

片的重要指标,收率越高越容易压片,选定为制粒工艺筛选的主要指标。同时崩解时限也是考察片剂的重要参数,崩解时限越小越好,作为辅助参考指标。

表4 正交试验设计与结果

Table 4 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	D	颗粒收率 /%	崩解时限 /min
1	1	1	1	1	50.1	43
2	1	2	2	2	84.5	41
3	1	3	3	3	62.9	38
4	2	1	2	3	48.9	45
5	2	2	3	1	73.4	39
6	2	3	1	2	63.7	38
7	3	1	3	2	34.6	42
8	3	2	1	3	69.9	43
9	1	2	2	2	84.5	41
10	3	3	2	1	64.2	39
颗粒收率 K_1	65.8	44.5	61.2	62.6		
K_2	62.0	75.9	65.9	60.9		
K_3	56.2	63.6	57.0	60.6		
R	5.8	31.4	8.9	2.0		

可见影响香云肝泰颗粒高速湿法制粒的因素主次顺序为 $B > C > A > D$, 即主药占处方量对香云肝泰颗粒高速湿法制粒有显著影响,乙醇用量对崩解时限影响最小。因此最佳制粒条件为 $A_1B_2C_2D_1$, 即主药占处方量 60%, 70% 乙醇用量为 25 mL/100 g, 搅拌 2 min。

2.3 验证试验:称取香菇多糖 1 800 g、云芝多糖 1 200 g、淀粉 2 000 g 混合均匀,加 70% 乙醇 1 250 mL,搅拌 2 min。16 目筛网制粒,置热风循环干燥箱内,75 ℃ 条件下干燥,16 目筛网整粒,压片包衣,测得薄膜片的崩解时限为 41 min。

3 讨论

影响高速湿法制粒的因素除搅拌时间、主药占处方量的比例、乙醇体积分数和乙醇用量外,还有药粉的细度、环境空气湿度等^[4],具体影响情况还有待以后的工艺研究中进一步探讨。

本实验以颗粒收率为主要评价指标,包衣片崩解时限为辅助参考指标。正交试验的结果分析以颗粒收率为单一指标,而崩解时限在保证合格的前提下不影响对整个试验的科学分析。

References

- [1] Yang Y. Study on disintegration and hardness of TCM tablets [J]. *Prim J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 1995, 9(4): 20.
- [2] Wang D L. Discussion on disintegration of TCM tablets [J]. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 1984(8): 4.
- [3] Liu H Q. Preliminary study on disintegration of tablets made of TCM extracts [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1989, 14(3): 29.
- [4] Tu J H. Study on the application of high speed mixing and granulating machine in sugarless TCM granules [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(3): 230.

大孔吸附树脂分离纯化珍珠菜总黄酮的研究

游本刚,唐丽华*,徐向毅,周晓霞

(苏州大学药学院,江苏 苏州,215007)

珍珠菜系报春花科植物虎尾珍珠菜 *Lysimachia clethroides* Duby 的根或全草,味苦、辛,性平,具有清热利湿、活血散瘀、解毒消痈之功效。国外学者从 20 世纪 70 年代开始相继从中分离得到槲皮素苷、山柰酚等黄酮类化合物^[1,2],国内学者近年来对其化学成分也有所研究^[3,4]。本实验室对珍珠菜提取物进行药理学研究发现,珍珠菜全草总黄酮具有良好的抗肿瘤作用^[5]。因此本实验采用大孔吸附树脂对珍珠菜总黄酮的分离纯化工艺进行了研究。

1 仪器与试剂

UV-2401PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),电子分析天平(Starororous),DZ-900 回转振荡器(太仓市实验设备厂)。

D4020、NKA-9、AB-8 树脂(南开大学化工厂),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所),试剂均为分析纯,珍珠菜药材由苏州雷允上药材采购站提供,经本院生药教研室刘春宇副教授鉴定为虎尾珍珠菜 *L. clethroides* Duby 的全草。

2 方法与结果

2.1 上样液的制备:取经粉碎的珍珠菜药材适量,

收稿日期:2006-11-18

基金项目:苏州大学医学发展基金(EE132609),苏州大学青年教师研究基金(Q3132532)

