

素的数目和比例均发生了改变, 这些可能也是导致钟乳石生品和炮制品药理药效及生物活性不同的重要因素。同时, 钟乳石经炮制后, 其所含的 Pb、Cd、Hg、Cu、As 均符合中国药典 2010 年版中的限量规定, 这也说明炮制有减毒作用。

3.7 化学元素入血的比较研究

药物必须由用药部位进入血液循环才能起作用(肠道直接起作用及外用药物除外), 矿物药亦不例外。通常大鼠灌胃剂量为 60 kg 成年人的 6 倍, 高、中、低组在此基础上分别再设 1、2、4 倍剂量, 为了更好地检测血液中元素变化情况, 选择高剂量灌胃, 即在 60 kg 成年人的 6 倍剂量基础上再乘以 4。由表 3 中大鼠血清元素变化情况可知, 钟乳石炮制前后的血钙浓度与生理盐水组相比差异无统计学意义; 钟乳石炮制后的血钾、血钠含量均有所降低, 并与生理盐水组相比差异非常显著, 其原因有待进一步研究; 同时, 钟乳石经炮制后, 检出了元素 Sn, 且与生理盐水组相比差异有统计学意义。科学实验表明, Sn 与黄素酶活性有关, 能促进蛋白质和核酸代谢, 有利于生长发育^[9]。由此推断, 炮制对钟乳石具有增效的作用。

总之, 炮制机制的阐明与炮制前后的药效研究是密不可分的, 而钟乳石炮制前后的药效作用不仅与其化学成分有关, 还与矿物本身晶体结构

特征、元素赋存情况、体内生物化学效应和生物物理效应等有关, 因此, 对钟乳石炮制机制的阐明还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010) Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 240.
- [2] ZHAO Z J. Analysis of Mineral Drugs(矿物药分析) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991: 182-188, Appendix II.
- [3] Writing Group of Chinese Medicine Dictionary. Chinese Medicine Dictionary(中药辞海) [M]. Vol 2. Beijing: China Medical Science Press, 1996: 1554-1556.
- [4] FAN C S. Harvesting, Identification and Application of Traditional Chinese Medicine(中药采收鉴别应用全书) [M]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press, 1995: 731-732.
- [5] XU C J. Science of Chinese Medicinal Herbs Preparation(中药炮制学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985: 136.
- [6] AN J Z, XU Z H. The Application of new technologies and new methods in the extraction of Chinese herbal medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12(5): 465-467.
- [7] LI Y K. Some problems in experimental method of Chinese herbs serum pharmacology [J] Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 1999, 10(2): 95-98.
- [8] WEN L. Infrared Spectroscopy of The Mineral(矿物红外光谱学) [M]. Chongqing: Chongqing University Press, 1989: 47, 56, 112.
- [9] NI Y M, YAN C H, ZHANG J, et al. Trace Elements and Nutrition Health(微量元素与营养健康) [M]. Shanghai: Tongji University Press, 2009: 164.

收稿日期: 2013-10-15

大孔吸附树脂富集参血胶囊中人参皂苷 Rb₁ 的工艺研究

王京霞, 陈琳, 乔晴, 吴超(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

摘要: 目的 研究大孔吸附树脂富集参血胶囊中人参皂苷 Rb₁ 的工艺条件。方法 采用 HP1100 高效液相色谱仪 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 紫外检测波长: 203 nm, 流动相: 乙腈-水(30:70)对人参皂苷 Rb₁ 进行测定。以树脂的比吸附量、比洗脱量及人参皂苷 Rb₁ 含量为指标, 对树脂类型进行筛选, 同时进行洗涤溶剂的选择, 及应用 L₉(3⁴) 正交实验进行洗脱条件的研究, 从而确定大孔吸附树脂纯化工艺参数。结果 人参皂苷 Rb₁ 在 0.752~9.4 μg 内呈现良好的线性关系, 确定洗涤溶剂为 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 最佳洗脱条件: 提取液上柱后静置 12 h, 用 15 倍 60% 的乙醇溶液, 以流速 1.0 mL·min⁻¹ 进行洗脱。在此条件下, 所得的人参皂苷 Rb₁ 含量较高。结论 该法简便、专属性强, 可用于参血胶囊中人参皂苷 Rb₁ 的提取。

关键词: 参血胶囊; 人参皂苷 Rb₁; 大孔吸附树脂; 富集技术

中图分类号: R283; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)09-1075-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.010

Study on Enrichment of Ginsenoside Rb₁ in Shenxue Capsules by Macroporous Adsorptive Resin

