

元胡止痛软胶囊的大孔树脂精制工艺优选

杜茂波, 刘淑芝*, 沈硕, 于娟, 杜艳娇
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

〔摘要〕 目的:优选元胡止痛软胶囊中鞣质类成分的去除工艺及有效成分的精制工艺,为该制剂的工业化生产提供参考。方法:以没食子酸作为鞣质类的指标成分,延胡索乙素作为生物碱类的指标成分,通过单因素试验考察去除鞣质及富集延胡索乙素的方法并对富集延胡索乙素的工艺条件进行优化。结果:选择 AB-型大孔树脂精制元胡止痛软胶囊,可除去没食子酸,富集延胡索乙素。富集延胡索乙素的最佳工艺条件为上样液质量浓度 0.28 g·mL⁻¹,径高比 1:10,每克树脂吸附延胡索乙素 1.366 mg,洗脱溶剂 95% 乙醇,洗脱流速 2 BV·h⁻¹,洗脱剂用量 5 BV。延胡索乙素的吸附率和洗脱率分别为 84.7%, 85.0%,纯化后总生物碱纯度达 3.63%,较纯化前的 0.349% 显著提高。结论:AB-8 型大孔树脂可以在去除鞣质类成分的情况下,富集元胡止痛软胶囊中以延胡索乙素为代表的有效成分,为改善该制剂的临床疗效和患者顺应性提供参考。

〔关键词〕 元胡止痛软胶囊; AB-8 型大孔树脂; 延胡索乙素; 没食子酸

〔中图分类号〕 R283.6;R284.1;R284.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)18-0013-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180013

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.0956.006.html>

〔网络出版时间〕 2015-08-07 9:56

Optimization of Purification Process of Yuanhu Zhitong Soft Capsules by Macroporous Resin DU Mao-bo, LIU Shu-zhi*, SHEN Shuo, YU Juan, DU Yan-jiao (Institue of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize purification process of Yuanhu Zhitong soft capsules about removing tannins and enriching alkaloids. **Method:** Gallic acid was indicators to purify tannins, tetrahydropalmatine was indicators to purify alkaloids. Single factor test was adopted to optimize purification process of removing gallic acid and enriching tetrahydropalmatine in Yuanhu Zhitong soft capsules. **Result:** AB-8 macroporous resin was selected, its best process of enriching tetrahydropalmatine was: the concentration of sample solution of 0.28 g·mL⁻¹, diameter height ratio of 1:10, the largest adsorption capacity of 1.366 mg for per gram of resin, eluent of 95% ethanol, elution flow rate of 2 BV·h⁻¹, eluent amount of 5 BV. Under these conditions, adsorption rate was 84.7%, elution ratio was 85.0%. Purity of total alkaloids in the final product was up to 3.63%. **Conclusion:** AB-8 resin can be used to remove tannins and enrich alkaloids, this study provides a reference for improving clinical efficacy and patient compliance of Yuanhu Zhitong soft capsules.

〔Key words〕 Yuanhu Zhitong soft capsules; AB-8 macroporous resin; tetrahydropalmatine; gallic acid

软胶囊是固体制剂的一种,较传统的固体制剂(片剂、颗粒剂等)具有生物利用度高的特点。软胶囊体系由内容物与囊壳两部分组成。药物在内容物中以多种形式存在,如以蜂蜡为核心的混悬液等。一般软胶囊的囊材核心组成为明胶、甘油、水^[1]。此外,还可能包含一些抗氧剂、着色剂等。

作为囊壳材料的明胶可与醛类物质发生氨缩醛反应,造成囊壳老化,这样会影响软胶囊的崩解与溶出,导致软胶囊高生物利用度的优势不存在。醛类物质的来源为周围环境和软胶囊内容物。中药软胶

〔收稿日期〕 20150123(004)

〔基金项目〕 国家自然科学基金青年科学基金项目(81202931)

〔第一作者〕 杜茂波,在读博士,助理研究员,从事中药制剂及经皮给药新剂型研究,Tel:010-84043227,E-mail:dumaobo@icmm.ac.cn

〔通讯作者〕 *刘淑芝,研究员,博士生导师,从事中药制剂及经皮给药新剂型研究,Tel:010-84043227,E-mail:liushuzhi2004@sina.com

