

抗复感颗粒的提取工艺研究

曹斌^{*}, 孙翠, 赖其瑞, 农云开, 李文琪
(广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 探讨抗复感颗粒的提取工艺。方法: 以黄芪甲苷含量、总多糖含量、干浸膏的得率为考查指标, 采用正交设计法确定抗复感颗粒的最佳提取工艺。结果: 抗复感颗粒最佳提取工艺为加水 8 倍量, 提取 3 次, 提取时间为第 1 次 1.5 h, 第 2, 3 次为 1 h。结论: 优选的抗复感颗粒提取工艺简单、实用, 具有可操作性, 适合工业大生产。

[关键词] 抗复感颗粒; 提取工艺; 黄芪甲苷; 总多糖; 正交设计

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0006-04

抗复感颗粒是由广西中医学院第一附属医院自行研制开发的治疗小儿反复呼吸道感染的纯中药医院制剂——健脾益气合剂(又名: 抗复感合剂 I 号)。是在临床应用的基础上研制而成, 经过 10 年来的临床应用, 证实该药能改善反复呼吸道感染患儿的症状、体征, 减少复感次数, 临床有效率达 95.6%^[1]。本方由黄芪、党参、白术、陈皮等 8 味药材组成, 其中黄芪、党参为君药。具有健脾益气固表之功, 用于肺脾气虚型复感儿效果良好。现代研究表明, 黄芪中的黄芪甲苷及黄芪多糖 (astragaloside) I, , 杂多糖 AH-L, 酸性多糖 AMon-S 等多糖具有调节免疫功能、促进机体代谢等作用^[2-3]。党参根中大部分是糖类, 其中有果糖 (fructose), 菊糖 (inulin)^[4], 多糖^[7]和 4 种杂多糖 CP₁, CP₂, CP₃, CP₄^[5] 等, 党参多糖同其它药用植物多糖一样, 具有广泛的药理作用, 主要包括调节机体免疫^[5-9]。白术含有果糖 (fructose), 菊糖 (inulin)^[10], 具免疫活性的甘露聚糖 AM-3^[11] 等, 白术多糖具有重要生理活性, 具有抗肿瘤、抗衰老、增强机体免疫力等功能^[11-14]。因此本试验根据有效成分性质、中草药用药习惯和临床疗效, 采用水提工艺, 以黄芪甲苷含量、总多糖含量、干浸膏得率为考察指标, 对影响水煮工艺的主要因素即加水量、提取时间、提取次数等因素, 采用正交实验方法优选

本方的水提工艺条件, 为确定该制剂的生产工艺提供实验依据。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Empower 色谱工作站. Waters 2420 ELSD 蒸发光散射检测器, 色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 721 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), LD4-2A 型高速离心机 (北京医用离心机厂), Heidolph Laborota 4000 旋转蒸发仪, FA1104 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); Sartorius 天平, 101-3 型电子鼓风干燥箱 (上海阳光实验仪器有限公司)。

黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110781-200512); 所有药材购自南宁生源中药饮片有限责任公司, 其中黄芪、党参、白术均由广西中医药研究院生药学教授赖茂祥鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bag. var. *mongholicus* (Beg.) Hsiao. 的干燥根、桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf. 的干燥根、菊科植物白术 *Atractodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。乙睛为色谱纯 (Dima 公司), 其他试剂均为分析纯, 水为超净水。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙睛-水 (35:65); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 30 °C; ELSD 漂移管温度 50 °C; 喷雾器雾化温度 36 °C; 理论板数按黄芪甲苷计不低于 4 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 2.43 mg, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度,

[收稿日期] 2010-01-13

[基金项目] 广西科学技术研究与技术开发计划项目 (桂科攻 0630002-2L)

[通讯作者] * 曹斌, 女, 助理研究员, 学士, 主要从事药学和中药制剂研究, Tel: (0771) 5868275; E-mail: caobinj@163.com

即得浓度为 $0.486 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 50 mL(取相当于黄芪生药 1.67 g 的提取液),水浴蒸干,残渣加水 20 mL,微热溶解,用水饱和的正丁醇溶液振摇提取 4 次,每次 4 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。残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 12 cm)。以水 50 mL 洗脱,弃去水液。再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,用甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中。加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.1.4 标准曲线制备 分别吸取对照品溶液 0.10, 0.18, 0.26, 0.34, 0.42 mL, 置 1 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 48.60, 87.48, 126.36, 165.24, 204.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,进样 20 μL 测定。

结果黄芪甲苷质量浓度在 48.60 ~204.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积有良好的线性关系,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程: $Y = 1.7509X + 10.692$, $r = 0.9991$ 。