作者简介:游本刚(1977-),男,江苏人,讲师,硕士。

*通讯作者 唐丽华 Tel:(0512)65880029 E-mail: tanglihua@suda.edu.cn

依次加入 12、10、8 倍量的 80% 乙醇, 加热回流提取, 每次 1.5 h, 合并提取液, 滤过。滤液减压回收溶剂, 并浓缩至含生药 0.5 g/mL。浓缩液加 2 倍量水稀释, 静置, 抽滤除去不溶性物质, 滤液再次浓缩, 即得珍珠菜上样液, 冷藏保存备用。

2.2 珍珠菜总黄酮的 UV 法测定: 珍珠菜中含有多种黄酮和黄酮苷类化合物, 且曾分离得到芦丁等黄酮类成分^[3], 所以本实验利用黄酮类化合物的 3, 5 羟基与 Al^{3+} 生成络合物, 在可见区有最大吸收的特点, 以芦丁作为对照品, 采用紫外分光光度法测定珍珠菜总黄酮。

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取芦丁对照品 20.07 mg 于 100 mL 量瓶中, 以 95% 乙醇溶解并加至刻度, 摇匀即得 (质量浓度为 200.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.2.2 最大吸收波长的确定: 分别取芦丁对照品溶液和上样液适量, 置 25 mL 量瓶中, 分别加入 1 mL 10% AlCl_3 溶液, 加 95% 乙醇至刻度, 摇匀, 在 200~600 nm 波长进行扫描。结果芦丁对照品溶液和上样液与 Al^{3+} 络合后均在 405 nm 有最大吸收, 所以本实验选择 405 nm 作为测定波长。

2.2.3 标准曲线的制备: 精密量取芦丁对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 分别加入 1 mL 10% AlCl_3 溶液, 加 95% 乙醇至刻度, 摇匀, 于紫外分光光度计下测定其吸光度。以吸光度对质量浓度作最小二乘法回归, 得标准曲线方程为 $C = 38.672 A + 0.075$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), 线性范围为 4.014~32.112 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2.4 测定: 取一定量待测供试品溶液于 25 mL 量瓶中, 加入 1 mL 10% AlCl_3 , 加 95% 乙醇至刻度, 在 405 nm 处测定其吸光度值, 代入标准曲线方程计算总黄酮的质量浓度。

2.3 静态吸附-洗脱试验

2.3.1 静态吸附曲线的制备: 精密称取经处理的湿树脂 4.0 g, 于 100 mL 具塞磨口三角烧瓶中, 分别加入经稀释的上样液 50 mL, 摇匀, 置电子振荡器上振摇 (110 r/min, 20 $^{\circ}\text{C}$), 每隔 30 min 取样测定总黄酮的质量浓度, 计算该时间点供试品溶液中总黄酮的质量浓度 (C) 与初始上样液中总黄酮的质量浓度 (C_0) 的比值, 并绘制 $C/C_0 \sim t$ 吸附曲线, 结果见图 1。可见, 在 90 min 时, 3 种树脂均已基本达到吸附平衡, 以 AB-8 树脂对总黄酮质量浓度下降最大, NKA-9 树脂的下降最小, 说明 AB-8 树脂对珍珠菜总黄酮吸附最好, NKA-9 树脂最差。

2.3.2 静态饱和吸附量的测定: 上样液振摇 24 h,

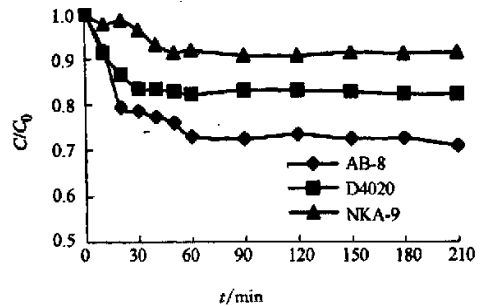


图1 树脂对珍珠菜总黄酮的静态吸附曲线 ($n=3$)

Fig.1 Static adsorption curves of *L. clethroides* on total flavones by macroreticular resins ($n=3$)

使总黄酮达到饱和吸附, 吸取上层供试品溶液适量, 测定, 计算总黄酮的质量浓度, 按饱和吸附量 = (上样液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 体积 - 吸附后溶液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 体积 - 取出的总黄酮量) / 湿树脂质量, 计算树脂静态饱和吸附量, 结果见表 1。3 种树脂的静态饱和吸附量依次为 AB-8 > D4020 > NKA-9, 以 AB-8 树脂对珍珠菜总黄酮吸附性能最好。