WANG Jingxia, CHEN Lin, QIAO Qing, WU Chao(*The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the technological parameters of the purification process of ginsenoside Rb₁ in Shenxue capsules by macroporous adsorption resin. **METHODS** Measured the content of ginsenoside Rb₁ by HP1100, the HPLC conditions were ZORBAX SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm); the detector wavelength was 203 nm; the mobile phase was acetonitrile-water(30 : 70). The type of resin was selected by the resin adsorption, elution volume ratio and the content of ginsenoside Rb₁. At the same time, wash solvent was selected and the L₉(3⁴) orthogonal experiment was carried out to study the elution conditions, in order to determine the purification technological parameters of macroporous adsorption resin. **RESULTS** The linear of ginsenoside Rb₁ had a good relationship from 0.752 μg to 9.4 μg. Determine the washing solvent solution was 0.5 mol·L⁻¹ NaOH and the optimal elution conditions were: extraction after standing for 12 h in column, with 15 times 60% ethanol, and the flowrate was 1.0 mL·min⁻¹. **CONCLUSION** The method was simple and exclusive, which can be available to enrich ginsenoside Rb₁ in Shenxue capsules.

KEY WORDS: Shenxue capsules; ginsenoside Rb₁; macroporous adsorptive resin; techology of purification

参血胶囊为浙江中医药大学附属第一医院自拟中药制剂,为血液科经验方,由人参皂苷组成,具有益气生血功能,用于气虚引起的白细胞、血小板减少症。人参皂苷是参血胶囊中主要活性成分,由人参叶提取而成。临床应用多年,患者反映良好。根据文献[1-3]报道,人参皂苷易吸附在树脂柱上,且易于解析回收,此外此树脂经再生后,可以反复使用,方法简便。为了更好地控制参血胶囊的工艺,以人参皂苷 Rb₁ 为检测指标,对主成分的大孔吸附树脂的分离过程进行研究,结果表明本方法专属性强,重复性好,可以作为参血胶囊中人参皂苷的提取工艺。

1 仪器、材料与试药

1.1 仪器

HP1100 高效液相色谱仪包括 G1322A 真空脱气机, G1311A 双泵, G1314A 紫外检测器, HP 化学工作站(美国安捷伦公司); KQ3200 超声波清洗器(上海昆山仪器公司),

1.2 材料

滤膜: 0.22 μm Φ 25 mm, 0.22 μm Φ 50 mm(上海兴亚净化材料厂); D101 及 D201 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司)。

1.3 试药

人参皂苷 Rb₁ 对照品(供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号: 110704-200217); 甲醇、乙腈均为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司); 水为自制双蒸水; 其他试剂均为分析纯。中药材人参叶购自浙江中医药大学附属第一医院中药房, 经该院中药房主任药师郑敏霞鉴定为五

加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey 的干燥叶。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 紫外检测波长: 203 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 10 μL。流动相: 乙腈: 水=30 : 70。理论板数按人参皂苷 Rb₁ 计 ≥ 2 500。人参皂苷 Rb₁ 色谱图见图 1。

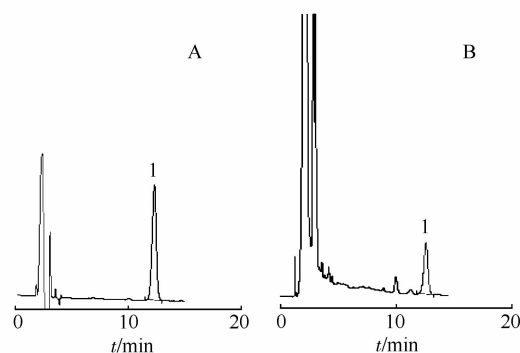


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-人参皂苷 Rb₁。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; 1-ginsenoside Rb₁.

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品 9.4 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 密塞, 摇匀, 即得人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液, 每 1 mL 对照品溶液中分别含人参皂苷 Rb₁ 对照品 0.94 mg。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加氯仿 40 mL, 加热回流 3 h, 弃氯仿溶液, 药渣挥去氯仿, 连同滤纸移入

具塞锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇 50 mL,密塞,放置过夜,超声处理 30 min,滤过,精密量取续滤液 25 mL,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取人参皂苷 Rb_1 对照品溶液逐级稀释到 0.94, 0.47, 0.376, 0.282, 0.188, 0.094, 0.075 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 人参皂苷 Rb_1 对照品溶液,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得人参皂苷 Rb_1 回归方程为 $Y=378.17X-4.2426$, $r=0.9997$, 人参皂苷 Rb_1 进样量在 0.752~9.4 μg 内呈良好的线性关系。

