

淡竹叶中竹叶黄酮的纯化工工艺研究*

初阳¹, 杨倩²

(1. 中国医科大学附属第一医院药学部, 沈阳 110001; 2. 沈阳药科大学, 110024)

摘要 目的 优选淡竹叶中竹叶黄酮纯化工工艺。方法 以淡竹叶中总黄酮含量为指标, 对树脂上样浓度、上样液 pH、上柱吸附流速、树脂药材比、乙醇洗脱浓度、洗脱速度进行优化。结果 pH 为 6.0 的高浓度竹叶黄酮提取液上样, 水洗至流出液无色, 以 80% 乙醇、 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 洗脱至流出液无黄酮颜色反应, 收集洗脱液。洗脱液固形物中总黄酮的平均纯度为 57.5%。结论 采用该工艺纯化竹叶总黄酮, 有效成分含量高, 方法重复性好, 适于工业化生产。

关键词 淡竹叶; 黄酮; 大孔树脂; 纯化

中图分类号 R284.2; R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-081(20012)05-0648-03

淡竹叶为禾本科植物淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 的干燥茎叶, 其味甘、淡, 性寒, 归心、胃、小肠经, 具有清热除烦、利尿功效, 多用于热病烦渴、口舌生疮、小便赤色、淋痛等症^[1]。竹叶黄酮是淡竹叶中黄酮类物质的总称, 也是淡竹叶发挥主要治疗作用的有效成分。目前市售竹叶黄酮含量一般为 24%, 笔者在本实验中探索一种安全易行且适于工业化大生产的提高竹叶黄酮的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-9100 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), FA1104 电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司), 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司), 真空干燥箱(上海医用仪器厂), RE52CS 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SZ-97 自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂 淡竹叶饮片(陕西天士力植物药业有限责任公司, 批号: 20090110, 经沈阳药科大学陆金才教授鉴定为淡竹叶 *Lophatherum gracile* Brongn. 茎叶), 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100080-200707), D101 型非极性大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司, 净品型)。无水乙醇(批号: 20101023)、石油醚(批号: 20100315)均为天津市富宇精细化工有限公司提供, 分析纯。95% 乙醇(沈阳市富康消毒药剂厂, 批号: 20100315)。亚硝酸钠(NaNO_2 , 批号: 20090509)、氢氧化钠(NaOH , 批号: 20101102)、硝酸铝 $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3]$, 批号: 20100820]均由天津市博迪化工有限公司提供。盐酸(HCl , 沈阳经济技术开发区试剂厂, 批号: 20110320), 三重蒸馏水(实

验室自制, 批号: 20110109)。

2 方法与结果

2.1 上柱液的制备 取淡竹叶 10 g, 70°C 下以 70% 乙醇 250 mL 水浴回流 2 h, 将提取液浓缩, 得到竹叶黄酮供试品溶液^[2]。

2.2 竹叶黄酮的测定 将“2.1”项下竹叶黄酮供试品溶液加入 50 mL 量瓶, 80% 乙醇定容。精密吸取上述溶液 2 mL 置 50 mL 量瓶, 并以 80% 乙醇补充至 12.0 mL。加入 5% NaNO_2 溶液 1.5 mL, 混匀, 放置 6 min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1.5 mL, 混匀, 6 min 后再加入 4% NaOH 溶液 20.0 mL, 混匀, 用水定容。以阴性对照为空白, 于 510 nm 波长处测吸光度(A)值^[3]。

2.3 树脂对竹叶黄酮的吸附情况考察

2.3.1 静态吸附量与解吸率的测定 室温下, 影响大孔吸附树脂吸附性能的主要因素有上样液浓度和上样液 pH^[4-6], 故笔者分别以供试液浓度和 pH 为考察指标进行单因素考察, 以确定最佳上样条件。

