

量水软化 6 h, 取出, 稍润, 横切 3 mm 厚片, 70 ℃下烘干, 川续断皂苷 VI、续断总皂苷、水浸出物、醇浸出物含有量分别为 7.86%、14.08%、43.71%、42.93%, 四者均高于传统工艺, 可知优化工艺稳定可行, 可用于该药材加工。

参考文献:

[1] 谭洪根, 林 生, 张启伟, 等. 高效液相色谱法测定续断药材中川续断皂苷 VI 的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 726-727, 739.

[2] 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: 329-330.

[3] 张永文, 薛 智. 川续断的化学成分研究[J]. 药学学报, 1991, 26(9): 676-681.

[4] 吴 帅, 刘二伟, 张 祎, 等. 川续断中化学成分的研究[J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(3): 147-150.

[5] 武 芸, 丁 莉. 五鹤续断多糖的提取及动态分布规律的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1325-1326.

[6] 马 强. 红车轴草和川续断的化学成分及质量研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2005.

[7] 张 琪, 汪仙阳, 马 博, 等. 复方续断总皂苷镇痛抗炎及预防骨质疏松症的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1683-1684.

[8] 郑志永. 续断苷对成人成骨细胞增殖和分化作用研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(5): 388-389.

[9] 龚小健, 吴知行, 陈 真, 等. 川续断对离体子宫的作用[J]. 中国药科大学学报, 1995, 26(2): 115-119.

[10] 王一涛, 王家葵, 杨 奎, 等. 续断的药理学研究[J]. 中药药理与临床, 1996(3): 20-23.

[11] 洪 汝, 卢焕俊, 许青松, 等. 续断提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马神经元的保护作用[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(6): 580-583.

[12] 王先丽, 陈龙菊. 五鹤续断对衰老小鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(9): 2059-2061.

[13] 蓝苑元, 雷 宁, 张晓菲, 等. 续断提取物对非酒精性脂肪肝小鼠调脂保肝作用及其有效部位研究[J]. 中草药, 2011, 42(12): 2497-2501.

[14] 张 琪, 汪仙阳, 马 博, 等. 复方续断总皂苷镇痛抗炎及预防骨质疏松症的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1683-1684.

六味地黄胶囊大孔吸附树脂纯化工艺的优化

吴 萍¹, 高 陆², 田淋淋¹, 任 晶¹, 白 冰², 徐 建^{1*}

(1. 吉林修正药业新药开发有限公司, 吉林省中药标准化关键工程技术重点实验室, 吉林 长春 130103;
2. 修正药业集团股份有限公司, 吉林 通化 134100)

摘要: 目的 优化六味地黄胶囊大孔吸附树脂纯化工艺。方法 以固形物得量和得率, 以及莫诺昔、马钱苷、芍药苷含有量和收率为评价指标, 药液-树脂用量比例、树脂径高比、吸附体积流量、洗脱体积流量、洗脱剂(70%乙醇)用量为影响因素, 优化纯化工艺。结果 最佳条件为药液-树脂用量比例 3:1, 树脂径高比 1:4, 上样体积流量 2 BV/h, 洗脱体积流量 2 BV/h, 洗脱剂用量 5 BV, 固形物得量和得率分别为 442.56 g 和 4.51%, 莫诺昔、马钱苷、芍药苷含有量和收率分别为 0.091 mg/mL 和 95.03%、0.052 mg/mL 和 92.66%、0.130 mg/mL 和 98.42%。结论 该方法稳定可靠, 药效成分指标可控, 可用于大孔吸附树脂纯化六味地黄胶囊。

关键词: 六味地黄胶囊; 纯化工艺; 大孔吸附树脂

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0735-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.004

Purification process optimization for Liuwei Dihuang Capsules with macroporous adsorption resin

WU Ping¹, GAO Lu², TIAN Lin-lin¹, REN Jing¹, BAI Bing², XU Jian^{1*}

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家中医药管理局标准化项目六味地黄胶囊标准化建设(ZYBZH-C-JL-24)

作者简介: 吴 萍(1982—), 女, 工程师, 研究方向为中药二次开发。Tel: 13756085267, E-mail: 625239481@qq.com

* 通信作者: 徐 建(1981—), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向为中药二次开发。E-mail: 123329687@qq.com

(1. Jilin Provincial Key Laboratory for Key Engineering Technology of Traditional Chinese Medicine Standardization, Jilin Xiuzheng Pharmaceutical New Drug Development Co., Ltd., Changchun 130103, China; 2. Xiuzheng Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tonghua 134100, China)

