

莲威阿那其处方药材水提工艺优化^Δ

金小越^{1*}, 帕提古丽·玉苏普², 王华洋¹, 耿东升^{3#}(1.新疆医科大学第六附属医院药剂科, 乌鲁木齐 830002; 2.疏附县人民医院药剂科, 新疆喀什 844100; 3.新疆军区联勤部药品仪器检验所, 乌鲁木齐 830002)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3551-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.32

摘要 目的:优化莲威阿那其处方药材水提工艺。方法:以多糖含量和粗多糖得率的综合评分为考察指标,以不同加水倍量、提取时间、提取次数为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化莲威阿那其处方药材水提工艺并进行验证试验。结果:提取次数对考察指标的综合影响程度最大;最优水提工艺为加水倍量12倍、提取时间2.0 h、提取3次。验证试验中多糖含量平均值为36.34 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{RSD}=0.24\%$, $n=3$),粗多糖得率平均值为10.18%($\text{RSD}=0.65\%$, $n=3$)。结论:优选的提取工艺合理可行、重现性好,可为本处方的剂型改造提供参考。

关键词 莲威阿那其;正交试验;水提工艺;优化

Optimization of Water Extraction Technology of Medicinal Material in Lian-wei Anacyclus Formulation

JIN Xiao-yue¹, Patiguli·Yusupu², WANG Hua-yang¹, GENG Dong-sheng³(1.Dept. of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China; 2.Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Shufu County, Xinjiang Kashgar 844100, China; 3.Institute of Drug and Instrument and Test of the Joint Logistics Department of Xinjiang Military Region, Urumqi 830002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water extraction process of medicine in lian-wei anacyclus prescription. METHODS: Composite score of polysaccharide content and raw polysaccharide were set as investigation index, the different adding water amount, extracting times and extraction duration were set as investigation factors, and $L_9(3^4)$ orthogonal test were conducted to optimize the water extraction technology of medicine in lian-wei anacyclus prescription and verification test was carried out. RESULTS: Extracting times had the most significant effect on the investigation index; the most optimized process was as follows as 12 times of adding water amount, 2.0 h of extracting times, 3 times of extraction. The average content of polysaccharide was 36.34 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{RSD}=0.24\%$, $n=3$) in the verification test, and the average content of raw polysaccharide was 10.18% ($\text{RSD}=0.65\%$, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimized technology is reasonable, feasible and reproducible, and can provide reference for the dosage form transformation.

KEYWORDS Lian-wei anacyclus; Orthogonal experiment; Water extraction technology; Optimization

莲威阿那其处方为我院中医科治疗退行性骨关节炎、椎间盘突出症的常用煎剂处方,由雪莲、阿那其根、肉苁蓉、桑椹、鹿衔草、透骨草、生白术等12味药材组成,具有补骨通络、活血化瘀、祛风止痛之功效。传统煎剂煎煮、携带、服用不方便,剂型改造是必然趋势。为此,笔者以多糖含量和粗多糖得率为考察指标^[1],采用正交试验法优选莲威阿那其处方水提工艺,为该处方的剂型改造提供研究基础。

1 材料

1.1 仪器

R-200D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);JYT-5型架盘分析天平(上海医用激光仪器厂);AKHL-III-16型艾柯超纯水机(四川成都康宁实验专用纯水设备厂);UV-240型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);W-201B型数显恒温水浴锅(江苏金坛市医疗仪器厂);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);ZKG4080型高温真空

学报,2006,28(1):97.

[9] 王宁惠.油菜籽(饼粕)中硫代葡萄糖苷总量速测方法-氯化钡法[J].青海农林科技,2009,12(3):58.

[10] 黄继英,王绥璋,李素梅.氯化钡-分光光度法测定油菜籽

^Δ基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(No.201191257)

*副教授。研究方向:药物分析、药品质量控制。E-mail:jinxiaoyue0112@163.com

#通信作者:主任药师。研究方向:中药民族药。E-mail:dongsheng811@sina.com

硫苷含量的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,1995,23(6):104.

