

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 178.

[2] 肖培根. 新编中药志: 第2卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 304.

[3] 严 玮. 佛手化学成分和药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2015, 31(8): 788-790.

[4] 朱晓艳. 佛手多糖分离纯化结构分析及抗氧化研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.

[5] 黄 玲, 张 敏. 佛手多糖对小鼠免疫功能影响[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(5): 324-325.

[6] 蓝峻峰, 刘 琨. 内部沸騰法提取叶下珠没食子酸[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 63-65.

[7] 冉建明, 田 茜, 何 晨, 等. 解吸-减压内部沸騰法提取黄苏普的工艺研究[J]. 中成药, 2016, 38(4): 944-947.

[8] 石灵高. 银杏总黄酮减压内部沸騰法提取及分离工艺研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.

[9] 李春玲, 翁艳英, 赵钟兴, 等. 三七总皂苷的减压内部沸騰提取及树脂吸附分离[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 372-373.

[10] 石灵高, 韦藤幼. 减压内部沸騰法提取银杏总黄酮的工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2701-2703.

[11] 杨军宣, 张 毅, 吕姗姗, 等. 减压内部沸騰法提取黄精多糖工艺[J]. 中成药, 2016, 38(2): 460-463.

[12] 翁艳英, 韦藤幼, 童张法. 内部沸騰法提取三七多糖的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1435-1436.

[13] 冉建明, 田 茜, 何 晨, 等. 解吸-减压内部沸騰法提取黄芩苷的工艺研究[J]. 中成药, 2016, 38(4): 944-947.

[14] 李 勇, 姚 曦. 不同炮制方法对佛手总多糖含量的影响[J]. 中国药业. 2012, 21(4): 24-26.

[15] 张文秀, 朱卫丰, 聂鹤云, 等. Box-Behnken 响应面法优化马钱子提取工艺[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1932-1936.

[16] 臧巧真, 唐 涛, 龙凯花, 等. Box-Behnken 效应面法优化 α -细辛脑长循环纳米粒制备工艺[J]. 中成药, 2016, 38(2): 456-460.

山香圆叶提取液纯化工艺的优化

罗开沛, 李小芳*, 林 浩, 罗 佳, 杨 露, 刘海霞, 严敏嘉

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: 目的 优化山香圆 *Turpinia arguta* (Lindl.) Seem. 叶提取液纯化工艺。方法 以总黄酮、女贞苷、野漆树苷的吸附率和解吸率为评价指标, 上样液和洗脱剂(乙醇)的质量浓度(或体积分数)、体积流量、用量为影响因素, 静态吸附试验筛选大孔吸附树脂, 并结合动态吸附优化工艺。结果 最佳条件为 HPD300 大孔吸附树脂, 上样液质量浓度 0.2 g/mL, 体积流量 1 mL/min, 上样量 30 mL, 2 BV 去离子水洗涤, 6 BV 50% 乙醇以 1 mL/min 体积流量洗脱, 总黄酮、女贞苷、野漆树苷含有量分别为 53.95%、13.74%、4.07%。结论 该方法简单准确, 稳定可靠, 可用于纯化山香圆叶提取液。

关键词: 山香圆; 叶; 纯化; 总黄酮; 女贞苷; 野漆树苷; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)04-0727-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.013

Optimization of purification of extract from *Turpinia arguta* leaves

LUO Kai-pei, LI Xiao-fang*, LIN Hao, LUO Jia, YANG Lu, LIU Hai-xia, YAN Min-jia

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—State Key Laboratory

收稿日期: 2016-06-13

基金项目: 四川省科技厅“苗子工程”重点项目(2016RZ0037); 四川省教育厅重点项目(15ZA0094); 成都中医药大学科研实践创新课题(ky2016-188)

作者简介: 罗开沛(1991—), 男, 硕士, 中药师, 研究方向为中药新制剂、新技术。Tel: 15351218131, E-mail: luokaipei@126.com