囊中广泛存在的一种醛类物质为鞣质。鞣质广泛存在于植物界,约 70% 以上的生药中含有鞣质类化合物,尤以在裸子植物及双子叶植物的杨柳科、山毛榉科、蓼科、蔷薇科、豆科、桃金娘科和茜草科中为多。鞣质类物质具有 3 个特点^[2-3]:①极易被氧化,如果存在于软胶囊内容物体系中,发生氧化反应可能会造成内容体系的不稳定,出现分层现象。②鞣质分子中有邻位酚羟基,故可与多种金属离子络合。一方面其可能与中药提取物中的金属离子络合产生肉眼可见的沉淀物,另一方面还可与药物中生物碱类有效成分反应而产生沉淀。③鞣质可与蛋白质结合生成沉淀,软胶囊的囊壳材料明胶可以与鞣质发生反应产生沉淀。上述因素均可造成明胶软胶囊不稳定,降低其生物利用度。

除去鞣质的常用方法有明胶沉淀法、碱沉法、聚酰胺色谱法及大孔树脂法等^[2]。大孔树脂是通过吸附和筛选原理,用一定的溶剂将吸附力和相对分子质量不同的有机化合物洗脱下来而达到分离目的的方法。元胡止痛软胶囊为 2010 年版《中国药典》收载品种,由延胡索(醋)、白芷组成,具有理气、活血、止痛的功能,用于治疗气滞血瘀的胃痛、胁痛、头痛及痛经。现代药理研究表明该制剂的活性成分为生物碱类物质,以延胡索乙素为代表。2010 年版《中国药典》将延胡索乙素作为元胡止痛软胶囊质量控制的指标成分。本实验拟以延胡索乙素为指标优选元胡止痛软胶囊内容物的精制工艺,以提高该制剂的稳定性,为其工业化生产提供参考。

1 材料

2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。醋延胡索、白芷(北京仟草中药饮片有限公司,经中国中医科学院中药研究所臧琛副主任药师鉴定,分别为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* 的干燥块茎,伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* 的干燥根),AB-8 型大孔树脂(南开大学化工厂),HPD100 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司),聚酰胺柱色谱(30 ~ 60 目,200 目,江苏长丰化工有限公司),SP825 型大孔树脂(日本三菱公司),延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110726-201011),没食子酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 20130329),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定^[4]

2.1.1 供试品溶液的制备

将洗脱液浓缩至干,精

密称取干粉适量,加 40% 甲醇 50 mL 超声溶解 30 min,定容于 50 mL 量瓶中,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.2 延胡索乙素 色谱条件为 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-乙腈-水-三乙胺(25:35:40:3),柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹。精密称取延胡索乙素对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加适量甲醇超声使溶解,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,制成 62 mg·L⁻¹ 对照品溶液。精密吸取对照品溶液适量,过 0.45 μm 微孔滤膜,分别进样 1,2,5,10,15,20 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线 $Y = 1 \times 10^6 X - 17\,534$ ($r = 0.999\,6$),线性范围 0.062 ~ 1.240 μg。

2.1.3 没食子酸^[5] 色谱条件为 Unitary C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.5% 磷酸(5:95),流速 1 mL·min⁻¹。精密称取没食子酸对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加适量甲醇超声使溶解,放冷,加甲醇定容至刻度,摇匀,制成每 0.105 mg·L⁻¹ 的溶液,精密吸取对照品溶液适量,过 0.45 μm 微孔滤膜,分别进样 1,2,5,10,15,20 μL。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线 $Y = 593.16X + 4.068$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.105 ~ 2.1 ng。

2.2 上样介质的选择^[6] 元胡止痛提取物的提取溶剂为 70% 乙醇^[4]。大孔树脂常用的上样介质为水,元胡止痛提取物用水进行溶解时,发现有较多沉淀,无法完全溶解,因此不能用水作为上样介质。精密称取元胡止痛提取物 0.2 g,精密加入不同体积分数(20%,30%,40%,50%,60%,70%,95%)乙醇 50 mL,超声溶解 30 min,过 0.22 μm 微孔滤膜,测得样品溶液中延胡索乙素质量浓度分别为 0.022 0,0.023 5,0.022 1,0.021 3,0.023 9,0.024 3,0.015 3 g·L⁻¹。说明延胡索乙素在体积分数 20% ~ 70% 乙醇中的溶解度差别不大,在 95% 乙醇中的溶解度较小,综合考虑,选择 30% 乙醇为上样介质。

2.3 元胡止痛上样液的制备^[4] 称取醋延胡索 400 g 和白芷 200 g,加 6 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 1.5 h,过滤,滤液减压回收乙醇,浓缩至无醇味,水浴蒸干,真空干燥,得 14.12 g·g⁻¹ 元胡止痛提取物。精密称取该提取物 20 g,加 30% 乙醇 1 L 超声 30 min 使溶解,过滤,得 0.28 g·mL⁻¹ 元胡止痛上样液。

