 树脂型号的选择 采用 D101、AB-8、DM301 3 种树脂,进行静态吸附量和静态洗脱率实验,以考察其对芍药苷的吸附及洗脱能力。

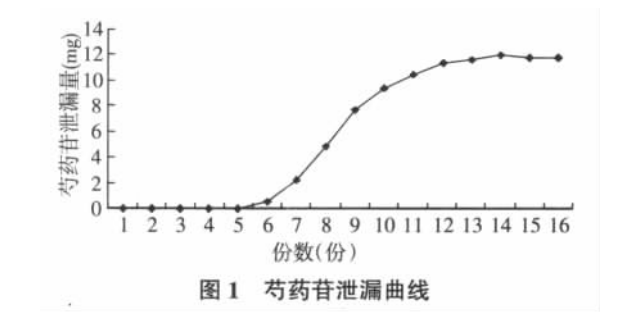
取 D101、AB-8、DM301 大孔树脂各 20 mL,加入上样液 125 mL,不时振摇,放置过夜后抽滤,测定吸附后的上样溶液中的芍药苷总量,计算 3 种树脂对芍药苷的静态吸附力(g/L)。将上述已饱和吸附的 D101、AB-8、DM301 大孔树脂,分别加入 120 mL 70%乙醇,不时振摇 4 h 后抽滤,测定洗脱液中芍药苷的含量,计算 3 种树脂对芍药苷的解吸率(%)。结果见表 2。

由表 2 可以看出,在 3 种树脂中 D101 具有较好的吸附力及解吸率,故选择 D101 进行赤芍提取液的纯化。

2.4.3 上样量的确定 用 D101 大孔树脂 120 mL 装柱(径高比约为 1:6),水洗至无醇味后不断上样,

表 2 3 种树脂的静态吸附力及解吸率		
树脂型号	静态吸附力 (g/L)	解吸率 (%)
D101	33.35	93.76
AB-8	30.63	83.34
DM301	27.66	80.26

每 60 mL 为 1 份收集下口流出液,测定每份中芍药苷总量,绘制芍药苷的泄漏曲线,结果见图 1。



由图 1 泄漏曲线上可初步确定:当上样液浓度为 0.5 g/mL 时,泄漏点为第 6 份,折合树脂与生药的比为 1:1.5(v/w)。

2.4.4 上样量的验证 用 D101 大孔树脂装 3 根柱,树脂体积均为 80 mL(径高比约为 1:6),取上样液,按树脂与生药的比为 1:0.75、1:1、1:1.5(v/w)的比例分别上样 120、160、240 mL。上样后先用 2 倍树脂体积(BV)水洗,弃去水洗液,再用 4BV 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,测定洗脱液中芍药苷的总量,计算芍药苷自上样液至洗脱液的吸附回收率。结果显示 3 个大孔树脂柱吸附回收率依次为 96.77%、94.52%、82.41%。可见按 1:1.5 上样虽然上样量较大,但是吸附回收率较低;按 1:0.5 吸附回收率较高,但是上样量较少造成树脂的浪费。故确定上样量为:树脂与生药的比为 1:1(v/w)。

2.4.5 水洗量的确定 上样完毕后,必须用一定量的水洗除杂以降低出膏率,同时又不能将芍药苷洗下来。为此,考察了不同水洗量对芍药苷回收率的影响。

用 120 mL D101 大孔树脂装柱(径高比约为 1:6),按 1:1 上样 240 mL,用 5BV 量水洗,测定每倍水洗液中芍药苷的含量,计算损失率;蒸干每倍柱床体积的水洗液,测定固形物收率。结果:第 1~2 BV 水洗液中固形物收率为 15.23%,芍药苷的损失率只有 1.6%;第 3~5BV 水洗液中固形物收率为 0.72%,但芍药苷的损失率却高达 7.7%,故确定上样后用 2BV

量水洗除杂。

2.4.6 洗脱溶剂的浓度及用量的考察

2.4.6.1 50%和 70%乙醇的洗脱曲线 用 80 mL D101 大孔树脂装 2 根柱(径高比约为 1:6),按 1:1 上样 160 mL,用 2BV 量水洗后,分别用 50%和 70%的乙醇洗脱,每 40 mL 为 1 份收集下口流出液,测定每份中芍药苷的量(mg),结果见洗脱曲线见图 2。

