

苦柏妇炎栓精制工艺优选

姚琳, 高菲, 孙妍, 王伟明*

(黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036)

[摘要] 目的: 优选苦柏妇炎栓的精制工艺。方法: 运用大孔吸附树脂法, 以盐酸小檗碱、苦参碱、蛇床子素含量为指标, 通过单因素试验筛选树脂型号及其精制工艺; 采用 HPLC 测定指标成分含量。结果: 采用 HPD-400A 型大孔吸附树脂, 其最佳精制工艺为树脂(干重)-药材质量(1:3), 上样液质量浓度 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 上样液 pH 8, 洗脱流速 $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 加 5 BV 水洗脱, 之后分别用 5 BV 的 20% 乙醇和 40% 乙醇洗脱, 合并乙醇洗脱液, 减压回收, 干燥, 即得精制浸膏。结论: 经 HPD-400A 型大孔吸附树脂精制后, 栓剂载药量提高了 4.3 倍; 优选的精制工艺稳定可行, 可用于苦柏妇炎栓的工业化生产。

[关键词] 大孔吸附树脂; 盐酸小檗碱; 苦参碱; 蛇床子素

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0038-04

[doi] 10.11653/syfj2013110038

Optimization of Purification Technology of Kubai Fuyan Suppositories

YAO Lin, GAO Fei, SUN Yan, WANG Wei-ming*

(Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150036, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize purification technology of Kubai Fuyan suppositories. **Method:** Macroporous resin method was adopted, with the content of berberine hydrochloride, matrine and osthole as index, type of macroporous resin and its purification technology was screened by single factor test. The content of indicators ingredients were determined by HPLC. **Result:** HPD-400A type macroporous resin was selected with

[收稿日期] 20121123(004)

[第一作者] 姚琳, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂及新药研究, Tel/Fax: 0451-55665478, E-mail: yaoyao198003@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 王伟明, 博士, 研究员, 从事新药开发研究, E-mail: zyyjy@163.com

3 讨论

本实验分别应用正交试验法和响应面分析法分别对黄芪建中颗粒的提取工艺进行优化。选用正交试验时, 虽能得出优化结果, 但结果只能落在试验设计所选水平值上, 精度不够, 若水平值选择不恰当, 结果偏差太大; 而响应面分析法属于效应面法中一种设计, 其可在因素与响应值间建立数学模型, 通过对数学模型的处理得出多变量间的相互关系与影响因素^[5-7]。因此, 建议在进行提取工艺优选时, 尤其是复方制剂, 宜优先考虑选择响应面分析法。

[参考文献]

- [1] 吴禹池, 林启展. 小建中汤之功探析[J]. 光明中医, 2010, 25(2): 306.
- [2] 滕宇, 李正言, 初正云, 等. HPLC 法测定抗感片中芍药

苷的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(4): 140.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 508.
- [4] 段红, 翟科峰, 曹稳根, 等. 响应面法优化八角枫中水杨苷的提取工艺[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(5): 322.
- [5] 张璐, 翁立冬, 刘莉, 等. 正交试验法优选蛇床子渗漉提取的工艺条件[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 12.
- [6] 蒋志华, 俞力超, 冯子旺, 等. 响应面法优化仙鹤草总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 17.
- [7] 徐伟, 凌伟坚, 褚克丹, 等. 响应面法优化车前子油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 2011, 36(23): 3253.

[责任编辑 仝燕]

optimum purification technology was as following: ratio of resin and crude drug 1:3, the sample solution concentration of $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ with pH 8, elution flow rate of $1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, eluated with 5 BV water, then eluated with 5 BV of 20% ethanol and 40% ethanol, merged ethanol eluent, recovered, dried, then received purified extracts. **Conclusion:** Drug loading of suppositories increased 4.3 times after purified with HPD-400A type macroporous resin. This optimized purification technology was stable and feasible, which could be used for industrial production of Kubai Fuyan suppositories.

[**Key words**] macroporous resin; berberine hydrochloride; matrine; osthole

苦柏妇炎栓为我院医院制剂,由黄柏、蛇床子、苦参等药物组成,具有清热燥湿、解毒杀虫、通淋化浊的功效,用于湿热蕴结所致的带下病机阴道炎、慢性盆腔炎等症的治疗。本课题组前期通过药效学试验确定了该制剂的水提醇沉工艺,并进行了工艺参数的优化,但提取液经醇沉后浸膏得率仍很高,使栓剂载药量低,且不利于成型,故拟选用大孔吸附树脂法对提取液进行进一步精制。

大孔吸附树脂是20世纪60年代末发展起来的有机高聚物吸附剂,具有较好的吸附性能^[1]。由于其具有物理化学稳定性、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、节省费用等诸多优点,目前已被广泛应用于中草药化学成分的分离、富集等方面^[2]。本实验以盐酸小檗碱、苦参碱、蛇床子素含量为评价指标,通过单因素试验筛选树脂型号及其精制工艺,为苦柏妇炎栓的临床推广提供实验依据。