表 1 树脂静态饱和吸附量的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Static adsorption capacity in saturation by macroreticular resins ($n=3$)

树脂种类	上样液中总黄酮 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	吸附后溶液中总黄酮 /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	饱和吸附量 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
NKA-9	9.98	8.98	12.56
D4020	9.98	8.17	22.71
AB-8	9.98	7.04	36.73

2.3.3 静态洗脱曲线的制备: 将上述吸附饱和的树脂抽滤, 用少量水冲洗后, 再置于三角烧瓶中, 分别加入 50 mL 95% 乙醇, 再次置于电子振荡器上振摇 (110 r/min, 20 $^{\circ}\text{C}$), 每隔 30 min 取样测定, 计算溶液中总黄酮浓度, 按静态洗脱率 = (洗脱液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 取样前洗脱液体积 + 之前取出的总黄酮量) / 饱和吸附量 $\times 100\%$ 计算洗脱率, 绘制洗脱曲线, 结果见图 2。可见, 采用 95% 乙醇洗脱时, 3 种树脂均在 30 min 时基本达到洗脱平衡, 洗脱率依次为 D4020 > AB-8 > NKA-9。

2.3.4 静态洗脱率的测定: 上述溶液继续振摇 24 h, 再吸取上层溶液, 测定总黄酮的质量浓度, 计算洗脱率, 结果见表 2。可见, 在 3 种树脂中, 95% 乙醇对珍珠菜总黄酮的平衡洗脱率与洗脱曲线呈现的结果一致。结合洗脱量来评价, AB-8 树脂远远高于其他两种树脂, 洗脱效果最好。

2.4 动态吸附-洗脱试验

2.4.1 动态吸附曲线的制备: 精密称取 3 种湿树脂各 20 g, 湿法装柱, 加入经稀释的上样液 200 mL, 调

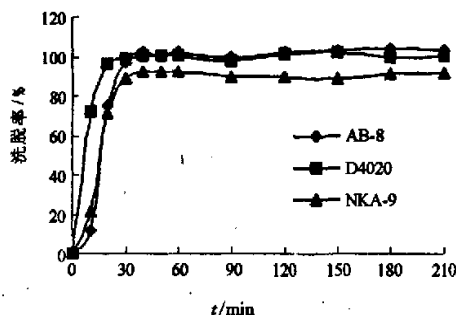


图 2 树脂对珍珠菜总黄酮的静态洗脱曲线 ($n=3$)

Fig. 2 Static elution curves of *L. clethroides* on total flavones by macroreticular resins ($n=3$)

表 2 3 种树脂的静态洗脱结果 ($n=3$)

Table 2 Static elution ratio by three types of macroreticular resins ($n=3$)

树脂种类	吸附量/mg	洗脱量/mg	洗脱率/%
NKA-9	50.24	37.18	74.15
D4020	90.85	87.90	96.75
AB-8	146.92	142.58	97.31

节体积流量为 1.0 mL/min, 待上样液流至下液面时, 开始计时并收集流出液, 每 10 min 收集一管, 采用紫外分光光度法测定每管中的总黄酮质量浓度, 以流出液中总黄酮质量浓度 (C) 与初始样品液中总黄酮质量浓度 (C_0) 的比值对收集中点时间作图, 绘制 $C/C_0 \sim t$ 吸附曲线, 结果见图 3。可见, C/C_0 越大, 吸附效果越差, 3 种树脂吸附总黄酮达到饱和的时间相差较大。NKA-9 在 80 min 时即接近吸附饱和, D4020 在 80 min 时接近吸附饱和, 而 AB-8 在 150 min 时才达到饱和吸附, 且 AB-8 树脂达到吸附饱和的速度最小。说明 AB-8 树脂吸附总黄酮达到饱和和所需的时间最长, 吸附量也最大, 从而可以提示 AB-8 树脂对珍珠菜总黄酮的吸附性能较其他两种树脂为好。

