

独一味镇痛止血有效部位的富集工艺

郝延军¹, 桑育黎^{2*}

(1. 辽宁省食品药品检验所, 沈阳 110023; 2. 辽宁大学药学院, 沈阳 110036)

[摘要] 目的:对独一味镇痛止血有效部位的富集工艺进行研究。方法:采用二甲氨基苯甲醛法测定总环烯醚萜含量、HPLC 测定 8-epideoxyloganin 含量,以正交试验法和单因素试验法筛选提取工艺和大孔吸附树脂分离条件。结果:最佳提取工艺为用 10 倍量 60% 乙醇渗漉提取,浸泡 36 h,渗漉速度 5 mL·min⁻¹·kg⁻¹。纯化工艺为将提取物上聚酰胺柱,水洗脱部分上 XDA-7 大孔吸附树脂,收集 30% 醇洗脱部分。结论:XDA-7 型树脂对独一味中环烯醚萜苷的富集能力优于其他树脂。洗脱溶剂 30% 乙醇能较好地洗脱环烯醚萜苷类成分。

[关键词] 独一味;有效部位;工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0019-04

Studies on Extraction and Purification Process of Analgesic and Hemostatic Bioactive Portion from *Lamiophlomis rotata*

HAO Yan-jun¹, SANG Yu-li^{2*}

(1. Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China;
2. Pharmaceutical College of Liaoning University, Shenyang 110036, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preparation process of extraction and purification for analgesic and hemostatic bioactive portion from *Lamiophlomis rotata*. **Method:** Determination of the total iridoid glycosides and 8-epideoxyloganin were performed by dimethylaminobenzaldehyde method and HPLC respectively. By Using single factor and orthogonal experiments, the best extraction and purification process with macroporous resin was optimized. **Result:** The best extraction was established as follows: solvent of 60% ethanol, soaking 36 hours, elution volume was 10 times of materials, percolation rate of 5 mL·min⁻¹·kg⁻¹. The purification process was as follows: the ethanolic extract should be separated by polyamide. The water elution was separated with XDA-7 macroporous resin and collecting the 30% ethanolic extract. **Conclusion:** XDA-7 macroporous resin has better ability of absorption and anti-absorption for iridoid glycosides and 30% ethanol was the best solvent for anti-absorption.

[Key words] *Lamiophlomis rotata*; bioactive portion; preparation process

独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 为唇形科独一味属多年生草本植物,全草入药,具有活血

止血、祛风止痛、干黄水等功效,主治跌打损伤,外伤出血,风湿痹痛,黄水病。药理试验筛选,已确定独一味药材乙醇渗漉提取物经聚酰胺分离后的水洗脱部分,再经大孔吸附树脂富集,30% 乙醇洗脱部分是镇痛、止血的主要活性部位。为了更科学、合理地利用药材资源,我们就如何有效地提取、富集药材的有效部位,进行了工艺研究。

1 材料

LC-2010A 型高效液相色谱仪,UV-2450 紫外-可

[收稿日期] 20100806(005)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A313)

[第一作者] 郝延军,博士,从事中药质量控制研究, E-mail: haoyanjuan@sina.com

[通讯作者] * 桑育黎,生药学博士,讲师,从事中药活性成分研究, Tel: 024-62202612, E-mail: ylsang1973@163.com

见分光光度计(岛津),Acculab 电子天平。柱层析用 40 目聚酰胺(惠州市华聚塑化科技有限公司),大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司)。试剂均为分析纯。

独一味经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为唇形科植物独一味 *L. rotata* 的干燥茎叶。8-表脱氧马钱子苷酸对照品(8-epideoxyloganic acid, 自行分离)经检测纯度大于 98%。

2 方法与结果

2.1 标准曲线制备 精密称取对照品 8-表脱氧马钱子苷酸 9.896 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解, 并稀释至刻度, 即得质量浓度为 $0.9896 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

精密量取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加 75% 乙醇 2 mL, 加盐酸 1 mL 于 80 °C 水解 20 min, 立即冷却。加对二甲氨基苯甲醛溶液 1 mL, 加 75% 乙醇至刻度, 在室温放置 30 min。在 620 nm 处测定吸收度^[1]。计算得回归方程 1(用于总环烯醚萜苷含量的测定)为 $Y = 3.054573X + 0.00115 (r = 0.9993)$, 8-表脱氧马钱子苷酸在 0.0197 ~ 0.0989 μg 呈良好的线性关系。

