

• 制剂工艺 •

利咽含片醇沉工艺的优选

蔡 鹰^{1,2*}, 丁安伟¹

(1. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210029; 2. 解放军第四五四医院, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的: 优选利咽含片的醇沉工艺, 方法: 高效液相色谱(HPLC)法, 分光光度比色法, 以提取物中绿原酸、黄芩苷、甘草酸, 沉淀物中多糖为观察指标, 结果: 以绿原酸等指标性成分计, 以 70% 醇沉保留最多, 50% 醇沉次之。以多糖计, 以 50% 醇沉工艺保留最多, 70% 醇沉次之, 结论: 用 70% 乙醇沉淀两次为优选出的工艺。

[关键词] 利咽含片; 醇沉工艺优选; 高效液相色谱法; 绿原酸; 黄芩苷; 甘草酸; 多糖; 分光光度比色法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0016-03

复方桔梗袋泡茶是我院开发的治疗急慢性咽炎的中成药袋泡剂, 由金银花、甘草、桔梗、木蝴蝶等药组成, 具有清热、养阴、祛痰、利咽功效, 拟制成利咽含片。以前我们对提取工艺进行了优化, 确立了工艺条件为煎煮 3 次, 加 10 倍量水, 每次煎煮 1 h。本实验主要讨论水提取后醇沉工艺中酒精浓度的选择。由于是制备口含片, 对口感和含药量要求相对较高, 根据预试验, 用离心的方法或加吸附澄清剂的方法去除杂质效果均不很理想, 所以采用酒沉方法。通过预试验, 用 50% 酒精浓度以下沉淀显困难, 所以, 对 50%, 60%, 70% 醇沉工艺进行优选。

1 仪器与试剂

仪器: UV-265 日本岛津分光光度计; LC-10AT 岛津高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外-可见检测器, N2000 色谱工作站。

药材: 购自亳州市中药材公司 绿原酸(中国药品生物制品检定所) 110753-200212; 甘草酸(安徽 DELTA 天然有机化合物信息中心); 黄芩苷(中国药品生物制品检定所) 110715-200413; 木犀草素(中国药品生物制品检定所) 111520-200201; 次野鸢尾黄素(中国药品生物制品检定所) 1157-200101; D-无水葡萄糖(中国药品生物制品检定所, 110833-200302) 甲醇, 乙腈为色谱纯, 其余为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Pro. No

IC18254F, Media 10 nm 5 μ m (4.6 mm \times 250 mm), Hanbon Science & Technology Co., Ltd, 流动相: A: 1% 醋酸乙腈, B: 1% 醋酸水溶液。

洗脱方法: 1. A-B(0.5: 99.5 \rightarrow 10: 90), 25 min 线性梯度, 2. A-B(10: 90 \rightarrow 25: 75), 50 min 线性梯度, 3. A-B(25: 75 \rightarrow 40: 60), 15 min 线性梯度, 4. A-B(40: 60 \rightarrow 50: 50), 10 min 线性梯度, 5. A-B(50: 50) 保持 10 min, 流速: 1 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 检测波长: 254 nm。理论板数按绿原酸计算应不低于 3 000, 按黄芩苷计算应不低于 10 000, 按甘草酸计算应不低于 15 000。

2.2 绿原酸、黄芩苷、甘草酸线性关系考察 精密称取绿原酸对照品 23.8 mg, 黄芩苷对照品 13.4 mg, 置 50 mL 量瓶甲醇定容至刻度, 另取甘草酸对照品 7.0 mg, 木犀草素 7.7 mg, 次野鸢尾黄素 4.2 mg, 置 50 mL 量瓶甲醇定容至刻度, 前后两个量瓶各取 10 mL 置 25 mL 量瓶, 共 20 mL 混匀, 精密吸取 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 分别至 5 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 分别精密吸取 20 μ L, 在上述色谱条件下, 注入液相色谱仪, 测定。重复 2 次, 测定绿原酸等的峰面积值, 以绿原酸峰面积值和浓度进行回归处理得回归方程: $Y = 1\,889.3X + 135.61$; 相关系数 $r = 0.999\,3$; 线性范围 11.90 μ g/mL \sim 190.4 μ g/mL; 以黄芩苷峰面积值和浓度进行回归处理得回归方程: $Y = 703.33X + 11.243$; 相关系数 $r = 0.999\,4$; 线性范围 6.70 μ g/mL \sim 107.2 μ g/mL; 以甘草酸峰面积值和浓度进行回归处理得回归方程: $Y = 4\,648.4X + 1.941\,2$; 相关系数 $r = 0.999\,0$; 线性范围 3.5 μ g/mL \sim 56.0 μ g/mL。