* 通信作者: 李小芳(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新技术。Tel: 13808195110, E-mail: lixiaofang918@163.com

Breeding Base Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China)

KEY WORDS: *Turpinia arguta* (Lindl.) Seem; leaves; purification; total flavonoids; ligustroflavone; rhoifolin; macroporous adsorption resins

山香圆叶为省沽油科植物山香圆 *Turpinia arguta* (Lindl.) Seem. 的干燥叶。现代研究表明,总黄酮是其主要有效部位,具有抗炎、抗菌、增强机体免疫等药理作用^[1-4]。目前,鲜有对其提取液纯化的报道,仅吴珊等^[5]以总黄酮为指标,初步确定了纯化工艺。2015版《中国药典》将女贞苷和野漆树苷作为该药材及其制剂质量的指标成分^[6],其提取液的合理纯化对相关制剂的质量控制具有重要作用。

大孔吸附树脂对中药成分具有选择性吸附能力,对黄酮类成分的富集纯化效果较显著^[7-9]。为进一步全面、准确地评价纯化条件,制备符合要求的中药有效部位原料药(含有量>50%),在课题组前期已优化的山香圆叶总黄酮提取工艺基础上,本实验通过对总黄酮、女贞苷、野漆树苷吸附率和解吸率的考察,研究大孔树脂纯化工艺,为有效利用山香圆叶这一资源奠定基础。

1 材料与试药

Agilent 1200 HPLC 色谱仪(美国安捷伦公司); UV-6000 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); BP211D 电子天平(德国 Satorius 公司)。女贞苷(批号 MUST-12062606)、野漆树苷(批号 MUST-12021702)、芹菜素(批号 MUST-15032610)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。山香圆叶购自江西青峰药业有限公司,经成都中医药大学药学院蒋桂华教授鉴定为正品。D101、AB-8、HPD100、HPD300、HPD400、HPD450、HPD600 大孔吸附树脂均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司。所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含有量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芹菜素对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,甲醇配制成 0.102 mg/mL 溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取已脱脂的山香圆叶粗粉适量,加入 25 倍量 50% 乙醇,超声提取 50 min,滤过,减压回收乙醇,制成生药量 0.2 g/mL 溶液,即得。

2.1.3 线性关系考察 将“2.1.1”和“2.1.2”项下溶液在 200~500 nm 波长下扫描,发现两者均

在 268.5 nm 处有最大吸收。精密量取对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,测定吸光度。以溶液质量浓度(C)对吸光度(A)进行回归,得方程为 $A = 0.0767C + 0.0288$ ($r = 0.9996$),在 2.04~10.20 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 取同一对照品溶液,于 268.5 nm 波长处测定,连续 6 次,测得吸光度 RSD 为 0.63%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,于 0、2、4、6、8、10 h 在 268.5 nm 波长处测定,测得吸光度 RSD 为 1.59%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份,于 268.5 nm 波长处测定,测得吸光度 RSD 为 1.07%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取含有量已知的供试品溶液 6 份,加入等量对照品溶液,于 268.5 nm 波长处测定,测得平均加样回收率为 98.1%,RSD 为 1.23%。

2.2 女贞苷和野漆树苷含有量测定^[10]

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.5% 磷酸(43:57); 检测波长 336 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取对照品女贞苷 10.10 mg、野漆树苷 10.05 mg,置于 100 mL 量瓶中,50% 甲醇定容,摇匀,即得贮备液。分别量取 25 mL 和 10 mL,置于同一 50 mL 量瓶中,50% 甲醇定容,制成含女贞苷 50.5 μg/mL、野漆树苷 20.1 μg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取 2、4、8、12、16、20 μL,在“2.2.1”项色谱条件下进样分析,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得回归方程为女贞苷 $Y = 780.02X - 1.8066$ ($r = 0.9999$)、野漆树苷 $Y = 1053.3X - 0.5367$ ($r = 0.9999$),分别在 0.101~1.01、0.0403~0.403 mg 范围内线性关系良好。色谱图见图 1。

