

• 制剂工艺 •

加味四逆颗粒水提取大孔树脂精制工艺的研究

李云涛¹, 王丽娜^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150010; 2. 哈药集团世一堂制药厂, 黑龙江 哈尔滨 150088)

[摘要] 目的: 选择加味四逆颗粒最佳精制工艺条件。方法: 采用正交试验设计, 以芍药苷、橙皮苷、甘草酸 3 种成分为指标, 采用 HPLC 法对上述指标成分进行含量测定。结果: 选用 AB-8 型大孔树脂, 每克树脂的最大吸附量分别为芍药苷 47.1 mg、橙皮苷 11.5 mg、甘草酸 57.7 mg, 上样药液浓度为 0.5(生药) g·mL⁻¹, 树脂柱的径高比为 1: 7, 吸附流速为 2(BV/h), 洗脱杂质用水量 4 倍吸附柱体积为最佳精制条件。结论: 大孔树脂吸附法可用于加味四逆颗粒的精制。

[关键词] 加味四逆颗粒; 大孔吸附树脂; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)01-0016-03

加味四逆颗粒由柴胡、白芍、枳实、甘草等药味组成, 具有疏肝解郁、调畅气机等功效。本文以芍药苷、橙皮苷、甘草酸 3 种成分为指标, 采用正交设计考察了加味四逆颗粒精制工艺的条件; 大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂, 具有较好的吸附性能, 近年来开始应用于中草药化学成分的提取分离, 本文中我们采用此法对加味四逆颗粒水提取所得浸膏进行进一步的精制, 对泄漏曲线、上样药液浓度、树脂柱的径高比、吸附流速、洗脱杂质用水量进行了工艺考察。

1 仪器与药品

Agilent 1100 高效液相色谱仪, G2170AA 色谱工作站(安捷伦科技有限公司); UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津); AS10200B 型超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 色谱柱(奥泰公司 C₁₈ 250 mm × 4.6 mm, 5 μm); AB-8 型大孔吸附树

脂(天津)。橙皮苷对照品(72129405)、芍药苷对照品(76329407)、甘草酸铵对照品(73129403), 均由中国药品生物制品检定所提供。高效液相用乙腈、甲醇为色谱纯(美国天力); 其余试剂均为分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司); 水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 芍药苷

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈-1% 冰醋酸溶液(20: 80)为流动相; 检测波长为 230 nm。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 2 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含芍药苷 0.06 mg 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取干膏适量, 研细, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加稀乙醇 35 mL, 超声处理 30 min(功率 240 W, 频率 45 kHz), 放冷, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.4 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.2 甘草酸

[收稿日期] 2008-06-02

[基金项目] 哈尔滨市科技攻关计划项目(2006AA3BS140)

[通讯作者] * 王丽娜, Tel: (0451) 84667617; E-mail: liyuntao.66@163.com

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 甲醇- 0.2 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-冰醋酸(67: 33: 1) 为流动相; 检测波长为 250 nm。理论板数按甘草酸峰计算应不低于2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草酸单铵盐对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含甘草酸单铵盐 0.2 mg 的溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取干膏适量, 研细, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加流动相 35 mL, 超声处理 30 min (功率 240 W, 频率 45 kHz), 放冷, 加流动相至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.4 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.3 橙皮苷

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈-1% 冰醋酸溶液(20: 80) 为流动相; 检测波长为 250 nm。理论板数按橙皮苷峰计算应不低于2 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含橙皮苷 0.4 mg 的溶液, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取干膏适量, 研细, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 水浴回流 3 h, 放冷, 加甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.4 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

3 泄漏曲线的考察

通过泄漏曲线的考察, 为预算树脂用量和上样量提供依据。按处方比例称取生药饮片共 480 g, 加去离子水 6 倍量分别提取 3 次, 每次 1 h, 浓缩至室温下测定相对密度为 1.02, 室温下静置 24 h 后备用, 取处理好的 AB-8 型大孔树脂 4 g (干重), 装柱, 将上述上清液稀释至浓度为 0.5(生药) g·mL⁻¹ (上样前分别用高效液相测定含量), 徐徐加入树脂柱, 上样流速调节为 2 BV/h, 收集流出液, 每份 10 mL, 通过其中各指标成分薄层鉴别试验的结果确定最大上样量。^[1] 以流出液份数为横坐标, 各指标成分含量为纵坐标, 绘制泄漏曲线, 结果见表 1。

结果表明, 从第 4 份开始, 橙皮苷鉴别反应呈阳性, 从第 3 份开始, 甘草酸、芍药苷鉴别反应呈阳性, 说明此两种情况下相应的成分开始泄漏, 故根据上

样前高效液相测定 3 种成分的含量结果, 每克树脂的最大吸附量分别为甘草酸 57.7 mg 橙皮苷 11.5 mg、芍药苷 47.1 mg。

表 1 泄露曲线考察的测定结果

流出液份数	甘草酸鉴别	橙皮苷鉴别	芍药苷鉴别
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	-	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+