2.4 大孔吸附树脂的预处理 取 HPD100,SP825,AB-8 型大孔吸附树脂适量,加 95% 乙醇浸泡 24 h,

充分溶胀后,除去上浮树脂碎片和杂物,湿法装柱,用 95% 乙醇以适当流速通过树脂柱,洗至流出液-水(1:5)混合不呈浑浊,水洗至无醇味,备用。

2.5 不同精制方法的考察^[7-8]

2.5.1 大孔树脂法 取 HPD100, AB-8, SP825 型大孔树脂和聚酰胺柱色谱 200 目,聚酰胺柱色谱 30 ~ 60 目各 3.0 g,分别置于 50 mL 锥形瓶中,各加入 0.28 g·mL⁻¹元胡止痛上样液 50 mL,振摇 24 h,使树脂完全吸附。将静态吸附的样品分别装入 5 根已经处理好的树脂柱中,静置 2 h,加水 2 BV 进行洗脱,弃去水洗液,用 95% 乙醇 4 BV 进行洗脱,洗脱液水浴蒸干,按 2.1 项下方法测定,结果延胡索乙素吸附量分别为 0.265, 0.296, 0.199, 0.025, 0.065 mg·g⁻¹,没食子酸质量浓度分别为 0, 0, 6.943, 0, 7.137 mg·L⁻¹。

2.5.2 碱沉法 精密称取元胡止痛提取物 1 g,加 80% 乙醇 50 mL 超声溶解 30 min,滤过,备用,滤液用 10% 氢氧化钠调 pH 8.0,振摇 24 h,抽滤,滤液用乙酸调 pH 7,按 2.1 项下方法测定,结果延胡索乙素未检出,没食子酸质量浓度 80.50 mg·L⁻¹。

综上可知,经 HPD100, AB-8 型大孔树脂及聚酰胺柱色谱 200 目精制后的样品中已无没食子酸,说明这 3 种树脂对鞣质类物质有较好的去除效果;延胡索乙素的吸附量以 AB-8 型大孔树脂为最优,故选择 AB-8 型大孔树脂对元胡止痛软胶囊进行精制。

2.6 泄露曲线绘制 向树脂柱中加入已处理好的 AB-8 型大孔树脂 5 g,径高比 1:10,取 0.28 g·mL⁻¹元胡止痛上样液 120 mL 过柱,上样流速 2 BV·h⁻¹,分段收集泄露液,每份 10 mL,按 2.1 项下方法测定延胡索乙素含量,绘制泄露曲线,见图 1。结果显示在第 8 份流出液中指标成分质量浓度开始明显变大,故确定最大上样量为 80 mL(1 BV = 20 mL),延胡索乙素吸附量 6.83 mg,每克树脂吸附延胡索乙素 1.366 mg,吸附率 84.7%。

2.7 洗脱溶剂考察 按上述确定的吸附条件,取上样液通过 4 根 AB-8 型大孔树脂进行动态吸附,按确定的工艺条件上样,加水 2 BV 水洗脱杂质,分别用体积分数 60%, 70%, 80%, 95% 的乙醇溶液 4 BV 洗脱,洗脱流速 2 BV·h⁻¹,收集洗脱液,水浴蒸干,真空干燥,计算延胡索乙素质量分别为 5.19, 5.39, 5.53, 5.80 mg,4 根树脂柱的洗脱率分别为 76%, 79%, 81%, 85%,故选择 95% 乙醇洗脱。

2.8 洗脱曲线考察 AB-8 型大孔树脂湿法装柱

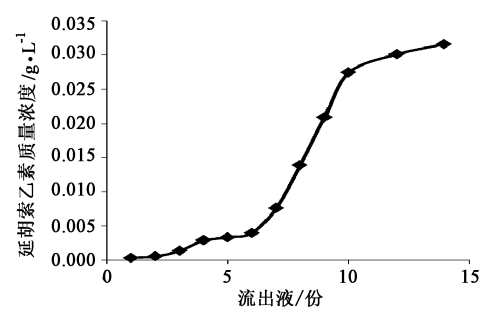


图 1 元胡止痛软胶囊的 AB-型大孔树脂精制工艺中延胡索乙素的泄露曲线

Fig.1 Leakage curve of tetrahydropalmatine in purification process of Yuanhu Zhitong soft capsules by AB-8 macroporous resin

5 g,径高比 1:10,按上述确定的吸附和洗脱条件进行纯化,加水 2 BV 洗脱杂质,用 95% 乙醇 130 mL 以 2 BV·h⁻¹的流速洗脱,分段收集洗脱液,每份 10 mL,共收集 13 份,测定延胡索乙素的含量,绘制洗脱曲线,见图 2。结果发现在第 10 个流份时,延胡索乙素基本已洗脱完全,确定乙醇用量 100 mL (5 BV)。

