

· 制剂工艺 ·

吴茱萸汤大孔树脂精制工艺

王雅琚¹, 龚慕辛^{1*}, 王智民², 张启伟²

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100060)

[摘要] 目的: 研究大孔吸附树脂富集吴茱萸汤水煎液中 7 种有效成分的工艺条件。方法: 以柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷(Lcs)、人参皂苷 Re(Re)、人参皂苷 Rb₁(Rb₁)、吴茱萸内酯(Li)、姜辣素(6-Gi)、吴茱萸碱(Ev)、吴茱萸次碱(Ru)等 7 种成分为考察指标, 通过静态及动态吸附考察, 确定了筛选的树脂型号; 采用单因素实验考察了吸附时间、上样量与树脂体积比; 采用正交实验, 对工艺参数进行了优化。结果: 正交实验表明, 影响吴茱萸汤大孔树脂精制工艺的主要因素为径高比、上样药液浓度和乙醇浓度, 最佳工艺为径高比 1:4, 上样药液浓度 0.33 g/mL, 上样流速 0.1 倍柱体积/min, 60% 乙醇洗脱。结论: 吴茱萸汤中 7 种成分精制后含量保留 70% 以上, 其中 5 种成分保留 90% 以上, 用大孔树脂对吴茱萸汤水提液进行精制是合理可行的。

[关键词] 吴茱萸汤; 大孔树脂; 精制工艺; 有效成分

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0001-07

Study on Refining Technology of Wuzhuyu-tang by Macroporous Resin

WANG Ya-xin¹, GONG Mu-xin^{1*}, WANG Zhi-min², ZHANG Qi-wei²

(1. College of Pharmacy of Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100060, China)

[Abstract] Objective: To set up a proper technology of refining of the aqueous extract of Wuzhuyu-tang. **Method:** 7 kind components which had been improved to be absorbable pharmacological ingredients were chosen as index for refining. The static adsorption, dynamic adsorption and leakage curve experiments were done to choose a proper resin. By means of single-factor experiment and orthogonal experiment, the optimum refining conditions were found, such as adsorption time, proportion of sample weight and resin volume, proportion of diameter and height, concentration of decoction and eluent, flow rate, eluent volume and so on. **Result:** The AB-8 resin had the best separating efficiency when the content in the aqueous extract was 0.33g per 1mL equivalent to raw material, the ratio of dia-height was 1:4, and the volume of 60% ethanol as eluant 8BV with desorption-power 0.1BV/min. **Conclusion:** The content of 7 kind components were over 70% after refining, 5 of them were over 90%. It is concluded that the optimized extracting and refining technology is reasonable and feasible.

[Key words] Wuzhuyu-tang; macroporous resin; refining technology; effective substances

偏头痛为临床常见的特发性头痛, 是一侧或双侧发作性、搏动性的剧烈头痛。其患病率高, 易反复发作, 严重影响患者的生存质量, 因此研究开发治疗

偏头痛的中药已成为医药界的一个热点^[1]。吴茱萸汤治疗阳虚寒凝证所致偏头痛, 有效性和安全性已经得到了广泛认同。但吴茱萸汤煎液黏稠, 出膏量大, 为其后续制剂工艺带来困难, 拟采用大孔树脂对其进行精制, 在尽可能保留其药效成分的基础上, 去除杂质, 为新制剂研发提供保证。

1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪 (2695 分离单元,

[收稿日期] 2009-10-15

[基金项目] 国家十一五支撑计划项目(2006BAI08B03); 2007 年中医药行业科技专项项目(200707007 和 200707009)

[通讯作者] * 龚慕辛, Tel: (010) 83911626

Waters2996 二极管阵列检测器), Kromasil TC-C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250mm, 5 μm, Akzomobel 公司), 电子分析天平(型号 2004MP, Sartorius 公司), KQ-100E 型超声波清洗提取仪(昆山市超声仪器有限公司), 磁力搅拌器(上海雷磁新泾仪器有限公司), LD5-2A 离心机(国产), RE 5298A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SHZ-D 循环水式多用真空泵(巩义市予华仪器有限公司), 玻璃层析柱(1.2 cm, h30 cm), AB-8、NKA-9、NKA-12、D-101、DA-201 大孔树脂(洁净级 南开大学化工厂), HPD100 大孔树脂(河北沧州宝恩化工公司)。

柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷(Lcs, 自制, 纯度 95%)、人参皂苷 Re(Re, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110754-200217, 供含量测定用)、人参皂苷 Rb₁(Rb₁, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110704-200318, 供含量测定用)、吴茱萸内酯(Li, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110800-200404, 供含量测定用)、姜辣素(6-Gi, 自制, 纯度 98%)、吴茱萸碱(Ev, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110802-200505, 供含量测定用)、吴茱萸次碱(Ru, 购自中国药品生物制品检定所, 批号 110800-200504, 供含量测定用)。乙腈(美国 Dikma 公司, 色谱级), 甲醇(Tedia 公司, 色谱级), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

吴茱萸药材购于湖南九汇现代中药有限公司(批号为 050803), 鉴定为芸香科吴茱萸属 *Evodia nitaecarpa* (Juss.) Benth. 的果实, 样品保存在本实验室(WZY-0709); 人参药材购于吉林吉安, 大枣药材购于河南新郑, 样品保存在本实验室(RS-0803, DZ-0709); 生姜购自北京。以上药材经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 药液及供试品溶液的制备

2.1.1 药液的制备 称取吴茱萸 27 g, 人参(捣碎成 5~10 mm 小块) 27 g, 鲜生姜(切片) 54 g, 大枣(剪开) 32 g, 加水 1 000 mL, 浸泡 30 min, 水煎 15 min, 滤过, 残渣加 800 mL 水煎 12 min, 滤过, 合并药液, 减压浓缩至药液质量浓度为生药 0.23 g·mL⁻¹。

2.1.2 供试品溶液的制备 药液 15 mL 减压浓缩成膏, 加甲醇 20 mL 使溶解, 超声处理 20 min, 滤过。用 5 mL 甲醇分 3 次洗涤残渣及滤纸、滤器, 滤液置蒸发皿中水浴 80℃ 挥干。残渣用甲醇溶解, 转移至

5 mL 量瓶, 定容。

2.2 7 种药效成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 Kromasil TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Akzomobel 公司), 甲醇-乙腈-水梯度洗脱(表 1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 203 nm。

表 1 梯度洗脱时间-浓度表 /%

时间/min	甲醇	乙腈	纯水
0	1.0	16.0	83.0
20	1.0	16.0	83.0
25	1.0	19.0	80.0
35	4.0	25.0	71.0
45	4.0	32.0	64.0
115	4.0	32.0	64.0

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 Lcs, Re, Rb₁, Li, 6-Gi, Ev, Ru 对照品 10.6, 6.4, 8.1, 8.6, 3.2, 2.5, 3.0 mg, 置 7 个 2 mL 量瓶中, 以甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 配制成浓度分别为 5.3, 3.2, 4.0, 4.3, 1.6, 1.25, 1.5 mg·mL⁻¹ 的相应对照品贮备液。精密吸取 Lcs, Ev, Ru, Li 对照品贮备液适量, 稀释得到吴茱萸混合对照品溶液 aq1(浓度依次为 1.060, 0.250, 0.300, 1.720 mg·mL⁻¹), aq2(浓度依次为 0.053, 0.013, 0.015, 0.086 mg·mL⁻¹), aq3(浓度依次为 0.021, 0.005, 0.006, 0.034 mg·mL⁻¹)。精密吸取上述 Re, Rb₁ 对照品溶液适量, 稀释得到人参混合对照品溶液 aq4(浓度依次为 2.133, 1.333 mg·mL⁻¹); 精密吸取 aq4 对照品溶液稀释得到人参混合对照品溶液 aq5(浓度依次为 0.213, 0.133 mg·mL⁻¹); 精密吸取 aq4 稀释得到人参混合对照品溶液 aq6(浓度依次为 0.043, 0.027 mg·mL⁻¹)。精密吸取上述姜辣素对照品溶液 aq7 适量稀释得到姜辣素对照品溶液 aq8, aq9, 浓度为 0.160, 0.080 mg·mL⁻¹。