2.3 纯化工艺考察

2.3.1 树脂预处理 取大孔吸附树脂适量,95%

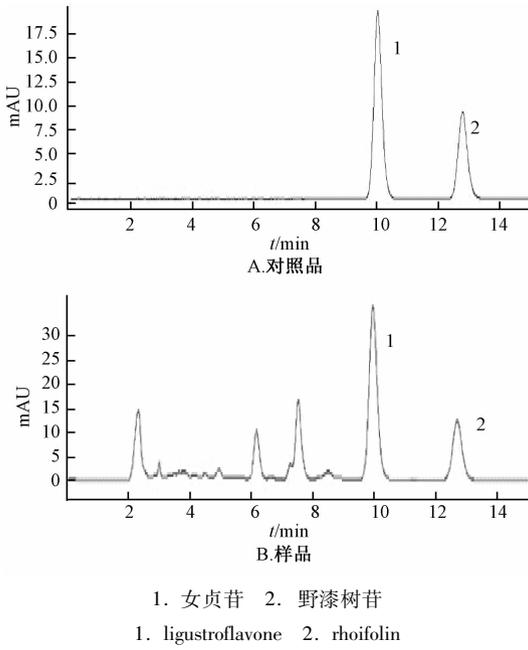


图1 2种成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of two constituents

乙醇浸泡24 h使其充分溶胀，湿法装柱，再用95%乙醇冲洗，直至流出液与水混合(1:5)后不呈浑浊，最后用去离子水洗至无醇味，备用。

2.3.2 树脂型号筛选 称取预处理好的7种大孔树脂(D101、AB-8、HPD100、HPD300、HPD400、HPD450、HPD600)各1 g，置于50 mL具塞锥形瓶，加入样品溶液20 mL，每10 min振摇1次，每次30 s，共10次，静置24 h，过滤，测定滤液中总黄酮、女贞苷、野漆树苷含量。将吸附饱和的大孔树脂加70%乙醇20 mL静态洗脱，每10 min振摇1次，每次30 s，共10次，放置24 h，测定三者含量，结果见表1。由表可知，HPD300大孔树脂对3种成分的吸附率和解吸率均较高，故选择其进行下一步实验。计算公式如下， $\text{吸附率} = [(C_0 - C_1) V_1] / C_0 V_1 \times 100\%$ ， $\text{解吸率} = [C_2 V_2 / (C_0 - C_1) V_1] \times 100\%$

式中， C_0 为样液初始质量浓度， C_1 为吸附后质量浓度， V_1 为样液体积， C_2 为洗脱液质量浓度， V_2 为洗脱液体积。

2.3.3 上样液质量浓度 取经预处理的HPD300大孔树脂4份，柱体积10 mL，湿法装柱，配制0.05、0.1、0.2、0.3 g/mL样品溶液，以相同体积流量进行动态吸附，收集流出液，2 BV去离子水洗，合并流出液和水洗液，测定总黄酮、女贞苷、野漆树苷含量，计算吸附率，结果见表2。

表1 7种大孔吸附树脂对吸附率和解吸率的影响

Tab. 1 Effects of seven macroporous adsorption resins on adsorption and desorption rates

型号	总黄酮		女贞苷		野漆树苷	
	吸附率/%	解吸率/%	吸附率/%	解吸率/%	吸附率/%	解吸率/%
D101	55.60	83.12	63.55	76.87	68.09	71.94
HPD100	70.82	71.26	90.92	81.23	89.53	76.25
AB-8	69.71	72.36	86.21	85.06	83.11	86.20
HPD300	72.91	86.54	91.34	90.68	92.89	89.47
HPD400	69.47	82.63	86.70	91.42	90.34	88.76
HPD450	58.26	63.40	70.82	68.33	65.78	68.39
HPD600	68.55	68.15	78.91	73.25	82.56	77.18

