

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.005

大孔树脂法对益阴消渴滴丸的纯化工艺研究*

陈利¹, 宋国红², 李卿^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院江南分院药学部, 重庆 400010; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 优化益阴消渴方分离纯化工艺。方法 采用大孔树脂柱层析法,以高效液相色谱法测定葛根素含量,考察乙醇洗脱用量、大孔树脂用量、树脂径高比、药液上样浓度、药液 pH 对富集纯化工艺的影响。结果 经验证试验表明,富集纯化后益阴消渴方中葛根素的含量比上柱前葛根素的含量显著提高,葛根素转移率达 85.14%。结论 益阴消渴方经大孔树脂富集纯化后,以葛根素为代表的有效部位含量显著提高,工艺条件稳定可行,为制剂成型工艺提供了理论依据。

关键词:益阴消渴;纯化工艺;葛根素;大孔树脂

中图分类号:R932;R943

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)05-0014-04

Purification Technology of Yiyin Xiaoke Dropping Pills by Macroporous Resin Method

CHEN Li¹, SONG Guohong², LI Qing²

(1. Department of Pharmacy, Jiangnan Branch of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China 400010;

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400065)

Abstract: Objective To optimize the separation and purification technology of Yiyin Xiaoke Dropping Pills. **Methods** Macroporous resin column chromatography method was adopted, HPLC method was used to determine the content of puerarin. The effects of ethanol elution amount, the dosage of macroporous resins, the ratio of diameter-to-height on resins, the sample concentration and pH of liquid on the enrichment and purification technology were investigated. **Results** After enrichment and purification, the experimental results showed that the content of puerarin in Yiyin Xiaoke recipe was significantly higher than that before using column, and the transfer rate of puerarin was 85.14%. **Conclusion** After enrichment and purification with macroporous resin, the content of effective site group which was represented by puerarin in Yiyin Xiaoke recipe is significantly increased, and the technological conditions are stable and feasible, which provides the theoretical basis for the preparations technology.

Key words: Yiyin Xiaoke; purification technology; puerarin; macroporous resins

益阴消渴原剂型为胶囊剂,功能主治为益气养阴、清热生津,用于气阴不足所致消渴,以及 2 型糖尿病见上述证候者^[1],作用明确,成分清楚。处方中君药葛根所含葛根素不仅具有较好的降血糖作用,同时还具有改善

糖尿病并发症的药理活性。研究表明,葛根素能改善胰岛素抵抗,降低糖尿病大鼠血糖和保护其肾脏功能。处方中其余 3 味中药也具有较好的降血糖作用。由于原剂生产工艺简单,采用部分药物粉碎后直接入药的方

*基金项目:重庆市科研院所绩效激励引导专项资助项目[cstc2017jxjl-jbky120008]。

第一作者:陈利,男,药师,研究方向为药物调剂和药事管理,(电子信箱)512579082@qq.com。

△通信作者:李卿,男,大学本科,副主任药师,研究方向为中药新药开发及质量标准,(电子信箱)576173878@qq.com。

- 水果果糖中 5-羟甲基糠醛[J]. 食品工业科技,2012,33(23): 314-315.
- [7] 黄世勇,王富丽,潘丽霞. 果糖脱水制备 5-羟甲基糠醛[J]. 化学进展,2009,21(7): 1442-1449.
- [8] BICKER M, HIRTH J, VOGEL H. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub- and supercritical acetone[J]. Green Chemistry, 2003, 5(2): 280-284.
- [9] GLATT H, SCHNEIDER H, LIU Y. V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals[J]. Mutation Research, 2005, 580(1-2): 41.
- [10] SURH Y J, LIEM A, MILLER J A, et al. 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(10): 2375.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 647-648.
- [12] 国家食品药品监督总局. 国家食品药品监督管理总局国家药品标准制订件[J]. 中国药品标准, 2016, 17(2): 149-150.
- [13] 谢延, 许祥雷, 汪洪湖. 果糖注射液灭菌工艺的优化[J]. 安徽医药, 2011, 15(9): 1069-1070.
- [14] 樊武良. 有关葡萄糖注射液 pH 值及其它[J]. 中国药品标准, 2004, 5(2): 17-18.
- [15] 周福富, 廖爱国, 刘风景, 等. 不同因素对 5-羟甲基糠醛含量的影响[J]. 中国药业, 2008, 17(19): 44-45.
- [16] 李新生, 钟湘, 欧阳冰, 等. 5% 果糖注射液制备及灭菌工艺探讨[J]. 中国药业, 2006, 25(20): 35-36.
- [17] 孙春蕾. 果糖脱水制备 5-羟甲基糠醛的研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2011.