2.2.3 线性关系的考察 精密吸取吴茱萸混合对照品溶液 aq1, aq2, aq3 适量, 人参混合对照品溶液 aq4, aq5, aq6 适量, 姜辣素对照品溶液适量, 置高效液相色谱仪中测定峰面积。以进样量(mg)为横坐标, 各成分峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 见表 2。

2.2.4 精密度实验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL, 重复进样 5 次, 测定各成分峰面积积分值, 计算 RSD 值, 结果(见表 3)符合分析要求。

表 2 7 种成分线性关系考察

成分	回归方程	r	线性范围/mg
Lcs	$Y=4.3229 \times 10^9 X - 4.8086 \times 10^5$	0.9995	$1.10 \times 10^{-4} \sim 2.12 \times 10^{-2}$
Re	$Y=3.9338 \times 10^8 X + 1.8191 \times 10^5$	0.9994	$2.10 \times 10^{-5} \sim 4.26 \times 10^{-2}$
Rb ₁	$Y=3.4933 \times 10^8 X + 1.5820 \times 10^4$	0.9990	$1.30 \times 10^{-5} \sim 2.66 \times 10^{-2}$
Li	$Y=8.6697 \times 10^8 X - 6.0370 \times 10^4$	0.9998	$1.72 \times 10^{-4} \sim 3.44 \times 10^{-2}$
6-Gi	$Y=2.0284 \times 10^9 X + 1.9014 \times 10^5$	0.9998	$4.00 \times 10^{-4} \sim 3.20 \times 10^{-2}$
Ev	$Y=5.7117 \times 10^9 X + 9.7052 \times 10^4$	0.9995	$2.60 \times 10^{-5} \sim 5.20 \times 10^{-3}$
Ru	$Y=5.5840 \times 10^9 X + 4.5685 \times 10^4$	0.9991	$3.00 \times 10^{-5} \sim 6.00 \times 10^{-3}$

表 3 精密度试验

成分	RSD/%
Lcs	2.58
Re	1.88
Rb ₁	2.92
Li	2.21
6-Gi	2.01
Ev	2.67
Ru	2.56

2.2.5 稳定性实验 分别精密吸取同一样品供试溶液,于 0, 3, 6, 9, 12 h 进样,测定其各成分峰面积积分值,计算 RSD 值,结果(见表 4)符合分析要求。说明在 12 h 内结果稳定。

表 4 7 种成分测定稳定性

成分	RSD/%
Lcs	1.91
Re	0.44
Rb ₁	2.22
Li	1.66
6-Gi	1.94
Ev	1.90
Ru	2.70

2.2.6 重复性实验 精密称取样品 3 份,按供试品溶液制备方法制成供试品溶液,进行测定,计算 7 种指标成分平均含量的 RSD 值,结果(见表 5)符合分析要求。

表 5 7 种成分测定重复性试验

成分	RSD/%
Lcs	1.27
Re	0.93
Rb ₁	0.61
Li	1.13
6-Gi	2.71
Ev	2.67
Ru	1.10

2.2.7 加样回收率实验 称取已知含量的洗脱液浓缩得到的半成品浸膏 6 份,每份 0.45 g,精密称定,分别加入 7 种对照品适量,照供试品溶液制备方

法制成供试品溶液,按上述条件测定其含量,计算回收率,结果(见表 6~12)符合分析要求。

表 6 Lcs 加样回收

No.	称样量/g	样品含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.4507	1.8249	3.5431	97.74	95.44	2.94
2	0.4520	1.8302	3.5544	97.91		
3	0.4503	1.8233	3.3202	91.63		
4	0.4506	1.8245	3.3410	92.18		
5	0.4503	1.8233	3.5114	96.91		
6	0.4597	1.8614	3.5241	96.25		