2.2 工艺参数考察与优化

2.2.1 大孔吸附树脂的预处理与装柱 取大孔吸附树脂,适量装入树脂柱,加入高于树脂层 20 cm 的 95%乙醇浸泡 4 h,然后放净洗涤液。同法反复洗至出口洗涤液在试管中加 3 倍量水不显浑浊为止,随即用清水充分洗涤后至无乙醇气味。

2.2.2 上柱液样品制备 中药材人参叶 1 000 g 用 50%乙醇溶液提取 3 次,回流提取 2 h·次⁻¹,过滤,合并 3 次滤液,减压浓缩回收至无醇味,制成相对密度约为 1.08(60 $^{\circ}C$)的浸膏备用。

2.2.3 树脂型号筛选 根据文献[2-3]报道,常用大孔吸附树脂分离纯化人参皂苷。所以选择 D101、DA201 或 D101 与 DA201 的混合树脂来进行实验,以树脂比吸附量、比洗脱量及人参皂苷 Rb_1 含量等为考察指标进行比较,结果见表 1。

表 1 不同类型树脂对人参皂苷纯化效果的比较

Tab. 1 Results of purification effect of different types of resin for ginsenoside

项目	树脂型号		
	D101	DA201	D101+DA201(1:1)
比吸附量/ $mg \cdot mL^{-1}$	1.87	1.82	1.83
比洗脱量/ $mg \cdot mL^{-1}$	1.79	1.73	1.76
人参皂苷 Rb_1 含量/%	1.36	0.83	0.91

由表 1 可知 D101 树脂比吸附量和比洗脱量分别为 1.87 和 1.79 $mg \cdot mL^{-1}$, 因此选择 D101 树脂分离参血胶囊中的人参皂苷 Rb_1 。

比吸附量(absorption ratio) $A=(m_{上}-m_{残}-m_{水洗})/V$, 比洗脱量(elution ratio) $E=m_{洗脱}/V$ 。 $m_{上}$ 、 $m_{残}$ 、 $m_{水洗}$ 、 $m_{洗脱}$ 分别代表上柱样品液中、过柱液中残余、水洗脱液中、60%乙醇洗脱部分的人参皂苷 Rb_1 含量(以 mg 计); V 代表树脂体积(以 mL 计)。

2.2.4 洗涤溶剂的选择 用水、0.5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 和 0.5 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 溶液分别对已经吸附人参皂苷的树脂进行洗涤,以人参皂苷 Rb_1 含量为指标,筛选洗涤溶剂。从结果可知,0.5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 溶液洗涤效果最好,洗去多余杂质,得到的样品中人参皂苷 Rb_1 含量最高,所以选择 0.5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH 溶液作洗涤溶剂,结果见表 2。

表 2 不同溶剂对树脂洗涤效果的影响

Tab. 2 Results of different solvent on resin washing effect

溶剂	用量/倍	流量/ $mL \cdot min^{-1}$	分离物色泽	人参皂苷 Rb_1 含量/%
水	6	1.5	褐色	0.36
0.5 $mol \cdot L^{-1}$ NaOH	6	1.5	淡黄棕色	2.18
0.5 $mol \cdot L^{-1}$ HCl	6	1.5	淡黄棕色	1.06

2.2.5 洗脱条件的选择 甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等溶剂对 D101 树脂中的皂苷成分均有较好的解吸作用,从安全生产、成本等因素考虑,选择乙醇作为生产参血胶囊中人参皂苷的洗脱剂。以洗脱物中人参皂苷 Rb_1 为指标,乙醇浓度、静置时间、乙醇用量(树脂体积的倍数)、流速等因素对洗脱物的影响结果见表 3~5。

表 3 因素水平表

Tab. 3 Table of factors and levels

水平	乙醇浓度/% A	静置时间/h B	乙醇用量/倍 C	流速/ $mL \cdot min^{-1}$ D
1	50	8	5	1.0
2	60	12	10	2.0
3	70	18	15	3.0

表 4 正交试验结果

Tab. 4 Results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	人参皂苷 Rb_1 含量/%
1	1	1	1	1	1.14
2	1	2	2	2	1.16
3	1	3	3	3	1.35
4	2	1	2	3	1.95
5	2	2	3	1	2.14
6	2	3	1	2	1.44
7	3	1	3	2	1.78
8	3	2	1	3	1.38
9	3	3	2	1	1.47
K_1	3.65	4.87	1.42	1.68	
K_2	5.53	4.68	1.47	1.56	
K_3	4.63	4.26	1.90	1.55	
R	1.88	0.61	0.48	0.16	

表 5 方差分析结果

Tab. 5 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值
A	0.589	2	0.295	22.9
B	0.065 0	2	0.032 5	2.5
C	0.286	2	0.143	11.14
D(误差)	0.025 8	2	0.012 9	

注: 查 F 值表^[4]得 $F_{0.05(2,2)}=19$, $F_{0.01(2,2)}=99$ 。

Note: Chek the table of F values^[4] $F_{0.05(2,2)}=19$, $F_{0.01(2,2)}=99$.