(收稿日期:2018-07-15)

式,其余药材水煎煮入药,导致葛根素溶出受限,影响临床疗效。本研究中采用单因素试验、正交试验法优选了益阴消渴处方提取工艺,选用大孔树脂柱层析法对方中的有效部位群进行了富集纯化,以处方君药葛根中主要成分葛根素为测评指标,优化益阴消渴方的分离纯化工艺,为后续的制剂成型提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);SB-5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-S 型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药

葛根、野苦瓜、荔枝核、山药药材均购自重庆市菜园坝中药材市场,经重庆市中药研究院肖铭玉副研究员分别鉴定为豆科植物甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth. 的干燥根、葫芦科植物野苦瓜 *Momordica charantia* L. 的成熟果、无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子、薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎;D101 型大孔树脂(天津市海光化工有限公司);葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号为 752-200108);甲醇为色谱纯,水为一级水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamondsil C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(28:72);流速:1 mL/min;柱温:30℃;紫外检测波长:250 nm。选择葛根素含量为检测指标,按 2015 年版《中国药典(一部)》^[1]葛根药材含量测定方法进行测定。结果可见,葛根素峰与相邻峰分离度良好,色谱图见图 1。

2.1.2 溶液制备

取葛根素对照品 18.64 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品贮

备溶液。

照益阴消渴处方比例,称取野苦瓜、葛根、荔枝核、山药适量,用 70% 乙醇提取 3 次,乙醇用量为药材量的 6 倍,第 1 次回流 1.5 h,第 2 次、3 次回流 1 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,加水适量使溶解,静置,取上清液过 D101 型大孔树脂,弃去过柱液,用水洗至近无色,再用 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,于水浴上分别浓缩至干,减压干燥,称定固形物质量,作为供试品,并制备供试品溶液。

照益阴消渴处方比例,称取缺葛根的其余 3 味药材,照供试品的提取方法,制得缺葛根阴性样品,并制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取对照品贮备溶液 0.5,1,2,4,5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密量取 10 μL,进样,按拟订色谱条件进样测定,以葛根素进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 7\,131\,295 X - 34\,632$, $r = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,葛根素进样量在 0.372 8~3.728 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取对照品贮备溶液 10 μL,按拟订色谱条件连续进样 6 次。结果的 RSD 为 0.78% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0,1,4,8,16 h 时进样测定。结果的 RSD 为 0.94% ($n = 6$),表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一样品 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定葛根素峰面积,计算其含量。结果的 RSD 为 1.06% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一样品 6 份,精密加入葛根素对照品适量,照 2.2 项下方法,制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定葛根素峰面积,计算其含量及回收率。结果见表 1。

