

• 制剂工艺 •

冠心 II 号方水煎液纯化工艺方法比较

王锦玉¹, 冯伟红¹, 全燕^{1*}, 闫家福¹, 王智民¹, 朱晓新¹, 李连达²

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的: 探讨冠心 II 号方水煎液纯化工艺方法。方法: 以除杂率、丹酚酸 B 等 4 种指标成分的含量为指标, 对水煎液分别采用离心、醇沉、超滤膜过滤、澄清剂沉淀、大孔吸附树脂分离 5 种纯化工艺进行了比较研究。结果与结论: 大孔吸附树脂分离法除杂率明显优于其它 4 种纯化方法, 并可保留绝大部分有效成分。

[关键词] 冠心 II 号; 纯化工艺; 大孔吸附树脂; 丹酚酸 B; 芍药苷; 阿魏酸; 羟基红花黄素 A

[中图分类号] R286.3 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)06-0014-03

Comparative Studies on the Purifying Conditions of the Elixation of the Guanxi II decoction

WANG Jin-yu¹, FENG Wei-hong¹, TONG Yan^{1*}, YAN Jia-fu¹, WANG Zhi-min¹,
ZHU Xiao-xin¹, LI Lian-da²

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;
2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the purifying conditions for the elixation of the Guanxi II decoction(GX- II). **Methods:** Using the removal rate and the content of Salvianolic acid B and 3 other active ingredients as indexes. The purification of the elixation of the Guanxi II decoction with 5 different conditions were compared, such as overspeed centrifugal, alcohol sedimentation, ultrafiltration membrane filtering, clarifier flocculation, and macroporous resin purifying etc. **Result and Conclusion:** The method of macroporous resin purification is superior to the other purification methods because it can reserve most parts of the active ingredients.

[Key words] Guanxin II; purifying technologic conditions; macroporous resin; salvianolic acid B; paeoniflorin; ferulic acid; hydroxymethyl-Safflor yellow A

冠心 II 号方由丹参 16 g, 川芎 8 g, 红花 8 g, 赤芍 8 g, 降香 5.3 g 组成, 具有调节血液循环功能, 增加冠脉血流量及心肌营养血流量, 改善血液流变性、血凝状态及血小板功能, 预防血栓形成及动脉粥样硬化, 对垂体后叶素诱发的心肌缺血有明显保护作用。

但冠心 II 号方水煎剂服用量较大, 患者不方便。本文以冠心 II 号方中的多个化学成分及干浸膏得率为指标, 对水煎液进行了精制纯化工艺的研究, 为进一步研究开发冠心 II 号方的适宜剂型打下良好的基础。

1 仪器与试剂

Alliance Waters 高效液相色谱仪, 2695 分离单元, 2996 二极管矩阵检测器, 1515 单元泵, 2487 双波长紫外检测器, 717 自动进样器, Empower² 色谱工作站。色谱柱: Kromasil C₁₈ 4.6 mm × 250 mm, 5 μm。低

[收稿日期] 2007-03-14

[基金项目] 国家 973 项目-冠心二号配伍规律研究
(2005CB523400)

[通讯作者] * 全燕, Tel(010) 84027721

温离心机(德国, K80型), 中空纤维超滤器(北京潞美分离应用技术研究), 蠕动泵(日本, MILLIPORE公司)。

水为高纯水, 乙腈、甲醇为优级纯, 其他试剂均为分析纯。101果汁澄清剂(上海市徐汇区华逊应用生物化学研究所), HPD-100大孔吸附树脂(河北沧州市宝恩化工有限公司)。

对照品丹酚酸 B(批号: 111562-200504)、芍药苷(批号: 110736-200629) 阿魏酸(批号: 0773-9910)、羟基红花黄色素 A(批号: 111637-200503) 均购于中国药品生物制品检定所, 供含量测定用。

药材丹参, 产山东临沂; 川芎, 四川都江堰; 红花, 河南商丘; 赤芍, 内蒙古多伦; 降香, 海南。含量测定结果: 丹参: 丹酚酸 B 7.81%, 丹参酮 II A 0.28%、川芎: 阿魏酸 0.124%、赤芍: 芍药苷 5.09%、红花: 羟基红花黄色素 1.60%。