①上样液浓度考察: 分别准确称取预处理湿树脂 10.0 g, 置 250 mL 具塞三角瓶, 分别精密加入已知浓度(C_0 , 0.02, 0.04, 0.06 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、pH 6.0 的竹叶黄酮水溶液 100 mL, 置于摇床上 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振摇 24 h, 充分吸附后滤过, 测定各滤液中黄酮浓度(C_1), 并按下式计算黄酮的吸附量(Q , $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)^[6]。 $Q = (C_0 - C_1) \times 110/10$ 。分别取经上法吸附饱和的树脂, 置 250 mL 锥形瓶, 各加入 95% 乙醇 100 mL, 室温浸泡, 置于摇床, $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振摇 24 h, 充分解吸后滤过, 测定各滤液中黄酮浓度, 以下式计算解析率($R_{\text{解}}$): $R_{\text{解}} = C_{\text{解}} \cdot V/Q$ [$C_{\text{解}}$: 解吸液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), V : 解吸液体积(mL), Q : 黄酮吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。结果见表 1。当上样液为 0.06 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 大孔树脂的 Q 和 $R_{\text{解}}$ 均达到最大。

收稿日期 2011-09-14 修回日期 2011-12-13

基金项目 * 沈阳市科学技术计划项目(1091142-9-00)

作者简介 初阳(1980-), 女, 辽宁沈阳人, 讲师, 主管药师, 硕士, 主要从事中药药剂学研究。电话: 024-83282156, E-mail: chuyang1980@yahoo.com.cn。

表 1 不同浓度样品静态吸附量与解析率测定结果

| 浓度 | C_1 | Q | $C_{解}$ | $R_{解}/\%$ |
|------|--------------------------|------|---------|------------|
| | (mg · mL ⁻¹) | | | |
| 0.02 | 0.006 | 0.18 | 0.012 | 6.67 |
| 0.04 | 0.010 | 0.34 | 0.020 | 5.98 |
| 0.06 | 0.017 | 0.50 | 0.033 | 7.72 |

②上样液 pH: 分别准确称取经预处理的湿树脂 10.0 g, 置 250 mL 具塞三角瓶, 分别精密加入考察“2.3.1”项①中 Q 和 $R_{解}$ 较大的浓度 C_0 的竹叶黄酮水溶液 100 mL, 调节 pH 至 5.0, 6.0, 7.0, 摇床上 100 r · min⁻¹ 振荡 24 h, 充分吸附后滤过, 按该项下测定黄酮的 Q 与 $R_{解}$ 。结果见表 2, 上样液 pH6.0, 大孔树脂 Q 和 $R_{解}$ 均达到最大, 故粗提液 pH 为 6.0 为树脂的最佳吸附 pH。

表 2 不同 pH 条件下静态吸附量与解析率测定结果

| pH | $C_1/$ | $Q/$ | $C_{解}/$ | $R_{解}/\%$ |
|-----|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| | (mg · mL ⁻¹) | (mg · g ⁻¹) | (mg · mL ⁻¹) | |
| 5.0 | 0.004 | 0.52 | 0.037 | 7.10 |
| 6.0 | 0.006 | 0.50 | 0.042 | 8.40 |
| 7.0 | 0.013 | 0.43 | 0.011 | 2.67 |

2.3.2 动态吸附考察 取经预处理的 D101 大孔树脂湿法装柱, 确认无明显气泡及断层后考察竹叶黄酮的动态吸附。

①上柱吸附流速对黄酮保留率的影响: 取竹叶黄酮提取液, 精密吸取 10 mL, 分别以 2, 4, 6, 8, 10 BV · h⁻¹ (BV: 流出液的体积相当于床体积的倍数, 倍床体积) 的流速上柱吸附, 收集流出液, 静止 1 h。然后以 10 BV · h⁻¹ 流速清洗, 收集流出液。合并两次流出液, 测定竹叶黄酮含量, 计算竹叶黄酮在树脂柱的保留率。结果 2, 4, 6, 8, 10 BV · h⁻¹ 样品保留率分别为 90.2%, 89.9%, 87.7%, 82.5% 和 74.9%。表明上柱吸附流速过快, 竹叶黄酮损失较大, 当吸附流速 < 4 BV · h⁻¹ 时, 竹叶黄酮保留率较高。