1 材料

SCL-10A型高效液相色谱仪(日本岛津),Bp211D型1/10万电子分析天平(赛多利斯),AE240型1/万电子分析天平(梅特勒)。蛇床子素、盐酸小檗碱、苦参碱对照品(均购于中国药品生物制品检定所,批号分别为110822-200406,110713-200609,110805-200306),中性氧化铝(上海杜园精细化工有限公司),乙腈、冰乙酸、三乙胺、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,HPD-400A,AB-8,ME-1,S-8型大孔吸附树脂均购于沧州宝恩化工厂。黄柏、苦参、蛇床子等药材均购自安国市京业药业有限公司,经黑龙江省中医研究院王有志研究员鉴定符合2010年版《中国药典》一部有关规定。

2 方法及结果

2.1 盐酸小檗碱含量测定^[2]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品5.25 mg,置50 mL量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取待测样品适量,精密

称定,置具塞锥形瓶中,精密加入盐酸-甲醇(1:100)溶液25 mL,称定质量,于60℃水浴温热15 min,超声处理30 min,放冷,用盐酸-甲醇(1:100)溶液补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-水-冰乙酸-三乙胺(25:73:1:1),检测波长265 nm,进样量5 μL 。

2.2 苦参碱含量测定^[3]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品5.85 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取待测样品适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液0.5 mL,精密加入三氯甲烷20 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用三氯甲烷补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 mL,加至中性氧化铝柱(100~200目,5 g,内径1 cm)上,依次用三氯甲烷、三氯甲烷-甲醇(7:3)混合溶液各20 mL洗脱,合并收集洗脱液,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇定容至10 mL,摇匀,即得。

2.2.3 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-水(0.1%三乙胺,0.04%磷酸)(16:84),检测波长215 nm,进样量5 μL 。

2.3 蛇床子素含量测定^[4]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取蛇床子素对照品6.27 mg,置25 mL量瓶中,加乙醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取浓缩清膏适量,精密称定,置具塞锥形瓶中,加无水乙醇25 mL,精密称定质量,放置2 h,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用无水乙醇补足减失的质量。精密量取上清液5 mL,置10 mL量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相乙腈-水(65:35),检测波长322 nm,进样量5 μL 。

2.4 大孔吸附树脂精制条件的筛选

2.4.1 上柱液的制备 称取处方量药材共 1.050 kg,按优选的工艺条件进行提取,醇沉,取上清液,过滤,减压回收乙醇,浓缩至 1.050 L。

2.4.2 静态吸附-洗脱性能试验 分别取已处理好的 4 种树脂 10 g,置于 100 mL 锥形瓶中,各加入上样液 30 mL,每 5 min 振摇 1 次,振摇 2 h 后,室温放置 24 h,使达饱和和吸附,滤过,分别测定原液和滤液中 3 种指标成分的含量,测定 4 种树脂的含水量,按下式计算得 ME-1, AB-8, HPD-400A, S-8 型干树脂的盐酸小檗碱比吸附量 (A) 分别为 17.86, 18.59, 17.74, 9.84 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 苦参碱的 A 分别为 14.233, 16.111, 14.813, 6.391 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 蛇床子素的 A 分别为 0.334, 0.353, 0.335, 0.186 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。各树脂的盐酸小檗碱相对比吸附量 (RA)^[5] 分别为 0.348, 0.364, 0.347, 0.192 g^{-1} ; 蛇床子素的 RA 分别为 0.345, 0.364, 0.346, 0.194 g^{-1} ; 苦参碱的 RA 分别为 0.267, 0.302, 0.278, 0.120 g^{-1} 。

$$A = (M_1 - M_2)V/W; RA = A/M_1V$$

式中 M_1 为起始质量浓度; M_2 为剩余质量浓度; V 为溶液体积; W 为干树脂质量。

取上述 4 种饱和吸附树脂,滤除多余溶液,加去离子水 100 mL 洗脱树脂,洗脱液弃去,用 80% 乙醇 100 mL 浸泡树脂 24 h,洗脱,测定洗脱液中指标成分的含量。结果各树脂中盐酸小檗碱洗脱率分别为 84.50%, 87.54%, 89.17%, 85.71%; 苦参碱洗脱率依次为 63.09%, 76.75%, 89.08%, 57.63%; 蛇床子素洗脱率分别为 61.19%, 70.60%, 88.76%, 79.79%。

$$\text{洗脱率} = C_d \times V_d / [(C_0 - C_e) \times V_A] \times 100\%$$

上式中 C_d 为洗脱液质量浓度, V_d 为洗脱液体积, C_0 为吸附液起始质量浓度, C_e 为吸附平衡质量浓度, V_A 为吸附液体积。可见,综合吸附-脱吸附性能以 HPD-400A 型树脂最佳。