注:Lcs 加入量 1.8 mg。

表 7 Re 加样回收

No.	称样量/g	样品含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.4507	10.2133	18.7412	92.72	93.02	2.99
2	0.4520	10.2428	18.7961	92.85		
3	0.4503	10.2043	19.7183	97.59		
4	0.4506	10.2111	17.9587	88.86		
5	0.4503	10.2043	18.8588	93.34		
6	0.4597	10.4173	18.9382	92.76		

注:Re 加入量 10.0 mg。

表 8 Rb₁ 加样回收

No.	称样量/g	样品含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.4507	11.2949	20.1752	90.49	91.34	1.24
2	0.4520	11.3275	20.4062	91.39		
3	0.4503	11.2849	20.1481	90.41		
4	0.4506	11.2924	20.7884	93.25		
5	0.4503	11.2849	20.1615	90.47		
6	0.4597	11.5205	20.7165	91.99		

注:Rb₁ 加入量 11.0 mg。

表 9 Li 加样回收

No.	称样量/g	样品含量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.4507	7.0402	13.7381	97.85	96.42	2.17
2	0.4520	7.0605	13.8697	98.64		
3	0.4503	7.0340	13.7326	97.85		
4	0.4506	7.0386	13.3570	95.14		
5	0.4503	7.0340	13.0660	93.10		
6	0.4597	7.1808	13.6059	95.94		

注:Li 加入量 7.0 mg。

表 10 6-Gi 加样回收

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.450 7	4.023 643	7.758 9	96.70	94.30	2.35
2	0.452 0	4.035 249	7.452 6	92.75		
3	0.450 3	4.020 072	7.681 5	95.78		
4	0.450 6	4.022 75	7.580 6	94.49		
5	0.450 3	4.020 072	7.651 1	95.40		
6	0.459 7	4.103 991	7.350 3	90.70		

注: 6-Gi 加入量 4.0 mg。

表 11 Ev 加样回收

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 %	RSD %
1	0.450 7	0.290 9	0.568 4	96.20	95.57	2.71
2	0.452 0	0.291 7	0.574 3	97.06		
3	0.450 3	0.290 6	0.569 1	96.35		
4	0.450 6	0.290 8	0.571 4	96.71		
5	0.450 3	0.290 6	0.571 6	96.78		
6	0.459 7	0.296 7	0.539 0	90.33		

注: Ev 加入量 0.3 mg。

表 12 Ru 加样回收

No.	称样量 /g	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.450 7	2.651 3	4.826 6	91.91	91.36	1.68
2	0.452 0	2.659 0	4.778 1	90.86		
3	0.450 3	2.649 0	4.777 0	91.01		
4	0.450 6	2.650 8	4.848 5	92.34		
5	0.450 3	2.649 0	4.661 5	88.81		
6	0.459 7	2.704 3	4.946 0	93.25		

注: Ru 加入量 2.6 mg。

2.3 树脂的预处理 6 种型号的新大孔树脂 (D-101, AB-8, NKA-9, NKA-12, DA-201, HPD100), 以 10 倍量 95% 乙醇回流 1 h, 分别装层析柱, 蒸馏水洗至无醇味、蒸干后无残留物, 备用。

2.4 树脂型号的筛选 经过查阅文献资料, 结合生产实际经验^[2], 确定筛选的树脂种类。其中非极性 2 种 (HPD100, D-101), 弱极性 1 种 (AB-8), 极性 3 种 (NKA-9, NKA-12, DA201)。