2 提取及纯化方法

2.1 水煎样品溶液的制备 参考常规临床煎煮方法, 取药材饮片丹参 96 g, 川芎 48 g, 赤芍 48 g, 红花 48 g, 降香 32 g, 加 10.8 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1 h, 滤过, 放至室温, 定容至 4 080 mL。均分 6 份。原液为样品 ①。

2.2 离心除杂法 取水煎样品溶液 780 mL(52 g 生药), 水浴浓缩至 52 mL, 放至室温, 离心(3 000 rpm) 20 min, 取上清液, 加水定容至 100 mL。为样品 ②。

2.3 醇沉除杂法 取水煎样品溶液 780 mL, 水浴浓缩至 52 mL, 加 95% 乙醇 113 mL, 使醇浓度为 65%, 混匀, 放置过夜, 滤过, 沉淀用 20 mL 65% 乙醇分 2 次洗涤, 滤过, 合并滤液, 回收乙醇, 放至室温, 加水定容至 100 mL。为样品 ③。

2.4 澄清剂除杂法 取水煎样品溶液 780 mL, 水浴浓缩至 52 mL, 加入 1% 101 澄清剂 50 mL, 混匀, 冰箱冷藏 12 h。抽滤, 以少量水洗涤滤器, 合并滤液, 水浴浓缩至约 80 mL, 放至室温, 加水定容至 100 mL。为样品 ④。

2.5 膜过滤除杂法 取水煎样品溶液 780 mL, 离心(3 000 rpm) 20 min, 取上清液, 用蠕动泵通过中空纤维超滤器滤过, 截流分子量为 5 000, 加 200 mL 分 4 次反复洗涤剩余不能通过的浓液及中空超滤柱, 超滤后药液水浴浓缩至约 80 mL, 放至室温, 加水定容至 100 mL。为样品 ⑤。

2.6 大孔树脂除杂法 取水煎样品溶液 780 mL, 通

过 HPD-100 型大孔树脂 100 g 柱, 流速 3 mL/min, 加 500 mL 水洗, 流出液弃去, 用 60% 乙醇 500 mL 洗脱树脂柱, 收集洗脱液, 回收乙醇约 80 mL, 放至室温, 加水定容至 100 mL。为样品 ⑥。

3 含量测定方法

参考 2005 年版药典法^[1], 建立了丹酚酸 B、阿魏酸、芍药苷、羟基红花黄色素 A 的含量测定方法(方法学研究另文发表)。

3.1 丹酚酸 B 的含量测定

3.1.1 供试品溶液制备 样品 2.1, 2.2~ 2.6, 分别精密吸取 1.0 mL, 0.1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入高纯水定容至刻度, 摇匀后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 备用, 作为供试品溶液。

3.1.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的丹酚酸 B 对照品 1.07 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得, 作为供试品溶液(0.107 mg/mL)。

3.1.3 色谱条件 波长 286 nm, 流动相: 乙腈-水-磷酸(25: 75: 0.3), 1 mL/min。进样量: 对照品 10 μL, 样品 10 μL。

3.2 羟基红花黄色素 A 含量测定

3.2.1 供试品溶液制备 样品 2.1, 2.2~ 2.6, 分别精密吸取 1.0 mL, 0.1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加高纯水稀释至刻度, 摇匀后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 备用, 作为供试品溶液。

3.2.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的羟基红花黄色素 A 对照品 1.6 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 20% 甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 20% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得, 作为对照品溶液。(0.003 2 mg/mL)。

3.2.3 色谱条件 波长 403 nm, 流动相: 甲醇-乙腈-0.7% 磷酸水溶液(26: 2: 72), 1 mL/min。进样量: 对照品 10 μL, 供试品 20 μL。

3.3 芍药苷含量测定

3.3.1 供试品溶液制备 样品 2.1~ 2.6, 分别精密吸取 0.1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 备用, 作为供试品溶液。

3.3.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的芍药苷对照品 1.7 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得, 作为对照品溶液。(0.17 mg/mL)

