

芎归舒络颗粒提取纯化工艺考察

董德云¹, 臧琛², 金日显¹, 刘宝华¹, 王锦玉^{2*}

(1. 中国中医科学院实验药厂, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选芎归舒络颗粒的提取、纯化工艺。方法: 以阿魏酸转移率为指标, 采用正交试验优选芎归舒络颗粒水提取工艺, 选取浸泡时间、加水量、提取次数及提取时间为影响因素, HPLC 测定阿魏酸含量; 采用醇沉法纯化芎归舒络颗粒, 以阿魏酸转移率和纯度为指标, 单因素试验考察其醇沉条件。结果: 优选的提取工艺为加 15 倍量水浸泡 1 h, 提取 2 次, 每次 1 h; 其醇沉条件为醇沉至乙醇体积分数 60%, 相对密度 1.08 ~ 1.14 (60 ℃)。结论: 该优选工艺稳定可行, 可为芎归舒络颗粒的工业化生产提供试验依据。

[关键词] 芎归舒络颗粒; 阿魏酸; 醇沉; 提取

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2012) 18-0059-03

Investigation of Extraction and Purification Technology for
Qiongui Shuluo Granule

DONG De-yun¹, ZANG Chen², JIN Ri-xian¹, LIU Bao-hua¹, WANG Jin-yu^{2*}

(1. Experiment Drug Factory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction and purification technology of Qiongui Shuloug granule. Method: With transfer rate of ferulic acid as index, water extraction technology of Qiongui Shuloug granule was optimized by orthogonal test, soaking time, extraction times, extraction time and the amount of water were selected as factors, the content of ferulic acid was determined by HPLC; With transfer rate and purity of ferulic acid as indexes, single-factor test was used to investigate alcohol precipitation technology. Result: Optimized extraction technology was: soaked 1 h with 15 times the amount of water, extracted 2 times with 1 h per time; alcohol precipitation technology was: alcohol precipitation to the concentration of ethanol 60%, the relative density of 1.08-1.14 (60 ℃). Conclusion: This optimized technology was stable and feasible, it could provide experimental basis for industrial production of Qiongui Shuloug granule.

[Key words] Qiongui Shuloug granule; ferulic acid; alcohol precipitation; extraction

芎归舒络颗粒为临床经验方, 由川芎、当归、红花等 6 味药物组成, 主治心绞痛、头痛等, 疗效显著。川芎为方中君药, 能活血行气、祛风止痛^[1], 其主要有效成分为阿魏酸, 有抑制血小板聚集等作用^[2], 方中臣药当归中也含有阿魏酸, 本试验以阿魏酸含量及其纯度为考察指标, 采用正交试验和单因素试

验优选芎归舒络颗粒的水提取、纯化工艺, 为其工业化推广提供试验依据。

1 材料

安捷伦 1100-型高效液相色谱仪 (美国惠谱), 阿魏酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0773-9708), 试验药材购于北京市药材公司, 经全检均符合 2010 年版《中国药典》项下的有关标准, 水为超纯水, 甲醇、冰乙酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸含量测定^[3]

[收稿日期] 20120614 (016)

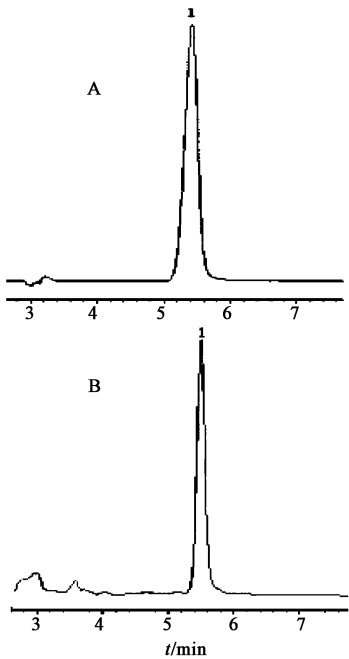
[第一作者] 董德云, 副主任技师, 从事制药机械研究, Tel: 010-84036439, E-mail: baihu468@sohu.com

[通讯作者] * 王锦玉, 硕士, 助理研究员, 从事中药制剂研究, Tel: 010-84029227

2.1.1 色谱条件 ZY1104-型 Kromasil-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 北京分析仪器厂), 流动相 甲醇-水-冰乙酸 (35: 65: 1), 柱温 30 ℃, 检测波长 320 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 理论塔板数以阿魏酸计算应 > 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 2 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取本品颗粒适量, 研细, 精密称定 0.25 g, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 200 W, 频率 60 kHz) 10 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 上清液用 0.5 μm 微孔滤膜滤过, 即得。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品溶液; 1. 阿魏酸

图 1 芎归舒络颗粒 HPLC

2.1.4 线性关系考察 精密吸取阿魏酸对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 25 μL, 分别注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以阿魏酸质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 6\,421.5X - 10.2$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明阿魏酸在 0.032 ~ 0.403 μg 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密称取同一供试品溶液, 进样 5 次, 测定峰面积, 结果 RSD 1.21%, 说明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 依法测定, 结果 RSD