2.4.1 静态吸附的考察 分别取处理好的各型号树脂 2.0 g, 置具塞锥形瓶中, 加入水使其充分溶胀, 再精密加入 20 mL 吴茱萸汤药液 (0.2 g·mL⁻¹), 磁力搅拌 15 min, 静置过夜 (约 12 h), 弃去汤液, 以 25

mL 水清洗树脂, 待树脂沥干, 加入 95% 乙醇 20 mL 回流 30 min, 滤过, 滤液定容至 25 mL, 各取 5 mL 滤液于蒸发皿中水浴挥干, 加甲醇 20 mL 超声处理 20 min, 过滤, 滤液挥干, 甲醇溶解并定容至 5 mL, 过滤测定含量, 比较 6 种型号大孔树脂吸附容量。综合评分为 7 种成分吸附率之和除以 7, 吸附率的计算公式如下:

$$\text{吸附率} = \frac{\text{95\% 乙醇洗脱出的各成分含量}}{\text{上样水煎液中各成分含量}} \times 100\%$$

结果见表 13。

表 13 6 种大孔树脂静态吸附 7 种成分吸附率 /%

指标成分	非极性		弱极性	强极性		
	HPD100	D-101	AB-8	NKA-9	NKA-12	DA-201
Lcs	30.51	41.86	53.99	37.59	37.83	25.03
Re	6.93	8.41	9.35	6.43	4.77	7.96
Rb ₁	17.65	18.73	16.70	11.77	11.54	0.00
Li	16.66	18.08	16.88	12.19	12.68	7.52
6-Gi	9.59	14.74	1.28	1.12	9.89	3.50
Ev	15.66	19.16	44.40	27.68	10.94	5.45
Ru	1.24	1.36	2.13	1.85	1.52	0.97
综合评分	14.03	17.48	20.68	14.09	12.74	7.20

结果表明, 6 种树脂中综合评分最高的是弱极性大孔树脂 AB-8, 其次是大孔树脂 D-101, NKA-9, HPD100, NKA-12, DA-201, 由于 DA-201 型大孔树脂综合评分较低, 且对 Rb₁、Ru 吸附效果不理想, 故淘汰 DA-201 型大孔树脂, 采用前 5 种树脂进行动态吸附考察。

2.4.2 动态吸附的考察 取 5 根同样规格的层析柱, 每根各装一种树脂 6 mL, 取复方提取液 (0.23 g·mL⁻¹) 各 30 mL, 分别上样, 上样流速 0.1 倍柱体积·min⁻¹, 先用水 (约 180 mL) 洗脱, 至流出液 Molish 反应阴性, 再依次用 10%, 30%, 50%, 95% 的乙醇各 30 mL 洗脱, 分别收集各部分洗脱液, 减压蒸干后用甲醇 20 mL 超声处理 20 min, 过滤, 滤液挥干, 甲醇并定容至 5 mL, 过滤测定含量, 比较 5 种型号大孔树脂吸附 - 洗脱转移率, 综合评分为 7 种成分转移率之和除以 7。转移率的计算公式如下:

$$\text{转移率} = \frac{\text{各成分不同浓度乙醇洗脱量之和}}{\text{各成分在上样水煎液中含量}} \times 100\%$$

结果见表 14。

由表 14 可知, AB-8 和 NKA-9 两种树脂对 7 种成分的动态吸附效果较好, D-101 对 Ru 动态吸附效

果差, 综合考虑动、静态吸附结果, 选择了 AB-8 和 NKA-9 两种树脂进行进一步考察。从洗脱溶剂看, 各树脂均以 50% 乙醇洗脱效果最好。

表 14 5 种大孔树脂动态吸附 7 种成分转移率及综合评分 /%

成分	D-101	AB-8	NKA-9	NKA-12	HPD100
Lcs	22.57	31.23	18.62	14.74	12.56
Re	9.12	26.86	8.14	7.49	5.86
Rb ₁	2.75	1.56	13.58	18.44	5.92
Li	3.29	12.41	9.21	8.58	5.56
6-Gi	1.19	1.06	18.34	16.63	4.91
Ev	36.36	75.30	1.79	3.29	0.23
Ru	—	5.28	0.81	0.80	4.68
综合评分	10.75	21.96	10.07	10.00	5.67