由于人参皂苷 Rb_1 测定未设空白列, 未进行重复试验, 只能取方差最小的 D 列作为误差 e , 从而求得 F 值。

从表 4 正交实验结果可知, 实验号 5($A_2B_2C_3D_1$) 工艺提取的人参皂苷 Rb_1 含量最高, 而从极差分析结果可知最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3D_1$, 从提高人参皂苷 Rb_1 含量出发综合考虑选取 $A_2B_2C_3D_1$ 为提取工艺, 即样品液上柱后静置浸泡 12 h 后用树脂体积 15 倍量的 60%乙醇以 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速收集提取液。

通过树脂型号筛选、洗涤溶剂及洗脱条件的选择, 确定参血胶囊的提取工艺为: 样品液上柱静置 12 h 后, 先用 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 洗柱, 将杂质洗尽, 水洗至洗脱液近无色且 pH 值为 7 左右, 再用 60%乙醇洗脱人参总皂苷, 收集 60%乙醇洗脱部分, 真空干燥, 套胶囊即可。

3 讨论

从洗脱溶剂选择的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果可知, 改变洗脱液流速对人参皂苷 Rb_1 含量影响不大, 为

防止上柱液过快渗漏, 选择洗脱流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

比吸附量为单位质量干树脂吸附成分的总和, 代表树脂真实吸附能力。比洗脱量为吸附饱和时, 洗脱至终点后, 单位质量干树脂洗脱成分的质量。二者是确定树脂种类及用量的关键参数^[5]。本研究在大孔吸附树脂类型选择上只进行 D101, D201 及 D101+DA201(1:1) 的筛选, 有一定局限, 有待在以后的工作中完善。

大孔树脂分离纯化人参皂苷, 操作简便、成本低, 可以降低使用有机溶剂对人体和环境的危害, 适宜于工业化生产。

REFERENCES

- [1] CAI X, LIU Z G, WANG P X, et al. Study on purification process of ginsenoside with macro- reticular resin [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2001, 23(9): 631-634.
- [2] ZHANG C X, ZHENG Y L, ZHANG C H, et al. Study on extractive technology for total saponins and rebirth with macroreticular resin [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2003, 38(9): 661-664.
- [3] WU Q, CHEN X C, DU S Y. Study on enrichment of total ginsenosides from folium ginseng by technique of macroporous adsorptive resin [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2006, 29(5): 344-346.
- [4] ZHANG C H, ZHOU Y Z, LIU Y F. Mathematical statistics method(数理统计方法) [M]. Jinan: Shandong University Press, 1995.
- [5] ZHU H, HOU S X, SUN Y Y, et al. Macroporous resin adsorption and purification of effective components of different traditional Chinese medicine characteristics [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1998, 23(10): 607-609.

收稿日期: 2013-09-09

玳玳黄酮自微乳化软胶囊制备过程药效成分转移率考察

黄庆德, 程清, 陈丹*, 曾令军(福建中医药大学药学院, 福州 350122)

摘要: 目的 针对玳玳总黄酮有效部位多组分特性, 基于 HPLC 特征图谱研究玳玳黄酮自微乳化软胶囊制备过程中的药效成分转移率。方法 采用 HPLC 特征图谱法, 色谱柱为 Lichrocart C_{18} (250 mm×4.0 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%的磷酸水溶液(梯度洗脱); 流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 284 nm; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。结果 玳玳黄酮自微乳化软胶囊制备工艺过程中 8 个共有峰的转移率为 80.55%~95.93%, 其中主要特征成分柚皮苷和新橙皮苷迁移率均>95%, 各药效成分群整体迁移相似度>0.999。结论 玳玳黄酮自微乳化软胶囊制备工艺能够比较完整的保留玳玳总黄酮提取物的整体药效部位成分群。**关键词:** 玳玳总黄酮; 自微乳化软胶囊; 转移率; HPLC 特征图谱

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2012J01386); 福建省科技计划项目(2010Y2004, 2010J01189); 福建省发展和改革委员会产业技术开发项目(闽发改高技[2011]1598 号)

作者简介: 黄庆德, 男, 硕士, 副教授 Tel: 13960901707 E-mail: hqduang@163.com *通信作者: 陈丹, 女, 博士, 教授 Tel: (0591)22861135 E-mail: gscd2@163.com