

正交实验法优选地黄寡糖有效部位的提取工艺

张红果^{1,2}, 张汝学¹, 贾正平^{1*}, 邱建国¹, 李茂星¹, 蓝丹¹

(1. 兰州军区兰州总医院国家中医药管理局临床中药学重点学科, 兰州 730050;

2. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 以地黄中水苏糖含量和出膏率为指标优选地黄寡糖有效部位的提取工艺。方法: 以水苏糖为指标成分, 采用正交实验法对地黄寡糖有效部位的提取工艺进行优选。结果: 优选工艺为采用水煎煮提取, 加 10 倍量的水, 提取 3 次, 每次 1 h。结论: 优选出的工艺科学合理。

[关键词] 水苏糖; 出膏率; 提取工艺; 正交实验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0027-06

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根, 临床应用十分广泛。地黄性寒、味甘, 具有清热凉血、养阴生津的功效。现代药理实验证实地黄具有增加血红蛋白含量、提高机体造血功能、增强红细胞变形能力、降低血糖及防治糖尿病并发症; 对免疫系统具有双向调节作用等^[1]。现采用正交试验, 以水苏糖的含量为评价指标, 对地黄的提取工艺进行优化选择, 为合理开发利用地黄提供科学依据。

1 仪器与试药

SCL-6A 高效液相色谱仪, Shimadzu RID-6A 示

[收稿日期] 2009-11-30

[基金项目] 国家科技部中小企业技术创新基金(立项号 08C26216202398)

[通讯作者] * 贾正平, Tel: (0931) 8994652; E-mail: empriqqq@public.lz.gs.cn

3 讨论

冷却剂的筛选过程中, 冷却剂的表面张力、冷却剂与药液间的密度差及冷却剂的黏度是影响滴丸成型及圆整的重要因素。与液体石蜡相比, 二甲硅油的表面张力更小, 滴制的滴丸更加圆整。同时, 冷却剂与药液间的密度差在一定的范围内, 密度越接近, 滴丸越圆整。另外, 对于丸重大的大滴丸, 冷却剂黏度越大, 表面张力越小, 滴丸下降的速度越慢, 冷却效果及圆整度就越好。因此选择黏度高二甲硅油作为滴丸的冷却剂, 另外, 比较不同型号(350 cs, 500 cs)的二甲硅油对滴丸成型的影响, 结果没有明显差异, 可以选择不同型号的二甲硅油作为冷却剂。

差折光检测器(日本), Millennium³² 色谱管理系统; 色谱柱 Phenomenex NH₂ 柱(4.6 mm ×150 mm, 5 μm 美国), 检测灵敏度 Range 0.5 ×10⁻⁶ RIU; BP210S 电子天平(赛多利斯); XH-C 型旋涡混合器(姜堰市康健医疗器具有限公司); H·HS 电热恒温水浴锅(红旗医疗器械厂); BPZ-6033LC 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); 微量进样器(上海安亭微量进样器厂); 水苏糖对照品(Sigma 065K3775GAS-583); 地黄购自兰州市医药公司, 经兰州医学院药学系杨永健教授鉴定为玄参科(Scrophulariaceae)植物怀庆地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)的根, 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 地黄水提取和醇提取寡糖有效部位工艺的优选

2.1 高效液相色谱法测定水苏糖含量^[2]

2.1.1 色谱条件 流动相乙腈-水(70:30); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温室温; 进样量供试品溶液 20 μL,

滴丸的最终质量, 不只与成型有关, 在处方筛选时, 很重要的是得到质量稳定的滴丸处方, 以便于工业化生产, 因此, 试验中设计了考查 0 d 和 10 d 的滴丸与辅料相容性, 同时也初步考察了滴丸的稳定性。

[参考文献]

- [1] 国家药品监督管理局. 仙灵骨葆片[S]. 国家中成药标准汇编, 1998: WS-10289(ZD-0289)-2002.
- [2] 钟静芬. 表面活性剂在药学中的应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 401.
- [3] 陆锦芳, 赛德纳. 固体分散技术在中药制剂中的应用[J]. 中成药, 1995, 17(3): 6.