精密量取对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μL 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积。计算得回归方程 2(用于 8-表脱氧马钱子苷酸含量)为 $Y = 7.6 \times 10^6 X + 2.2 \times 10^2 (r = 0.9996)$, 8-表脱氧马钱子苷酸在 1.9792 ~ 9.896 μg 呈良好的线性关系。

方法的稳定性、精密度、重复性、加样回收率考察, 均符合规定, 方法可行。

2.2 总环烯醚萜苷含量测定 分别取 1/25 体积的样品渗漉液, 回收乙醇, 置 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇定容。取 0.2 mL 溶液置 5 mL 量瓶中, 加 75% 乙醇 2 mL, 加盐酸 1 mL 于 80 °C 水解 20 min, 立即冷却。加对二甲氨基苯甲醛溶液 1 mL, 加 75% 乙醇至刻度, 在室温放置 30 min。在 620 nm 处测定吸收度。计算 50 g 药材中总环烯醚萜的含量。

2.3 8-表脱氧马钱子苷酸含量测定 采用 HPLC, 迪马 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.025 mol \cdot L⁻¹ 磷酸水(50:50), 检测波长 238 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 40 °C^[2]。按上述条件操作, 进样量 5 μL 。根据回归方程 2 计算药材中 8-表脱氧马钱子苷酸的含量。

2.4 提取工艺优选 取独一味药材, 粉碎, 过 60 目筛。每份称取 50 g 药粉, 装柱。用选定浓度的乙醇

和浸泡时间浸润药材后, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验表的条件渗漉, 收集渗漉液。因素水平见表 1, 试验结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 独一味乙醇渗漉提取因素水平

水平	A 乙醇 体积分数/%	B 溶剂量/倍	C 浸泡时间/h	D 渗漉速度 /mL \cdot min ⁻¹ \cdot kg ⁻¹
1	60	10	12	1
2	75	12	24	3
3	90	15	36	5

表 2 独一味乙醇渗漉提取正交试验

No.	A	B	C	D	总环烯 醚萜苷 N/mg	8-表脱氧 马钱子苷酸 M/mg	综合 评分
1	1	1	1	1	682.12	525.64	94.76
2	1	2	2	2	673.94	497.13	91.19
3	1	3	3	3	735.83	546.80	100.00
4	2	1	2	3	641.71	421.73	81.16
5	2	2	3	1	656.03	459.33	86.06
6	2	3	1	2	650.41	446.45	84.34
7	3	1	3	2	617.67	396.65	77.10
8	3	2	1	3	648.36	425.29	81.91
9	3	3	2	1	618.69	399.27	77.44
\bar{K}_1	95.32	84.34	87.00	86.09			
\bar{K}_2	83.85	86.39	83.26	84.21			
\bar{K}_3	78.82	87.26	87.72	87.69			
R	16.5	2.92	4.46	3.48			

注: 评分标准规定 8-表脱氧马钱子苷酸 M(mg) 为 60 分, 总环烯醚萜苷 N(g) 为 40 分, 8-表脱氧马钱子苷酸最高量为 546.80 mg 定为 60 分, 其他值计分为 $M/546.80 \times 60$, 总环烯醚萜苷最高量为 735.83 mg, 定为 40 分, 其他值计分为 $N/735.83 \times 40$, 二项指标总分为 100 分, 总评分为 $M/546.80 \times 60 + N/735.83 \times 40$ 。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	429.03	2	214.51	31.83	<0.05
B(误差)	13.48	2	6.74		
C	34.36	2	17.18	2.55	>0.05
D	18.20	2	9.10	1.35	>0.05

