

壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒 提取液的纯化工工艺研究

盛华刚, 朱立俏, 林桂涛*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化效果。方法: 以纯化前后枳实薤白桂枝汤颗粒提取液中柚皮苷、橙皮苷含量和浸膏率为考察指标, 对壳聚糖澄清剂和乙醇沉淀法对提取液的纯化效果进行比较。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 确定壳聚糖澄清剂的最佳纯化工工艺。结果: 壳聚糖澄清剂要优于乙醇沉淀法, 最佳纯化工工艺为药液质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、静置温度为 30°C 、1% 壳聚糖溶液的加入量为药液体积的 40%、药液 pH 为 6。结论: 壳聚糖澄清剂可以用于枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化。

[关键词] 壳聚糖; 枳实薤白桂枝汤颗粒; 纯化

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0015-03

枳实薤白桂枝汤颗粒由中医传统名方《金匱要略》中枳实薤白桂枝汤研制而来, 由枳实、薤白、桂枝、厚朴、瓜蒌组成。原方用于“胸痹, 心中痞, 留气结在胸, 胸满, 胁下逆抢心”的治疗。现在临床上枳实薤白桂枝汤主要用于治疗冠心病、心绞痛^[1]等病症, 显示了较好的疗效。根据处方中各药材活性成分的性质和临床上以汤剂用药显示较好疗效的特点, 现将其制成颗粒剂。对于枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化处理, 本文对壳聚糖澄清剂与乙醇沉淀法进行了比较, 并采用正交试验优选壳聚糖澄清剂的最佳纯化工工艺。

1 仪器与药材

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, XSI05DU 电子天平(瑞士梅特勒公司), LD5-10 离心机(北京医用离心机厂)。乙腈为色谱纯, 其它试剂均为分析纯; 壳聚糖(山东奥康生物科技有限公司, 批号: 090303V); 聚酰胺(50~80 目, 浙江台州路桥四甲生化塑料厂); 柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110722-200309), 橙皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0721-9909)。枳实、薤白、桂枝、厚朴、瓜蒌均购自济南建联药店。

2 不同纯化工工艺比较

2.1 枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的制备

枳实、薤白、桂枝、厚朴、瓜蒌 5 味药, 加 22 倍量水, 煎煮 1 次, 3 h, 滤过, 滤液浓缩至每 mL 相当于生药 1 g, 作为原药液。

2.2 壳聚糖纯化处理

2.2.1 1% 壳聚糖溶液的配制 称取壳聚糖 1.5 g, 加 1% 醋酸 150 mL, 搅拌混匀后静置 24 h, 备用。

2.2.2 壳聚糖澄清剂纯化处理 精密吸取原药液 25 mL, 加热至 70°C , 加入 10% 体积的壳聚糖溶液, 搅拌 20 min, 30°C 静置 12 h, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液转移至 100 mL 量瓶中, 沉淀加 25 mL 水洗涤 1 次, 再次离心, 上清液转移至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 作为壳聚糖纯化处理供试品溶液。

2.3 70% 乙醇沉淀处理 精密吸取原药液 25 mL, 加乙醇使含醇量达到 70%, 低温(5°C)静置 24 h, 滤过, 滤液回收乙醇至无醇味, 转移至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 作为乙醇沉淀法供试品溶液。

2.4 柚皮苷和橙皮苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C_{18} (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm); 以乙腈 - 0.2% 磷酸溶液(20:80)为流动相; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 283 nm。

2.4.2 标准曲线的制备 精密称取减压干燥至恒重的柚皮苷对照品 3.78 mg、橙皮苷对照品 3.35 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。精密吸取柚皮苷溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。精密吸取橙皮苷溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度。各吸取 20 μL 进样, 以进样量

[收稿日期] 2009-09-15

[通讯作者] * 林桂涛, Tel: (0531) 89628590; E-mail: xiaolangsmile@sohu.com

为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得柚皮苷回归方程 $Y=918\ 392X-1\ 678$ ($r=0.999\ 9$),柚皮苷在 $0.302\ 4\sim3.024\ \mu\text{g}$ 有良好的线性关系;橙皮苷回归方程 $Y=927\ 263X+5\ 918$ ($r=0.999\ 9$),橙皮苷在 $0.134\sim1.608\ \mu\text{g}$ 有良好的线性关系。

2.4.3 供试品溶液中柚皮苷^[2]和橙皮苷的含量测定 精密吸取供试品溶液适量(原药液 2.5 mL,纯化处理供试品溶液 10 mL),通过聚酰胺柱(2.5 g,内径 1.5 cm,湿法装柱),以水 25 mL 洗脱,弃去水液,再用甲醇 50 mL 洗脱,收集洗脱液,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,续滤液测定柚皮苷和橙皮苷质量分数。结果见表 1。

2.5 浸膏率的测定 精密吸取供试品溶液 25 mL,分别置已干燥至恒重的蒸发皿中,蒸干,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘 3 h,取出,置于玻璃干燥器中冷却后称重,计算浸膏率。见表 1。

表 1 纯化方法比较 /%

纯化方法	柚皮苷	橙皮苷	浸膏率
未纯化	1.396	0.130	40.47
乙醇沉淀	1.294	0.119	24.05
壳聚糖纯化	1.318	0.115	26.25

由表 1 可以看出,壳聚糖纯化法和乙醇沉淀法都可以有效降低提取液的浸膏率,并且对有效成分无明显影响。壳聚糖纯化法与乙醇沉淀法相比较,有效成分差别很小,且有降低成本、简化操作的特点。因此对于枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化,壳聚糖纯化法要优于乙醇沉淀法。