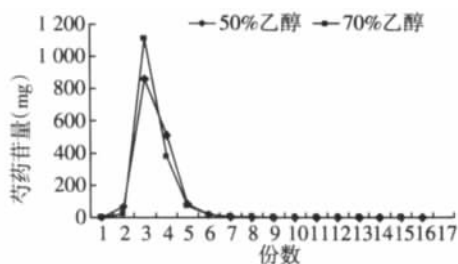


图 2 50%和 70%乙醇洗脱曲线

由图 2 可知,50%和 70%乙醇洗脱效果相当,4BV 均可将芍药苷洗净。

2.4.6.2 50%和 70%乙醇的总洗脱率实验 分别将 2.4.6.1 中 50%和 70%乙醇的洗脱液合并,测定洗脱液中芍药苷的量,计算芍药苷自上样液至洗脱液的总洗脱率。结果:50%乙醇总洗脱率为 85.1%,70%乙醇总洗脱率为 93.0%,故确定洗脱溶剂为 4BV 的 70%乙醇。

2.4.7 树脂柱重复使用次数考察 为了缩短生产周期提高生产效率,考察了大孔树脂柱每次上样洗脱后不经酸碱再生,只用 3BV 水洗简单再生、反复上样洗脱后芍药苷洗脱量的变化趋势,以确定大孔树脂柱重复使用次数。

向径高比约为 1:6,树脂体积 100 mL 的 D101 大孔树脂柱,缓慢上样 200 mL 2BV 水洗后,4BV 70%乙醇洗,再用 3BV 水洗简单再生,然后进行下一周期上样洗脱循环操作,测定每次 70%乙醇洗脱液中的芍药苷量(mg),绘制芍药苷洗脱量的趋势变化图,见图 3。

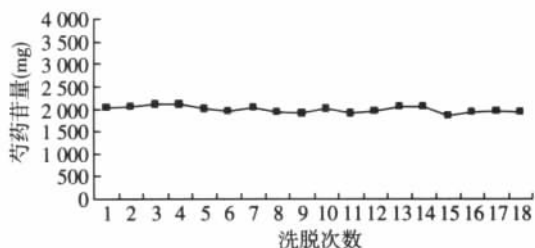


图 3 芍药苷吸附量变化趋势图

由图 3 可见,在上述工艺条件下,大孔树脂柱重复使用 18 次吸附量变化不大。暂定树脂柱可使用 18 次。

2.4.8 中试规模放大实验 在 2.3 和 2.4 确定的工艺条件下进行 3 批中试规模放大(原料赤芍药材中芍药苷的含量为 26.9 mg/g),用水提取 2 次,第 1 次 10 倍量,第 2 次 8 倍量,每次 2 h;将赤芍水提取液减压浓缩至约 1:0.5(v/w),加 2 倍量 80%乙醇醇沉过夜,抽滤,将滤液浓缩,用大孔树脂纯化,2 倍水洗后,用 4 倍 70%乙醇洗脱。洗脱液减压浓缩真空干燥,得赤芍干膏。3 批放大结果见表 3。

表 3 赤芍中试规模放大实验结果

批次	投料量(kg)	出膏率	干膏中芍药苷含量	芍药苷转移率/%
1	12.5	5.7	43.57	65.83
2	12.5	5.3	45.65	64.13
3	12.5	6.1	44.20	71.47

3 讨论

课题组对含有大孔树脂处理过的赤芍提取物等组成的制剂,用顶空气相法对有机溶剂的残留进行了测定,符合相关的限度规定。

在大孔树脂的实验室工艺考察中,应注重实际应用,贴近工业生产的需求,具体技术参数的确定应便于实际操作。且工艺确定后应进行中试放大验证实验,证明实验室所确定工艺的稳定性及可重复性。除常规的工艺纯化条件如上样量、洗脱剂浓度用量等考察以外,大孔树脂重复使用次数考察对工业生产中降低生产成本、节约工时、提高生产效率有一定意义。

在大孔树脂纯化工艺的实验室考察中,大孔树脂的用量不宜过小,以免造成较大的实验偏差,及中试放大后工艺难以重现。通常文献中对上样后水洗量均未作明确规定,只写明水洗至没有糖的 Molish 反应;水洗量应通过考察后确定,因为过量的水洗会导致目标成分的损失。

在本实验确定的工艺条件下进行 3 批中试规模放大,既保证了指标成分芍药苷稳定的转移率,又大大降低了出膏率,满足了制剂的要求。在本工艺基础上略加改进,就能使芍药苷含量达 70%以上,结果将另文发表。

参考文献:

- [1] 林巧,杨大国.赤芍药理作用与临床应用的研究进展[J].中华医学研究杂志,2006,6(6):642-644.
- [2] 于红宇,张军,詹丽玲,等.赤芍药材提取液的大孔树脂

精制工艺研究[J]. 中药材, 2004, 27 (11): 871-872.