KEY WORDS: Liuwei Dihuang Capsules; purification process; macroporous adsorption resin

六味地黄方出自钱乙《小儿药证直诀》，由熟地黄、牡丹皮、酒萸肉、山药、泽泻、茯苓组成，用于肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、消渴^[1]，六味地黄胶囊是其精制产品，服用量小，广泛应用于临床。在中药生产中，工艺参数及生产过程质量控制对制剂的有效性、均一性、稳定性有着较大影响，但目前关于六味地黄胶囊的研究大多涉及质量控制，而鲜有工艺研究及生产过程质量控制的报道。因此，本实验以六味地黄胶囊主要药效成分莫诺苷、马钱苷、芍药苷^[2-3]为评价指标，对大孔吸附树脂纯化工艺进行优化^[4-6]，以期保证该制剂均一稳定，质量可靠。

1 材料

1.1 仪器 Ultima-3000 双三元高效液相色谱仪(美国戴安公司); AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-300DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 芍药苷(批号 110736-201741)、莫诺苷(批号 111998-201602)、马钱苷(批号 111640-201605)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、磷酸为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

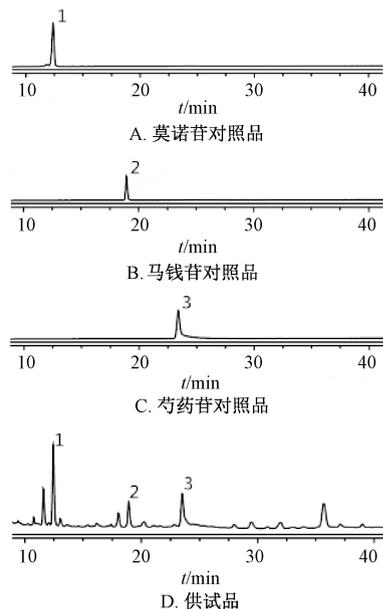
2.1 含有量测定^[7-12]

2.1.1 色谱条件 Kromasil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-0.1% 磷酸(20:80); 检测波长 240 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷对照品适量, 甲醇制成每 1 mL 分别含 50、30、30 μg 上述成分溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密吸取供试液 10 mL, 置于具塞锥形瓶中蒸干, 精密加入 25 mL 甲醇, 称定质量, 超声(250 W、50 kHz) 30 min, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2、5、8、10、15 μL, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标(Y), 进样量为横坐



1. 莫诺苷 2. 马钱苷 3. 芍药苷
1. morroniside 2. loganin 3. paeoniflorin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

标(X)进行回归, 得到莫诺苷、马钱苷、芍药苷回归方程分别为 $Y=16.872X+0.068$ ($r=1.0000$)、 $Y=26.133X+0.3529$ ($r=1.0000$)、 $Y=26.611X+1.2715$ ($r=0.9800$), 分别在 0.1182~0.8865、0.4426~3.3195、0.051~0.3825 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.2 大孔吸附树脂纯化工艺优化

2.2.1 上样液前处理 称取酒萸肉(176 g)醇提后药渣、牡丹皮(132 g)水蒸气蒸馏后水溶液和药渣、熟地黄 352 g、泽泻 132 g、山药 176 g, 加水煎煮 3 次, 加水量依次为 6、4、4 倍量, 每次 1 h, 滤过, 滤液合并^[1], 浓缩至 7 000 mL(每 1 mL 药液含生药材 0.14 g), 莫诺苷、马钱苷、芍药苷含有量分别为 0.093、0.057、0.139 mg/mL。

2.2.2 泄漏曲线绘制 取湿 D101 大孔吸附树脂 15 g, 装入层析柱(内径 1.5 cm、高 20 cm)中, 径高比 1:4。另取“2.2.1”项下水煎液 200 mL 上样, 体积流量 1 mL/min, 每 20 mL 收集 1 份, 共 10 份, 测定每份泄漏液中芍药苷、莫诺苷、马钱苷含有量, 以泄漏量为纵坐标, 上样量为横坐标绘制泄漏曲线, 结果见图 2。由图可知, 上样

