

表 6 L₉(3⁴) 正交设计及结果

Table 6 L₉(3⁴) orthogonal design and results

试验号	A	B	C	D(空白)	丸重合格率/%
1	1	1	1	1	78.3
2	1	2	2	2	85.9
3	1	3	3	3	82.1
4	2	1	2	3	95.7
5	2	2	3	1	97.2
6	2	3	1	2	94.6
7	3	1	3	2	93.2
8	3	2	1	3	95.7
9	3	3	2	1	87.5
K ₁	246.3	267.2	268.6	263	
K ₂	287.5	278.8	269.1	273.7	
K ₃	276.4	264.2	272.5	273.5	
R	13.73	4.87	1.30	3.57	

等^[1~5]。本实验从影响滴丸的圆整度和丸重两方面考察了各因素的影响,确立制备舒胸滴丸的最佳条件。

表 7 丸重合格率方差分析

Table 7 Variance analysis of qualified rate of pill weight

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值
A	302.962	2	151.481	12.13
B	39.636	2	19.818	1.587
C	3.002	2	1.501	0.120
D(误差)	24.967	2	12.488	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

3.2 实验中发现,药物与基质混匀时,药物细粉应在 120 目以上,且应先与约 10% ~ 20% 的水混匀后再与基质熔融,可保证成品颜色均匀、光滑、与药物

基质易于混匀。

3.3 冷却剂种类选择时,着重考虑冷却剂的相对密度与黏度,以使滴丸缓缓下降。制备舒胸滴丸时甲基硅油优于液体石蜡,梯度冷却优于非梯度冷却。

3.4 实验中曾使用聚乙二醇 6000,但由于与药物融合性差,稠度大,滴制困难,滴制时需要提高滴制温度,因此选择了聚乙二醇 4000。

3.5 评价指标采用了以每粒滴丸最短径/最长径>0.8(反映滴丸的圆整度)和丸重差异(±7.5%),避免了人为评价等主观因素。

3.6 舒胸片为糖衣片,每片含原药材量为 0.4 g,改制成滴丸后,每粒滴丸相当于每片含药量。在提高了生物利用度的同时,减少了工艺流程,携带与服用的方便性也大大增强。

References:

[1] Luo X J, Guan S J. Experimental study on preparation method for Xianglian Dropping Pill [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1992, 14(9): 4-6.
[2] Mi H, Dong F Y. Study on optimum preparation procedure for Guanxin Danshen Dropping Pill [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(3): 190-192.
[3] Fan B T. *Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine* (中药药剂学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1997.
[4] Lin Y P, Qiu D W. Optimization of preparation technology for Migao Xinle Dropping Pill by uniform design [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(4): 219-220.
[5] Guo J P, Zhao T Y. *In vitro* dissolution test of Flavonoid Pilulae from Gegen [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(6): 298-299.

大孔吸附树脂纯化麦冬总皂苷的工艺研究

周跃华¹, 吴笑如², 徐德生², 冯 怡², 李 瑾瑾^{2*}

(1. 国家食品药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100038; 2. 上海中医药大学, 上海 200032)

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 是一味常用滋阴中药, 始载于《神农本草经》, 历代重要本草都有记载。麦冬具有养阴生津、润肺清心的功能, 可用于热病伤津、心烦口渴等症。现代研究发现: 麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮、多糖、氨基酸等成分。其中麦冬皂苷类成分具有一定的抗心肌缺血、抗心律

失常等作用, 在中医临床上用于治疗冠心病、心绞痛并取得了一定疗效^[1]。本实验采用大孔吸附树脂法对麦冬中麦冬总皂苷进行纯化, 并对其纯化条件进行了考察, 以期对麦冬的进一步开发和利用提供参考。

1 材料与仪器

浙麦冬购自上海药材公司徐汇区中药饮片厂, 经上海中医药大学药教研室鉴定为百合科沿阶草

* 收稿日期: 2003-03-15
作者简介: 周跃华(1963—), 男, 中药药剂学硕士, 国家食品药品监督管理局药品审评中心工作人员, 主要从事中药新药药学资料的评价。Tel: (010) 68585566-444 E-mail: yuehuazl234@sina.com