[3] 刘爱玲, 张盛, 王坤波, 等. 赤芍中芍药苷和白芍苷纯化工艺研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(3): 35-37.

[4] 周丽. 赤芍总苷的提取和分离纯化工艺研究[J]. 食品科技, 2008, 8: 152-154.

[5] 陈寅生, 姚仲青. 膜分离与大孔树脂吸附技术在赤芍总苷

提取与分离中的应用. 南京中医药大学学报[J]. 2006, 22(6): 406-408.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 22-22.

(收稿日期 2009-04-03)

· 临床报道 ·

中西医结合治疗下肢深静脉血栓体会

谷岩

关键词: 中西医结合; 下肢血栓; 治疗

中图分类号: R285.5

文献标识码: B

文章编号: 1673-9043(2009)03-0145-01

笔者2004—2006年采用中西医结合治疗下肢深静脉血栓形成34例, 治疗周期较短, 消肿止痛见效快, 复通率高, 无并发症出现。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组深静脉血栓(DVT)患者34例, 男8例, 女6例, 平均年龄35.82岁, 病程3 d~2 a不等。全部患者均经下肢血管彩色多普勒或血管造影明确诊断。其中无明显诱因者8例, 平均年龄60岁(45~70岁)。34例患者治疗前均有下肢肿胀、疼痛症状。单侧血栓者28例; 双侧血栓者6例, 共40条肢体。

1.2 诊断方法 诊断标准: 参照1995年中国中西医结合周围血管病专业委员会制定的标准拟定: ①发于外伤、手术、分娩、肿瘤等长期卧床以后, 常见于单侧下肢。②发病急骤, 患肢广泛肿胀, 可为凹陷性, 疼痛, 小腿区明显压疼, 皮肤温度升高或正常, 皮色暗红或发白或青紫。浅静脉扩张。③舌质淡紫或淡红, 苔黄腻或白腻, 脉滑数或沉。④彩色多普勒超声检查示患肢呈深静脉闭塞或回流不畅, 血液呈高凝状态。血沉增快。中医辨证为湿热下注型或脾虚湿盛型。排除急性动脉栓塞、急性淋巴管炎、丹毒等疾病。

2 治疗方法

2.1 中医治疗 ①治以益气活血、通络祛湿之法, 黄芪桂枝五物汤合四妙散加减, 药用生黄芪、桂枝、当归、苍术、黄柏、川牛膝、生薏苡仁等, 水煎服, 1剂/d。②中药制剂 灯盏花注射液40 mL加入生理盐水250 mL静脉滴注, 1次/d。

2.2 西医治疗 病程在3个月以内者, 低分子肝素5 000 U, 皮下注射, 每12 h 1次, 共2周, 停用前2~3 d开始口服华法

令2.5~5 mg, 1次/d。调整剂量以使国际标准化比值(INR)维持在2~3之间。病程超过3个月者, 肠溶阿司匹林100 mg口服, 1次/d。

3 治疗结果

疗效评定标准: 痊愈: 症状体征消失, 血液流变学指标达正常范围; 显效: 症状体征大部分消失, 其他症状体征明显好转, 血液流变学指标大部分恢复到正常范围; 有效: 症状体征减轻, 血液流变学指标达正常范围; 无效: 症状体征均无改善。

治疗结果: 34例中痊愈7例, 显效20例, 有效5例, 无效2例, 有效率为94%。

4 讨论

中医学认为本病属“脉痹”范畴。本组病例, 中医辨证均属气虚血瘀加湿证, 治疗选用黄芪桂枝五物汤合四妙散加减。黄芪桂枝五物汤是《金匮要略》中益气活血的代表方, 四妙散的功效是清热、利湿、健脾。同时为了进一步改善症状, 笔者联合用中药制剂静脉输注, 灯盏花注射液可以降低毛细血管通透性, 增加静脉张力, 改善静脉回流。

晚期患者虽可取得不同程度的效果, 但大多数遗留有患肢静脉功能不全的现象。早期治疗, 能促进血栓溶解和防止血栓蔓延滋长, 恢复静脉血流, 这是取得疗效的机制。

参考文献:

[1] Harry R, Buller, Giancarlo A, et al. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: The seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy [J]. Chest, 2004, 126(3): 401-428.

[2] 孙葵葵, 王辰. 深静脉血栓形成研究进展[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2004, 24(5): 289-292.

(收稿日期 2009-02-26)

作者单位: 300192 天津市第一中心医院

作者简介: 谷岩(1976-), 男, 医学硕士, 研究方向为外科学血管外科。