2.4.3 AB-8 和 NKA-9 泄漏曲线的考察 各取 15 mL 处理好的树脂分别装入两根相同的层析柱, 加入药液, 上样流速为 6 BV·h⁻¹, 每 5 mL 收集 1 瓶, 共上样 70 mL, 处理同上, 测定含量。结果见图 1。纵坐标为泄漏百分率, 横坐标为收集份数。

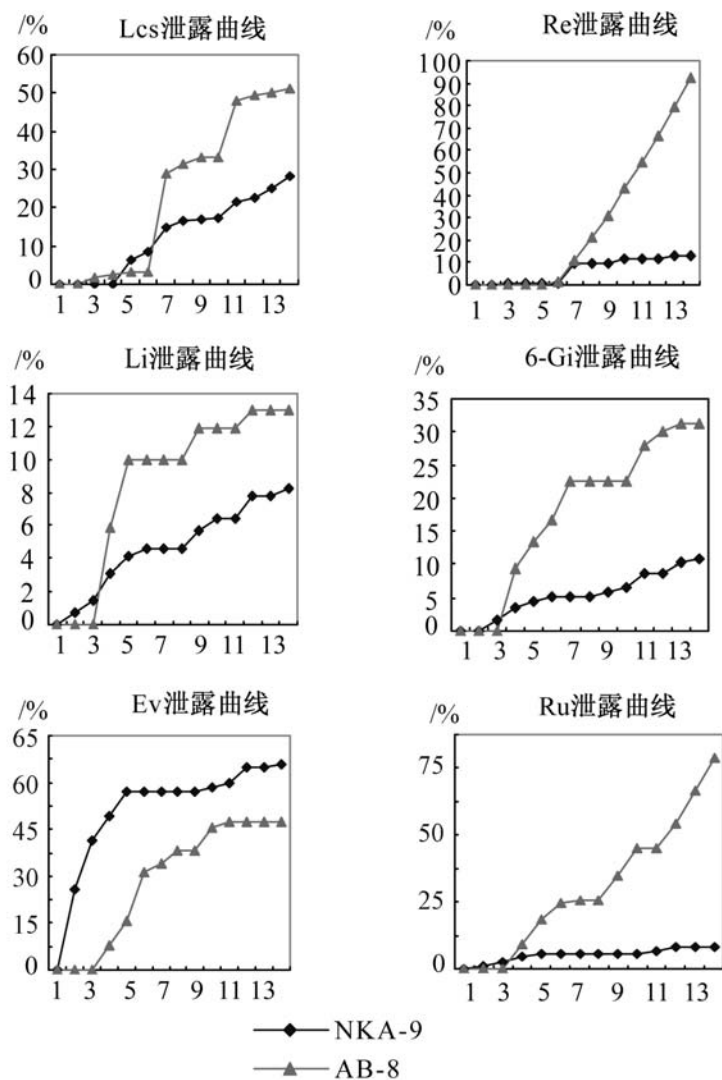


图 1 AB-8 和 NKA-9 型大孔树脂对 Lcs, Re, Li, 6-Gi, Ev 和 Ru 的泄漏曲线

综上所述, AB-8 型大孔树脂与 NKA9 型大孔树脂对于 6 种成分的泄漏点基本相近, AB-8 型大孔树脂略优于 NKA-9 型, 故采用 AB-8 型大孔树脂对吴茱萸汤药液进行精制并进行工艺的优化。

2.5 AB-8 型大孔树脂分离富集条件优化

2.5.1 正交实验对工艺参数的优化 设计的 L₉(3⁴) 的正交实验因素水平表(见表 15), 对树脂的径高比(A)、上样复方提取液浓度(B), 上样流速(C), 洗脱剂浓度(D) 4 个因素进行了考察, 收集各洗脱液, 以 7 种成分洗脱率为考察指标, 平行实验 3 次, 实验结果见表 16, 对每组数据的综合评分进行方差分析见表 17, 各水平优选综合评分的 K 值见表 18。