60 mL时莫诺昔开始泄漏, 80 mL时其他2种成分也开始泄漏。

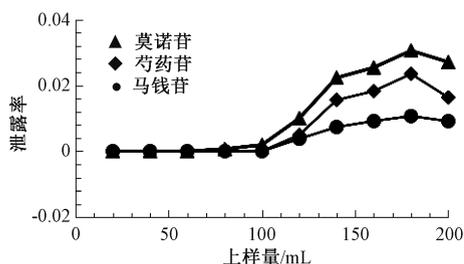


图2 各成分泄漏曲线

Fig. 2 Leakage curves for various constituents

2.2.3 药液-树脂用量比例考察 取3根相同型号的层析柱(内径1.5 cm,高20 cm),按径高比1:4装柱,湿树脂量15 g,上样量75、60、45 mL,即药液-树脂用量比例5:1、4:1、3:1,上样后纯化水洗脱,收集水洗液,计算泄漏量和泄漏率,结果见表1。由表可知,最佳药液-树脂用量比例为3:1。

表1 药液-树脂用量比例考察结果

Tab. 1 Results of drug liquid-resin consumption ratio investigation

药液量/ 树脂量	莫诺昔		马钱苷		芍药苷	
	泄漏量/ mg	泄漏率/ %	泄漏量/ mg	泄漏率/ %	泄漏量/ mg	泄漏率/ %
	3:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4:1	0.09	2.57	0.02	1.40	0.04	1.11
5:1	0.11	2.35	0.03	1.35	0.06	1.24

2.2.4 树脂径高比考察 取3份湿树脂,每份15 g,分别装入不同型号树脂柱中,使径高比为1:3、1:4、1:5,各取45 mL药液上样,纯化水洗脱至流出液无色,70%乙醇洗脱,收集洗脱液,置于恒重的蒸发皿中蒸干,测定固形物量及残渣中莫诺昔、马钱苷、芍药苷含量,计算收率,公式为收率=($C_1 \times V_1 / C_2 \times V_2$) $\times 100\%$,其中 C_1 为洗脱液中莫诺昔/马钱苷/芍药苷含量, V_1 为洗脱液体积, C_2 为水提浓缩液中莫诺昔/马钱苷/芍药苷含量, V_2 为上样液体积,结果见表2。由表可知,最佳树脂径高比为1:4。

表2 树脂径高比考察结果(n=3)

Tab. 2 Results of resin diameter-height ratio investigation (n=3)

树脂径高比	固形物		莫诺昔		马钱苷		芍药苷	
	得量/g	得率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%
1:3	0.336 7	5.34	0.080	86.02	0.049	85.96	0.126	90.64
1:4	0.350 7	5.57	0.089	95.69	0.053	92.98	0.132	94.96
1:5	0.290 4	4.61	0.087	93.55	0.052	91.22	0.127	91.37

2.2.5 吸附体积流量考察 取3份湿树脂,每份15 g,分别装入3根相同型号的层析柱(内径1.5 cm,高20 cm)中,径高比1:4,各取45 mL药液上样,纯化水洗脱至流出液无色,70%乙醇洗

脱,收集洗脱液,置于恒重蒸发皿中蒸干,测定固形物量及残渣中莫诺昔、马钱苷、芍药苷含量,按“2.2.4”项下公式计算收率,结果见表3。由表可知,最佳吸附体积流量为2 BV/h。

表3 吸附体积流量考察结果

Tab. 3 Results of adsorption volume flow rate investigation

吸附体积流量/ (BV·h ⁻¹)	固形物		莫诺昔		马钱苷		芍药苷	
	得量/g	得率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%
1	0.343 1	5.45	0.088	94.62	0.052	91.23	0.137	98.56
2	0.338 6	5.37	0.089	95.70	0.052	91.23	0.138	99.28
2	0.340 0	5.40	0.086	92.47	0.051	89.47	0.128	92.09

2.2.6 洗脱体积流量考察 取3份湿树脂,每份15 g,分别装入3根相同型号的层析柱(内径1.5 cm,高20 cm)中,径高比1:4,各取45 mL药液上样,纯化水洗脱至流出液无色,70%乙醇洗脱,洗脱体积流量1、2、3 BV/h,收集洗脱液,置于恒重蒸发皿中蒸干,测定固形物量及残渣中莫诺昔、马钱苷、芍药苷含量,按“2.2.4”项下公式计算收率,结果见表4。由表可知,最佳洗脱体积流量为2 BV/h。

2.2.7 洗脱剂用量考察 取3份湿树脂,每份约15 g,分别装入3根相同型号的层析柱(内径1.5 cm,高20 cm)中,径高比1:4,各取75 mL药液上样,纯化水洗脱至流出液无色,3、4、5 BV 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,置于恒重蒸发皿中蒸干,测定固形物量及残渣中莫诺昔、马钱苷、芍药苷含量,按“2.2.4”项下公式计算收率,结果见表5。由表可知,最佳洗脱剂用量为5 BV。