0.74%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 称取同一批号样品, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 测定, 结果 RSD 1.42%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批号样品约 0.125 g, 分别精密加入 0.08 g · L⁻¹ 阿魏酸对照品溶液 2.5 mL, 按 2.1.3 项下方法制备, 按色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 99.89%, RSD 1.02%, 说明该方法稳定可行。

2.2 提取工艺优选 按处方比例称取各味中药, 共 9 份, 每份 30 g, 按四因素三水平安排正交试验进行提取, 滤过, 加水定容至一定体积, 按 2.1.1 项下方法测定阿魏酸含量。因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 芎归舒络颗粒水提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 加水量 /倍	B 提取 时间/h	C 提取 数/次	D 浸泡 时间/h
1	10	1	1	0
2	12	1.5	2	1
3	14	2	3	2

表 2 芎归舒络颗粒水提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	阿魏酸提 出量/mg
1	1	1	1	1	8.82
2	1	2	2	2	11.31
3	1	3	3	3	12.05
4	2	1	2	3	10.24
5	2	2	3	1	11.68
6	2	3	1	2	8.59
7	3	1	3	2	12.25
8	3	2	1	3	9.13
9	3	3	2	1	12.87
K ₁	10.73	10.44	8.85	11.12	
K ₂	10.17	10.71	11.47	10.72	
K ₃	11.42	11.17	11.99	10.47	
R	0.98	0.73	3.14	0.65	

由表 3 极差结果可知, C 因素为主要影响因素, 具体顺序为 C > A > B > D; 以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果表明 C 因素对试验有显著性差异, 但 K₂ 和 K₃ 较接近, 无显著性差异; A, B 因素无显著性差异, 考虑到大生产成本, 优选提取工

表3 阿魏酸提出量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	2.34	2	1.17	3.62	
B	0.83	2	0.41	1.28	
C	17.07	2	8.54	26.38	* <0.05
D(误差)	0.65	2	0.32		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

艺 $A_1B_2C_2D_0$ 。即加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 1.5 h。

2.3 验证试验 按处方比例称取各药材 3 份,每份 150 g,按正交试验优选工艺进行 3 次验证试验,结果阿魏酸提取量分别为 62.54,62.83,61.82 mg,计算平均转移率 81.2%,说明优选的提取工艺稳定可行。

2.4 醇沉条件优选^[4-5]

2.4.1 醇沉浓度的考察 按处方比例称取药材共 100 g,按优选工艺进行提取,水浴浓缩至相对密度 1.14(60 ℃),浓缩液分 3 份,分别加入 95% 乙醇至乙醇体积分数 50%,60%,70%,充分搅拌混匀,静置过夜,取上清液减压回收乙醇,定容,取适量测定阿魏酸含量及干浸膏得率,结果阿魏酸提取量分别为 37.2,40.3,39.4 mg,干浸膏得率分别为 15.1%,13.2%,12.8%,60% 乙醇沉淀最佳。

2.4.2 浸膏醇沉相对密度的考察 在上述试验基础上,按处方比例称取药材共 100 g,按优选工艺进行提取,分 3 份,分别浓缩至不同浸膏相对密度(1.08,1.14,1.20),醇沉至乙醇体积分数 60%,充分搅拌混匀,静置过夜,取上清液减压回收乙醇,定容,取适量测定阿魏酸含量及干浸膏得率,结果阿魏

酸提取量分别为 40.3,40.1,37.5 mg,干浸膏得率分别为 13.8.1%,13.2%,12.4%。结果表明浸膏相对密度 1.14,1.08 醇沉时,阿魏酸得量及干膏得率接近,由于大生产浸膏相对密度不易控制,故固定相对密度 1.08~1.14(60 ℃)。

3 讨论

本研究前期,通过药效试验比较了全方水煎及 60% 乙醇回流提取 2 种工艺路线,结果水煎效果较好。正交试验提取后,水提取液的干膏得率约为 21.6%,经过醇沉工艺后,干膏得率降至约 13%,阿魏酸平均转移率 >75%。进行醇沉工艺考察时,静置过夜以利于杂质的沉淀,并采用离心法除去沉淀。本文进行正交试验和醇沉工艺优选时,仅选用单一指标作定量分析,由于复方制剂中成分复杂,可能存在一定的偏差,在之后的研究中将结合药效学指标进行综合分析,为芎归舒络颗粒的临床应用提供坚实的试验依据。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:38.
[2] 梁红冬.阿魏酸的合成及抗氧化性能的研究[J].化学与生物工程,2012,29(1):60.
[3] 黄罗生,郭健新,刘咏梅,等. HPLC 测定阿魏酸含量的探讨[J]. 中成药,2004,26(2):134.
[4] 蔡鹰,丁安伟. 利咽含片醇沉工艺的优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):16.
[5] 袁佳,李页瑞,陈勇,等. 多指标综合评分法优选红花提取液醇沉工艺[J]. 浙江大学学报:医学版,2011,40(1):27.

[责任编辑 全燕]