

此为相转变温度,因此控制搅拌乳化温度在65~71得到的微乳相对稳定。

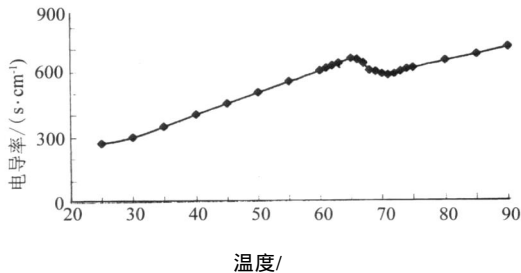


图5 微乳的电导率-温度曲线

Fig. 5 Conductivity-temperature curve of silybin microemulsion

2.5 稳定性考察

2.5.1 离心加速试验:根据《中国药典》2005年版一部附录IO 乳剂离心稳定性标准,以4 000 r/min离心15 min,无分层现象,无药物析出,提示该微乳均一稳定。

2.5.2 高温和光照试验:微乳充氮、密封,分别于40、60, 4 500 lx 条件下放置10 d,分别于0、5、10 d 考察微乳的外观、平均粒径、有效成分的质量浓度,见表5。可见该乳剂在室温下3个月内能维持均一稳定。60 的10 d 留样的外观变化尤为明显,有效成分的质量浓度下降量略高于其他条件,并且有少量乳滴凝聚情况发生,说明该微乳应低温或室温贮藏。但是从平均粒径变化来看,3种条件对粒径的影响都不大,说明即使发生凝聚只是局部发生,而微乳整体仍比较稳定。

3 讨论

计算稳定性参数K。时采用离心加速比较微乳的分层速度,以紫外分光光度法测定微乳离心前后

表5 高温和光照试验

Table 5 High temperature and illumination

条件	外观	平均粒径/	有效成分
		nm	相对量/%
3个月室温	均一,无沉淀	32	97.8
40	0 d 均一,无沉淀	31	98.3
	5 d 均一,无沉淀	31	98.1
	10 d 均一,无沉淀	32	97.5
60	0 d 均一,无沉淀	31	98.3
	5 d 有少量乳滴挂壁	33	97.2
	10 d 有少量乳滴挂壁	35	96.0
4 500 lx 光照	0 d 均一,无沉淀	31	98.3
	5 d 均一,无沉淀	31	97.7
	10 d 均一,无沉淀	33	97.0

的吸光度,相差越小,说明乳剂越稳定。该方法简便快捷,是评价乳剂稳定性的重要指标。

乳化剂和助乳化剂的种类及配比对微乳质量起着重要作用,本实验由简单方法入手,逐步提高筛选精度,先后通过测表面张力、绘制拟三元相图和正交设计进行处方筛选,在达到实验目的的前提下尽量减少工作量。

水飞蓟宾难溶于水和油,本实验将其制备为口服微乳。性质考察结果表明,该工艺得到的微乳外观、稳定性良好,符合要求,为进一步研究提供参考。

参考文献:

[1] 朱步瑶, 赵国玺. 液体表(界)面张力[J]. 化学通报, 1981, (6): 341.

[2] 王鸿辰. 水飞蓟素溶解性能的研究[J]. 药学通报, 1984, 19 (12): 23-25.

[3] Levy M Y, Schutze W, Fuhrer C, et al. Characterization of diazepam submicron emulsion interface: role of oleic acid[J]. J Microencap sul, 1994, 11(1): 79-92.

[4] 韩继洪, 苏德森. 抗癌药物FT-207 脂肪乳剂物理性质的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1991, 8(1): 14-17.

[5] 宋梅, 平其能, 吴正红. 水飞蓟宾纳米乳的制备及家兔体内药动学[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 427-431.