[11] 王菁,白晓光,海力茜·陶尔大洪.新疆芫菁中硫代葡萄糖苷提取工艺条件的优化[J].西北药学杂志,2013,28(3):237.

[12] 修丽丽,钮昆亮.十字花科植物中的硫代葡萄糖苷及其降解产物[J].浙江科技学院学报,2004,16(3):187.

(收稿日期:2015-04-27 修回日期:2015-07-06)

(编辑:刘萍)

干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)。

1.2 药材

雪莲(批号:120112)、阿那其根(批号:110918)、肉苁蓉、桑椹、鹿衔草、透骨草、生白术(批号均为:120119)等12味药材购于新疆本草堂中药饮片有限公司,由新疆医科大学第六附属医院提供药材质检报告书,药材符合2010年版《中国药典》(一部)相关药材项下的规定^[2],其中雪莲、阿那其根符合《维吾尔药志》相关药材项下的规定^[3-4]。

1.3 药品与试剂

D(+)-无水葡萄糖对照品(简称葡萄糖对照品,四川省维克奇生物科技有限公司,批号:110728,纯度:98%);95%乙醇、浓硫酸、苯酚均为国产分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 水提工艺方法及指标评分公式

将晾干后的醇提药材(雪莲、肉苁蓉、威灵仙、仙灵脾、鸡血藤)的药渣与剪碎成绿豆大小的阿那其根、桑椹、鹿衔草、透骨草(水提药材)以及生白术挥发油提取后晾干的药渣混匀,沸水投料,以多糖含量和粗多糖得率的综合评分为指标,进行单因素及正交试验,筛选最优水提取工艺。依据药材中活性成分的药理作用及所占比重,设定多糖含量和粗多糖得率的评分权重系数分别为0.8、0.2,评分公式为:多糖含量评分=多糖含量/最大多糖含量×80;粗多糖得率评分=粗多糖得率/最大粗多糖得率×20;综合评分=多糖含量评分+粗多糖得率评分。

2.2 粗多糖的提取及得率测定^[5]

将剪碎成绿豆大小的阿那其根、桑椹、鹿衔草、透骨草和乙醇回流提取后的雪莲等5味药材的药渣以及生白术提取挥发油后的干药渣合并沸水投料进行水煎煮提取,过滤后,将药液浓缩为每1 ml药液约含生药0.2 g。放至室温后,在快速搅拌下迅速加入95%乙醇,使药液含醇量达到80%,室温放置1 h后,密封于4℃冰箱,冷藏24 h,过滤,滤渣用95%乙醇、丙酮、乙醚依次洗涤多次,即可得到粗多糖。再经干燥6 h,及时移至干燥器中,冷却30 min后,精密称定质量,计算粗多糖得率:

$$\text{粗多糖得率} = \frac{\text{粗多糖样品质量}}{\text{提取多糖药材的质量}} \times 100\%$$

2.3 水提液中多糖含量测定方法的研究^[6]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取于105℃烘箱干燥至恒质量的葡萄糖对照品25.00 mg,置于25 ml量瓶中,超纯水超声溶解并稀释至刻度,摇匀,即得1.00 mg/ml的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥后粗多糖粉末5.00 mg,加至50 ml量瓶中,加超纯水超声溶解并加至刻度,摇匀。

2.3.3 多糖含量测定波长的确定 采用苯酚-硫酸法测定^[7]。精密量取对照品和供试品溶液各1.0 ml,置于50 ml锥形瓶中,分别精密加入1.6 ml新制备的5%苯酚溶液,震荡摇匀后,迅速精密加入浓硫酸6.0 ml,充分振荡摇匀,室温放置25 min。以超水平行试验为空白参比,在400~700 nm波长下用紫外-可见分光光度计进行扫描,详见图1。

