

• 工艺研究 •

复方三七脊复康胶囊提取精制工艺的研究

全燕*, 李先端, 王锦玉, 马振山, 王琳, 王元瑜
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 本文采用药效筛选试验, 确定复方三七脊复康胶囊最佳的提取精制工艺路线为稀乙醇回流提取, 水返溶后大孔树脂精制。方法: 工艺优选中, 均以人参皂苷 Rg1 含量为指标, 采用正交试验确定了提取工艺中的乙醇浓度、提取次数、乙醇用量, 确定了大孔树脂精制的工艺参数包括树脂型号、树脂用量、洗脱剂的浓度、洗脱剂用量等。结果: 过树脂流出母液及水洗液未检出人参皂苷 Rg1、Rb1、Re 及三七皂苷 R1、川芎、芍药苷、银杏叶、钩藤, 表明本复方药液通过大孔树脂床流出液未造成有效成分的泄漏。而吸附树脂乙醇洗脱液中均可检出以上成分, 且人参皂苷 Rg1 过树脂前后含量保留 90% 以上。结论: 本方用大孔树脂分离精制工艺是合理的。

[关键词] 大孔树脂; 精制; 人参皂苷 Rg1; 人参皂苷 Rb1; 人参皂苷 Re; 三七皂苷 R1

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0001-03

复方三七脊复康胶囊由三七、川芎、白芍、人参、银杏叶、钩藤等八味中药组成, 具有活血化瘀, 通经活络; 滋补肝肾, 息风生髓的功效。主治脊髓损伤: 脊髓挫伤、脊髓裂伤、脊髓水肿、脊髓不完全性横贯损伤。本病治疗周期较长, 原临床以汤剂入药, 处方剂量较大(每日 79g 生药), 患者不易长期坚持服用, 故需改变剂型。经过提取工艺的试验研究, 可大幅度降低出膏率, 干膏粉吸潮性小, 可不加辅料, 经干压制粒, 颗粒流动性好, 宜制成胶囊剂, 通过制剂学、药效学、毒理学和质量控制等方面的深入研究, 本胶囊剂质量稳定, 安全、有效, 同时便于患者服用, 携带方便。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 惠普-1100 型高效液相色谱仪(美国), 紫外检测器。对照品人参皂苷 Rg1 由中国药品生物制品检定所提供, 含量测定用(批号: 0703-200015)。药材样品三七、人参均购于北京市药材公司。水为纯水, 甲醇为优级纯, 四氢呋喃为分析纯, 其他试剂均为分析纯。

2 色谱分析条件

色谱柱填料为: Kromasil-C₁₈, 5 μ m, 4.6mm \times

250mm(北京分析仪器厂制造)。

甲醇-四氢呋喃-水(20: 10: 75)为流动相。柱温 40 $^{\circ}$ C。蒸发激光散射检测器; 漂移管温度 110 $^{\circ}$ C, 气体流量 3L/min。分离度(R) 4 种内酯峰与相邻杂峰分离度大于 1.5, 理论板数按白果内酯峰计算应不低于 3000。

3 方法与结果

3.1 提取工艺路线的设计与选择 根据各组成药物的化学性质, 可用乙醇提取或水提取, 设计了 4 种提取精制工艺路线, 分别为: 水煮醇沉、50% 乙醇回流、水煮液过大孔树脂法及 50% 乙醇回流返溶液过大孔树脂。

4 种工艺路线制备的样品用药理指标进行筛选, 采用盲法通过对脊髓损伤区修复情况的观察和比较, 表明工艺 1~ 4 制备的样品, 对于大鼠脊髓损伤区的修复均有效, 药效评分依次为: 21、19.75、22.5、23.5, 工艺 4(回流返溶液过大孔树脂法)制备的样品药效最优, 故采用工艺 4 做进一步优选。

3.2 乙醇回流提取条件优选 按处方比例称取药材 79g 生药, 共 9 份, 按表 L₉(3⁴) 正交设计表, 以人参皂苷 Rg1 含量为指标, 考察了乙醇浓度、提取次数、乙醇用量 3 个因素, 见表 1。以表 2 设计方案进行实验。