3.3.3 色谱条件 波长 230 nm, 流动相: 甲醇-0.05

mol/L 磷酸二氢钾水溶液(38:62), 1 mL/min。进样量: 对照品 10 μL, 样品 10 μL。

3.4 阿魏酸含量测定

3.4.1 供试品溶液制备 样品 2.1, 2.2~ 2.6, 分别精密吸取 2.0 mL, 0.1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加高纯水稀释至刻度, 摇匀后, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 备用, 作为供试品溶液。

3.4.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒重的阿魏酸对照品 1.225 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 精密吸取 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得, 作为供试品溶液(0.0049 mg/mL)。

3.4.3 色谱条件 波长 321 nm, 流动相: A. 乙腈, B. 1% 冰醋酸水溶液, C. 1% 冰醋酸甲醇溶液, 线性梯度, 进样量: 对照品 10 μL, 样品 25 μL。

时间 min	A	B	C
0	15	85	0
25	0	60	40
40	0	60	40

结果各样品液中均未检出丹参酮 IIA, 其余成分含量见表 1。

表 1 不同汤剂纯化方法比较(mg/mL)

纯化方法	干膏得率	相对除杂率(%)	丹酚酸 B	羟基红花黄色素 A	芍药苷	阿魏酸
原液	194.1	0	6.475	0.117	3.61	0.010
离心	173.8	10.46	6.312	0.096	3.388	0.007 92
醇沉	153.3	21.02	6.458	0.097	3.565	0.008 29
澄清剂	165.6	14.68	4.764	0.081	3.056	0.006 26
膜过滤	152.0	21.69	4.103	0.096	3.193	0.007 03
大孔树脂	25.5	86.86	5.274	0.031	3.446	0.006 51

注: 每 100 mL 含生药量为 52 g。

结果表明: 复方冠二汤剂采用浓缩离心、醇沉、澄清剂、膜分离、大孔吸附树脂的 5 种精制除杂方法, 除杂效果大孔树脂法明显优于其他方法, 干膏得率下降明显, 相对未精制时的除杂率为 87%, 芍药

苷含量基本未下降, 丹酚酸 B、阿魏酸含量稍有降低, 但羟基红花黄色素含量明显下降(降低 2/3), 离心、醇沉、澄清剂、膜过滤的精制方法除杂效果不理想, 仅能除掉 10%~20% 的杂质。

4 讨论

冠心 II 号抗心肌缺血活性最强的部位为水溶性成分, 且全方合煎液对犬心肌缺血有明显的保护作用, 对心脏血流动力学有很好的调节作用, 快而持久, 明显优于五药单煎后再混合在一起的药液, 并且合煎液中君药丹参的主要有效成分——丹酚酸 B 是含量明显高于单煎^[1]。合煎液再精制, 可减小服用剂量, 制成合理的剂型, 有利于患者服用。比较 5 种分离纯化方法, 离心除杂法是中医临床常用的水煎液除杂方法, 方法简单, 成本较低, 有效成分保留率高, 但除杂效果最差, 本方仅减小了 10% 的服用量。醇沉法是制备中成药中最常用的工业化除杂方法, 本方可以降低约 20% 的服用量, 有效成分保留率高, 但工艺相对复杂, 步骤多, 成本较高, 由于需 2 次加热浓缩, 不利于热敏性成分的保留。澄清剂法和膜过滤法除杂效果和有效成分保留率都不是十分理想, 膜过滤后的溶液颜色浅, 澄明好, 适合于制备口服液等剂型。大孔树脂分离纯化工艺条件的确定参考了“冠心 II 号二次开发”(国家“九五”攻关) 课题的研究成果, 选用的 HPD-100 型树脂优于原工艺 AB-8 型树脂, 树脂用量为生药量的 2 倍, 丹酚酸 B、芍药苷、阿魏酸等成分基本无泄漏, 但对红花中的成分羟基红花黄色素 A 的吸附较差, 含量下降了约 2/3。大孔树脂分离纯化效果最好, 服用量降低了 87%。日服用量(45.3 g 生药) 仅为约 2 g, 为进一步开发新剂型提供了较大的空间。

[参考文献]

[1] 全燕, 王锦玉, 冯伟红, 等. 冠心 II 号方单煎与合煎对主要有效成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 1-3.