2.4.3 动态吸附量考察^[6] 取预先处理好的 HPD-400A 型湿树脂 50 mL 装柱,慢慢注入上样液,上样流速 2 $\text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$,收集流出液,每份 5 mL, HPLC 测定各指标成分峰面积。以流出液瓶号(1 个瓶号相当于 5 mL 的样品体积)为横坐标,指标成分质量浓度为纵坐标,得动态吸附曲线,见图 1~2。结果发现,泄漏的指标成分中苦参碱最先泄露,因为苦参碱在药材中含量最高,所以吸附达平衡也最快,流出液达到 9 瓶时泄露就开始出现,因此确定树脂(干重)-药材质量(1:3)。

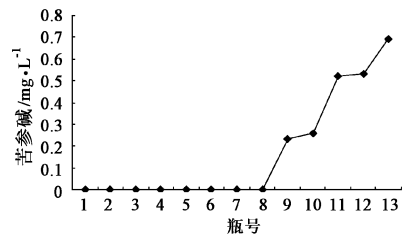


图 1 苦柏妇炎栓中苦参碱泄露曲线

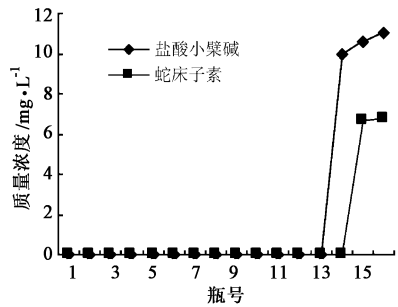


图 2 苦柏妇炎栓中盐酸小檗碱、蛇床子素泄露曲线

2.4.4 洗脱剂浓度考察 将已吸附好样品的 HPD-400A 型树脂分别用去离子水、20% 乙醇、40% 乙醇、80% 乙醇洗脱,收集洗脱液,以每 1 BV 为 1 瓶,每种洗脱体系收集 4 瓶, HPLC 测定指标成分含量,绘制洗脱曲线,见图 3~5。

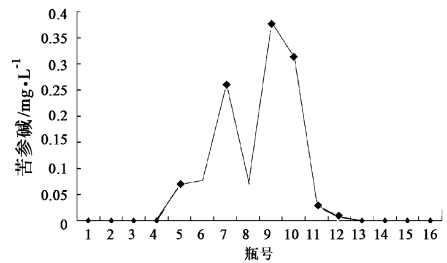


图 3 苦柏妇炎栓中苦参碱洗脱曲线

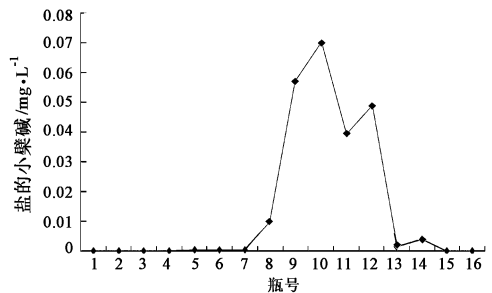


图 4 苦柏妇炎栓中盐酸小檗碱洗脱曲线

由图 3~5 可知,去离子水均未洗下 3 种指标成分,苦参碱出现在 20% 乙醇和 40% 乙醇中,尤以 40% 乙醇为主,盐酸小檗碱主要出现在 40% 乙醇中,蛇床子素主要出现在 80% 乙醇中。因此,合并 40% 乙醇及 80% 乙醇洗脱液,可基本洗脱完全。

2.4.5 上样液质量浓度考察 取预先处理好的 HPD-400A 型湿树脂 50 mL 装柱,共 4 根,将上样液的

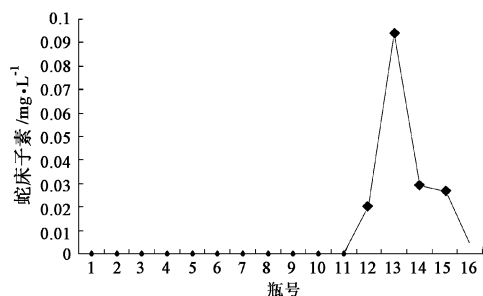


图5 苦柏妇炎栓中蛇床子素洗脱曲线

生药质量浓度分别调整为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g·mL⁻¹, 上样流速 2 BV·h⁻¹, 待树脂充分吸附后, 分别用水, 20% 乙醇, 40% 乙醇及 80% 乙醇各 5 BV 洗脱, 合并 40% 乙醇和 80% 乙醇的洗脱液。采用 HPLC 测定其中各指标成分含量。结果, 盐酸小檗碱的比吸附量分别为 15.2, 17.8, 14.5, 12.2 mg·g⁻¹, 苦参碱的比吸附量分别为 12.8, 14.1, 12.4, 11.1 mg·g⁻¹, 蛇床子素的比吸附量分别为 0.28, 0.41, 0.37, 0.34 mg·g⁻¹。故选取上样液质量浓度 1.0 g·mL⁻¹。