方差分析结果表明, 各因素 3 个水平间无显著性差异; 极差结果表明, B 因素(煎煮次数)为主要影

[收稿日期] 2005-02-01

[通讯作者] 全燕, Tel: (010) 84027721; E-mail: tongyan1012@sohu.com

响因素, 最佳提取工艺为 A₁B₃C₂, 即乙醇浓度为 50%, 回流提取 3 次(每次 2 小时), 乙醇每次用量为 5 倍。

表 1 乙醇回流提取正交设计因素表

	A(乙醇浓度, %)	B(提取次数, 次)	C(乙醇用量, 倍)
1	50	1	4
2	60	2	5
3	70	3	6

表 2 正交实验安排与结果

实验号	A	B	C	D(空列)	人参皂苷 Rg1 提取量(mg)
1	1	1	1	1	281
2	1	2	2	2	440
3	1	3	3	3	434
4	2	1	2	3	329
5	2	2	3	1	382
6	2	3	1	2	398
7	3	1	3	2	288
8	3	2	1	3	280
9	3	3	2	1	380
K_1	385.00	299.33	319.67	347.67	$F_{1-0.10}(2, 2) = 9$
K_2	369.67	367.33	383.00	375.33	$F_{1-0.05}(2, 2) = 19$
K_3	316.00	404.00	368.00	347.67	
R	69.00	34.89	63.33	27	
\bar{S}	7876.22	16923.56	6572.22	1530.89	
F	5.14	11.05	4.29		

3.3 水返溶倍数的确定 乙醇提取液回收乙醇至无醇味, 分别加水至 6、9、12 倍生药量返溶, 静置过夜, 离心, 上清液水浴浓缩, 真空干燥, 测定人参皂苷 Rg1 含量, 见表 3。

表 3 水返溶倍数的确定

样品	生药量(g)	干膏得量(g)	人参皂苷 Rg1 含量(g)
6 倍水返溶	79	22.0	0.337
9 倍水返溶	79	23.6	0.361
12 倍水返溶	79	24.3	0.369

结果表明: 水返溶 12 倍量与 9 倍量相近, 明显优于 6 倍量, 确定用 9 倍量水返溶。

3.4 大孔吸附树脂提取分离的工艺研究 大孔吸附树脂是一类有机高聚物吸附剂, 具有较好的吸附性能, 近年来开始应用于中草药化学成分的提取分离^[1,2], 是提取分离中草药水溶性成分有效的方法,

故我们采用此法提取分离复方三七脊复康中诸药的有效成分。本实验用正交设计法对大孔吸附树脂提取分离条件进行研究, 优选出最佳分离工艺。

3.4.1 大孔吸附树脂型号的选择 根据药物的化学性质, 选择 D-101、D-201、HPD-100、BS-55 四种不同型号的非极性大孔吸附树脂, 取各型号树脂, 分别吸附药液, 树脂床用生药 4 倍量 70% 乙醇洗脱, 分别收集洗脱液, 水浴挥干, 真空干燥, 测定人参皂苷 Rg1 含量, 结果见表 4。

表 4 树脂型号的优选

树脂型号	树脂用量 (g)	生药量 (g)	干膏量 (g)	人参皂苷 Rg1 含量(mg)
D-101	120	79	3.87	304
D-201	120	79	4.27	287
HPD-100	120	79	4.60	337
BS-55	120	79	4.56	335

结果表明, HPD-100、BS-55 两种型号较好, HPD-100 树脂强度较好, 厂家有质量标准及生产许可证, 产品质量有保证, 故选 HPD-100 型树脂。

3.4.2 大孔树脂床吸附参数的正交试验

(1) 正交试验设计按 $L_9(3^4)$ 正交设计进行试验, 以人参皂苷 Rg1 含量为指标, 选用 HPD-100 型大孔树脂, 考察了洗脱剂的浓度、洗脱剂用量、大孔树脂用量 3 个因素, 每个因素设计 3 个水平, 见表 5。

表 5 试验因素水平

	A 大孔树脂量 (倍生药)	B 乙醇洗脱剂浓度 (%)	C 洗脱剂用量 (倍生药)
1	0.5	50	2
2	1.0	60	3
3	1.5	70	4

(2) 实验方法及数据 按处方比例称取生药饮片, 用 5 倍量 50% 乙醇回流提取三次, 每次 2h, 合并提取液, 滤过; 回收乙醇至无醇味, 加水至生药 12 倍量返溶, 放置过夜; 取上清液分别过树脂床按 $L_9(3^4)$ 方案进行实验。见表 6。对人参皂苷 Rg1 含量及正丁醇提取物重进行极差、方差分析。见表 7、表 8。

