文章编号:1001-6880(2014)4-0579-04

D101 大孔树脂富集纯化板蓝根木脂素活性部位的工艺研究

潘以琳,李　进,李　祥*,陈建伟

南京中医药大学,南京 210046

摘　要:本文以板蓝根总木脂素和 Clemastanin B 的含量为指标探讨 D101 大孔树脂纯化板蓝根木脂素活性部位的工艺。通过对树脂比容积、吸附容量、吸附流速、泄漏曲线、水洗终点、径高比、梯度解吸、解吸曲线等参数的考察,从而得出富集纯化板蓝根木脂素活性部位的最佳工艺条件为:上样量 5 BV,径高比 1∶3,吸附流速 4 BV/h,1 BV 水洗,5 BV 的 50% 乙醇洗脱。并证明了所选的大孔树脂纯化工艺稳定、可靠,有效成分损失少,杂质去除率高,值得在生产中推广应用。

关键词:板蓝根;大孔树脂;木脂素;Clemastanin B

中图分类号:R284.2　　**文献标识码**:A

Enrichment and Purification of Lignans from Radix Isatidis by D101 Macroporous Resin

PAN Yi-lin, LI Jing, LI Xiang*, CHEN Jiang-wei

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046, China

Abstract: In this study, Radix Isatidis was purified by D101 macroporous resin. The purification conditions were optimized using the total active lignans and Clemastanin B as screening indexes. The influencing parameters including resin ratio of volume, adsorption capacity, adsorption velocity curve, leakage, washing end, ratio of diameter to height, gradient desorption and desorption curve were investigated. The optimum condition of enrichment and purification of active lignans from Radix Isatidis were as follows: 5 BV of the sample volume, 1∶3 of the ratio of diameter to height, 4 BV/h of the adsorption velocity, 1 BV of water elution and 5 BV of 50% ethanol elution. It was concluded that the purification process with D101 macroporous resin was stable, reliable, less loss of effective components, high impurity removal rate and worthy of popularization and application in large scale production.

Key words: Radix Isatidis; macroporous resin; lignans; Clemastanin B

板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根,性苦、寒,有清热解毒,凉血利咽的功效[1]。目前临床上主要用于病毒性疾病及细菌感染性疾病的治疗,尤其在抗病毒方面疗效确切。在对板蓝根抗病毒有效部位进行筛选过程中发现,木脂素部位有良好的抗病毒效果[2]。在制剂生产中,板蓝根多采用传统水提醇沉的方法提取分离,在去除多糖、蛋白质等大分子物质的同时也去除了很多有效成分,且该工艺周期长、杂质去除不尽、易产生絮凝物[3]。课题组已做过的研究表明,微波提取技术、膜分离技术在板蓝根有效部位的研究中应用效果良好[4,5]。大孔吸附树脂现在已经广泛的应用于中药的研究中,它具有物理化学稳定性高、比表面积大、吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和、再生处理方便、使用周期长、宜于构成闭路循环、节省费用等诸多优点[6]。本实验以板蓝根木脂素活性部位作为研究对象,研究板蓝根药材经微波提取、膜分离处理后的药液进行大孔树脂吸附纯化的工艺。

1　仪器与材料

HWC3-LA 型微波提取设备(广州兴兴微波能有限公司);LNG-NF-101 超滤膜分离设备(上海朗极膜分离设备工程有限公司);Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);KQ-100 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AY220 型分析天平(十万分之一,SHIMADZU 日本岛津公司);

收稿日期:2013-03-29　　接受日期:2013-07-17

基金项目:江苏省产学研联合创新奖金项目(BY2009110);南京中医药大学"康缘中医药科技创新基金"项目(HZ0808KY);江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2010)

*通讯作者 Tel:86-25-85811512;E-mail: lixiang_8182@163.com

Spectrum752 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

板蓝根药材购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司(批号 110115),经南京中医药大学中药鉴定教研室陈建伟教授鉴定为十字花科植物菘蓝的干燥根;阴阳离子交换树脂(安徽三星树脂科技有限公司);Clemastanin B(简称为 CB,自制,经 IR、^{1}H NMR、^{13}C NMR 和 MS 等确定其结构,液相色谱面积归一化法检查其纯度大于 98.0%)。