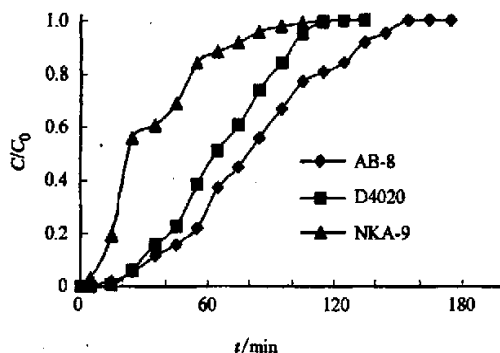


图 3 树脂对珍珠菜总黄酮的动态吸附曲线 ($n=3$)

Fig. 3 Dynamic adsorption curves of *L. clethroides* on total flavones by macroreticular resins ($n=3$)

2.4.2 动态饱和吸附量的测定: 上样完毕后, 用少量水冲洗, 使树脂床中的上样液完全流出, 合并流出液, 测定流出液体积和其中总黄酮的质量浓度。再用水冲洗树脂, 直至流出的水洗液接近无色, 收集水洗液, 测定体积和总黄酮的质量浓度。按照动态饱和吸附量 = (上样液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 上样体积 - 流出液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 体积 - 水洗液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 体积) / 所取出的总黄酮量 / 湿树脂质量计算树脂动态饱和吸附量, 结果见表 3。可见, 3 种树脂对珍珠菜总黄酮的动态饱和吸附量以 AB-8 树脂最大, D4020 树脂其次, NKA-9 树脂最差, 这也与穿透曲线呈现的结果一致, 说明 AB-8 树脂对珍珠菜总黄酮的吸附性能最好。

表 3 树脂动态饱和吸附量的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Dynamic adsorption capacity in saturation by macroreticular resins ($n=3$)

树脂种类	样品液浓度/ (mg $\cdot$ mL $^{-1}$)	流出、水洗液和取出 的总黄酮量/mg	饱和吸附量/ (mg $\cdot$ g $^{-1}$)
NKA-9	10.49	1 455.19	5.92
D4020	10.49	981.39	29.61
AB-8	10.49	765.86	40.38

2.4.3 动态洗脱试验: 将上述动态饱和吸附后的树脂加 95% 的乙醇进行洗脱, 至乙醇开始流出时进行收集, 至洗脱液中不含总黄酮时停止收集, 记录洗脱液体积和总黄酮的质量浓度。按照动态洗脱率 = 洗脱液中总黄酮的质量浓度 $\times$ 洗脱液体积 / 饱和吸附量 $\times 100\%$ 计算动态洗脱率, 结果见表 4。可见, 在 3 种树脂中, 95% 乙醇对珍珠菜总黄酮的动态洗脱量与洗脱率均以 AB-8 树脂最大, 洗脱效果最好。

表 4 树脂动态洗脱的测定结果 ($n=3$)

Table 4 Dynamic elution ratio by three types of macroreticular resins ($n=3$)

树脂种类	吸附量/mg	洗脱量/mg	洗脱率/%
NKA-9	118.31	85.15	71.97
D4020	592.11	379.02	64.01
AB-8	807.64	807.64	98.98

3 讨论

3.1 总黄酮分析方法的选择: 黄酮类化合物多具有 3, 4, 5 羟基, 可与许多金属试剂反应生成有色络合物, 根据此特点可以利用 UV 来测定总黄酮的量。珍珠菜中黄酮类化合物大多含有 3, 5 羟基, 可以与 Al^{3+} 生成络合物。芦丁对照品和珍珠菜提取液在 370 nm 左右均有最大吸收, 络合后在 400 nm 左右均有最大吸收, 为避免非黄酮类成分在 370 nm 波长下对总黄酮吸收产生干扰, 本实验选择采用络合显色法测定珍珠菜提取液中总黄酮的量。

3.2 影响树脂吸附性能的因素:本实验所采用的树脂有非极性(D4020)、极性(NKA-9)和弱极性(AB-8)3种类型,由实验结果可见,弱极性树脂AB-8的吸附量较大,这是由于珍珠菜总黄酮具有多酚结构,具有一定极性和亲水性,生成氢键的能力较强,有利于弱极性和极性树脂的吸附。另外,大孔树脂吸附原理主要为物理吸附,所以具有较高的比表面对吸附也有利,比表面增加,表面张力随之增大,吸附量提高。弱极性树脂AB-8的比表面明显大于NKA-9,所以其对黄酮吸附量也显著大于极性树脂NKA-9。