2.4.6 上样液 pH 考察 取预先处理好的 HPD-400A 型湿树脂 50 mL 装柱, 共 4 根, 调整上样液 pH 分别为 5, 6, 7, 8, 上样流速 2 BV·h⁻¹, 待树脂充分吸附后, 分别用水, 20% 乙醇, 40% 乙醇及 80% 乙醇各 5 BV 洗脱, 合并 40% 乙醇和 80% 乙醇的洗脱液。结果盐酸小檗碱的比吸附量分别为 17.82, 17.53, 17.69, 18.85 mg·g⁻¹, 苦参碱的比吸附量分别为 4.5, 11.2, 22.3, 33.6 mg·g⁻¹, 蛇床子素的比吸附量分别为 0.39, 0.31, 0.37, 0.32 mg·g⁻¹。说明 pH 对蛇床子素和盐酸小檗碱的比吸附量影响较小, 而对苦参碱的影响很大, 当 pH 8 时, 苦参碱的比吸附量最大, 同时盐酸小檗碱和蛇床子素的比吸附量也较高, 故选择上样液 pH 8。

2.4.7 洗脱流速考察 取预先处理好的 HPD-400A 型湿树脂 50 mL 装柱, 共 5 根, 调节上样流速 2 BV·h⁻¹, 分别采用 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 BV·h⁻¹ 的流速, 用水, 20% 乙醇, 40% 乙醇及 80% 乙醇各 5 BV 洗脱, 合并 40% ~ 80% 乙醇洗脱液。结果洗脱率的综合指标分别为 69%, 78%, 90%, 89%, 75%。故选取洗脱流速 1.5 BV·h⁻¹。

2.4.8 洗脱剂用量考察

2.4.8.1 水洗用量 取 HPD-400A 型树脂 10 mL, 湿法装柱, 根据已确定条件加入上样液, 以 1.5 BV·h⁻¹ 用水洗脱, 收集洗脱液, 每 1 BV 体积收集 1 瓶, 直至洗至无色。结果发现, 当接到第 5 瓶时, 水洗液基本变成无色, 故水洗用量确定为 5 BV。

2.4.8.2 醇洗用量 由 2.4.4 项下洗脱曲线可知, 当每种醇洗脱剂醇用量为 4 BV 时, 各指标成分基本洗脱干净, 将各醇洗脱剂用量均定为 5 BV。

3 讨论

采用 HPLC 测定精制前后提取物中各指标成分含量, 结果苦参碱、盐酸小檗碱、蛇床子素的相对转移率分别为 90.29%, 87.70%, 84.50%。将该精制提取物以适宜基质制成栓剂, 其载药量比未精制前提高了 4.3 倍, 且栓剂成型效果良好。

在参考文献的基础上, 根据树脂的理化性质、结构特点及不同型号树脂的适用范围, 选用了 ME-1 (非极性), HPD400A (中极性), AB-8 (弱极性), S-8 (极性) 型树脂进行比较。其中 ME-1 和 HPD400A 型树脂尤其适宜于富集各种活性成分。在试验准备过程中, 各类型树脂按厂家说明进行了预处理, 并测定其含水率, 结果 ME-1, AB-8, HPD400A, S-8 型树脂的含水率分别为 71.41%, 72.56%, 71.22%, 48.58%。大孔吸附树脂制备中药供试液与常用的溶剂提取法制备供试液相比, 前者具有干扰性成分少、有毒有机溶剂应用少、成本低等优点, 在中药质量分析中将具有良好的应用前景^[7]。在后续研究中, 本课题组将配合主要药效学对比试验, 以证明上柱前与洗脱后药物的“等效性”。

[参考文献]

- [1] 张旭, 王锦玉, 全燕, 等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 286.
- [2] 何伟, 李伟. 大孔树脂在中药成分分离中的应用[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 134.
- [3] 冷玉杰, 刘兵, 张振秋. 高效液相色谱法测定抗感冒片中盐酸小檗碱的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(5): 640.
- [4] 张杰, 向大雄, 罗杰英, 等. 反相高效液相色谱法测定苦参药材中苦参碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(11): 718.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 295.
- [6] 夏新华. 复方中药“舒胸片”多组分在大孔树脂上吸附-脱吸附性能及其动力学研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2006.
- [7] 付克, 张坤, 闫广利, 等. 柴芩清肝方提取物大孔吸附树脂精制工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 26.
- [8] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中应用[J]. 世界科学技术——中药现代化, 2004, 6(3): 22.

[责任编辑 全燕]