②树脂(干)药材比的考察: 调整竹叶黄酮提取液的上柱量, 使树脂药材比(干树脂与水提液中竹叶药材的质量比)分别为 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 水洗至无色, 以 80% 乙醇溶液作为洗脱溶液, 2 BV · h⁻¹ 解吸, 收集洗脱液, 测定竹叶黄酮的转移率。结果树脂药材比为 8:1, 6:1, 4:1, 2:1 时, 转移率分别为 89.0%, 89.3%, 88.6% 和 86.2%。表明随着树脂药材比的增大, 竹叶黄酮的转移率有所增加。树脂药材比在 4:1 ~ 8:1 纯化效果较好, 考虑到大孔吸附树脂的成

本, 选择树脂药材比为 4:1。

③乙醇浓度: 将 0.057 mg · mL⁻¹ 竹叶黄酮浓缩液上树脂柱, 先以水洗至洗脱液无色, 分别选取 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 乙醇溶液以 2.0 mL · min⁻¹ 连续洗脱, 收集不同浓度洗脱液各 100 mL, 分取 2 mL 洗脱液至 5 个 10 mL 量瓶, 测定总黄酮浓度, 并计算提取物纯度, 以确定最佳洗脱液浓度。结果见表 3。当乙醇浓度为 80% 时, 总黄酮含量最高。

表 3 不同乙醇浓度对提取物总黄酮含量的影响

| 乙醇浓度/% | $C/$ (mg · mL ⁻¹) | $P/$ % |
|--------|-------------------------------|--------|
| 20 | 0.021 | 23.3 |
| 40 | 0.032 | 41.6 |
| 60 | 0.050 | 51.1 |
| 80 | 0.051 | 57.3 |
| 95 | 0.047 | 52.7 |

④洗脱速度: 经以上条件确定, 将 0.057 mg · mL⁻¹ 竹叶黄酮浓缩液上树脂柱, 先以水洗至洗脱液无色, 然后选取 80% 乙醇溶液分别以 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL · min⁻¹ 流速洗脱至洗脱液无黄酮显色反应, 达到洗脱完全, 收集不同流速洗脱液, 浓缩, 冷冻干燥, 测定总黄酮含量, 计算提取物纯度, 结果洗脱速度分别为 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL · min⁻¹ 时, 提取物纯度分别为 52.8%, 58.1%, 49.5%, 43.2%。当洗脱速度为 2.0 mL · min⁻¹ 时总黄酮含量最高, 故洗脱速度确定为 2.0 mL · min⁻¹。

2.3.3 D101 大孔树脂最佳纯化工艺的确定 经以上吸附条件的筛选, 确定 D101 大孔树脂的最佳纯化工艺。即: pH 6.0 竹叶黄酮提取液以树脂药材比 4:1, 吸附流速 4 BV · h⁻¹ 上样, 先以水洗至流出液无颜色, 然后以 80% 乙醇、2.0 mL · min⁻¹ 洗脱至流出液无黄酮颜色反应。将洗脱液浓缩, 减压蒸发, 真空干燥称质量并以“总黄酮含量测定”项下方法测定总黄酮含量, 计算提取物纯度。结果表明, 3 次平行实验结果分别为 56.8%, 58.2%, 57.6%, 平均纯度 57.5%。

3 讨论

上样液浓度对大孔吸附树脂的吸附与解吸附有明显影响。在一定的浓度范围内, 浓度越高, 大孔吸附树脂的吸附与解吸附越高, 但浓度不可能无限升高, 若浓度超过 0.06 mg · mL⁻¹, 则提取物过浓, 流动性不好, 不易上样, 且损失较多。提取物为 0.06 mg · mL⁻¹ 时, 竹叶黄酮提取物溶液与大孔树脂接触充分, 吸附较好, 同时保证了解吸附率的提高。pH 对 D101 型大孔吸

附树脂吸附与解吸附有较大影响。在酸性条件下对竹叶黄酮的吸附性能较好,解吸附性能也较好。这可能与提取物呈弱酸性有关,当 pH ≤ 6 时,黄酮提取物为分子形态,利于大孔树脂的吸附。采用 20% ~ 95% 乙醇冲洗,竹叶总黄酮含量在 80% 时纯度较高,乙醇浓度较高,能将总黄酮洗脱完全。但当浓度达到 95% 时,不仅竹叶黄酮被洗脱,其他脂溶性物质也被洗脱,反而使纯度降低。

