

乙肝舒颗粒剂中黄芪最佳提取工艺研究

武琳, 刘淑芝, 李曼玲, 冯伟红

(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 采用正交设计优选, 探讨方中黄芪最佳提取工艺, 以黄芪甲苷为检测指标。最佳提取工艺是共加 18 倍水, 提取 2 次, 0.5h/次。

关键词: 黄芪甲苷; 正交设计; 提取工艺

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)02-0008-02

慢性乙型肝炎(CHB)是一种严重危害人类健康的常见病,对CHB的防治是一个全球性公共卫生问题。目前国内对乙型肝炎治疗尚无良策,虽然中医在一定程度上缓解症状,但在抑制病毒这一核心指标方面尚无明显突破。西药抗病毒治疗方面,主要有干扰素、核苷类似物抗病毒药,但长期应用干扰素价格昂贵,存在严重副作用及HBV变异,现在多采用两药联用,但仍有毒副作用明显等问题。

因此,安全有效的抗乙型肝炎病毒药物的研制显得尤为重要。中药种类丰富,应用历史渊源流长,是现代药物开发的宝库。本方为中药复方,是由黄芪、丹参等药组成,经药效学筛选发现本方对化学性肝损伤有疗效。在抗乙型肝炎病毒体内实验中,证明其具有抑制病毒、保肝的作用。

黄芪为方中君药,在本方中通过健脾温肾、益气补血,调整和增强机体免疫功能来发挥作用。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根。具有补气固表,利尿托毒,排脓,敛疮生肌等功效。其主要有效成分为皂苷,多糖,黄酮等。因此,在提取工艺的研究中,选择以黄芪甲苷为定量指标,用正交试验法优选黄芪的提取工艺条件。

1 材料与仪器

对照品:黄芪甲苷购自中国药品生物制品检定所。药材:黄芪购于卫仁药材批发公司。试剂:乙腈为色谱纯,甲醇、正丁醇为分析纯,水为高纯水。仪器:HP1100液相色谱;HP3395积分仪(美国,安捷伦公司),Alltech 500 蒸发光散射检测器(美国,All-

tech),HGA-2000 空气发生器(北京汇龙公司)。

2 方法与结果

2.1 含量测定检测方法的建立 采用HPLC法测定黄芪甲苷含量。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈:水(35:65);流速:1.0ml/min;柱温:室温;ELSD检测漂移管温度:105℃;气体流速:2.64slpm。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取黄芪甲苷对照品,用甲醇溶解,使成每ml含0.036mg的溶液,作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取供试品药粉0.5g,加20ml甲醇,超声45min,过滤,滤液回收甲醇并浓缩至干,加10ml水溶解,用水饱和正丁醇萃取3次,每次20ml,合并正丁醇提取液,用氨试液萃取3次,每次20ml,弃去氨液,正丁醇液蒸干,加1ml甲醇,微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

2.1.4 含量测定 取供试品各20μl,黄芪甲苷对照品(0.036mg/ml)10μl,20μl进样,用外标两点法计算含量。

2.2 水提工艺的研究 选择L₉(3³)正交试验表,对提取工艺进行筛选,因素和水平见表1。

表1 试验因素水平表

水平	因素		
	A 提取时间(h/次)	B 提取次数(次)	C 加水量(倍)
1	0.5	1	15
2	1	2	18
3	1.5	3	21

2.2.1 样品的制备 按处方比称取生药50g,按正交试验表安排,加水提取,过滤,滤液浓缩成药材:药液=0.5:1,离心20min,2500rpm,取上清液,浓缩成

稠膏,真空干燥,50℃,备用。

2.2.2 含量测定 按 2.1 项下方法进行。

2.2.3 试验数据与方差分析,结果见表 2,表 3。

表 2 正交试验数据表

试验号	因素				结果(黄芪甲苷)mg/g 生药
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.0499
2	1	2	2	2	0.0606
3	1	3	3	3	0.0595
4	2	1	2	3	0.0407
5	2	2	3	1	0.0547
6	2	3	1	2	0.0468
7	3	1	3	2	0.0426
8	3	2	1	3	0.0564
9	3	3	2	1	0.0597
k_1	0.1700	0.1332	0.1531	0.1643	$T = \sum y_i$
k_2	0.1422	0.1717	0.1610	0.1500	$CT = T^2/9$
k_3	0.1587	0.1660	0.1568	0.1566	
\bar{k}_1	0.0567	0.0444	0.0510	0.0548	
\bar{k}_2	0.0474	0.0572	0.0537	0.0500	
\bar{k}_3	0.0529	0.0553	0.0523	0.0522	
R	0.0093	0.0128	0.0027	0.0048	