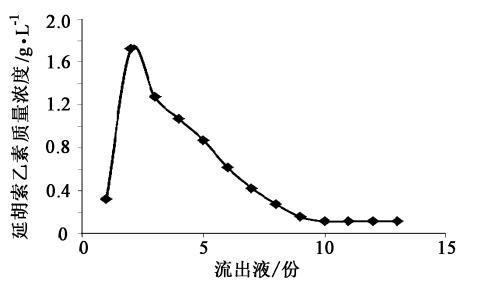


图 2 元胡止痛软胶囊的 AB-型大孔树脂精制工艺中延胡索乙素的洗脱曲线

Fig.2 Eluting curve of tetrahydropalmatine in purification process of Yuanhu Zhitong soft capsules by AB-8 macroporous resin

2.9 验证试验 按上述确定的工艺,以延胡索乙素和没食子酸含量为指标进行 3 次验证试验,结果 3 批样品终产物中延胡索乙素质量分数分别为平均质量分数 3.63%, RSD 1.2%。较纯化前的 0.349% 显著提高。

3 讨论

本文在预试验过程中发现,采用 10% 明胶沉淀法除去鞣质时,沉淀过滤较为困难,混入的明胶不易除去,故未选择该方法对鞣质类成分进行精制。本文选择大孔树脂法、聚酰胺柱色谱法及碱沉法进行考察,结果表明大孔树脂法与聚酰胺柱色谱法均优于碱沉法,尤其以 HPD100, AB-8 型大孔树脂及聚酰胺柱色谱 200 目对鞣质类成分的精制效果最好。大孔树脂与聚酰胺柱色谱分离的原理不同,聚酰胺柱

色谱通过氢键吸附与鞣质形成稳定的结构而不被洗脱,HPD100,AB-8型大孔树脂属于非极性大孔树脂,鞣质类成分在其表面无法吸附,从而达到除去的目的。

大孔树脂法较聚酰胺柱色谱法在富集以延胡索乙素为代表的生物碱类成分时有明显优势。可能是延胡索乙素类成分与聚酰胺类树脂形成氢键的能力较弱造成的。而对于同一性质的 HPD100,AB-8 型大孔树脂,二者对延胡索乙素类生物碱吸附的差别,可能是由于树脂孔径不同造成的。大孔树脂法用以精制中药复方制剂已经有广泛的应用,但一般的研究只注重对其有效成分的富集而忽略了对杂质成分的去除^[9]。本文的研究对象软胶囊是一种特殊制剂,其对内容物的要求较高。这类制剂既要求有足够的有效成分以保证药效,又需要除去鞣质类杂质提高制剂的稳定性,从而保证其高生物利用度的优势。

软胶囊由囊壳及内容物两部分组成。精制后的元胡止痛软胶囊较精制前有三方面的改善:①经过精制后,需要制剂药物变少,这样就可以选择新型载体系统将药物制成溶液型内容物,大大提高了药物的生物利用度,还可提高元胡止痛软胶囊的稳定性。例如可将药物制成纳米微乳、醇质体、胶束、纳米粒等溶液剂。②内容物中鞣质的去除可以避免其被氧化后造成内容物体系不稳定而出现的结块、分层等现象。③对以明胶为囊壳材料的软胶囊而言,鞣质的去除可大大降低其与明胶发生氨缩醛反应的机

率,使得囊壳得到保护,使其崩解、溶出不受影响。

[参考文献]

[1] 杜茂波,刘淑芝,王晨,等. 基于中医传承辅助平台明胶软胶囊囊皮配方规律分析[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(1):16-18.

[2] 毕殿洲. 药剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:531-536.

[3] 石碧,何先祺,爱德华·哈斯兰姆. 水解类植物鞣质性质及其与蛋白质反应的研究[J]. 皮革科学与工程,1994,4(3):18-21.

[4] 杜茂波,刘淑芝,刘树扬,等. 元胡止痛软胶囊中延胡索提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):50-52.

[5] 杜茂波,刘淑芝. HPLC 测定元胡止痛软胶囊中没食子酸含量[J]. 中国中医药信息杂志,2014,21(4):80-81,85.

[6] 苏红,兰燕宇,马琳,等. 采用聚酰胺除辛芍冻干粉针中赤芍提取物鞣质的工艺研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(6):632-635.

[7] 周本宏,张琛霞,沈恒,等. 大孔吸附树脂对地榆中总鞣质的纯化[J]. 中国药师,2011,11(5):685-688.

[8] 孙萍,张根林,马彦梅,等. 大孔树脂对沙枣鞣质的吸附及解吸性能研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(13):6912-6913.

[9] 张旭,王锦玉,全燕,等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(6):286-290.

[责任编辑 刘德文]