References:

- [1] Kim I S, Kim H J, Park H. Studies on the chemical constituents of *Lysimachia clethroides* [J]. *Yakhak Hoechi*, 1993, 37(4): 325-328.
- [2] Yasukawak K, Takido M. Studies on the chemical constituents of genus *Lysimachia* L. On the whole parts of *Lysimachia japonica* Thunb. and *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1986, 106(10): 939-941.
- [3] Zou H Y, Tu P F. Study on flavonoids from *Lysimachia clethroides* [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(1): 59-61.
- [4] Ren F Z, Qie J K, Qu H H, et al. Study on the chemical constituents of *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Pharm J PLA* (解放军药学报), 2002, 24(2): 178-180.
- [5] Xu X Y, Tang L H, Liang H Q. Study on anti-tumor effect of the extraction of *Lysimachia clethroides* Duby [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2003, 22(2): 31.

北豆根中蝙蝠葛酚性碱提取工艺的正交试验优选

刘长丽¹, 杨绍云², 曾繁典^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院 药理学系, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北省医药工业研究院, 湖北 武汉 430061)

蝙蝠葛酚性碱(phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*, PAMD)是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 干燥根茎中提取得到的双苄基异喹啉类酚性生物碱,其主要成分为蝙蝠葛碱(dauroicine)^[1]。蝙蝠葛碱具有舒张冠脉,增加冠脉血流、抗心肌缺血、抗血小板聚集和抗动脉粥样硬化作用^[2~5]。PAMD中的生物碱均为双苄基异喹啉类生物碱,具有相同的分子骨架,相似的化学结构,宜作为有效部位进行研究和开发。PAMD有明显的抗实验性心律失常和抗心肌缺血的作用^[6]。此类生物碱兼有脂溶性和酸碱两性,据此特点设计PAMD提取工艺,通过酸水渗漉和乙醇回流提取得到PAMD。本实验采用正交试验设计以总生物碱的得量和蝙蝠葛碱的得量为考察指标对提取过程中酸水渗漉工艺和乙醇提取工艺的条件进行优选,以期优化提取工艺条件。

1 仪器与药品

RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SP2000 泵(美国光谱物理公司); UV1000 紫外检测器, HP 3394A 数据处理器; PHS-3C 数字式酸度计(上海理达仪器厂); 瑞士 AE200 型电子分析天平。

蝙蝠葛根茎(北豆根药材)由伊春药业有限公司质量检验中心提供并鉴定; 蝙蝠葛碱对照品为自制,

用归一化法测定其质量分数在99.0%以上; 高效液相色谱用试剂为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总生物碱的测定: 参照《中国药典》2005年版一部北豆根片项下中和法。取粗总生物碱约0.1g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加醋酸乙酯25mL, 振摇30min, 滤过, 用醋酸乙酯10mL分3次洗涤容器和滤渣, 洗液与滤液合并, 置水浴上蒸干, 加无水乙醇10mL使溶解, 精密加0.01mol/L硫酸滴定液25mL与甲基红指示液2滴。用0.02mol/L氢氧化钠滴定液滴定, 即得。每毫升0.01mol/L硫酸滴定液相当于6.248mg蝙蝠葛碱^[7]。

2.2 蝙蝠葛碱的HPLC法测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱 Inertsil ODS-3 C₁₈ 柱(150mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 乙腈-水-磷酸-三乙胺(15:85:0.2:0.2); 检测波长: 279nm; 体积流量: 1.5mL/min; 柱温: 室温。

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取蝙蝠葛碱对照品50.35mg, 置100mL量瓶中, 加流动相适量, 超声处理使其溶解, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 标准曲线的制备: 从蝙蝠葛碱对照品溶液中精密移取5、10、15、20、25mL置50mL量瓶中, 加

收稿日期: 2006-11-11

作者简介: 刘长丽(1976—), 女, 黑龙江伊春人, 2004年获得华中科技大学同济医学院药理学硕士学位, 现在上海美迪西生物医药有限公司从事GLP质量保证工作。 E-mail: lucyliu7651@sina.com.cn

* 通讯作者 曾繁典 Tel: (027)83630652 E-mail: fdzeng@163.com