注: 表 5 中“+”表示鉴别反应呈阳性,“-”表示鉴别反应呈阴性

4 上样药液浓度、树脂柱的径高比、吸附流速的考察

为考察上样药液浓度、树脂柱的径高比和上柱吸附流速对 AB-8 型树脂吸附指标成份的影响, 按 L₉(3⁴) 正交设计分别装柱、上样进行试验, 以橙皮苷、芍药苷、甘草酸为指标成分, 每个因素设计 3 个水平, 计算各组实验对应的树脂吸附量, 结果见表 2^[2]。

按处方比例称取生药饮片 480 g, 加去离子水 6 倍量分别提取 3 次, 每次 1 h, 浓缩至相对密度为 1.05(80 ℃), 将此浓缩液均分成 3 份, 按正交实验设计分别稀释成规定的 3 个浓度, 静置 24 h 后, 取上清液分别上树脂床, 按 L₉(3⁴) 方案进行实验, 测定芍药苷、橙皮苷、甘草酸的含量, 并对试验结果进行方差分析, 结果见表 3~ 6。

表 2 试验因素水平

因素	水平		
药液浓度(每毫升含生药量)	1: 1	1: 0.75	1: 0.5
吸附流速(BV/h)	4	3	2
树脂柱的径高比	1: 3	1: 5	1: 7

表 3 实验设计与结果

因素	A	B	C	D	橙皮苷	芍药苷	甘草酸
					含量(mg)		
1	1	1	1	1	0.36	0.68	0.56
2	1	2	2	2	0.36	0.70	0.54
3	1	3	3	3	0.39	0.68	0.75
4	2	1	2	3	0.30	0.54	0.44
5	2	2	3	1	0.33	0.59	0.56
6	2	3	1	2	0.40	0.72	0.71
7	3	1	3	2	0.31	0.55	0.53
8	3	2	1	3	0.29	0.53	0.49
9	3	3	2	1	0.37	0.65	0.65

表 4 方差分析结果(橙皮苷)

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.007	2	0.004	2.333	$P>0.05$
B	0.013	2	0.007	4.333	$P>0.05$
C	0.003	2	0.002	1.000	$P>0.05$
误差 D	0.003	2			

表 5 方差分析结果(芍药苷)

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.020	2	0.010	1.538	$P>0.05$
B	0.017	2	0.009	1.308	$P>0.05$
C	0.003	2	0.002	0.231	$P>0.05$
误差 D	0.013	2			

表 6 方差分析结果(甘草酸)

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	0.003	2	0.002	3.000	$P>0.05$
B	0.067	2	0.034	67.000	$P<0.05$
C	0.010	2	0.005	10.000	$P>0.05$
误差 D	0.001	2			

注:表 4~ 6, $F_{0.05(2,2)} = 19$

结果与分析对橙皮苷、芍药苷影响树脂吸附效果的 3 个因素无显著性差异,对甘草酸影响树脂吸附效果的因素中吸附流速有显著性差异,根据实验结果同时结合实际生产经验选取上样药液浓度为 0.5(生药)g·mL⁻¹,树脂柱的径高比为 1:7,吸附流速为 2(BV/h)较理想。

5 洗脱杂质用水量

按处方比例称取生药饮片共 480 g,加去离子水 6 倍量分别提取 3 次,每次 1 h,浓缩至室温下测定相对密度为 1.02,室温下静置 24 h 后,取上清液 0.5(生药)g·mL⁻¹ 35 mL 加入已处理好的 44 mL AB-8 型大孔吸附树脂中,流出液 Mg-HCl 反应为深黄色,此时树脂的吸附能力处于饱和状态。以去离子水洗脱,每 44 mL 为一份,收集洗脱液,水浴蒸干后备用,结果见表 7。^[3]

表 7 洗脱树脂用水量的测定结果

收集份数	1	2	3	4	5	6	7	8
茛三酮反应	+++	++	++	+	+	+	±	-

注:“-”、“±”、“+”、“++”、“+++”分别表示理化鉴别的颜色从“无”到由浅至深

结果表明,4 倍吸附柱体积的水可将杂质基本除去。

6 讨论

大孔吸附树脂近年来开始应用于中草药化学成分的提取分离,我们对加味四逆颗粒组成药物主要有效成分的性质进行了分析,因其主成分的性质相近,我们采用大孔树脂对该复方的水提取液有效成分进行精制,对泄漏曲线、上样药液浓度、树脂柱的径高比、吸附流速、洗脱杂质用水量进行了工艺考察,结果选用 AB-8 型大孔树脂,每克树脂的最大吸附量分别为芍药苷 47.1 mg、橙皮苷 11.5 mg、甘草酸 57.7 mg,上样药液浓度为 0.5(生药)g·mL⁻¹,树脂柱的径高比为 1:7,吸附流速为 2(BV/h),洗脱杂质用水量 4 倍吸附柱体积为最佳精制条件,因为影响大孔吸附树脂分离的因素较多,为了达到较好的精制效果,我们还对其精制条件进行了解吸溶媒、洗脱终点、洗脱速度等参数的考察,研究结果将另文报告。

[参考文献]

[1] 王丽娜,王 巍,李云涛. 加味四逆颗粒大孔树脂精制工艺的研究 I [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15 (5): 63.

[2] 马振山,全 燕,王 琳,等. 复方柴胡汤提取分离的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, (4): 1.

[3] 唐第光. 大孔吸附树脂法提取三七总皂苷工艺探讨 [J]. 中成药, 1990, 12(8): 526.