含量测定 精密吸取供试品溶液,按上述方法测定,计算样品中的黄芪甲苷含量。

2.2 苯酚—硫酸法测定总多糖含量

2.2.1 对照品溶液 精确称取 105 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 203.9 mg 置 100 mL 量瓶中,以蒸馏水溶解并稀释至刻度。再分别精密吸取 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 mL 置 100 mL 量瓶中稀释至刻度,分别编号为 1, 2, 3, 4, 5 号管,摇匀,即得贮备液。

2.2.2 标准曲线的制备 分别吸取编号为 1, 2, 3, 4, 5 号管的葡萄糖标准品贮备液 1 mL, 置 10 mL 具塞试管中,依次加入蒸馏水使终体积为 2.0 mL,另取 2.0 mL 蒸馏水作空白对照,各管加入 5% 苯酚试液 1 mL,摇匀,迅速滴加浓硫酸各 5 mL,摇匀后放置 5 min,置沸水中加热 20 min,冰水浴冷却之后,于 484 nm 处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 6.3413X + 0.0242$, $r = 0.9994$,表明葡萄糖质量浓度在 50.975 ~101.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.3 供试液的制备 精密吸取提取液 10 mL 置离心管中,加入 95% 乙醇 85 mL,放置 1 h 后,离心

(3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min),倾去上清液,吹干沉淀中残余乙醇,加水 10 mL 溶解,同法再醇沉 1 次,将沉淀物加适量水溶解,定量转移至 100 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,滤过。取续滤液 20 mL,加水稀释至 100 mL,混匀,作为供试品溶液。

2.2.4 总多糖测定 精密吸取供试液 1 mL,按上述方法测定,计算总多糖的含量。

2.3 干浸膏的测定 照《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法,精密吸取提取液 30 mL,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,105 干燥 3 h,取出,置干燥器内冷却 30 min,精密称重,计算干浸膏得率。

2.4 正交试验设计 用 $L_9(3^4)$ 正交表,以黄芪甲苷含量、总多糖含量、干浸膏的得率为指标,对影响水煮工艺的主要因素即加水倍数、提取时间、提取次数进行考察。根据中药制剂的常规方法及本品前身医院制剂生产的实际经验,拟定因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

因素水平	A 加水量/倍	B 煎煮次数	C 煎煮时间/h
1	6	1	1.0
2	8	2	1.5
3	10	3	2.0

按处方比例平行称取各味药材,共称取 9 份,每份 194.2 g,按表 2 安排试验,药材加水煎煮,合并提取液,浓缩并定容至 1 000 mL,提取液备用。

2.5 数据处理与工艺优选 用综合加权评分法,以黄芪甲苷质量分数,总多糖质量分数和干膏得率作为评价指标,各指标成分 9 次试验的最大值为 100 分,将各指标成分的含量分别转换为评分值,考虑到黄芪甲苷含量和总多糖含量较为重要,故其加权系数各取 0.4,浸膏得率的加权系数取 0.2,将每次试验的各指标成分的评分值乘以相应的加权系数后求和,得综合评分值,即综合评分 = 黄芪甲苷质量分数/最大黄芪甲苷质量分数 $\times 100 \times 0.4$ + 总多糖质量分数/最大总多糖质量分数 $\times 100 \times 0.4$ + 干膏得率/最大干膏得率 $\times 100 \times 0.2$ 。

以综合评分值进行正交试验结果和方差分析,正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

2.6 优选提取工艺确定 通过正交试验和方差分析结果表明,B因素(煎煮次数)具有显著性,对本工艺影响最大,是影响黄芪甲苷提取率高低的重要因

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果计算表 ($n=2$)

试验号	A	B	C	D	黄芪甲苷 /ng·g ⁻¹	多糖 /%	干膏得 率/%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.2355	2.16	15.15	46.68
2	1	2	2	2	0.2821	3.75	23.31	67.73
3	1	3	3	3	0.4382	5.17	27.47	94.71
4	2	1	2	3	0.3031	3.54	18.13	64.67
5	2	2	3	1	0.3589	4.05	22.43	76.19
6	2	3	1	2	0.4473	5.31	28.77	97.39
7	3	1	3	2	0.3013	3.65	18.55	65.59
8	3	2	1	3	0.3528	4.11	24.81	77.65
9	3	3	2	1	0.4438	5.53	30.31	99.69
K_1	209.12	176.94	221.72	222.56				
K_2	238.26	221.57	232.09	230.71				
K_3	242.92	291.79	236.49	237.03				
R	11.27	38.28	4.92	4.82				

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	p
A	223.67	2	111.84	6.37	>0.05
B	2234.72	2	1117.36	63.67	<0.05
C	38.32	2	19.15	1.09	>0.05
D(误差)	35.10	2	17.55	—	—