2.2 富集纯化工艺考察

2.2.1 大孔树脂乙醇洗脱用量考察

按处方比例,称取野苦瓜、葛根、荔枝核、山药适量,

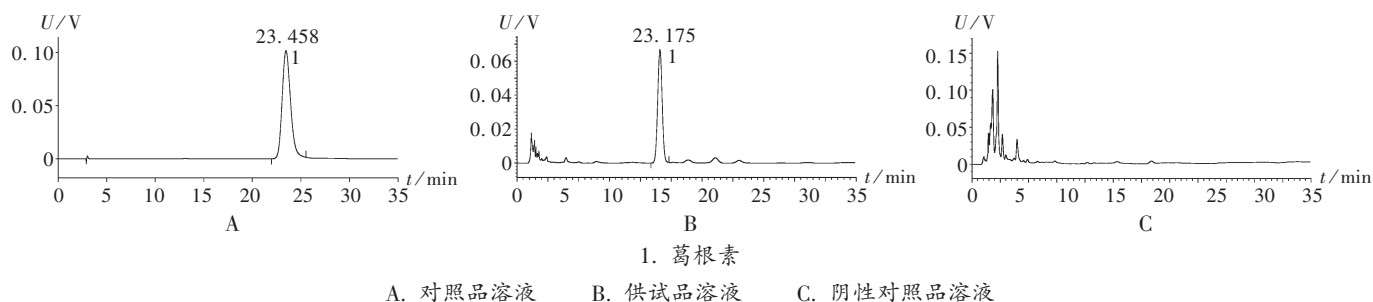


图 1 高效液相色谱图

表1 葛根素加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.078 0	0.884 0	1.956 3	99.36	98.71	0.57
1.078 0	0.884 0	1.945 7	98.16		
1.078 0	1.105 0	2.174 2	99.20		
1.078 0	1.105 0	2.164 3	98.31		
1.078 0	1.326 0	2.379 3	98.14		
1.078 0	1.326 0	2.392 1	99.10		

用6倍量70%乙醇回流提取3次,合并乙醇提取液,回收乙醇至无醇味,加10倍量水使溶解,静置,取上清液过D101型大孔树脂,弃去过柱液,用水洗至近无色,再用70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,每次20 mL,收集8次,于水浴上分别浓缩至干,减压干燥,称定固形物质量,测定葛根素含量。结果见图2。可见,以70%乙醇洗脱时,葛根素集中于2~3倍洗脱量,其固形物质量、葛根素含量85%以上均集中在此部分。故在吸附样品后,加水洗脱至近无色,再用70%乙醇(用药材量的8倍量)洗脱时,即可。

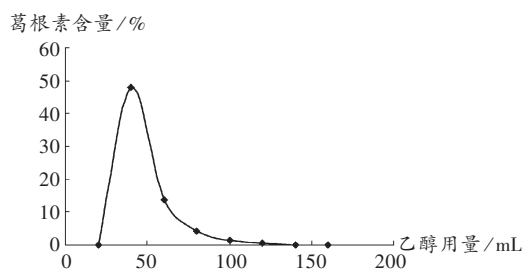


图2 乙醇洗脱解吸曲线

2.2.2 大孔树脂用量考察

按处方比例,称取野苦瓜25 g,葛根155 g,荔枝核10 g,山药10 g,用6倍量70%乙醇回流提取3次,合并乙醇提取液,回收乙醇至无醇味,加10倍量水使溶解,静置,取上清液并溶解至2 000 mL,备用。

分别取5根玻璃柱(直径为1 cm),称取大孔树脂17.5 g(相当于干树脂5 g),分别取上述溶液20 mL(相当于2 g药材)、30 mL(相当于3 g药材)、50 mL(相当于5 g药材)、100 mL(相当于10 g药材)、200 mL(相当于20 g药材),过D101型大孔树脂,分别用药材量的25倍量水洗涤,收集过柱液和水洗液,再用药材8倍量的70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,分别于水浴上浓缩至干,减压干燥,称定固形物质量,计算葛根素含量,公式如下。结果见表2。可见,综合分析后选用3 g药材、5 g树脂,即药材量-树脂量(0.6:1)。

2.2.3 大孔树脂径高比考察

按处方比例称取野苦瓜、葛根、荔枝核、山药适量,用已确定的条件提取,提取液均分为3等份,备用;取径高比为1:3.4,1:5,1:7的树脂柱,各加入已处理好的D101型大孔树脂8 g(湿法装柱)。将药材提取

表2 不同量益阴消渴提取液对吸附纯度效果的影响

项目	上样药材量(g)				
	2	3	5	10	20
S(mg/g)	1.892 8	2.839 2	4.183 6	7.114 3	12.564 3
A(mg/g)	1.892 8	2.839 2	4.183 6	7.114 3	12.564 3
E(mg/g)	1.676 8	2.194 0	2.956 1	4.915 6	8.841 8
P(%)	11.98	9.14	10.56	7.92	11.94
保留率(%)	88.59	77.27	62.46	51.94	46.71

注:比上柱量(S)=(供试液中葛根素量-水洗出的葛根素量)/树脂质量;比吸附量(A)=比上柱量(S);比洗脱量(E)=洗脱出的葛根素量/树脂质量;纯度(P)=洗脱出的葛根素量/提取固形物质量 $\times 100\%$;保留率=洗脱出的葛根素量/上样液中葛根素量 $\times 100\%$ 。