2 实验方法

2.1 吸附原液的制备

准确称取板蓝根药材粉末(过 20 目筛)100 g,浸泡 15 min,微波辐射功率 700 W,加 15 倍量水提取 2 次,每次提取时间 8 min,合并两次提取药液过滤取上清液;得到的上清液选择相对分子量 5000 的卷式中空有机超滤膜,过膜压力 0.5 MPa,过膜流速 30 L/h,超滤 3 次,体系温度维持室温(22 ℃)的条件进行超滤处理,收集渗余液,作为大孔树脂纯化的原液[4,5],原液生药浓度 0.028 g/mL。

2.2 总木脂素含量测定[7]

精密吸取膜处理的透过液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,以蒸馏水加至刻度,摇匀;以一定浓度的 Clemastanin B 标准溶液作为对照品溶液,在 280 nm 波长处以紫外分光光度法测其吸光度,计算总木脂素含量;以对照品浓度(mg/mL)为横坐标,吸光度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线,计算得到回归方程为 $A = 5.301C + 0.0392$($R^2 = 0.9998$),线性范围为 0.0206 ~ 0.1020 mg/mL。

2.3 Clemastanin B 的含量测定及色谱分析条件

Clemastanin B 的含量按照前期所建立的方法进行测定[8]。Clemastanin B 的色谱分析条件:Hyspesil C_{18}柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相为甲醇-水(21∶79),流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,检测波长 280 nm,进样量 20μL。

3 结果与分析

3.1 D101 大孔树脂吸附板蓝根木脂素活性部位的影响因素研究

3.1.1 比体积测定

准确称取 D101 大孔吸附树脂 3 份(约 0.40 g),湿法装入量筒中,记录体积。结果 D101 大孔吸附树脂的比体积 5.541 mL/g(RSD 为 0.82%)。

3.1.2 吸附容量考察

取吸附原液 200 mL,D101 大孔吸附树脂柱床(径高比 1∶2)吸附,吸附流速 4 BV/h;吸附结束以后,用 2 BV 的蒸馏水冲洗。合并上柱流出液和水洗液,浓缩至 100 mL。测定总木脂素和 Clemastanin B 的含量,计算吸附容量([(上柱液中指标成分含量-过柱液中指标成分含量)/干树脂量])。结果,D101 大孔树脂对总木脂素和 Clemastanin B 的吸附容量分别为 9.189、0.091 mg/g($n = 3$,RSD 为 0.18%)。

3.1.3 吸附流速的考察

分别量取 D101 型大孔吸附树脂 50 mL 装于玻璃柱中(径高比 1∶2),吸附原液 50 mL 上样,分别以 1、2、3、4、5、6 BV/h 流速进行吸附;吸附完成后以 2 BV 蒸馏水冲洗;再以 6 BV 的 50 % 乙醇洗脱,洗脱速率 4 BV/h,收集洗脱液。测定洗脱液中指标成分的含量,计算比洗脱量([比洗脱量 = 洗脱液中含量/干树脂量]),见图 1。结果,以 4 BV/h 进行洗脱时能把指标性成分洗脱完全。

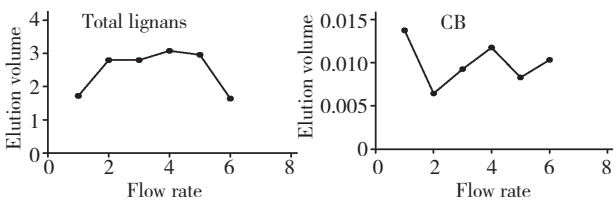

图 1 不同吸附流速对指标成分的影响

Fig. 1 Effect of different adsorption velocity on index components

3.1.4 泄漏曲线

准确称取经处理过后的 D101 大孔吸附树脂 50 mL,装于玻璃柱中(径高比 1∶2),吸附原液 500 mL 上样,以 4 BV/h 的吸附流速进行吸附;在吸附过程中每树脂床体积收集为 1 个流份(即 50 mL),总收集 10 个流份。测定所得各流份中总木脂素、Clemastanin B 的含量,绘制各指标的泄漏曲线,见图 2。

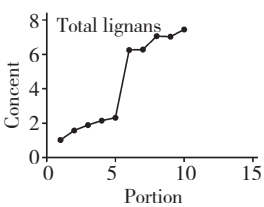

图 2 D101 大孔树脂-板蓝根木脂素部位吸附泄漏曲线图

Fig. 2 Adsorption leak curve of active lignans of Radix Isatidis by D101 macroporous resin