最佳条件为: A₂B₃C₂。即大孔树脂用量为 1 倍(生药量), 洗脱剂乙醇浓度为 70%, 洗脱剂用量为 3 倍(生药量)。

3.4.3 大孔树脂床对人参皂苷 Rg1 的最大吸附量考察 取处方比例的复方三七脊复康生药 79g, 按

表 6 实验设计与结果

因素	A	B	C	D	正丁醇提取物	人参皂苷 Rg1
					重(g)	含量(mg)
试 验 号	1	1	1	1	0.7921	106.7
	2	1	2	2	0.8355	113.3
	3	1	3	3	0.8502	117.5
	4	2	1	2	1.1355	149.6
	5	2	2	3	1.1403	147.3
	6	2	3	1	1.2195	154.9
	7	3	1	3	1.0320	134.9
	8	3	2	1	1.0946	134.7
	9	3	3	2	1.3021	151.4

表 7 极差分析

指标	正丁醇提取物重(g)				人参皂苷 Rg1 含量(mg)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K_1	0.83	0.99	1.04	1.08	112.50	130.40	132.10	135.13
K_2	1.17	1.02	1.09	1.03	150.60	131.77	138.10	134.37
K_3	1.14	1.12	1.01	1.03	140.33	141.27	133.23	133.93
R	0.34	0.13	0.08	0.05	38.1	10.87	6.00	1.20

表 8 方差分析

指标	方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
	B	$S_B = 0.03$	2	0.02	5.99	
	C	$S_C = 0.01$	2	0.01	2.14	
	E	$S_E = 0.01$	2.00	0.00		
人参皂苷 Rg1 含量(mg)	A	$S_A = 2331.71$	2	1165.85	1052.43	**
	B	$S_B = 210.20$	2	105.10	94.88	*
	C	$S_C = 60.97$	2	30.48	27.52	*
	E	$S_E = 2.22$	2.00	1.11		

$F_{1-0.10}(2, 2) = 9, F_{1-0.05}(2, 2) = 19, F_{1-0.01}(2, 2) = 99.$

优选的工艺提取、返溶, 药液通过装有 24.5g 大孔吸

表 10 过大孔树脂前后主要成分比较

样品	生药量(g)	干膏得量(g)	人参皂苷 Rg1 含量(g)	TLC 鉴别					
				人参皂苷 Rg1、Rb1、Re	三七皂苷 R1	川芎	芍药苷	银杏叶	钩藤
过树脂前药液	79	24.3	0.369	可检出三成分	可检出	可检出	可检出	可检出	可检出
过树脂流出母液及水洗液	79	19.4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
树脂柱乙醇洗脱液	79	4.6	0.337	可检出三成分	可检出	可检出	可检出	可检出	可检出

[参考文献]

[1] 李伯平. 大孔吸附树脂在天然产物分离中的应用[J].

附树脂的吸附柱, 用 50mL 水洗吸附柱, 收集流出液及水洗出液, 吸附柱用 100mL 70% 乙醇洗脱, 收集乙醇液, 分别将两样品浓缩、真空干燥、称重, 测定人参皂甙 Rg1 的含量, 结果见表 9。

表 9 大孔树脂床对人参皂甙 Rg1 的最大吸附量考察

样品	干膏得量(g)	人参皂甙 Rg1 含量(%)	人参皂甙 Rg1 测得量(mg)
树脂未吸附物(水液)	20.3117	0.54	110
树脂吸附物(乙醇洗脱液)	1.9410	11.34	220

24.5g 树脂吸附了 220mg 人参皂甙 Rg1, 其余的漏出, 树脂对人参皂甙 Rg1 的最大吸附量为每克 9mg。

3.4.3 复方三七脊复康回流返溶液过大孔树脂前后主要成分比较见表 10。

4 讨论

过树脂流出母液及水洗液未检出人参皂苷 Rg1、Rb1、Re 及三七皂苷 R1、川芎、芍药苷、银杏叶、钩藤, 表明本复方药液通过大孔树脂床流出液未造成有效成分的泄漏, 弃去是合理的。而吸附树脂乙醇洗脱液中均可检出以上成分, 且人参皂苷 Rg1 过树脂前后含量保留 90% 以上, 进一步表明了本大孔树脂分离精制工艺的合理性。复方三七脊复康回流返溶液过大孔树脂前后制备样品, 送药理试验, 采用盲法通过对脊髓损伤区修复情况的观察和比较, 对于大鼠脊髓损伤区的修复均有效, 过大孔树脂前后药效评分分别为 19.75 和 23.5, 回流返溶液过大孔树脂制备的样品药效优于未过大孔树脂的样品, 可能是有效成分的富集使药效提高, 表明大孔树脂分离精制是必要的。

中草药, 1990, 21(8): 138-141.

[2] 唐第光. 大孔吸附树脂法提取三七总皂甙工艺探讨[J]. 中成药, 1990, 12(3): 5-6.