

藏药复方黄獐软肝颗粒提取工艺研究

孙忠文^{1,2}, 刘汉清², 黄一平^{1*}, 鞠建明¹

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 优选临床有效经验方复方黄獐软肝颗粒的最佳提取工艺。方法: 通过正交实验法 $L_9(3^4)$, 醇提工艺以黄芪甲苷含量作为考察指标, 水提工艺以多糖含量为考察指标优选复方黄獐软肝颗粒的提取工艺。结果: 最佳醇提取工艺为 10 倍量的 75% 的乙醇回流提取 3 次, 每次提取 1 h; 最佳水提取工艺为 10 倍量水提取 3 次, 每次提取 1.5 h。结论: 该提取工艺稳定、合理、可行。

[关键词] 复方黄獐软肝颗粒; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0016-03

复方黄獐软肝颗粒是用于肝纤维化治疗的临床有效验方, 处方由人工牛黄、黄芪、印度獐牙菜、红花、余甘子等药材组成, 功能保肝利胆。笔者通过对复方中诸药有效成分及药理作用的文献研究, 采用全方药材全部醇提, 药渣继续加水提取的方法, 以尽可能完全的提取方中有效成分。本文通过正交试验探讨醇提工艺和水提工艺, 达到优化处方提取工艺的目的。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); AL 204 1/万天平(瑞士 METTLER 公司); DW-2 型 恒温电热碗(江苏省通州市张芝山镇决心化工电器厂); DK-S26 型 恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); Anke TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂); UV-2802 型 紫外-可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。黄芪甲苷(供含量测定用, 批号 0781-200210, 中国药品生物制品检定所); 葡萄糖(分析纯, 质量分数 99.91%); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯。印度獐牙菜、余甘子购于拉萨市高原生物研究所, 黄芪、甘草等药材购于江苏省中西医结合医院药剂科。

2 醇提工艺优选^[1]

2.1 方法 通过文献研究, 黄芪甲苷为复方发挥保

肝利胆作用的有效成分, 因此, 确定采用黄芪甲苷为指标, 通过 4 因素 3 水平正交试验, 优化醇提工艺, 因素水平见表 1。

表 1 醇提取因素水平

水平	A 醇浓度 /%	B 溶剂倍数	C 提取次数	D 提取时间 /min
1	65	8	1	1
2	75	10	2	1.5
3	85	12	3	2

2.2 正交样品溶液的制备 按照一日处方量, 称取黄芪等其他药材共 9 份, 精密称定得质量 $W(g)$, 按正交试验表各行所列条件进行提取, 过滤, 得 9 份正交样品提取液, 量取体积 $V(mL)$ 。测定黄芪甲苷含量, 见表 2。

2.3 黄芪甲苷的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 5.07 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取相当于 4 g 黄芪生药的提取液, 减压浓缩至约 30 mL, 正丁醇萃取 4 次, 每次用量分别为: 50, 50, 40, 40 mL, 合并正丁醇萃取液, 氨试液洗涤 3 次, 每次 40 mL。正丁醇萃取液蒸干, 残渣加甲醇溶解, 并定容至 5 mL, 摇匀, 即得。

2.3.3 色谱条件与系统适应性 色谱柱 Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (32:68), 柱温 30 ℃, Alltech 蒸发光散射检测器, 漂移温度 115 ℃, 载气流速 2.0 L·min⁻¹, 进样体积 10 μL。见图 1。

数据分析: 通过直观分析可以看出, 醇提工艺最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3D_3$, 即 10 倍量 75% 的乙醇提

[收稿日期] 20100111(017)

[第一作者] 孙忠文, 硕士生, 研究方向: 中药新制剂和新剂型研究

[通讯作者] * 黄一平, 研究员, 硕士生导师, Tel: (025) 85637809; E-mail: yiping@163.com

取 3 次, 每次提取 2 h; 通过方差分析, 提取次数对结果有显著影响, 考虑到提取时间对结果影响较小, 同时为降低能源消耗, 提取时间考虑采用 1 h, 因此拟采用醇提工艺条件: 10 倍量 75% 乙醇提取 3 次, 每次提取 1 h。

表 2 醇提各指标测定结果 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	A	B	C	D	黄芪甲苷质量分数
1	65	8	1	1	0.527
2	65	10	2	1.5	0.731
3	65	12	3	2	0.877
4	75	8	2	2	0.756
5	75	10	3	1	0.892
6	75	12	1	1.5	0.588
7	85	8	3	1.5	0.863
8	85	10	1	2	0.589
9	85	12	2	1	0.736
K_1	0.712	0.715	0.568	0.718	
K_2	0.745	0.737	0.741	0.727	
K_3	0.729	0.734	0.877	0.741	
R	0.033	0.022	0.309	0.023	

2.4 醇提工艺验证试验

2.4.1 样品制备 取一个处方量药材 3 份。按照正交优选的最佳醇提工艺条件提取, 即药材加 10 倍量 75% 乙醇, 提取 3 次, 每次提取 1 h, 平行试验 3 份, 记为 1, 2, 3 号样品。

2.4.2 黄芪药材中黄芪甲苷的提取 另称取黄芪药材粉末 4 g 精密称定, 置于索氏提取器中, 加甲醇 40 mL, 冷浸过夜, 再加甲醇适量, 加热回流 4 h, 提取液浓缩至干, 残渣加水 10 mL, 微热使溶解, 用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液充分洗涤 2 次, 每次 40 mL, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 即得黄芪药材溶液, 记为 4 号样品。