液分别上柱,待上柱液流完后,用8倍量70%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,分别于水浴上浓缩至干,减压干燥,称定固形物质量,测定葛根素含量。结果径高比为1:3.4,1:5,1:7时葛根素含量分别为0.28%,0.26%,0.25%。经D101大孔树脂处理,树脂径高比为1:3.4效果更优。

2.2.4 药液上样质量浓度考察

按处方比例称取野苦瓜、葛根、荔枝核、山药适量,用已确定的条件提取,回收乙醇,加10倍量水使溶解,取上清液均分为3等份,备用;溶液1为每1 mL相当于0.04 g药材的溶液,溶液2浓缩至每1 mL相当于0.4 g药材的溶液,溶液3浓缩至每1 mL相当于0.8 g药材的溶液,备用。取径高比为1:3.4的树脂柱,加已处理好的D101型大孔树脂9 g(湿法装柱)。将药材提取液分别上柱,上柱液流完后,用8倍量70%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,于水浴上蒸干,减压干燥,称定固形物质量,测定葛根素含量。结果上样浓度为1:0.04,1:0.4,1:0.8时葛根素含量分别为0.28%,0.24%,0.22%。以药材提取液上样(0.04 g/mL)过D101大孔树脂处理,葛根素保留吸附率较好。故确定用药材10倍量水溶解后,取上清液过柱。

2.2.5 药液 pH 考察

按处方比例称取野苦瓜、葛根、荔枝核、山药适量,用已确定的条件提取、回收乙醇,加水溶解,取上清液均分为4等份,备用。溶液1为原液;溶液2和溶液3用5%碳酸氢钠溶液分别调pH为8和9;溶液4用5%盐酸溶液调pH为6,备用。取径高比为1:3.4的树脂柱,加已处理好的D101型大孔树脂(湿法装柱),将各供试溶液分别上柱,待上柱液流完后,用8倍量70%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,水浴蒸干,减压干燥,称定固形物质量,测定葛根素含量。结果溶液4,2,3的葛根素含量分别为0.25%,0.25%,0.24%;溶液1含量为0.28%。表明测得样品中葛根素的含量,用5%碳酸氢

钠溶液调 pH 8 和 pH 9 及用 5% 盐酸溶液调 pH 6 的溶液均低于原液(即不调节 pH),故药材提取回收乙醇后,加水溶解不需调 pH 即可过大孔树脂柱。

2.2.6 吸附流速和洗脱流速考察

关于吸附流速和洗脱流速,由于树脂粒径小,即使全部放开其速度也是很慢,屠鹏飞等^[2]的研究也证明了这一点,并指出吸附流速和洗脱流速对目标成分的收率和含量基本无影响,故建议吸附流速采用全流速的 1/2,洗脱流速采用全流速。

2.3 验证试验

根据拟订的提取方法,称取野苦瓜 20 g、葛根 124 g、荔枝核 8 g、山药 8 g,共 3 份,采用 70% 乙醇提取 3 次,乙醇用量为药材量的 6 倍,第 1 次回流 1.5 h,第 2,3 次回流 1 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,加 10 倍量水使溶解,照前述确定的各项参数进行大孔树脂吸附-洗脱试验,上柱前溶液和乙醇洗脱液分别用高效液相色谱法测定葛根素含量。结果见表 3。可见,葛根素的收率与前面的吸附试验和树脂载量试验的葛根素收率基本吻合,葛根素转移率达 85.14%,证明工艺可行。

表 3 纯化效果验证试验结果(%)

时间	葛根素含量		
	1	2	3
纯化后	0.28	0.28	0.28
上柱前	0.33	0.34	0.34

3 讨论

3.1 检测指标选择

本试验中以葛根素含量为检测指标,考察了乙醇洗脱用量、大孔树脂用量、树脂径高比、药液上样浓度、药液 pH 对益阴消渴方有效部位群富集纯化的影响,试验结果表明,采用大孔树脂分离纯化后的处方固形物质量大为减少,以葛根素为代表的有效部位群纯度增长显著,通过减少固形物质量,而处方有效部位群相对稳定,为后续制备新型速释制剂打下了良好的基础。