大孔吸附树脂纯化达原滴丸处方提取液的工艺研究

廖茂梁¹, 张铁军¹, 高文远², 薛艳^{1*}

(1. 天津药物研究院 中药现代研究部, 天津 300193; 2. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300193)

摘要: 目的 研究大孔吸附树脂对达原滴丸提取液的吸附性能, 考察精制工艺。方法 以达原滴丸中黄芩苷质量分数和收率为主要考察指标, 考察了大孔吸附树脂 NKA-12、HPD-600、HPD-500、HPD-300、HPD-100、D101、AB-8、NKA-9 对达原滴丸中黄芩苷的吸附和解吸特性以及纯化能力。结果 达原滴丸提取液上HPD-300 树脂, 上样液黄芩苷质量浓度为 2.65 mg/mL, 体积流量为 3 BV/h, 50% 乙醇解吸 5 BV 时, 水洗 4 BV, 解吸效果较好。结论 HPD-300 树脂可用作达原滴丸的精制。

* 收稿日期: 2007-04-23

基金项目: 天津市科技攻关培育项目(033101911)

作者简介: 廖茂梁(1981—), 男, 江西南康人, 主要从事中药研发。Tel: (022) 23003935 E-mail: liamaoliang@163.com

关键词: 达原滴丸; 黄芩苷; 大孔吸附树脂

中图分类号: R286.1; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0054-04

Purification of Dayuan Dropping Pills extract with macroporous resin

LIAO Mao-liang¹, ZHANG Tie-jun¹, GAO Wen-yuan², XUE Yan¹

(1. Department of Modern Chinese Materia Medica, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;

2. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective To study the adsorption function of macroporous resin for purifying the extract of Dayuan Dropping Pills and to investigate the purification process of Dayuan Dropping Pills by macroporous adsorption resin. **Methods** Taking the content and the extraction rate of baicalin as the main standard index, and the adsorption characters as well as the purification capacities of eight types of macroporous adsorption resins, such as NKA-12, HPD-600, HPD-500, HPD-300, HPD-100, D101, AB-8, and NKA-9, used to treat baicalin of Dayuan Dropping Pills were investigated preliminarily. **Results** The appropriate adsorption conditions were: the concentration of baicalin was 2.65 mg/mL, flow rate was 3 BV/h, the effect of desorption was satisfactory when 50% alcohol (5 BV) and water (4 BV) were used as eluant. **Conclusion** HPD-300 resin can be applied to refine the Dayuan Dropping Pills.

Key words: Dayuan Dropping Pills; baicalin; macroporous adsorption resin

达原滴丸处方源于明代吴又可《瘟疫论》中的达原饮,由厚朴、槟榔、草果、白芍、知母、黄芩、甘草组成,功在达膜原、辟秽浊,对病毒感染性发热、湿热发热以及一些不明原因的高热均有良好疗效^[1]。大孔吸附树脂法是纯化精制中草药水溶性成分的有效方法^[2,3],故本实验采用大孔吸附树脂对达原滴丸提取液进行精制,以黄芩苷的质量分数和收率为指标,对大孔树脂型号、上样质量浓度、流量、洗脱剂乙醇的体积分数及洗脱剂的用量等参数进行了考察,为达原滴丸处方药材提取液中的有效成分的精制及相应药剂的研制开发提供依据。

1 仪器和材料

戴安高效液相色谱仪,包括P680四元泵、自动进样器、UVD170U检测器、Chromeleon色谱工作站;HPD-100、HPD-300、HPD-500、HPD-600大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司);NKA-9、NKA-12、AB-8大孔吸附树脂(南开大学化工厂);D101大孔吸附树脂(天津农药股份有限公司);黄芩苷对照品由中国药品生物制品检定所提供,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。各药材均购于天津市中药饮片厂,由本院张铁军研究员鉴定。

2 方法和结果

2.1 黄芩苷的HPLC法测定

2.1.1 色谱条件: Tianhe C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以甲醇-水-磷酸(47:53:0.2)为流动相;检测波长为280 nm。理论板数按黄芩苷计算应不低于2500。

2.1.2 标准曲线的绘制:精密称取在60℃减压干

燥4h的黄芩苷对照品适量,加甲醇制成56 μg/mL黄芩苷对照品溶液。精密吸取上述溶液1、5、10、15、20、25 μL进样,测定峰面积。以黄芩苷峰面积值为纵坐标,进样质量为横坐标绘制标准曲线,进行线性回归,得线性方程 $Y = 176.38X - 9.1009$, $r = 0.9999$,线性范围为0.056 ~ 1.400 μg。