属植物麦冬 *O. japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. 的干燥块根。

安捷伦 1100 高效液相色谱仪, PL—ELSD 蒸发光散射检测器(英国 PL 公司), SGK—2LB (5LB) 低噪音空气泵(北京市精华苑技术研究所), RE52AA 旋转蒸发器(上海生化仪器厂)。

麦冬皂苷 D 对照品由日本昭和大学药学院生药及天然药化研究室伊田喜光教授提供, 纯度为 98%。高效液相用乙腈、甲醇为色谱纯, 其他均为分析纯。D-101、AB-8 大孔树脂(天津农药股份有限公司树脂分公司), HPD-100 大孔树吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司), NK-9 大孔树脂(天津南开大学化工厂)。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备: 取麦冬药材以 80% 乙醇提取, 回收乙醇至无醇味。离心, 取上清液, 用乙醚萃取 2 次, 再以水饱和正丁醇萃取 4 次, 正丁醇萃取液用 0.1 mol/L NaOH 反萃 2 次, 正丁醇液回收至干, 用甲醇溶解并加至刻度, 即得。

2.2 麦冬皂苷 D 的含量测定: 采用 HPLC-ELSD 法^[2]。色谱条件为色谱柱: Platnum C₁₈ 100A, (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) (Alltech 公司); 流动相: 乙腈-水(42 : 58); 预柱: phenomenex part No. KJO-282(迪马公司); 柱温: 室温; 雾化温度: 65 ; 蒸发温度: 80 ; 气体流速: 1.5 SLM。精密称取麦冬皂苷 D 对照品, 以甲醇溶解配成 1.00, 0.80, 0.60, 0.40, 0.20 mg/mL 的对照品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积的对数与对照品进样量的对数进行线性回归, 得回归方程: $\ln M = 0.58741 \ln A - 4.1494$, $r = 0.9993$, 线性范围为 2.00 ~ 20.00 μg。

2.3 麦冬总皂苷的含量测定: 采用紫外分光光度法^[3]。取麦冬皂苷 D、葡萄糖及麦冬总皂苷的甲醇液适量, 置具塞刻度试管中, 挥去甲醇, 加入 10 mL 高氯酸, 混匀, 65 加热 10 min, 冰水终止反应, 于紫外分光光度计上扫描, 麦冬皂苷 D 在 395 nm 处有最大吸收峰, 麦冬总皂苷在 397 nm 左右有最大吸收峰, 二者相近, 葡萄糖在附近无干扰, 故选 395 nm 为麦冬皂苷的测定波长。线性方程为 $Y = 0.80645X + 0.001731$, $r = 0.9993$ 。线性范围: 0.129 0 ~ 0.774 2 mg。

2.4 大孔树脂的前处理: 取 D-101 及 HPD-100 大孔树脂分别装于索氏提取器中, 以 95% 乙醇提取以除去树脂中有机残留物, 每天 10 h, 提取 7 次, 至醇

洗脱液加数倍水后不显浑浊, 且醇提取液在 200 ~ 400 nm 处吸光度小于 0.05 为止。树脂再用水洗去乙醇, 装柱即可。AB-8 及 NKA-9 树脂均按说明书要求进行前处理。

2.5 上柱前药液的前处理: 由于药液中若有悬浮的微粒存在, 有可能堵塞大孔树脂表面的微孔, 影响吸附, 故上柱前的药液需经过澄清处理。取麦冬醇提液, 回收乙醇, 离心取上清液, 制备供试品溶液; 沉淀加水混悬, 同法处理, 均定容至相同浓度(含生药量相等)。将 HPLC-ELSD 图谱中麦冬皂苷 D 峰面积按回归方程计算, 以此为指标分别比较供试品中麦冬皂苷 D 的量。药液离心前后皂苷含量变化, 上清液中约保留了 77.11% 的麦冬皂苷 D, 沉淀中的残留量约 21.22%。加强对沉淀的洗涤会减少皂苷的损失。