对照品溶液 20 μL 。所有进样溶液均经 $\phi = 0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜超滤, 超声脱气。水苏糖保留时间为 11 min 左右。分离度 (R) > 1.5, 理论塔板数 (n) 以水苏糖峰计算不低于 11 400。

2.1.2 对照品及供试品的制备 精密称取水苏糖对照品, 加灭菌注射用水配制成每 mL 含 8 mg 的溶液, 0.45 μm 滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为对照品溶液。精密称取地黄提取物 0.02 g, 加灭菌注射用水定容至 1 mL 并使完全溶解, 处理如对照品, 作为供试品溶液。

2.2 正交实验设计 地黄含有多种水溶性成分, 主要为糖类成分。地黄寡糖就是从地黄中提取分离出来的一类分子量较小的寡糖成分^[31], 主要为四糖 (水苏糖), 还包括三糖和二糖。根据糖类成分极性较大的性质, 提取工艺选用水煎煮提取及醇回流提取, 对其提取工艺进行优选。

2.2.1 分别称取地黄药材 50 g, 共 9 份, 以加水量、提取时间、提取次数等因素为考察对象, 每个因素拟订 3 个水平 (见表 1)。选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 具体实验安排见表 2。提取液静置后取上清液, 浓缩至稠浸膏, 减压干燥, 测定水提取物的出膏率及水苏糖含量。

表 1 地黄水煎煮提取工艺因素水平表

实验水平	A 加水量 / 倍数	B 提取次数	C 提取时间 / h	备注
1	10	1	0.5	首次需补加 2 倍量*
2	15	2	1.0	
3	20	3	1.5	

* 根据吸水率实验, 吸水率为 200%

2.2.2 称取地黄药材 50 g, 共 9 份, 以加入乙醇量、提取次数、提取时间、乙醇浓度等因素为考察对象, 每个因素拟订 3 个水平 (见表 3)。选用 $L_9(3^4)$ 正交设计表, 具体实验安排见表 4。提取液静置后取上清液, 浓缩至稠浸膏, 减压干燥, 测定醇提取物的出膏率和水苏糖质量分数。

表 2 和表 4 的提取物得率及水苏糖含量结果表明: 水提物得率及水苏糖含量比醇提物得率及水苏糖含量高, 因此应采用水煎煮法提取地黄寡糖有效部位。

由表 5 可知, B 因素对水提物得率具有显著性影响 ($P < 0.05$)。

表 2 水提取正交设计

No.	A	B	C	D	提取物得率 / %	水苏糖质量分数 / %
1	1	1	1	1	28.38	7.78
2	1	2	2	2	53.81	17.09
3	1	3	3	3	60.08	19.38
4	2	1	2	3	45.35	13.57
5	2	2	3	1	49.34	13.62
6	2	3	1	2	54.22	16.62
7	3	1	3	2	36.85	11.14
8	3	2	1	3	50.79	14.28
9	3	3	2	1	71.60	17.89
聊	47.42	36.86	44.46	49.77		
聊	49.64	51.31	56.92	48.29		
聊	53.08	61.97	48.76	52.07		
R_1	5.66	25.11	12.46	3.78		
SS	48.753	952.737	240.241	21.769		
聊	14.75	10.83	12.89	13.10		
聊	14.61	15.00	16.18	14.95		
聊	14.44	17.97	14.72	15.75		
R_2	0.31	7.13	3.29	2.65		
SS	0.147	77.047	16.297	11.069		

表 3 地黄乙醇回流提取工艺因素水平表

实验水平	A 乙醇用量 / 倍数	B 回流次数	C 回流时间 / h	D 乙醇浓度 / %	备注
1	10	1	0.5	50	首次需补加 2 倍量*
2	15	2	1.0	70	
3	20	3	1.5	90	