2.1.3 样品测定:吸取样品液适量,用50%甲醇适当稀释后,过0.45 μm滤膜,弃去初滤液,取续滤液进样,测定。

2.2 树脂类型的选择

2.2.1 树脂的预处理:取各型号树脂适量,用乙醇浸泡24 h,充分溶胀,用适当体积分数的乙醇洗至洗出液加适量蒸馏水无白色浑浊现象,再用蒸馏水洗至无醇味,备用。

2.2.2 上样液的制备:按达原饮处方比例称取槟榔300 g,厚朴、黄芩、知母、白芍各150 g,甘草、草果各75 g,加热提取3次,每次1h,每次加12倍量水,回流时间1h。合并提取液,减压浓缩,浓缩液加95%乙醇使乙醇体积分数达到70%,静置过夜,离心,上清液减压回收乙醇,水液加一定量蒸馏水稀释至以黄芩苷计3.5 mg/mL,即得,备用。

2.2.3 静态吸附量与解吸率的比较:称取各型号树脂4 g,置于250 mL锥形瓶中,加50 mL上样液,静置12 h,前6 h每隔0.5 h振摇1次,待吸附完成后分离出上清液。树脂再用20 mL水洗1次,合并入上清液,备用。各树脂再依次用30%、60%乙醇各50 mL浸泡洗脱6 h,收集洗脱液,测定吸附后药液和洗脱液中黄芩苷质量浓度,计算吸附量和洗脱率。结果

见表1。结果表明,HPD-100和HPD-300的吸附量与解吸率均好,所以选择了HPD-100和HPD-300采用动态吸附法作进一步考察。

$$Q = (C_0 - C_x) \times V \quad M = 50 \times C_{x2} \quad E = M/Q \times 100\%$$

Q为黄芩苷的吸附量, C₀为上样液中黄芩苷的质量浓度, C_x为吸附后药液中黄芩苷的质量浓度, V为溶液体积, C_{x2}解吸后药液中黄芩苷的质量浓度, M为黄芩苷的洗脱质量, E为洗脱率

表1 各种树脂的吸附与解吸性能

Table 1 Adsorption and desorption capacities of various resins

型号	吸附量/mg	30%乙醇 解吸率/%	60%乙醇 解吸率/%	总解吸率/%
NKA-12	133.61	60.92	32.81	93.74
HPD-600	78.26	63.29	29.84	93.13
HPD-500	95.89	59.01	31.66	90.67
HPD-300	158.61	43.31	44.57	87.88
HPD-100	154.13	45.41	38.70	84.11
D101	109.38	55.91	39.35	95.25
AB-8	139.04	54.63	34.11	88.74
NKA-9	45.41	76.69	18.84	95.53

2.2.4 动态法选择树脂: 取处理好的HPD-100和HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm), 调节流量为3 BV/h, 上提取液50 mL, 收集流出液, 备用; 分别用水, 30%、60%乙醇各50 mL洗脱, 收集洗脱液, 备用; 测定吸附后药液及各洗脱液中黄芩苷的质量浓度, 计算吸附量和解吸率, 结果见表2。比较HPD-100和HPD-300树脂的静态与动态吸附、解吸情况, HPD-300与HPD-100的吸附量和洗脱率差异不大, HPD-300稍好, 故选择HPD-300作为达原滴丸处方药物的纯化精制树脂。

表2 HPD-100和HPD-300树脂动态吸附性能

Table 2 Dynamic adsorption capacity of HPD-100 and HPD-300

型号	吸附量/mg	比吸附量/(mg · mL ⁻¹)	解吸率/%
HPD-100	122.76	9.72	97.67
HPD-300	128.13	10.79	98.80

2.3 HPD-300的吸附性能和影响因素考察^{4,51}

2.3.1 上样液质量浓度对吸附量的影响: 取含黄芩苷2、2.65、3.5、4、8 mg/mL的上样液100 mL, 加入处理好的HPD-300树脂中, 静态吸附, 其余操作同2.2.3项下方法, 计算吸附量, 结果见表3。结果表明, 含黄芩苷2.65 mg/mL时, 吸附量较大。