3 壳聚糖纯化工艺参数的考察

采用壳聚糖进行纯化的过程中,药液浓度、静置温度、壳聚糖的加入量、pH 等因素会对纯化效果产生影响^[3-4],以柚皮苷、橙皮苷的含量和浸膏率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行考察,优选出最佳纯化工艺。因素水平见表 2。

3.1 方法 精密吸取质量浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液 25 mL, $0.50\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液 50 mL, $0.25\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液 100 mL,加热至 70 $^{\circ}\text{C}$,按正交表中的设计,同 2.2.2 项下方法操作,加水定容至 250 mL。精密吸取 25 mL 药液,分别按 2.4.3 项和 2.5 项下方法进行含量和浸膏率测定。见表 3。

表 2 壳聚糖纯化工艺因素水平

水平	A 质量浓度 $/\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	B 静置温度 /	C 壳聚糖 加入量/%	D pH
1	1	5	10	不调
2	0.5	30	20	5
3	0.25	60	40	6

注:未纯化处理供试品溶液的质量浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,可加水稀释至 $0.5\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.25\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;原药液 pH 约为 4,采用 10% NaOH 溶液调节 pH 为 5,6。

表 3 壳聚糖纯化条件 $L_9(3^4)$ 正交 /%

试验号	A	B	C	D	柚皮苷 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 生药	橙皮苷 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 生药	浸膏率 /%
1	1	1	1	1	11.34	0.89	25.24
2	1	2	2	2	12.72	1.05	27.48
3	1	3	3	3	11.99	0.93	25.39
4	2	1	2	3	13.73	1.20	28.44
5	2	2	3	1	13.10	1.26	25.83
6	2	3	1	2	12.66	1.17	28.09
7	3	1	3	2	12.89	1.03	29.11
8	3	2	1	3	13.32	1.00	30.09
9	3	3	2	1	10.85	0.83	28.13

柚皮苷	K_1	12.017	12.653	12.440	11.763
	K_2	13.163	13.047	12.433	12.757
	K_3	12.353	11.833	12.660	13.013
	R	1.146	1.214	0.227	1.250
橙皮苷	K_1	0.957	1.040	1.020	0.993
	K_2	1.210	1.103	1.027	1.083
	K_3	0.953	0.977	1.073	1.043
	R	0.257	0.126	0.053	0.090
浸膏率	K_1	26.037	27.597	27.807	26.400
	K_2	27.453	27.800	28.017	28.227
	K_3	29.110	27.203	26.777	27.973
	R	3.073	0.597	1.240	1.827

表 4 柚皮苷方差分析

因素	SS	f	F	P
A	2.084	2	20.840	<0.05
B	2.299	2	22.990	<0.05
C(误差)	0.100	2	1.000	
D	2.615	2	26.150	<0.05

表 5 橙皮苷方差分析

因素	SS	f	F	P
A	0.130	2	26.000	< 0.05
B	0.024	2	4.800	
C	0.005	2	1.000	
D(误差)	0.012	2	2.400	

表 6 浸膏率方差分析

因素	SS	f	F	P
A	14.197	2	25.719	< 0.05
B(误差)	0.552	2	1.000	
C	2.643	2	4.788	
D	5.876	2	10.645	

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$

由分析可知: 以柚皮苷含量为指标, 最佳条件为 $A_2B_2C_3D_3$; 以橙皮苷含量为指标, 最佳条件为 $A_2B_2C_3D_2$; 以浸膏率为指标, 最佳条件为 $A_1B_3C_3D_1$ 。

药液浓度、静置温度、pH 为影响柚皮苷含量的主要因素 ($P < 0.05$), 而药液浓度为影响橙皮苷含量和浸膏率的主要因素 ($P < 0.05$)。综合以上分析, 确定最佳纯化工工艺条件为 $A_2B_2C_3D_3$ 。即药液质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、静置温度为 30°C 、壳聚糖溶液的加入量为 40%、药液 pH 为 6。

3.2 验证试验 正交试验优选出的最佳工艺验证 3 次, 结果柚皮苷质量分数为 $(13.70 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药, 橙皮苷含量为 $(1.26 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药, 浸膏率为 $(25.72 \pm 0.13) \%$, 说明正交试验优选出的纯

化工工艺条件是稳定可行的。

4 讨论

壳聚糖纯化处理药液一次离心后沉淀会吸附少量有效成分, 加少量水洗涤后再次离心可尽量将沉淀所吸附的有效成分溶解完全, 防止有效成分损失。

试验中仅对枳实中的柚皮苷和橙皮苷含量进行了研究, 未对其他成分如枳实中的辛弗林、厚朴中的厚朴酚与和厚朴酚进行研究。主要原因是这几种成分的水提取率较低, 经过减压浓缩和减压干燥后在制得的颗粒剂中含量极少, 从制剂的整体研究考虑, 未对壳聚糖澄清剂对其影响进行详细考察。

壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的有效成分无明显影响, 且能够显著降低浸膏率; 相对于乙醇沉淀法, 有效成分差别很小, 具有原料消耗少, 成本低, 生产周期短, 后续处理容易, 只需离心即可等优点, 要优于乙醇沉淀法。

[参考文献]

- [1] 郭来, 张家礼. 枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛 30 例[J]. 成都中医药大学学报, 1997, 20(4): 25.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 171.
- [3] 任红莉, 阿依努尔, 宋达. 壳聚糖用于银杏叶提取液澄清工艺的研究[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 25.
- [4] 王海宁, 谢印芝, 樊飞跃. 壳聚糖及 ZTC1 + 1- 澄清剂对大青叶提取液的澄清工艺研究[J]. 中国药房, 2008, 19(21): 1625.

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿, 请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员, 登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后, 如录用, 请按通知要求交纳论文发表费。(见本刊稿约 7 投稿及缴费)