由表可知，上样液质量浓度过高或过低均会降低吸附率，故最终确定为0.2 g/mL。

表2 上样液质量浓度对吸附率的影响

Tab. 2 Effect of sample concentration on adsorption rate

上样液/ (g·mL ⁻¹)	吸附率/%		
	总黄酮	女贞苷	野漆树苷
0.05	65.39	80.23	75.65
0.1	73.41	98.35	96.14
0.2	76.54	97.72	98.06
0.3	64.75	88.40	87.19

2.3.4 上样液体积流量 取经预处理的HPD300大孔树脂4份，柱体积10 mL，湿法装柱，取0.2 g/mL样品溶液，以0.5、1、2、3 mL/min体积流量上样，收集流出液，2 BV去离子水洗，合并流出液和水洗液，测定总黄酮、女贞苷、野漆树苷含量，计算吸附率，结果见表3。由表可知，随着体积流量增加吸附率逐渐降低，在0.5 mL/min时最高，但延长了纯化周期，为保证上样进度和较高吸附率，最终确定为1 mL/min。

表3 上样液体积流量对吸附率的影响

Tab. 3 Effect of sample flow rate on adsorption rate

上样液体积流量/ (mL·min ⁻¹)	吸附率/%		
	总黄酮	女贞苷	野漆树苷
0.5	84.89	98.56	98.72
1	83.36	98.07	97.21
2	75.41	94.43	95.96
3	63.95	90.12	88.54

2.3.5 上样量 取经预处理的HPD300大孔树脂，柱体积10 mL，湿法装柱，取0.2 g/mL样品溶液，以1 mL/min体积流量连续上样，分段收集流出液，每份5 mL，检测每段流出液中总黄酮含量，绘制泄漏曲线，结果见图2。由图可知，当上样量达到35 mL时，总黄酮出现明显泄漏，故最终确定为30 mL。

2.3.6 洗脱剂(乙醇)体积分数 取经预处理的

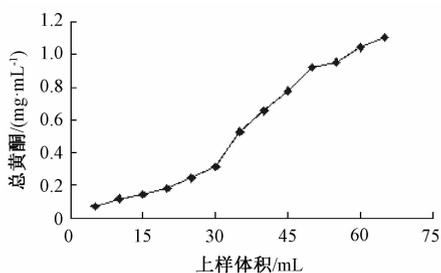


图2 总黄酮泄露曲线

Fig. 2 Leakage curve of total flavonoids

HPD300 大孔树脂 4 份, 柱体积 10 mL, 湿法装柱, 取 0.2 g/mL 样品溶液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 2 BV 去离子水洗脱, 合并流出液和水洗液, 30%、50%、70%、95% 乙醇各 50 mL 洗脱, 收集洗脱液, 测定总黄酮、女贞苷、野漆树苷含有量, 计算解吸率和纯度, 结果见表 4。由表可知, 当乙醇体积分数为 50% 时, 3 种成分解吸率和纯度均较高, 故最终选择 50% 乙醇洗脱。

表 4 乙醇体积分数对解吸率的影响

Tab. 4 Effect of ethanol concentration on desorption rate

乙醇/%	解吸率/%			纯度/%
	总黄酮	女贞苷	野漆树苷	
30	78.42	48.63	35.00	43.55
50	92.15	91.74	90.69	52.67
70	93.80	91.82	91.45	47.21
95	94.63	93.65	92.08	44.93

2.3.7 乙醇体积流量 取经预处理的 HPD300 大孔树脂 4 份, 柱体积 10 mL, 湿法装柱, 取 0.2 g/mL 样品溶液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 2 BV 去离子水洗脱, 合并流出液和水洗液, 5 BV 50% 乙醇以 0.5、1、2、3 mL/min 体积流量洗脱, 收集洗脱液, 测定总黄酮、女贞苷、野漆树苷含有量, 计算解吸率, 结果见表 5, 最终确定乙醇体积流量为 1 mL/min。