2.3.2 上样速度对吸附的影响: 取处理好的HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm), 取黄芩苷质量浓度为2.63 mg/mL的药液100 mL, 分别以2、3、4 BV/h的流量上柱, 考察不同流量

表3 上样液中黄芩苷质量浓度对吸附量的影响

Table 3 Effect of baicalin concentration in supernatant on adsorption capacity

上样液质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	比吸附量/(mg · g ⁻¹)
2.00	40.23
2.65	45.25
3.50	42.65
4.00	39.22
8.00	35.68

对树脂吸附量的影响, 结果见图1。结果表明, 上样速度以3 BV/h较好。

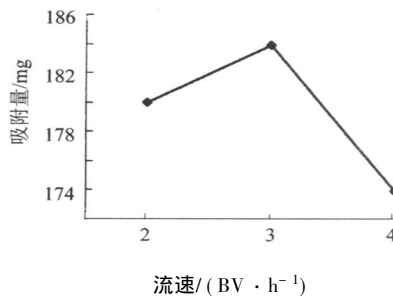


图1 上样速度对吸附量的影响

Fig. 1 Effect of velocity on adsorption capacity

2.3.3 泄漏曲线的绘制: 取处理好的HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm), 将黄芩苷质量浓度为2.64 mg/mL的提取液, 以3 BV/h上柱, 每一个柱体积(10 mL)为一流份, 收集流出液, 测定流出液中黄芩苷的质量浓度, 至吸附饱和时为止, 以黄芩苷质量浓度为横坐标, 上样柱体积为纵坐标绘制曲线, 见图2。结果表明, HPD-300可处理6倍柱体积的物料液。达吸附饱和时可吸附12倍柱体积的药液。

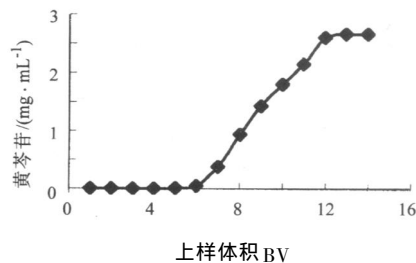


图2 HPD-300的吸附泄漏曲线

Fig. 2 Adsorption leak curve of HPD-300

2.3.4 洗脱剂乙醇体积分数的选择: 取处理好的HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm), 调节流量为3 BV/h, 取提取液60 mL, 以3 BV/h速度上样, 依次用40 mL蒸馏水、30%乙醇50 mL、50%乙醇50 mL、70%乙醇40 mL洗脱, 洗脱液每10 mL收集一份, 依次编号为1~18号, 其中1~4为水洗液, 5~9为30%乙醇洗脱液, 10~14为50%乙醇洗脱液, 15~18为70%乙醇洗脱液, 测定洗脱液中

黄芩苷的质量浓度。以黄芩苷质量浓度为纵坐标,洗脱柱体积为横坐标,绘制洗脱曲线,见图3。

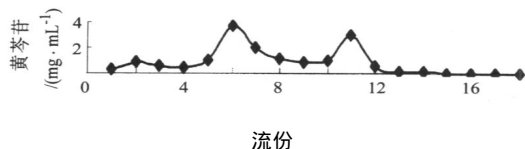


图3 不同体积分数乙醇的洗脱曲线

Fig. 3 Acohol elution curve of different concentration

将处理好的HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm)装3根小柱,调节流量为3 BV/h,取含黄芩苷2.49 mg/mL上样液50 mL上柱,收集流出液,备用;每根小柱先用水40 mL洗脱,然后这3根小柱分别用30%、40%、50%乙醇60、50、40 mL洗脱,分别收集洗脱液,备用;测定流出液及洗脱液中黄芩苷的质量浓度和干膏量,计算黄芩苷的洗脱率和产物中黄芩苷的质量分数,见表4。结果表明,用30%乙醇洗脱时产物中黄芩苷的质量分数较高,而用50%乙醇洗脱时洗脱率较高,同时考虑二者,选择50%乙醇为洗脱溶剂。