表 3 醇提工艺验证试验 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No.	黄芪甲苷质量分数	聊
1	0.863	
2	0.871	0.864
3	0.859	
4	0.961	

验证试验 3 份样品黄芪甲苷质量分数平均值为 $0.864 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药, 表明该工艺参数合理可行。

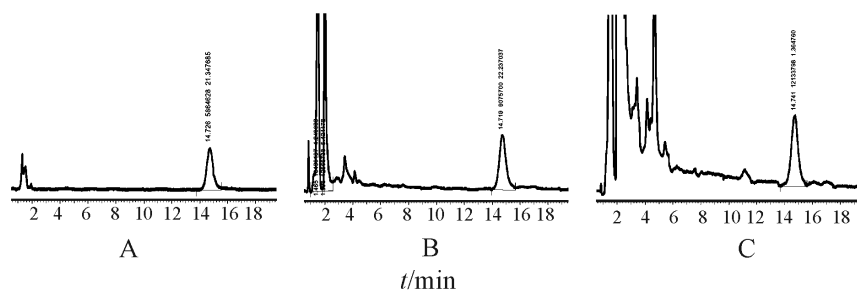


图 1 黄芪甲苷含量测定 HPLC 色谱

A 黄芪甲苷对照品; B 黄芪药材; C 提取物样品

3 水提工艺优选

3.1 方法 通过文献研究, 醇提之后的药渣中所含多糖类能提高机体免疫力, 因此确定以总多糖含量为指标, 通过 4 因素 3 水平正交试验, 优化水提工艺, 因素水平见表 4。

表 4 醇提取因素水平表

水平	A 溶剂倍数	B 提取次数	C 提取时间 /min
1	8	1	1
2	10	2	1.5
3	12	3	2

3.2 正交样品溶液制备及多糖含量测定

3.2.1 正交样品溶液制备 取醇提正交试验的药渣, 按照原编号依次进行水提正交试验, 提取液过滤, 量取体积。

3.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 105 干燥至恒重的葡萄糖 25 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容至刻度, 精密吸取 2 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 配成 $488.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 储备液和 $195.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

3.2.3 供试品溶液的制备 精密量取浓缩至 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的各试验号提取液 25 mL, 置于锥形瓶中, 加乙醇至含醇量 85%, 静置 12 h, 滤过, 滤渣用无水乙醇 25 mL 洗涤, 然后加蒸馏水 50 mL 溶解(必要时水浴加热溶解), 采用 Sevag 法脱蛋白, 即加入三氯甲烷-正丁醇(5:1)混合液 15 mL, 振摇, 萃取 30 min, 水相离心除去蛋白, 取水溶液重复以上 Sevag 法脱蛋白操作两次, 所得水溶液置于 100 mL 量瓶中, 蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 1 mL 于 25 mL 量瓶中, 蒸馏水稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

3.2.4 样品中多糖的含量测定^[2] 取对照品溶液 0.5 mL、供试品溶液 1 mL, 置 10 mL 刻度试管中, 加水使成 2 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速加入 5 mL 浓硫酸, 振荡 5 min, 沸水浴加热 15 min, 取出后冷水浴 30 min, 于波长 490 nm 处测定吸光度,

随行试剂作空白对照。结果见表 5。

表 5 水提工艺正交试验结果 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

No	A	B	C	D	总多糖质量分数
1	8	1	1	1	12.85
2	8	2	1.5	2	13.78
3	8	3	2	3	15.75
4	10	1	1.5	3	14.33
5	10	2	2	1	15.19
6	10	3	1	2	18.27
7	12	1	2	2	12.19
8	12	2	1	3	15.07
9	12	3	1.5	1	18.31
K_1	14.127	13.363	15.397	15.450	
K_2	15.930	14.680	15.473	14.987	
K_3	15.430	17.443	14.617	15.050	
R	1.803	4.080	0.856	0.463	

数据分析:通过直观分析可以看出,水提工艺最佳工艺条件为 $A_2B_3C_2$,即 10 倍量水提取 3 次,每次提取 1.5 h;通过方差分析,提取次数对结果有显著影响,因此拟采用水提工艺条件:10 倍量水提取 3 次,每次提取 1.5 h。

3.3 水提工艺验证试验 取以上醇提取验证试验药渣,进行水提取工艺验证,结果 3 份平行试验总多糖的平均质量分数为 $19.15 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药,表明该工艺参数基本合理可行。

4 讨论

复方中主要均含有醇溶性较好的有效成分,因此,通过正交试验优化醇提取工艺;同时,醇提药渣中主要含有醇溶性差的多糖等物质,而多糖亦是复方发挥作用的药效成分,因此,继续加水提取药渣中多糖类成分,以尽可能完全的提取复方中有效成分。

在工艺研究过程中,充分考虑到工业生产的实际,对提取工艺影响较小的因素,如提取时间,为降低生产成本,在验证试验中采用能耗较少的水平,得到的结果基本合理可行。

[参考文献]

- [1] 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,2005:212.
- [2] 李孝栋,陈景山,陈峰,等. 黄芪多糖含量测定的方法学研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(2):35.

[责任编辑 仝燕]