结果表明,供试品溶液与对照品溶液均在485 nm波长处

有最大吸收峰,故确定485 nm为多糖含量测定波长。

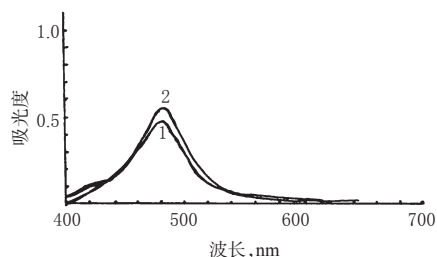


图1 紫外扫描光谱图

1.对照品;2.供试品

Fig 1 UV scanning spectrum

1. reference substance; 2. test sample

2.3.4 线性范围考察 分别精密量取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml的葡萄糖对照品溶液,置于10 ml量瓶中,超纯水定容至刻度,充分摇匀,制备成系列质量浓度的对照品溶液。精密量取对照品溶液各1.0 ml,置于50 ml锥形瓶中,分别精密加入1.6 ml新制备的5%苯酚溶液,振荡摇匀后,迅速精密加入浓硫酸6.0 ml,充分振荡摇匀,室温放置25 min。以超水平行试验为空白参比,在485 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖对照品吸光度(A)对质量浓度(c)进行回归,得回归方程 $A=8.230c-0.017$ ($r=0.9997$),结果表明,葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.02~0.1 mg/ml。

2.3.5 精密度试验 精密量取0.06 g/L对照品溶液6份,每份1.0 ml,按照“2.3.4”项下方法加入显色剂进行操作,以超水平行试验为空白参比,结果吸光度的RSD为0.29% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.6 重复性试验 准确称取6批水提药材干燥后的粗多糖粉末5.00 mg,共6份,置于50 ml量瓶中,依法测定,结果含量的RSD为1.09% ($n=6$),表明方法重复性较好。

2.3.7 稳定性试验 分别准确量取对照品和供试品溶液(0.06 mg/ml)各1.0 ml,分别于1、2、3、4、5、24 h时加入显色剂进行操作,测定吸光度,计算含量。结果含量的RSD分别为1.71%、1.73% ($n=6$),表明对照品溶液、供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批干燥后粗多糖粉末5.00 mg,各9份,加入至50 ml量瓶中,再分别精密加入1.84、2.30、2.76 mg葡萄糖对照品,加超纯水超声溶解并稀释至刻度,摇匀。各精密量取1 ml,加入显色剂进行操作,计算回收率。结果平均回收率为99.38% ($RSD=0.96\%$, $n=3$)。

2.3.9 样品含量测定 精密称取3批莲威阿那其水提处方药材,按“2.2”项下方法得到多糖,并按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,测定吸光度,计算即得。

2.4 提取工艺的优选^[8]

2.4.1 单因素试验 正交试验前,首先对其影响因素进行单因素试验,考察了不同加水倍量、提取时间、提取次数对多糖含量和粗多糖得率水提工艺的影响,最后确定以评分较高的各因素水平(加水倍量12、16、20倍,提取时间1.0、1.5、2.0 h,提取次数1、2、3次)进行正交试验。

2.4.2 正交试验设计与结果 选择水为提取溶剂,以加水倍

量(A)、提取时间(B)和提取次数(C)为考察因素,每个因素选取3个水平,以多糖含量和粗多糖得率综合评分作为评价指标,采用L₉(3⁴)正交表进行试验。因素与水平见表1;正交试验安排与结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水倍量),倍	B(提取时间),h	C(提取次数)
1	12	1.0	1
2	16	1.5	2
3	20	2.0	3

表2 正交试验安排与结果

Tab 2 Arrangement and results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	多糖含量, μg/ml	粗多糖得率, %	综合评分
1	1	1	1	1	30.86	7.48	81.76
2	1	2	2	2	34.39	8.94	92.24
3	1	3	3	3	36.33	10.17	98.78
4	2	1	2	3	33.29	8.31	88.65
5	2	2	3	1	35.36	10.83	97.86
6	2	3	1	2	31.96	8.15	85.42
7	3	1	3	2	34.99	9.53	94.65
8	3	2	1	3	32.56	7.36	84.85
9	3	3	2	1	34.75	10.51	95.93
K ₁	272.78	265.06	252.03	275.55			
K ₂	271.93	274.95	276.82	272.31			
K ₃	275.43	280.13	291.29	272.28			
R	3.50	15.07	39.26	3.29			