采用大孔树脂法对淡竹叶中黄酮类化合物的提取液进行分离和纯化,经纯化后得到的固形物中总黄酮的平均纯度为 57.5%,比市售的竹叶黄酮制剂纯度(24%)提高约 34%,含量较高,满足中药有效部位的制剂要求。

洗脱速度对总黄酮含量也有明显影响,当洗脱速度过快时,洗脱溶液没有与大孔吸附树脂上的总黄酮充分接触,洗脱不完全。洗脱速度过慢时,无法带动总黄酮流出大孔树脂。因此,洗脱流速也是关键。

由于黄酮类化合物对光、热、湿敏感,易分解变质,因此经提取纯化制备的竹叶黄酮提取液和冻干粉末都必须置于避光的阴凉干燥处保存。

参考文献

[1] 马子密,傅延龄. 历代本草药性汇解[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:133.
 [2] 杨倩,初阳. 淡竹叶中总黄酮物质的提取工艺考察[J]. 山西医药杂志,2010,39(12):1128-1129.
 [3] 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,2010:附录 31.
 [4] 李欣孺,赵峰,龙伟,等. 山茱萸总皂苷的大孔吸附树脂分离与纯化研究[J]. 医药导报,2009,28(6):767-770.
 [5] 龙继红. 大孔吸附树脂纯化天然药物有效成分的影响因素[J]. 华西药学杂志,2007,22(2):237-238.
 [6] 曾元儿,王凤云,江滨绵,等. 茵陈提取液的大孔树脂静态吸附工艺影响因素考察[J]. 中成药,2007,29(2):199-202.

DOI 10.3870/yydb.2012.05.035

尼美舒利缓释片的制备与体外释放度考察

郑稳生,方夏琴,王璐璐,张宇佳,马书键

(中国医学科学院药物研究所,药物传输技术与新型制剂北京重点实验室,北京 100050)

摘要 目的 考察制备尼美舒利骨架缓释片的最佳缓释材料、缓释材料含量和制片压力。方法 采用正交实验,从片剂外观、释放度确定缓释片处方和工艺。结果 通过指标评价体系比较 3 种缓释材料[羟丙基甲基纤维素(HPMC)、kollidon 和卡波姆]的性能,其中 kollidon 压片性能最佳,片剂外观完整光滑,指标得分均达 12 分(总 15 分),HPMC 缓释性能最佳。通过最佳处方和工艺制得的 3 批骨架片外观完整光滑,缓释片释放行为最接近 Higuchi 释放,12 h 平均累积释放达 96.05%。结论 该制备工艺简单可行。

关键词 尼美舒利;缓释;正交实验;体外释放

中图分类号 R971.1;R927.1 **文献标识码** A

文章编号 1004-0781(2012)05-0650-03

尼美舒利(nimesulide)溶解度小,口服给药存在胃肠道不良反应,生物半衰期较短,普通制剂服用后血药浓度波动大等问题^[1-4]。为减少用药次数,进一步降低其胃肠道不良反应,笔者运用缓释材料制备每天给药两次的尼美舒利骨架片,以期避免普通制剂的血药浓度峰谷现象。笔者采用正交实验考察羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)、kollidon 及卡波姆对骨架片释放度的影响,着重研究缓释材料对制剂释放效果的影响,并评价不同缓释材料的作用特

点,对缓释制剂处方的设计及优化具有一定参考价值^[9]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 RC-8D 溶出度测试仪(天津市光学仪器厂)、HP8453 UV 检测器、DP30A 单冲压片机(北京国药龙立科技有限公司)。

1.2 试剂 尼美舒利原料(河北九天生物制品有限公司,含量>99.0%,批号:091101),尼美舒利对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100555-200501),羧甲基纤维素钠(武汉科技有限公司,含量:99%),HPMC(日本信越公司,SH 100000),kollidon SR(BASF 公司),卡波姆 974P(北京市海淀会友精细化工厂)。

收稿日期 2011-07-10 修回日期 2011-10-04

作者简介 郑稳生(1966-),男,安徽潜山人,副研究员,博士,主要从事药物传输技术及新型制剂研究。电话:010-63165233, E-mail:zhengwensheng@imm.ac.cn。