表 15 AB-8 型大孔树脂优化工艺正交实验因素水平表

水平因素	A	B	C	D
	径高比 /cm cm	上样浓度 /g·mL ⁻¹	上样流速 /柱体积倍数·min ⁻¹	洗脱液乙醇体积分浓度 /%
1	1 4	0.23	0.05	40
2	1 6	0.11	0.1	50
3	1 1	0.33	0.15	60

表 16 正交实验结果各组洗脱率平均值 (n=3) /%

编号	Lcs	Re	Rb ₁	Li	6-Gi	Ev	Ru
1	62.51	95.68	22.57	30.62	34.89	37.37	15.32
2	70.74	92.85	25.24	24.36	26.23	33.79	16.94
3	74.98	72.63	28.01	84.92	83.59	45.95	70.32
4	27.99	81.76	19.33	84.34	69.17	34.33	48.64
5	27.93	49.28	8.48	19.63	26.25	1.72	10.69
6	29.92	58.65	67.66	76.26	71.12	51.67	33.72
7	44.26	78.15	12.80	46.96	56.40	8.47	34.92
8	31.85	88.36	14.97	63.23	75.15	34.29	47.34
9	43.68	79.15	30.81	78.29	77.77	46.67	45.99

表 17 方差分析表

方差来源	f	SS	MS	F
A	2	331.061	165.531	29.499 ¹⁾
B	2	2120.351	1060.176	188.931 ¹⁾
C	2	415.237	207.618	36.999 ¹⁾
D	2	1168.371	584.185	104.106 ¹⁾
总误差	18	101.006	5.611	

$F_{0.05}(2, 18) = 3.55, F_{0.01}(2, 18) = 6.01, ^1) P < 0.01$

表 18 AB-8 型大孔树脂优化工艺正交实验洗脱率综合评分 K 值

水平	A	B	C	D
1	<u>49.98</u>	45.07	49.67	40.25
2	42.79	37.59	<u>50.38</u>	45.77
3	49.50	<u>59.61</u>	42.21	<u>56.25</u>

实验结果表明, 因素 A(径高比), B(上样药液浓度), C(上样流速), D(乙醇浓度) 具有显著性差异, 最佳工艺为径高比 1 4, 上样药液浓度 0.33 g·

mL^{-1} , 上样流速 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 60% 乙醇洗脱。按最佳工艺重复实验, 各成分吸附 - 洗脱转移率(见表 19) 高于表 17 中数值。

表 19 最佳工艺重复实验中各成分转移率 /%

	Lcs	Re	Rb ₁	Li	6-Gi	Ev	Ru
转移率	91.45	97.14	85.94	91.71	73.22	69.94	76.55

2.5.2 洗脱剂用量的考察 取层析柱, 装入树脂, 按照正交设计的最佳工艺上样, 先用 15 BV 水洗脱, 再用 60% 乙醇洗脱, 每 1 BV 收集 1 份, 共收集 8 份, HPLC 法测定每份中各成分的峰面积, 绘制洗脱曲线, 如图 2。纵坐标为峰面积, 横坐标为加入洗脱液的体积。

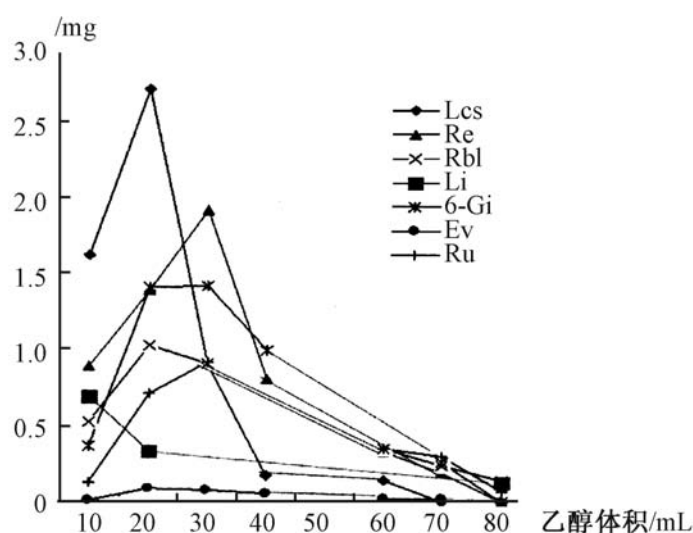


图 2 洗脱剂用量与洗脱各成分含量关系图

由图 2 可知, 用 60% 乙醇 80 mL 洗脱后, 7 种成分已基本被洗脱完全。继续洗脱, 每份中各成分含量都非常少, 耗费溶剂。故确定用 60% 乙醇洗脱 8 BV。