2.3 葡萄糖标准曲线的制备^[1] 干燥至恒重的葡

[收稿日期] 2006-05-30

[通讯作者] * 蔡鹰, Tel: (025) 80865307; E-mail: caiying 1967

126.com

葡萄糖对照品,精密称定,用蒸馏水溶解定容,使其浓度为0.862 mg/mL,精密吸取对照溶液1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,4.0 mL,分别置50 mL量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,各取1 mL分别置25 mL试管中,各加入9%苯酚溶液1 mL,摇匀,小心快速加入浓硫酸5 mL,摇匀后置于沸水浴中加热15 min,取出,冷却至室温,另取蒸馏水1 mL,加苯酚和硫酸,操作同上,为空白对照,用分光光度计于490 nm处测定吸光度,建立回归方程: $A = 0.0092C + 0.0702$, $r = 0.9534$,线性范围在17.2 μg ~69.0 μg 。

2.4 沉淀物样品液的制备和多糖含量测定 取水煎浓缩液(2.44 g 生药/mL, 50 °C时密度为1.26) 100 mL,分别缓慢加111, 171, 280 mL 95%乙醇,边加边振摇,离心,沉淀物再分别加不同浓度乙醇161(50%乙醇), 221(60%乙醇), 330 mL(70%乙醇),摇匀,离心,得1, 2, 3号沉淀物,另取水煎浓缩液20 mL,蒸干,用95%乙醇300 mL分数次提取,得4号沉淀物,再取水煎浓缩液50 mL,加蒸馏水50 mL,稀释1倍,再加95%乙醇使成50%沉淀2次,得5号沉淀物。取各沉淀物分别加200 mL蒸馏水,摇匀,各取10 mL分别置100 mL容量瓶,加蒸馏水至刻度,混匀,再各取1 mL分别置100 mL容量瓶,加蒸馏水至刻度,混匀。得1, 2, 3, 4, 5号样品。精密吸取各样品液1 mL,按标准曲线项下方法测定吸光度,根据回归方程,求得沉淀物中多糖的含量。见表1。

表1 100 mL 浓缩液各沉淀物中多糖的含量

醇沉条件	乙醇浓度(%)				
	95	50	60	70	50*
多糖含量(g)	21.84	3.38	5.87	3.99	5.16

* 水煎浓缩液以蒸馏水稀释1倍样品。

精密度试验 精密量取浓度为0.017 24 mg/mL葡萄糖对照液,按标准曲线上的操作方法,连续测定5次, $RSD = 1.3\%$, $n = 5$ 。

回收率试验 精密吸取3号样品液0.5 mL,再分别加入浓度葡萄糖对照液0.5 mL,依样品测定方法测定吸光度,计算回收率平均值为99.5%, $RSD = 1.9$, $n = 5$ 。

2.5 提取物样品的制备和绿原酸等的测定 分别合并2.3项下沉淀物样品液的制备中所得50%, 60%, 70%两次上清液,抽滤,分别得265, 365, 565 mL上清液,各取2 mL, 100 °C蒸干,甲醇溶解,定容至10 mL容量瓶,0.45微孔滤膜过滤,取续滤液,即