表 5 乙醇体积流量对解吸率的影响

Tab. 5 Effect of ethanol flow rate on desorption rate

乙醇体积流量/ (mL·min ⁻¹)	解吸率/%		
	总黄酮	女贞苷	野漆树苷
0.5	92.79	91.25	89.82
1	95.28	92.17	94.26
2	87.46	86.51	90.07
3	83.54	81.30	83.95

2.3.8 乙醇用量 取经预处理的 HPD300 大孔树脂, 柱体积 10 mL, 湿法装柱, 取 0.2 g/mL 样品溶液, 以 1 mL/min 体积流量上样, 2 BV 去离子水洗脱, 50% 乙醇以 1 mL/min 体积流量洗脱, 分段

收集洗脱液, 每份 10 mL, 检测每段洗脱液总黄酮、女贞苷、野漆树苷含有量, 绘制洗脱曲线, 结果见图 3。由图可知, 3 种成分主要集中在 5 BV 以内, 为保证洗脱完全, 最终确定乙醇用量为 6 BV。

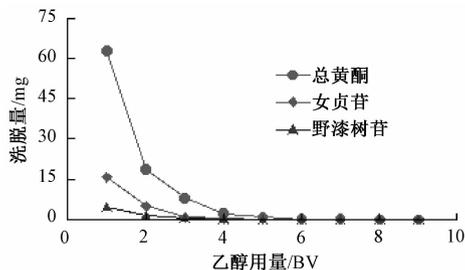


图 3 各成分洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of various constituents

2.4 验证试验 取经预处理的 HPD300 大孔树脂, 湿法装柱, 平行 3 份, 0.2 g/mL 样品溶液 30 mL 上柱, 体积流量 1 mL/min, 2 BV 去离子水洗脱, 再用 6 BV 50% 乙醇以 1 mL/min 体积流量进行洗脱, 洗脱液浓缩干燥, 测得总黄酮含有量分别为 55.12%、53.64%、53.09%, 平均 53.95%; 女贞苷分别为 14.12%、13.48%、13.62%, 平均 13.74%; 野漆树苷分别为 4.05%、4.20%、3.96%, 平均 4.07%, 表明该工艺稳定可行。

3 讨论

上样液质量浓度对吸附率的影响较大, 若质量浓度过低, 虽然有利于大孔树脂吸附总黄酮, 但上样量体积增加, 上样速度大于传质速度, 导致样液未吸附彻底就已流出; 质量浓度过高, 溶液黏度增加, 阻碍了树脂对总黄酮的吸附, 导致吸附效果降低。因此, 本实验选择上样液质量浓度为 0.2 g/mL。

在考察洗脱剂 (乙醇) 体积分数时, 发现在 50%、70%、95% 下洗脱物中总黄酮、女贞苷、野漆树苷的解吸率均较高; 但随着进一步增高, 其纯度逐渐降低。50% 乙醇洗脱后, 树脂柱呈浅绿色; 95% 乙醇洗脱后, 树脂柱呈浅白色, 推测浅绿色物质为极性较小的杂质, 由于高体积分数乙醇将有效组分和杂质同时洗脱, 从而降低了纯度, 与文献 [11] 报道一致。因此, 建议在乙醇体积分数不同, 而解吸率相差不大的情况下, 可纳入纯度作为评价指标, 既能保证较好的解吸效果, 又可得到纯度较高的化合物。

为确保有效部位和成分尽量同时保留, 本实验以总黄酮、女贞苷、野漆树苷的吸附率和解吸率为指标, 通过 HPD300 大孔树脂进行纯化, 测得洗脱

液中三者转移率(转移率=吸附率×解吸率)分别为83.17%、92.86%、94.65%。同时,总黄酮含量达53.95%,符合中药有效部位作为原料药的要求,而且女贞苷和野漆树苷的含有量分别为13.74%和4.07%,可为进一步开发中药新药提供依据。