2.6 树脂分离富集参数优选结果 通过以上对 AB-8 型树脂进行上样量、洗脱溶剂、柱床径高比、上样液浓度、吸附流速及洗脱体积等参数的考察与结果分析, 最终确定最佳树脂分离富集 7 种成分工艺为: 上样量与树脂体积比为 1:3 (由 2.4.3 池点折算得出), 上样液质量浓度为 $0.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 柱径高比为 1:4, 8 BV 60% 乙醇洗脱, 流速为 $6 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。乙醇洗脱前用 15 BV 的水洗脱除杂。

2.7 最终工艺验证 按上述确定的最佳工艺进行验证试验, 结果干膏得率为 3%。以 HPLC 法测定各成分的吸附 - 洗脱转移率, 结果见表 20。

由表 20 可知, 吴茱萸汤中 7 种成分精制后含量保留均在 70% 以上, 其中 Lcs, Re, Rb₁, 6-Gi, Ru 5 种成分保留 90% 以上, 说明采用大孔树脂对吴茱萸汤水提液进行精制是合理可行的。

表 20 工艺验证各成分吸附、洗脱、转移率 /%

	吸附率	洗脱率	转移率
Lcs	95.29	96.30	91.78
Re	98.61	98.38	96.99
Rb ₁	96.45	94.74	91.36
Li	92.28	94.91	87.59
6-Gi	97.42	93.48	91.15
Ev	95.55	77.33	73.48
Ru	97.75	95.83	93.53

3 讨论

通过查阅吴茱萸汤及其中各成分的化学、药理研究、药物动力学文献资料, 发现吴茱萸在方中发挥最主要的药效, 其中 Ev, Ru, Li 3 种成分可以吸收入血, 本课题前期研究发现其中的黄酮类成分 Lcs 也可以吸收入血; 人参中的人参皂苷 (Re, Rb₁) 和生姜中的辛辣成分 (6-Gi) 也均能吸收, 7 种成分治疗偏头痛各病理环节的药理作用机制相对清楚。基于入血成分有可能是有效成分的观点, 认为它们是吴茱萸汤中的有效成分, 故以其作为优选吴茱萸汤精制工艺的检测指标。

吴茱萸汤虽为临床常用方药, 药味简单, 但成分复杂, 极性大小各不相同, 在选择树脂时需要兼顾极性强的成分。在性能方面, AB-8 为弱极性树脂, 表面兼有疏水和亲水两部分, 既可从极性溶剂中吸附非极性物质, 又可由非极性溶剂中吸附极性物质, 因其孔径较小, 具有较高的比表面积, 故又可以同时靠物理作用吸附吴茱萸汤中对偏头痛有效的成分, 这可能是使用它有较好效果的原因。

在考察上样生药量与树脂体积比的同时, 考察了不同除杂方式, 即在药液吸附 45 min 后, 分别用 15 BV 水, 2 BV 10% 乙醇, 3 BV 10% 乙醇洗脱时各成分的流失率。实验结果证明, 15 BV 水与 2 BV 10% 乙醇除杂效果近似, 且各有效成分流失率更低, 故最终选择用 15 BV 水对吸附药液后的大孔树脂进行除杂。

[参考文献]

- [1] 步怀恩, 王建华, 王泓午. 偏头痛流行病学特点[J]. 天津中医药大学学报, 2006, 25(2): 82.
- [2] 孙彩华, 陈水英. 大孔吸附树脂在中药有效成分研究中的应用[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(3): 205.