3.2 大孔树脂吸附分离技术优势比较

与传统的分离纯化方法相比^[3],采用大孔树脂吸附分离技术对中药复方进行精制,从中提取有效部位(群)或有效成分(群),有明显优势。据报道,用树脂对苷类^[4]、黄酮^[5]、萜类^[6]、生物碱^[7]、内酯^[8]、有机酸^[9]等的分离纯化效果较好。本研究中筛选了不同型号的大孔树脂用于本处方的分离纯化试验。结果表明,D101 型大孔树脂适用范围较广,对于非极性或弱极性的有机化合物普遍吸附能力强,特别是对皂苷类的分离、纯化效果尤佳,对黄酮类化合物也适宜^[10-13]。处方中野苦瓜主要化学成分包括三萜、甾类、生物碱等;葛根化学成分包括黄酮类、三萜类、甾体类、香豆素类、葛酚苷类等,其中异黄酮类

为其主要有效成分,异黄酮类化合物有葛根素、大豆素、大豆苷等,葛根素为其主要成分;荔枝核含皂苷。D101 型大孔树脂经 20 多年的生产实践证实,该产品植物水溶性物质分离、纯化行之有效,工艺简单,易于操作,产品质量稳定,成本较低,安全可靠,故选用 D101 型大孔树脂对该方剂进行制备工艺的研究。

3.3 展望

益阴消渴原制剂为部分葛根药材粉碎入药,因而葛根中主要成分葛根素溶出较慢^[14-15],在人体内吸收和利用较差。前期研究报道了采用单因素影响试验、正交试验法优化处方提取工艺各项参数,在后续试验过程中,选用大孔树脂法对益阴消渴处方的有效部位群进行了富集、纯化,实现了中间提取物收率减少和日服用量降低的目标,可加快药物中有效成分溶出的速度,提高生物利用度,为该产品的工业化生产提供了参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 333.
- [2] 屠鹏飞, 贾存勤, 张洪全. 大孔吸附树脂在中药新药研究和生产中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(3): 22-28.
- [3] 王柏强, 刘 福, 何效平. 紫苏叶提取液的澄清纯化工艺优选[J]. 中国药房, 2016, 27(19): 2684-2686.
- [4] 周 芳, 赵 鑫, 张琪斐. 大孔吸附树脂法纯化红皮云杉多酚工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(9): 147-149.
- [5] 郭先帅, 刘冬云, 朱婉婷. AB-8 型大孔吸附树脂纯化复方荔枝茯苓丸中桃仁、赤芍提取物工艺[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 167-170.
- [6] 盛华刚. 壳聚糖做澄清剂对黄芩水提液的纯化工艺研究[J]. 食品与药品, 2013, 15(4): 229-231.
- [7] 金文芳, 李 波, 吕绒昌. 大孔树脂纯化马兰总三萜工艺研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(5): 92-94.
- [8] 刘金平, 汤树良, 袁 航. 组合树脂技术纯化葛根中葛根素工艺研究[J]. 天津药学, 2013, 25(4): 8-10.
- [9] 林秀仙, 罗爱勤, 陈 亮. 桑叶总黄酮不同纯化工艺的比较[J]. 中国当代医药, 2014, 21(4): 10-11.
- [10] 李会丽, 杜丽东, 史彦斌. 大黄游离总蒽醌的组合式提取和纯化工艺研究[J]. 兰州大学学报(医学版), 2014, 40(3): 62-70.
- [11] 张 徐, 方吉雷, 葛 青. 栀子黄色素纯化工艺的优化[J]. 浙江科技学院学报, 2016, 28(6): 456-461.
- [12] 赵惠茹, 马姣姣, 魏彩霞. 大孔吸附树脂分离纯化蒲公英中总黄酮的工艺研究[J]. 中国药业, 2014, 23(12): 81-83.
- [13] 韦 宾, 周吴萍, 容元平. AB-8 大孔树脂分离纯化柿叶总黄酮的研究[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 34-35.
- [14] 王瑛兰, 刘元昆, 崔翠翠. 葛根虎杖丸的提取工艺研究[J]. 中国执业药师, 2016, 13(10): 25-28.
- [15] 张守平, 李广华, 张 杰. 关于中药提取正交试验设计的疑问与探讨[J]. 齐鲁药事, 2011, 30(9): 546-547.

(收稿日期: 2018-07-16)