2.6 大孔吸附树脂型号的选择: 分别取等量不同型号的大孔树脂, 加无水乙醇充分溶胀, 用蒸馏水洗净, 置三角瓶中, 加麦冬供试品溶液等量, 20 恒温振摇 24 h, 分别取吸附前后的药液, 测定麦冬总皂苷含量, 计算, 即可得不同型号树脂对麦冬总皂苷的比吸附量^[4]。吸附后的树脂用水洗至 Molish 反应呈现阴性, 再加入 95% 乙醇 30 mL, 20 恒温振摇 24 h, 取解吸前后药液, 测定醇洗脱液中麦冬总皂苷的量, 计算不同型号树脂的洗脱率, 结果见表 1。可见, 以 D-101 和 HPD-100 型大孔吸附树脂为优, 最后选用近年使用较多的 D-101 型大孔吸附树脂。

表 1 几种型号大孔吸附树脂对麦冬皂苷的吸附及洗脱的影响 ($n = 3$)

Table 1 Effect of several type of resins on adsorption and elution of saponins in root of *O. japonicus* ($n = 3$)

树脂 型号	吸附前药液总 皂苷量/mg	吸附后残余总 皂苷量/mg	比吸附量 $/(mg \cdot g^{-1})$	洗脱液中总 皂苷量/mg	洗脱 率/%
D-101	38.86	3.00	71.72	25.16	70.2
AB-8	44.06	6.58	72.40	23.04	61.5
HPD-100	41.40	6.72	69.36	24.20	69.8
NK-9	40.82	13.94	53.75	15.90	59.2

2.7 大孔吸附树脂洗脱溶剂的选择: 分别取 D-101 树脂 3 等份, 用无水乙醇充分溶胀, 用蒸馏水洗净, 装柱, 供试品溶液 3 等份分别上样(经计算上样液中所含总皂苷量小于树脂吸附量), 用蒸馏水洗至 Molish 反应呈现阴性, 分别用 30%, 50%, 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 每 5 mL 一份, 按顺序编号, 从每份中吸取 0.5 mL, 水浴蒸干, 加高氯酸显色, 测总皂苷量, 绘制洗脱曲线, 见图 1。可见洗脱效果为: 70% 乙醇 > 50% 乙醇 > 30% 乙醇。

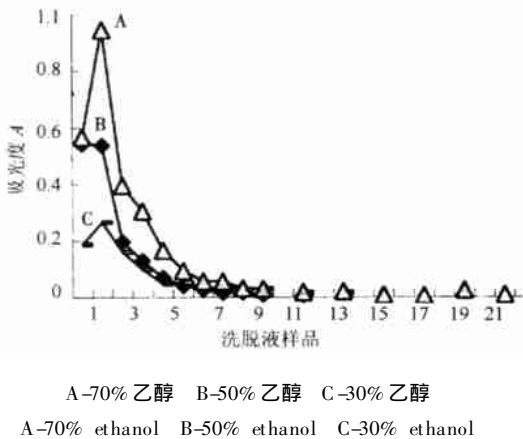


图 1 不同浓度乙醇的洗脱曲线

同上操作, 制备 30%, 50%, 70% 乙醇洗脱液样品, 另取上柱前的样品, 用正丁醇萃取 4 次, 正丁醇层用 0.1 mol/L NaOH 反萃 2 次, 合并正丁醇层, 浓缩至干, 甲醇溶解并定容, 作为上柱前总皂苷含量测定的样品。取样测定其中总皂苷的含量, 结果见表 2。

表 2 不同洗脱剂的洗脱效果 (n= 3)
Table 2 Effect of different concentration of alcohol on eluting total saponins (n= 3)

样品名称	洗脱液含 固体量/ g	总固体 得率/ %	总皂苷 量/ mg	总皂苷 纯度/ %	总皂苷 收率/ %
上柱前药液	0.333 4	100.00	15.134	4.5	100.00
30% 乙醇洗脱液	0.012 0	3.60	6.052	53.6	39.99
50% 乙醇洗脱液	0.018 2	5.46	10.212	56.1	67.48
70% 乙醇洗脱液	0.020 5	6.15	11.136	54.3	73.58