表 3 方差分析表

变异来源	离差平方和	自由度	F 值	显著值
S_A	1.288×10^{-4}	2	5.588	
S_B	2.864×10^{-4}	2	12.425	*
误差($S_C + S_D$)	4.61×10^{-5}	4		

$F_{0.05}(2, 4) = 6.94$, $F_B > F_{0.05}(2, 4)$, B 因素对结果有显著影响,影响因素大小顺序为 $B > A > C$ 。根据直观分析,每个因素取高水平,确定最佳工艺为 $A_1 B_2 C_2$,即 18 倍量的水,提取 2 次,0.5h/次。

2.3 三次重复实验 采用优选的水提工艺,进行三次重复实验,测得提取液中黄芪甲苷含量如下:

表 4 三批样品黄芪甲苷含量结果

样品	黄芪甲苷(mg/g 生药)
1	0.0831
2	0.0894
3	0.0896

测得三批样品中黄芪甲苷含量 $\bar{X} \pm SD = 0.0874$

± 0.037 (mg/g 生药),说明采用优选的提取工艺稳定,可行。

3 小结与讨论

3.1 皂苷类成分大多没有紫外吸收,或仅在紫外末端有吸收,容易受到试剂的干扰,使用紫外检测法存在一定的不足,此次试验使用的蒸发光散射检测器(Evapofative Light-Scattering Detector, ELSD)是一种新型的通用质量检测器,具有较好的灵敏度,克服了薄层色谱法准确度不高,重视性不好等的缺点,提高质量标准。三次重复实验黄芪甲苷含量略高于优选实验数据,主要是不同批号的药材造成的。黄芪甲苷在黄芪饮片中含量差别较大,但同一批号药材重复实验结果说明优选的条件稳定,检测方法重复性好。

3.2 张凤翎等^[1]通过临床初步观察认为黄芪多糖口服液在提高免疫功能,改善肝功能,增强抗病毒能力等方面有明显的作。黄芪苷具有免疫调节作用,可能在抗病毒感染所致肝损伤中起着主要作用。^[2]现代研究表明,黄芪具有调节免疫、保肝、抗菌、抗病毒,抗炎等药理作用。药理实验表明黄芪皂苷甲(ASI)可以促进小鼠再生肝的 DNA 合成,推测黄芪也能对抗 HBV 的肝细胞损伤,保护肝细胞免受病毒侵袭。^[3]药理学实验表明黄芪甲苷有抗炎、降压、镇痛、镇静作用,并增加血浆中 cAMP 和再生肝 DNA 含量,黄芪甲苷是黄芪中具有代表性的活性成份,目前含黄芪的制剂多以黄芪甲苷作为质控指标,且文献报道较多。^[4]而本方是用于治疗慢性乙型肝炎的方药,黄芪中多糖类、皂苷类成分均为水溶性成份,因此用水提取及以黄芪甲苷为指标筛选黄芪的提取工艺是合理的。故确定本方黄芪最佳提取工艺为 18 倍量水,提取 2 次,0.5h/次。

参考文献:

- [1] 张凤翎,孙德显,李秀明.黄芪多糖的制备及治疗肝炎的研究[J].药物生物技术,1995,2(2):26~28.
- [2] 尤丽芬,周瑶玺,张银娣,等.黄芪苷对人外周血自然杀伤活性影响的研究[J].中国免疫学杂志,1990,6(1):60~63,53.
- [3] 尤丽芬,陈钟英.黄芪的免疫及抗病毒作用机理[J].江苏医药,1992,18(1):52~53.
- [4] 王宝琴,苏健,鲁静.黄芪甲苷的检测在中药质控中的应用[J].中国中药杂志,1996,21(3):161~164.