根据直观分析,影响因素主次顺序为 $A > C > D > B$ 。以 B 为误差项进行的方差分析估算表明, A 因素为显著影响因素, C, D 为非显著影响因素, 根据以上结果, 确定最佳提取工艺为 $A_1 B_1 C_3 D_3$, 即用 10 倍量 60% 乙醇渗漉, 浸泡 36 h, 渗漉速度 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.5 聚酰胺分离对 8-表脱氧马钱子苷酸含量的影响 分别取 1/50 体积的渗漉液, 回收乙醇, 加水定容至 10 mL, 上已处理好的聚酰胺柱, 水洗脱, 收集洗脱液 200 mL。色谱条件同前。进样量 $8 \mu\text{L}$ 。比较经聚酰胺处理前后 8-表脱氧马钱子苷酸含量。结果如表 4。

表 4 聚酰胺处理前后 8-表脱氧马钱子苷酸含量比较

No.	上聚酰胺柱前的含量/mg	上聚酰胺柱后的含量/mg	保留率/%
1	525.640 0	445.364 2	84.728
2	497.130 7	403.253 5	81.116 1
3	546.801 9	462.165 3	84.521 5
4	421.729 2	410.768 5	97.400 9
5	459.334 4	369.908 2	80.531 3
6	446.446 6	348.875 4	78.144 8
7	396.652 1	322.914 1	81.409 9
8	425.288 4	343.453 8	80.757 7
9	399.268 5	328.488 7	82.272 6

渗漉液经聚酰胺分离后, 8-表脱氧马钱子苷酸的保留率均在 80% 以上。平均保留率为 83.4%。

2.6 大孔吸附树脂工艺考察

2.6.1 大孔吸附树脂的预处理 取 5 种不同型号的大孔吸附树脂, 用 95% 乙醇浸泡树脂 24 h 后, 湿法装柱, 用 95% 乙醇洗至洗出液加入水中不呈白色混浊, 用蒸馏水洗至中性; 用 4 BV 的 5% 盐酸溶液浸泡树脂, 用蒸馏水洗至中性; 用 4 BV 5% 氢氧化钠溶液浸泡树脂, 用蒸馏水洗至中性。

2.6.2 动态吸附力的考察 分别取经聚酰胺分离后的溶液 20 mL (8-表脱氧马钱子苷酸含量为 $0.924 33 \text{ mg}$) 5 份, 以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度上已处理好的 5 种树脂 (干重约 3 g), 重复上样 2 次。水洗, 收集水洗液 40 mL。再用 95% 乙醇洗脱, 收集醇洗脱液 40 mL, 测定, 结果见表 5。

树脂吸附量 = 总量 - 未被吸附量。

洗脱回收率 = 醇洗脱量 / 树脂吸附量 $\times 100\%$

死吸附量 = 上样总量 - 未被吸附量 - 醇洗脱量

表 5 5 种树脂对环烯醚萜类成分的吸附考察

树脂型号	未被吸附量 /mg	树脂吸附量 /mg	死吸附量 /mg	醇洗脱量 /mg	洗脱回收率 /%
XDA-7	0.112 5	0.811 8	0.016 1	0.795 7	86.1
HPD-45	0.320 5	0.603 8	0.193 1	0.406 7	44.0
HPD-600	0.525 1	0.399 3	0.025 3	0.373 9	40.5
AB-8	0.470 6	0.453 7	0.372 4	0.081 3	8.8
D-101	0.457 4	0.466 8	0.186 8	0.280 0	30.3

由以上结果可知 XDA-7 型树脂, 从树脂吸附量、死吸附量和醇洗脱量几方面对环烯醚萜类成分有较好的富集能力, 洗脱回收率最高。

2.6.3 洗脱溶剂的考察 取经聚酰胺分离后的溶液 100 mL (8-表脱氧马钱子苷酸含量为 $4.621 7 \text{ mg}$), 以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度上已处理好的 XDA-7 树脂, 重复上样 2 次。水洗, 收集水洗液 400 mL。再分别用 30% 乙醇, 50% 乙醇, 90% 乙醇洗脱, 分别收集不同浓度的醇洗脱液各 400 mL。均浓缩至 30 mL。按前述色谱条件进样, 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。结果见表 6。不同浓度醇洗脱部分均以 100 mL 为一个馏分。30% 乙醇洗脱各段中 8-表脱氧马钱子苷酸含量, 绘制洗脱曲线。见图 1。