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ 。

素,即煎煮提取次数对黄芪甲苷含量、总多糖含量和干膏得率有显著性影响,影响提取的主次因素为 $B > A > C$,即提取次数 > 加水量 > 回流时间。通过方差分析和 K 值综合考虑,根据生产实际情况,为了节约能源和时间,降低生产成本,故选择水煮条件为 $A_2 B_3 C_2$,即加 8 倍量水提取 3 次,提取时间为 1.5 h, 1 h。

2.7 最佳工艺条件的验证试验 按处方比例称取各味药材共 194.2 g,称取 6 份。分别做了试验(煎煮 3 次,每次加 10 倍量水,每次 2 h)与试验(煎煮 3 次,每次加 8 倍量的水,第一次 1.5 h,第二、三次各 1 h)的比较试验(均做了 3 批),结果见表 4。

从试验结果可知,试验 , 的黄芪甲苷、总多糖的提取率和干膏得率几乎一样,没有明显差异,按优选得到的工艺条件(试验)进行煎煮提取,其提取物提取率稳定在较优水平,说明试验 的工艺条件合理可行,具有可操作性,适合工业大生产,为最佳工艺条件。由此确定最佳的提取工艺条件为加 8 倍量水,提取 3 次,第 1 次 1.5 h,第 2,3 次为 1 h。

表 4 验证试验数据 ($n=3$)

试验号	黄芪甲苷 /ng·g ⁻¹ 黄芪	多糖 /%	干膏率 /%
-1	0.451	5.57	30.15
-2	0.446	5.51	30.28
-3	0.443	5.54	30.58
-1	0.438	5.25	29.48
-2	0.434	5.26	29.34
-3	0.432	5.22	29.62

3 讨论

有效成分含量的高低是药物疗效的重要评价因素,黄芪是本方的君药,黄芪甲苷其主要成分,对机体免疫功能有重要的调节作用;且方中主药都富含多糖,是本方健脾益气,调节免疫力的重要物质基础;干膏得率是制剂工艺可行性的一个影响因素,能总体上反应各味药中有效成分的提取情况,是经典的考察指标之一,所以试验选用黄芪甲苷含量,总多糖含量和干膏得率为评价指标优选提取工艺。

水提工艺研究结果表明,在本试验条件下,提取次数对指标成分的提取具有显著的影响,是提取工艺的重要影响因素。

[参考文献]

- [1] 王力宁,玉振喜,张晓春,等.系列抗复感合剂防治小儿反复呼吸道感染的临床研究[J].广西中医药,1998,21(6):4.
- [2] 卢彦琦,贺学礼.黄芪化学成分及药理作用综述[J].保定师范专科学校学报,2004,17(4):40.
- [3] 黄乔书,吕归宝.黄芪多糖的研究[J].药学学报,1982,17(3):200.
- [4] 蔡定国,王英贞.党参化学成分的研究(第二报)[J].中草药,1982,13(10):10.
- [5] 张思巨,张淑运.党参多糖的研究[J].中草药,1987,18(3):2.
- [6] 张汝学,王凤连.甘肃产党参多糖成分对小鼠体液免疫及白细胞介素-2 产生的影响[J].兰州医学院学报,1993,19(1):14.
- [7] 杨光,李发胜.党参多糖对小鼠免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2005,21(4):39.
- [8] 张晓君,祝晨蓀.党参多糖对小鼠免疫和造血功能的影响[J].中药新药与临床药理,2003,14(3):174.
- [9] 张汝学,王凤连.甘肃产党参多糖成分对小鼠细胞免疫的调节作用[J].兰州医学院学报,1992,18(3):161.

- [10] 王燕生, 张骏. 白术化学成分的研究 [J]. 中草药, 1985, 16(10): 7.
- [11] 顾玉成, 任丽娟. 中药白术免疫活性成分多糖的研究 [J]. 中国药学杂志, 1993, 28(5): 275.
- [12] 季宇彬, 高世勇. 多糖的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(增刊): 45.
- [13] 汤新江. 白术多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医研究, 1998, 11(2): 7.
- [14] 顾玉成, 任丽娟. 白术多糖的研究 [J]. 中草药, 1992, 23(19): 507.
- [责任编辑 仝燕]

欢迎订阅 2010 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》是经中国科技部批准, 由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物。已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊); “中国中文核心期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库”来源期刊; “中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)”全文收录期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊(光盘版)优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月。本着以提高与普及相结合的办刊方针。主要设置: 制剂工艺、化学与分析、药理、临床、综述、基层园地、消息等栏目, 交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量分析、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。

《中国实验方剂学杂志》现为半月刊, 16 开本, 240 页, 标准刊号: ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 10 元, 全年 180 元。国内外公开发售, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2-417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部。邮编: 100700, 联系人: 何希荣, 联系电话: (010) 84076882 或 64014411 转 2849; E-mail: czd@vip.sina.com