* 根据吸醇率实验, 吸醇率为 200%

表 4 乙醇提取正交实验设计

No.	A	B	C	D	提取物得率 / %	水苏糖含量 / %
1	1	1	1	1	24.66	5.36
2	1	2	2	2	43.17	9.67
3	1	3	3	3	17.12	2.85
4	2	1	2	3	8.86	1.45
5	2	2	3	1	58.08	14.68
6	2	3	1	2	41.43	11.82
7	3	1	3	2	39.67	9.06
8	3	2	1	3	12.66	2.17
9	3	3	2	1	63.25	13.36
聊	28.32	24.40	26.25	48.66		
聊	36.12	37.97	38.43	41.42		
聊	38.52	40.60	38.29	12.88		
R_1	10.21	16.20	12.18	35.78		
SS	170.964	453.700	293.251	2147.586		
聊	5.96	5.29	6.45	11.13		
聊	9.32	8.84	8.16	10.18		
聊	8.20	9.34	8.86	2.16		
R_2	3.36	4.06	2.41	8.97		
SS	9.243	17.524	29.285	145.910		

表 5 水提取物得率方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P
A	48.753	2	24.377	2.240	>0.05
B	952.737	2	476.369	43.766	<0.05
C	240.241	2	120.121	11.036	>0.05
D(误差)	21.769	2	10.884		

$$F_{1-0.05(2,2)} = 19.0, F_{1-0.01(2,2)} = 99.0$$

2.3 工艺验证 地黄采用水提取正交实验优选的工艺,提取 3 批,每批地黄药材投药量为 50 g,进行工艺验证。验证结果与正交试验结果吻合,表明此工艺合理,结果见表 6。

表 6 水提取工艺验证 /%

批号	水苏糖质量分数	提取物得率
20081128	17.64	61.45
20081129	19.72	59.83
20081130	17.57	59.45

3 讨论

地黄中含有复杂的化学成分,目前对其化学成分的研究已经比较透彻,地黄中含有环烯醚萜苷类、非苷环烯醚萜类、糖类、紫罗兰酮类、地黄脑苷类、黄酮类和甾醇类等成分^[4],其中含量最高的是糖类成分^[2]。根据糖类成分极性较大的性质,试验中采用水以及不同浓度的乙醇作为提取溶剂。以表 2 和表 4 中提取物得率及水苏糖含量的数据为考察指标,进行 *t* 检验分析水提物和醇提物是否具有统计学意义。*t* 检验结果表明:(1)水提和醇提对提取物得率无显著性影响($P > 0.05$),还不能认为地黄水提物与地黄醇提物的得率不同;(2)水提和醇提对水苏糖含量具有显著性影响($P < 0.05$),可以认为地黄水提物与地黄醇提物中的水苏糖含量不同。

以水提物得率为考察指标,由表 2 中极差 R_1 值

显示,各因素作用主次为 $B > C > A$;表 5 中方差分析结果表明:B 因素对水提物得率具有显著性影响($P < 0.05$)。极差分析结果与统计学分析结果一致,B 因素的影响比其他因素大,提取工艺以 $A_3B_3C_2$ 组合为佳。以水苏糖含量为考察指标,由表 2 中极差 R_2 值显示,各因素作用主次为 $B > C > A$;方差分析结果表明:B 因素的影响较其他两个因素较大。极差分析结果与统计学分析结果一致,B 因素的影响比其他因素大,提取工艺以 $A_1B_3C_2$ 组合为佳。考虑到以水苏糖含量为主,出膏率为辅,综合上述分析结果,并考虑经济成本认为最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2$,即:加 10 倍量的水,煎煮 1 h,共 3 次。

试验结果表明随着乙醇浓度的增加,地黄提取物得率及水苏糖含量减少,相反,乙醇浓度越低,提取物得率及水苏糖含量增加,这可能由于糖类成分更易溶于水,因此采用水煎煮提取效果较好。

试验过程中发现干燥温度及在此温度下干燥时间对地黄寡糖中的主要成分水苏糖含量影响较大,干燥时的温度控制不好,就会使得水苏糖含量减少。

[参考文献]

- [1] 蔡晶. 地黄的药理作用实验研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2007, 29(3): 164.
- [2] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. 地黄寡糖含量的 HPLC 法测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 8.
- [3] 张汝学, 周金黄, 贾正平. 地黄寡糖抗糖尿病药理作用及机制研究回顾[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(2): 48.
- [4] 刘彦飞, 赵宇, 武卫红, 等. 地黄的化学成分及其在加工炮制过程中的变化[J]. 国外医药·植物药分册, 2007, 22(3): 102.