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	2.221 7	2	1.110 8	0.943 5	>0.05
B	39.08	2	19.54	16.60	>0.05
C	262.81	2	131.40	111.61	<0.01
D(误差)	2.35	2	1.18		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$; $F_{0.01}(2, 2) = 99$

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19$; $F_{0.01}(2, 2) = 99$

由表2、表3结果可知,各因素对提取效果影响的大小顺序为提取次数(C) > 提取时间(B) > 加水倍量(A),故优选的提取工艺是A₃B₂C₃。根据正交试验结果,加水倍量(A)因素的影响较小。考虑到节约成本、保护水资源,故最后确定优选工艺条件为A₁B₂C₃,即加入12倍量的水,提取时间2.0 h,提取3次。

2.4.3 验证试验 取处方量水提药材,依照优化提取条件,平行提取3份样品,测定多糖含量及粗多糖得率。结果多糖含量分别为36.41、36.37、36.24 μg/ml,平均值为36.34 μg/ml(RSD=0.24%, n=3);粗多糖得率分别为10.13%、10.26%、10.17%,平均值为10.18%(RSD=0.65%, n=3),表明优选的水提工艺稳定、合理、可行。

3 讨论

3.1 处方采用水提取工艺的理论基础

莲威阿那其处方在临床应用是中药煎剂,疗效确切。鉴于传统煎剂的缺点,笔者对其剂型进行了改造。根据原剂型

的特点,水提物是发挥疗效的主要成分,同时兼顾了处方各药材所含成分的理化性质及功能主治的相关性。天山雪莲含有芦丁、槲皮素、高车前素、柯伊利素、木犀草素等黄酮类,大苞雪莲内酯等内酯类以及多糖^[9]类等化学成分;肉苁蓉主要含有苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木脂素类、单糖、双糖、多糖、氨基酸等^[10];桑椹的主要活性物质包括花色苷、白藜芦醇、芦丁、多糖^[11]等以及人体所必需的18种氨基酸,其中多糖存在于多种药材中,故笔者选取多糖含量及粗多糖得率为评价指标。

3.2 指标在综合评分中的权重分配

莲威阿那其处方是由12味药组成的复方制剂,采用提纯的单个指标或活性成分难以全面反映提取工艺的优劣。本处方的雪莲、肉苁蓉、桑椹等都含有多糖,是该处方中主要药理活性成分之一,故试验设计多糖含量权重比例为0.8。同时,结合复方制剂的特点,采用粗多糖得率为辅助指标,兼顾单一与复合成分,并根据相对贡献分配权重,设粗多糖得率权重比例为0.2。因此,笔者认为,本试验设定的质控指标依据了临床的有效性 & 功能主治,使处方质量控制更贴近临床应用。

本试验的水提工艺主要是对处方药材的水提浸膏工艺的优化,同时验证了定量指标的可行性,使处方的制剂质量控制和临床应用均有可控性。

参考文献

- [1] 王华洋,耿东升.莲威阿那其处方水提浸膏中总糖含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):47.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:95、126、180、281、304、306.
- [3] 刘勇民.维吾尔药志:上[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:433.
- [4] 刘勇民.维吾尔药志:下[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:499.
- [5] 杨永东,李聪颖,唐策,等.藏药蔓菁抗氧化活性多糖的提取及纯化工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):7.
- [6] 李计萍.中药新药研究中多糖含量测定方法探讨[J].中国中药杂志,2014,39(17):3 392.
- [7] 林颖,吴毓敏,吴雯,等.天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究[J].天然产物研究与开发,1996,8(3):5.
- [8] 江尚飞,刘应杰,杨宗发,等.正交试验优选辽源七厘复方中药提取工艺[J].中国药房,2014,25(27):2 521.
- [9] 瞿科峰,王聪,高贵珍,等.天山雪莲的研究进展[J].湖北农业科学,2009,48(11):2 869.
- [10] 李媛.肉苁蓉的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(1):7.
- [11] 陈诚,李洪波,杨欣,等.中药桑椹活性物质的研究进展[J].中药材,2010,33(10):1 660.

(收稿日期:2014-12-10 修回日期:2015-06-05)

(编辑:刘 萍)