表4 洗脱率及质量分数的测定结果

Table 4 Results of purification and elution rate

试验号	洗脱量/mg	干膏/mg	质量分数/%	洗脱率/%
30%乙醇洗脱	64.13	310.5	20.65	62.60
40%乙醇洗脱	79.32	442.5	17.93	77.42
50%乙醇洗脱	91.70	517.0	17.74	89.50

2.3.5 洗脱剂用量的确定:取处理好的HPD-300大孔吸附树脂10 mL湿法装柱(150 mm × 10 mm),调节流量为3 BV/h,取提取液60 mL,以3 BV/h上样,依次用蒸馏水40 mL,50%乙醇60 mL洗脱,洗脱液每10 mL收集一份,依次编为1~10号,其中1~4为水洗液,5~10为60%乙醇洗脱液,收集洗脱液,测定洗脱液中黄芩苷的质量浓度,绘制洗脱曲线,见图4。结果表明,用50%乙醇40 mL(4 BV)即可洗脱完全。

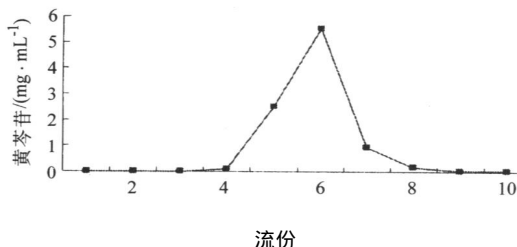


图4 HPD-300树脂洗脱黄芩苷的曲线

Fig. 4 Elution curve of baicalin by HPD-300 resin

2.4 试验验证:根据确定的树脂类型和最佳工艺,用3根树脂柱(26 cm × 5 cm)同时进行达原滴丸处方药物的纯化精制,结果树脂纯化后黄芩苷的平均收率为90.2%,产物中的黄芩苷的平均质量分数为17.8%。

3 讨论

达原滴丸提取液中所含化学成分复杂,除黄酮苷外,还含有生物碱、三萜皂苷类成分,以及多糖类、蛋白质等。为了尽可能多的保留有效成分,同时尽可能多地除去杂质,以便既提高疗效,又能减小服用量,同时也方便以后制剂成形的目的,本实验采用了大孔吸附树脂法纯化达原滴丸提取液,由于达原滴丸处方中还有芍药、槟榔、知母等药味,而仅以黄芩苷为考察指标进行了树脂条件的筛选,所以在条件确定以后,采用薄层色谱法考察了上样流出液以及水洗液中化学成分,未检出芍药苷、槟榔碱和菝葜皂苷。同时比较了达原滴丸处方药物水提液与达原滴丸处方药物提取液经过纯化后药理活性差异,结果显示二者没有显著性差异。但经过纯化后药液出膏率由30%降为7%左右,基本达到了纯化目的,并保证了疗效。

在吸附容量确定时实验选择了6倍量柱体积上样量,但在洗脱剂体积分数选择时发现用水洗也能把黄芩苷少量洗脱下来,考虑到可能是上样量过载所致,因此减小了上样量(5倍柱体积),结果水洗液中黄芩苷明显减少,故确定上样容量为5倍柱体积。

从结果分析,HPD-300基本适合达原滴丸处方药物提取液的精制纯化,HPD-300树脂对达原滴丸处方药物提取液的适宜纯化条件:上样液黄芩苷质量浓度为2.65 mg/mL,上5 BV柱体积提取液,流量为3 BV/h;洗脱剂用50%乙醇洗脱4个柱体积。

参考文献:

- [1] 月辰. 达原饮的临床应用概况[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(7): 446-447.
- [2] 李伯庭,王湘,李小进. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J]. 中草药, 1990, 21(8): 42-44.
- [3] 唐第光. 大孔吸附树脂法提取三七总皂甙工艺探讨[J]. 中成药, 1990, 12(8): 5-6.
- [4] 毕岳琦,侯世祥,毛声俊,等. 不同类型苷类在大孔吸附树脂上的吸附纯化特性研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 217-220.
- [5] 高红宁,金万勤,郭立伟,等. AB-8树脂对苦参总黄酮的吸附性能研究[J]. 中草药, 2001, 32(10): 887-889.