结果,当第 5 个流份时有明显的泄漏发生,而在 10

个流份中均没有检测到 Clemastanin B 成分。所以最佳上样体积为 250 mL。

3.1.5　水洗终点体积的确定

将 250 mL 吸附原液加入柱床中(径高比 1∶2),以上述条件进行吸附,吸附完成后以水进行洗脱,每 20 mL 收集为一个流份,共收集 10 个流份。测定流份中总木脂素、Clemastanin B 的含量和固含量,见图 3。结果,10 个流份的固含量分别为 6.680、6.380、1.600、0.640、0.460、0.420、0.360、0.280、0.200、0.080 g/L,第 3 个流份的时候,固体物含量已经达到总流出液固体物含量质量分数的 85.7%,并且随后固体物含量增加缓慢,慢慢趋于平衡;在收集的流份中没有检测到总木脂素和 Clemastanin B。按每段流份 20 mL,3 个流份 60 mL,所以水洗终点体积定为 1 BV。

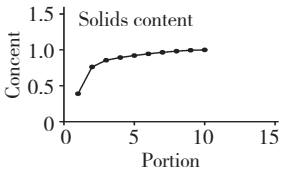

图 3　D101 大孔树脂吸附木脂素活性部位水洗体积考察

Fig. 3　Effect of water volume of D101 macroporous resin on adsorption of active lignans

3.1.6　径高比考察

量取不同体积的 D101 型大孔吸附树脂在特定型号的玻璃柱上装柱,分别使径高比 1∶2、1∶3、1∶4、1∶5、1∶6,取吸附原液 250 mL 上样,按上述条件进行吸附以后,用 6 BV 的 50% 乙醇溶液洗脱,收集洗脱液,测定总木脂素和 Clemastanin B 的含量,见图 4。结果,径高比 1∶3 时 D101 大孔树脂对木脂素活性部位有较好的吸附和解吸效果。

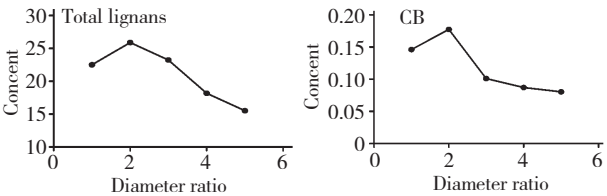

图 4　不同径高比对指标性成分的影响

Fig. 4　Effect of different diameter-height ratios on index components

3.1.7　梯度解吸考察

取吸附原液 250 mL 装于 D101 大孔树脂柱中(径高比 1∶3),按上述条件进行吸附以后,分别以 6BV 的 30%、50%、70%、90% 的乙醇溶液洗脱,收集各洗脱液,测定总木脂素和 Clemastanin B 的含量,见图 5。结果,50% 乙醇对两者有较强的洗脱作用,因此确定以 50% 乙醇作为洗脱溶剂。

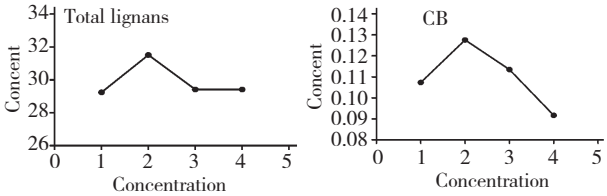

图 5　D101 大孔树脂-板蓝根木脂素活性部位梯度解吸考察

Fig. 5　Gradient desorption of active lignans of Radix Isatidis by D101 macroporous resin

3.1.8　解吸曲线的绘制

取吸附原液 250 mL 装于树脂柱中(径高比 1∶3),按上述条件进行吸附后,以 50% 乙醇洗脱,每一个柱体积收集一段洗脱溶液,共收集 10 份。测定所收集流份中总木脂素和 Clemastanin B 的含量。图 6 表明,第 6 个流份中已检测不到 Clemastanin B,总木脂素的含量也不再变化,前 5 个流份中总木脂素和 Clemastanin B 的解吸率分别为 89.63%、98.78%,说明此时柱床中的总木脂素和 Clemastanin B 已洗脱完全。提示最佳的洗脱溶媒用量为 5 BV。