洗脱液含固体量及总皂苷量相当于 10 g 生药中相应指标的含量。
solid substance in eluting solution and total saponins are equal to those of 10 g crude drug

2.8 验证试验: 取 D-101 大孔树脂, 加乙醇充分溶胀, 用水洗净, 装柱(柱的径高比为 1:9)。取麦冬提取液, 以每小时 2 倍柱体积的速度上柱, 流出液中皂苷反应呈阴性, 0.1% NaOH 洗至流出液无色, 再用水洗至中性, Mollish 反应呈现阴性后, 以 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 至 Liberman 反应呈阴性, 同时 208 nm 基本无吸收。洗脱用 70% 乙醇的量约为 15 倍柱体积。洗脱液减压浓缩, 定容至含生药 2 g/mL, 即得麦冬粗总皂苷提取物供试溶液。分别测定上柱前后麦冬样品中的总皂苷含量, 结果见表 3。可见经大孔树脂纯化后, 总皂苷纯度由 4.54% 上升为 50% 以上, 基本达到了纯化效果。

3 讨论

近年来, 大孔树脂已广泛用于中药有效成分的

表 3 大孔树脂纯化对麦冬提取物纯度的影响
Table 3 Effect of purification with resin on purity of extract in *O. japonicus*

溶液	总固体 物量/ g	总固体物 得率/ %	总皂苷 量/ mg	总皂苷 纯度/ %	总皂苷 收率/ %
上柱前	0.333 4	100.00	15.13	4.54	100.0
纯化后 1	0.019 9	4.38	10.84	54.5	71.65
纯化后 2	0.020 8	4.56	11.22	53.9	74.16

分离, 成为水溶性成分分离纯化的常用手段^[5,6]。大孔树脂与以往的离子交换树脂不同, 它本身具有因范德华力或氢键而产生的吸附性能, 此外, 因其本身的多孔性结构还使其具有类似分子筛的性能。故不同成分可因其与树脂吸附力的不同及成分相对分子质量的差异, 通过大孔树脂处理得到分离。

影响大孔树脂纯化效果的因素很多, 如上柱前样品液的理化性质(如温度、酸碱度、无机离子含量、黏度及相对密度等)、吸附的温度、上柱及洗脱时的流速、洗脱剂的种类及用量、树脂柱的径高比等。因种种原因, 未对树脂纯化的部分影响因素进行考察, 也未对树脂前处理后洗脱液中所含苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯、烷烃等进行检查。部分工作有待今后进一步研究。

本实验比较了麦冬总皂苷纯化用大孔树脂的型号及不同浓度乙醇作为洗脱剂对纯化的影响, 结果表明, 麦冬总皂苷用 D-101 树脂吸附, 70% 乙醇洗脱, 取得了较好的效果。该实验结果为麦冬总皂苷在生产中的精制纯化提供了有益的参考。

致谢: 日本昭和大学药学院生药及天然药化学研究室伊田喜光教授为本试验提供了麦冬皂苷 D 对照品。

References:

[1] Li L Q, Zhang L J. The pharmacological study of *Ophiopogon japonicus* [J]. *J Hebei Tradit Chin Med*, (河北中医药学报), 2000, 15(2): 34-35.
[2] Wu T, Yu B Y, Cheng Z H, et al. Determination of main saponins in *Ophiopogon japonicus* by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(3): 175-177.
[3] Tan X Q, Cheng Z H, Yu B Y. The study on quality control of *Ophiopogon japonicus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(7): 390-393.
[4] Ceng X M. The influence of inorganic salts to the adsorption of macroporous resin to total saponins in ginseng [J]. *Chin J Pharm.* (中国医药工业杂志), 1992, 23(8): 339-341.
[5] Ji A M, Li M, Zhou H Q. The extract of flavone on *Ginkgo* and the inject making [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 23(2): 102-103.
[6] Cai X, Liu Z Q, Wang P X, et al. The purification technics of total saponins in ginseng by macroporous resin [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(9): 631-633.