得供试品溶液。分别精密吸取20 μL ,在上述色谱条件下,注入液相色谱仪,测定。结果见表2,图1~4。

表2 100 mL 浓缩液各成分含量

酒沉浓度(%)	绿原酸含量(mg)	黄芩苷含量(mg)	甘草酸含量(mg)
50	326	257	31
60	146	147	35
70	351	314	45

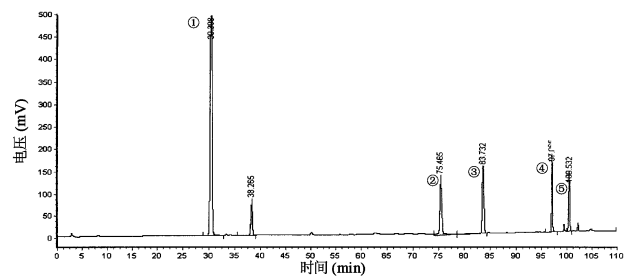


图1 混标 HPLC 图

1. 绿原酸; 2. 黄芩苷; 3. 木犀草素;
4. 甘草酸; 5. 次野鸢尾黄素

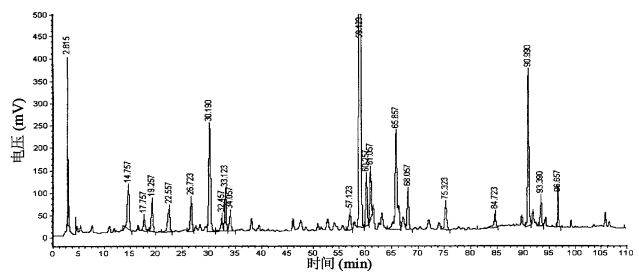


图2 50%乙醇沉淀后 HPLC 图谱

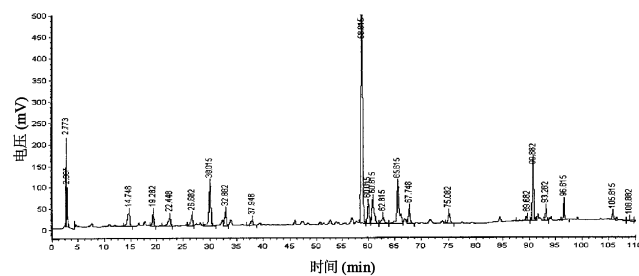


图3 60%乙醇沉淀后 HPLC 图谱

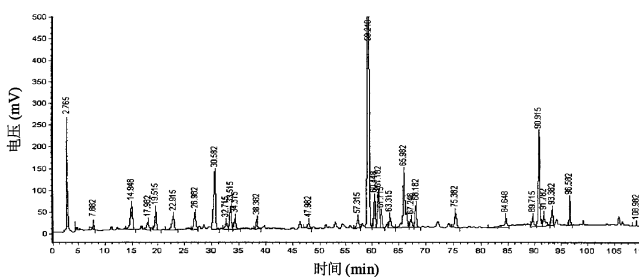


图4 70%乙醇沉淀后 HPLC 图谱

2.6 精密度试验 用浓度为47.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿原酸, 26.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芩苷, 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 甘草酸的混合对照品溶液连续进样5次,每次20 μL ,结果峰面积差异

较小, RSD= 0.8, 1.6, 2.1%。

2.7 重复性试验 取 70% 酒沉后上清液作供试液, 平行 5 份, 结果测得含量差异较小, 绿原酸、黄芩苷、甘草酸的平均含量依次为 351 mg ($n = 5$, RSD = 1.2%), 314 mg ($n = 5$, RSD = 1.7%), 45 mg ($n = 5$, RSD = 2.2%)。

2.8 稳定性试验 精密量取 20 μ L 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样, 测定峰面积计算含量, 绿原酸、黄芩苷和甘草酸的 RSD 依次为 1.7%, 2.3%, 2.0%。说明样品稳定性好。

2.9 加样回收试验 取 70% 酒沉后上清液作供试液 5 mL, (绿原酸 0.621 3 mg/mL, 黄芩苷 0.555 8 mg/mL, 甘草酸含量为 0.079 7 mg/mL), 再精密称取绿原酸 3.1 mg, 黄芩苷 2.8 mg, 甘草酸 4.0 mg (稀释 10 倍, 取 1 mL 用), 加入 5 mL 供试液中, 水浴 100 $^{\circ}$ C 蒸干, 甲醇分 3 次溶解, 抽滤, 定容至 50 mL 容量瓶。微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作供试液, 平行 6 份。平均回收率绿原酸为 100.3%, 黄芩苷为 98.2%, 甘草酸 102.2%。3 种成分的 RSD 依次分别为 2.0%, 1.8%, 1.9%。

3 讨论

由于处方中药味较多, 根据极性不同, 用梯度洗脱同时测定了绿原酸, 黄芩苷, 甘草酸的含量。经过

摸索, 以文中色谱条件为好。DAD 检测 254 nm 出峰多, 峰形好, 故选此波长。由于木犀草素, 次野鸢尾黄素未见出峰, 不作为考察对象。根据供试品和各对照品 DAD 全波长扫描结果, 各对照品相对保留时间和峰形在供试品图谱相应位置相吻合。

由于采用上清液直接测多糖的方法干扰太多, 不仅单糖, 低聚糖, 甚至苷类都会影响测定结果。故用沉淀物测多糖, 再以 95% 酒沉物测得量为总多糖, 两者相减, 可算出多糖保留量。

从结果可以看出, 几种方法多糖大部分得到了保留。清膏稀释一倍再用 50% 醇沉反而增加了多糖的沉淀流失。

由于南沙参, 麦冬的多糖为养阴的有效成分, 所以要尽可能多地保留, 根据多糖的测定结果, 以 50% 酒沉工艺保留最多, 70% 次之, 再根据绿原酸等指标性成分测定结果, 以 70% 保留最多, 50% 次之, 综合两者结果, 再考虑大生产以 70% 乙醇沉淀容易操作, 所以确定用 70% 乙醇沉淀 2 次为优化出的工艺。

[参考文献]

- [1] 赵珉, 纪耀华, 王秋香, 等. 茜草粗多糖的提取及总糖的含量测定[J]. 吉林中医药 2004, 24(6): 55.