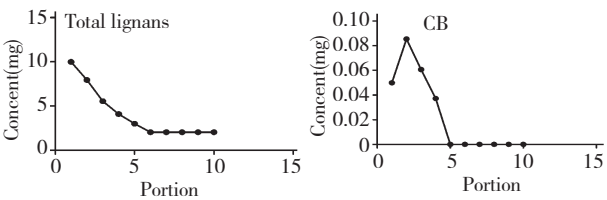

图 6　D101 大孔树脂-板蓝根木脂素活性部位解吸曲线

Fig. 6　Desorption curves of active lignans of Radix Isatidis by D101 macroporous resin

3.1.9　验证实验

取吸附原液 3 份,分别按照上述条件进行吸附和解吸,收集洗脱溶液,分别测定总木脂素和 Clemastanin B 的含量,计算经 D101 大孔树脂纯化富集以后木脂素部位的保留率([保留率 = (纯化后指标成分含量/吸附原液中指标成分含量) × 100%]),见表 1。结果,板蓝根木脂素活性部位经 D101 大孔树脂纯化富集后,总木脂素含量 1.19%,保留率 69.59%,Clemastanin B 的含量 0.087 mg/g,保留率为 72.50%。

表 1 D101 大孔树脂纯化板蓝根木脂素活性部位验证实验结果

Table 1 Validation results of active lignans of Radix Isatidis purified by D101 macroporous resin

原液 Primary liquid	浸膏得率 Extraction rate (%)	总木脂素含量 Total contents of lignans(%)	Clemastanin B (mg/g)
1	3.58	1.18	0.086
2	3.47	1.21	0.087
3	3.62	1.18	0.088
Average	3.56	1.19	0.087
RSD (%)	2.18	1.73	0.12
吸附原液 Adsorption primary liquid	26.79	1.71	0.12
保留率(%) Retention rate (%)	13.29	69.59	72.50

4 结论

D101 大孔树脂纯化富集板蓝根木脂素活性部位的最佳工艺为:上样量 5 BV,径高比 1∶3,吸附流速 4 BV/h,1 BV 水洗,5BV 的 50 % 乙醇洗脱。对木脂素活性部位的富集效果明显。以 HPLC 法测定板蓝根中 Clemastanin B 的含量准确高效,但选用紫外分光光度法测定板蓝根总木脂素部位的含量,方法专属性不强,有待进一步考察筛选。大孔树脂纯化富集中草药中有效成分的报道常见诸报端,但多是以有效部位单一指标来筛选工艺条件,不够准确,本文以总木脂素部位和 Clemastanin B 单体含量结合作为筛选指标,更全面、客观的评价工艺条件,终产物中板蓝根总木脂素部位和 Clemastanin B 单体的保留率均能达到较高水平,干膏含量明显下降。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission(国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I,191.

2 Cheng Y(程妍),Li X(李祥),Chen JW(陈建伟),*et al*. A study on antiviral effect s of the active parts from Radix Isatidis. *J Nanjing TCM Univ*(南京中医药大学学报),2011,27:155-157.

3 Xiang ZL(项振荣). The process method of extract refined Radix isatidis by membrane separation technique(应用膜分离技术对板蓝根提取液精制的工艺方法). CN 101564407A,2009-10-28.

4 Wang S(王盛),Li X(李祥),Chen JW(陈建伟). Study on lignanoids from Isatidis Radix by microwave extraction. *Chin J Exp Tradit Med Formul*(中国实验方剂学),2011,17(4):44-46.

5 Li J(李进),Li X(李祥),Chen JW(陈建伟),*et al*. Study on the content of effective components from Radix Isatidis by ultrafiltration technology. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2013,3:622-624.

6 Liu BG(刘彬果),Guo WY(郭文勇),Zhong L(钟蕾),*et al*. Application macroporous resin adsorption technology in the traditional Chinese medicine(TCM) preparations. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学学报),2003,19:453-457.

7 Huang TH(黄天辉),Shen PR(沈平孃). Study on microwave extraction of Fructus Schisandrae by uniform design optimizing technological. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2006,28:1111-1113.

8 Chen Y(陈勇),Li X(李祥),Chen JW(陈建伟),*et al*. Determination on content of clemastanin B and isolariciresinol in Banlangen granules by HPLC. *Res Prac Chin Med*(现代中药研究与实践),2009,22(6): 54-56.