另外,本实验在大孔树脂动态吸附阶段的考察是以吸附率为考察指标,可避免解吸阶段产生的误差对其的影响;在动态解吸阶段中,则以解吸率为考察指标,可排除吸附阶段的误差对其的影响,与仅以转移率为指标考察所有纯化因素相比,该方法更加准确、简便、可靠^[12-14]。

参考文献:

[1] 孙敬勇,刘秀荣,武海艳,等.山香圆化学成分及药理活性的研究进展[J].食品与药品,2011,13(11):441-444.
[2] 张磊,李俊,余世春,等.山香圆总黄酮的抗炎作用[J].安徽医科大学学报,2003,38(3):185-188.
[3] 詹拾飞,张建军,毛友昌,等.山香圆含片抗菌作用的试验研究[J].江西中医学院学报,2005,17(2):55.
[4] 张磊,李俊,余世春,等.山香圆总黄酮体外对大鼠佐剂性关节炎免疫功能的影响[J].中国药理学通报,2007,

23(1):106-110.
[5] 吴珊,李小芳,罗佳,等.大孔树脂纯化山香圆叶中的总黄酮[J].华西药学杂志,2014,29(6):680-682.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:29.
[7] 孙启文,吴松,方芸.D101大孔树脂纯化雪荔组方总黄酮工艺[J].中成药,2014,36(10):2208-2211.
[8] 王敏,陈文龙,王志仁,等.HP-20型大孔吸附树脂对土茯苓总黄酮的富集纯化作用[J].中成药,2015,37(9):2074-2078.
[9] 田彦芳,万海同,朱紫焯,等.基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺[J].中草药,2016,47(7):1118-1125.
[10] 章光文,周国平,杨香菊,等.HPLC法同时测定山香圆片中女贞苷和野漆树苷的含量[J].药物分析杂志,2009,29(6):912-914.
[11] 朱学鑫,蒋瑞彬,黄晶晶,等.大孔吸附树脂法富集山核桃叶球素查尔酮工艺的研究[J].中华中医药学刊,2016,34(2):304-306.
[12] 豆浩然,倪健,葛亮,等.大孔树脂纯化展毛地椒总黄酮工艺研究[J].辽宁中医杂志,2015,42(9):1726-1729.
[13] 罗娅君,边清泉,罗英,等.大孔树脂吸附马比木中喜树碱的工艺[J].中成药,2015,37(8):1859-1862.
[14] 孙政华,郭玫,邵晶,等.大孔吸附树脂纯化富集五脉绿绒蒿总生物碱[J].中成药,2016,38(1):77-83.

疏风定喘颗粒辅料的筛选

李璐, 王秀海, 王永香, 孙文杰, 吴云, 丁岗, 毕宇安, 王振中
(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

摘要:目的 筛选疏风定喘颗粒(炙麻黄、黄芩、前胡等)的辅料。方法 分别以糊精、乳糖、微晶纤维素、甘露醇、山梨醇为辅料进行制粒,混料设计进行优化;以成型性、吸湿性、溶化性、流动性、颗粒性状为指标,评价不同辅料所制颗粒的性状,响应面法进行优化;以颗粒成型率和溶化率为指标,单因素试验优化辅料用量。结果 以糊精为辅料制粒时效果最佳,根据干膏得率及服药量,其适宜用量为20%~30%。结论 糊精是制备疏风定喘颗粒的理想辅料。

关键词:疏风定喘颗粒;辅料;混料设计;响应面法;单因素试验

中图分类号:R944

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2017)04-0731-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.014

Optimization of excipients for Shufeng Dingchuan Granules

LI Lu, WANG Xiu-hai, WANG Yong-xiang, SUN Wen-jie, WU Yun, DING Gang,
BI Yu-an, WANG Zhen-zhong

收稿日期:2016-07-04

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09101043-003)

作者简介:李璐,女,硕士,从事中药新药研发。Tel:(0518)81152337, E-mail:lulu-xina@163.com