2.3 验证试验 按优化后的大孔吸附树脂纯化条

表4 洗脱体积流量考察结果

Tab. 4 Results of elution volume flow rate investigation

洗脱体积流量/ (BV·h ⁻¹)	固形物		莫诺昔		马钱昔		芍药昔	
	得量/g	得率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%
1	0.318 7	5.06	0.091	97.85	0.053	92.98	0.134	96.40
2	0.338 7	5.38	0.092	98.92	0.053	92.98	0.137	98.56
2	0.319 9	5.08	0.091	97.85	0.052	91.23	0.130	93.53

表5 洗脱剂用量考察结果

Tab. 5 Results of eluent consumption investigation

洗脱剂/BV	固形物		莫诺昔		马钱昔		芍药昔	
	得量/g	得率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%
3	0.291 2	4.62	0.091	97.85	0.051	89.47	0.133	95.68
4	0.293 7	4.66	0.091	97.85	0.052	91.22	0.136	97.84
5	0.270 7	4.30	0.092	98.92	0.053	92.98	0.138	99.28

件进行3批验证试验,结果见表6。由表可知,3批纯化物中固形物得率及莫诺昔、马钱昔、芍药昔含量RSD均小于3%,收率与工艺研究结果一致,表明该工艺稳定可行。

表6 验证试验结果 (n=3)

Tab. 6 Results of verification tests (n=3)

试验号	固形物		莫诺昔		马钱昔		芍药昔	
	得量/g	得率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%	含量/(mg·mL ⁻¹)	收率/%
1	450.27	4.59	0.088	93.83	0.054	93.72	0.131	99.32
2	435.13	4.44	0.093	96.63	0.052	92.63	0.132	98.45
3	442.28	4.51	0.091	94.64	0.051	91.64	0.128	97.50
平均值	442.56	4.51	0.091	95.03	0.052	92.66	0.130	98.42
RSD/%	1.71	1.66	1.96	1.12	2.12	0.76	1.19	0.63

3 讨论

中药血清药物化学研究表明,六味地黄制剂经口服吸收入血、在血清中含有量相对较高的药效成分主要为莫诺昔、马钱昔、芍药昔^[2-3],故选择三者作为检测指标。本实验所采用的因素对大孔吸附树脂分离纯化效果均有较大影响^[4-7],其中药液-树脂用量比例考察项下的药液上样量是依据泄漏曲线测定结果而设定。

另外,本实验取湿D101型大孔吸附树脂反复上样、洗脱、再生,发现同一份树脂再生后反复使用3次,莫诺昔、芍药昔吸附量与首次洗脱液相比下降30%时,可确定为树脂使用周期。

综上所述,优化后的六味地黄胶囊大孔吸附树脂纯化工艺合理可行,主要药效成分收率稳定,可用于该制剂的生产。

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: 707-708.
[2] 王喜军, 孙文军, 张宁, 等. 六味地黄丸血中移行成分分离及结构鉴定[J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 277-280.
[3] 朱东亮, 张海, 田文君, 等. 基于“成分-药效”关联分析的六味地黄丸质量控制方法[J]. 中国科学(化学),

2010, 40(6): 786-793.
[4] 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.
[5] 刘东彦, 石晓峰, 胡鹏斌, 等. 大孔吸附树脂富集纯化雪松松针总黄酮工艺的优化[J]. 中成药, 2017, 39(2): 308-311.
[6] 汤如莹, 王玉杰, 李伟, 等. D101型大孔吸附树脂分离纯化沙苑子总黄酮工艺研究[J]. 中草药, 2017, 48(16): 3342-3346.
[7] 林启焰, 谢凡, 程雪梅, 等. 正交试验优化滋肾养阴颗粒剂提取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(1): 213-215.
[8] 徐灿辉, 何维为, 何云飞. HPLC法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖昔、马钱昔、芍药昔和丹皮酚[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 257-259.
[9] 邓振雪, 赵金鹿, 胡容峰, 等. RP-HPLC法同时测定六味地黄渗透泵片中没食子酸等7种活性成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(9): 686-690, 700.
[10] 石伟, 王振中, 倪付勇, 等. 一测多评法在六味地黄软胶囊质量评价中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2880-2886.
[11] 邓禄新. 高效液相色谱法对六味地黄制剂中3种药材主要成分含量测定的研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(9): 77-79.
[12] 石伟, 李家春, 刘汉清, 等. 基于多成分定量测定的六味地黄浓缩丸质量分析[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1002-1006.