表 6 洗脱溶剂的考察

洗脱部分	8-表脱氧马钱子苷酸/mg	占上样量 /%	占树脂洗脱量/%
水	0.461 4	10.0	0
30% 乙醇	3.200 2	69.2	78.4
50% 乙醇	0.442 4	9.6	10.8
90% 乙醇	0.440 1	9.5	10.8

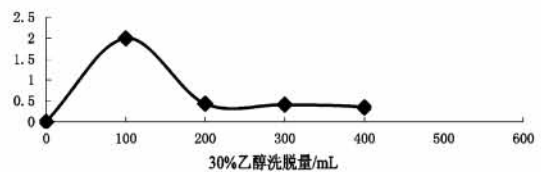


图 1 30% 醇洗脱部分洗脱曲线

由以上结果可知, 30% 乙醇能洗脱下大部分的环烯醚萜苷类成分, 除去未被树脂吸附部分和死吸附部分, 30% 乙醇部分所含环烯醚萜苷类成分的含量占总树脂洗脱量的 78.4%。

3 讨论

首次以镇痛止血有效成分 8-表脱氧马钱子苷酸

风灵凝胶中秋水仙碱的体外透皮特性

刘容飞¹, 谢燕^{1,2}, 袁秀荣^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海中医大源创科技有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究风灵凝胶中秋水仙碱的体外透皮吸收和体外释放情况。方法: 采用改良 Franz 扩散池装置, 以离体 SD 大鼠皮肤、透析膜为体外渗透屏障, 采用 HPLC 测定接收液中秋水仙碱的含量, 计算秋水仙碱单位面积累积渗透量和释药量, 比较透皮速率和释放速率。结果: 风灵凝胶中秋水仙碱 8 h 的体外释放和经皮渗透行为均符合 Higuchi 动力学方程, 体外释药量高于经皮渗透量, 且释药速率高于透皮速率。结论: 皮肤为风灵凝胶中秋水仙碱透皮吸收的主要屏障, 该制剂能平稳的释放药物, 具有长效缓释的特点。

[关键词] 秋水仙碱; 高效液相色谱法; 透皮吸收; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0022-04

Study on *in vitro* Percutaneous Absorption Properties of Colchicine in Fengling Gelatin

LIU Rong-fei¹, XIE Yan^{1,2}, YUAN Xiu-rong^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai Zhongyida Yuanchuang Technology Co. Ltd., Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in vitro* percutaneous absorption and *in vitro* release state of the main effective element colchicine in Fengling gelatin. **Method:** The Franz diffusion cells were chosen with excised SD rat skin and dialyzer as the *in vitro* permeability barrier; the content of colchicine was determined by HPLC, the cumulative permeation amount per unit area and release amount of colchicine were calculated, and the percutaneous

[收稿日期] 20110108(002)

[基金项目] 上海市科委中药现代化项目(08DZ1970400)

[第一作者] 刘容飞, 硕士研究生, 从事中药新药的研究工作, E-mail: rongfei526@yahoo.com.cn

[通讯作者] *袁秀荣, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究开发, E-mail: yuany@189.cn

为含量测定指标, 对独一味镇痛止血有效部位进行富集工艺研究。

独一味化学成分以环烯醚萜苷和黄酮类成分为主, 所以采用聚酰胺法, 可以将两类成分初步分离。再利用大孔吸附树脂富集总环烯醚萜苷。30%乙醇能洗脱下大部分的环烯醚萜苷类成分, 此结果与我们之前药理实验结果相吻合。佐证了环烯醚萜苷类成分为独一味药材中镇痛止血的主要有效部位。

独一味中的环烯醚萜类成分具有相似的结构, A 环结构相似, 一般 4 位有一 CO—取代, 所以采用

对二甲氨基苯甲醛法测定总环烯醚萜苷含量较为适合^[1]。

[参考文献]

- [1] 李茂星, 贾正平, 沈涛, 等. 分光光度法测定藏药独一味及其制剂中总环烯醚萜苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 45.
- [2] 钱大玮, 段金殿, 朱玲英, 等. HPLC 测定独一味中 Phlorigidioside C 的含量[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 549.

[责任编辑 全燕]