

复方石斛的提取工艺研究

徐小婷 徐应淑 王 森 张云莉

(遵义医学院药剂学教研室,遵义,563006)

摘要 目的:优选复方石斛最佳提取工艺。方法:以粗多糖、总黄酮、石斛碱的含量及干膏率为指标,采用正交试验法,利用多指标综合评价的方法及对权重系数的设置,优先最佳提取工艺。结果:复方石斛最佳提取工艺:10 倍量的 70% 乙醇和水各回流 120 min。结论:该优化工艺客观可行,稳定可靠,可为复方石斛的工业生产提供实验依据。

关键词 复方石斛;粗多糖;总黄酮;石斛碱;提取工艺

The Extraction Process of Compound Dendrobium

Xu Xiaoting, Xu Yingshu, Wang Sen, Zhang Yunli

(Zunyi Medical College, Zunyi 563006, China)

Abstract Objective: To establish the optimal extraction technology for compound dendrobium. **Methods:** To use the content of crude polysaccharide, flavonoids, dendrobine and the extraction rate as indexes and use the method of multi-index comprehensive evaluation and setting of weight coefficient to choose the best extraction technology by the orthogonal design. **Results:** The optimum conditions was 10 times of 70% alcohol and water reflux 120min respectively. **Conclusion:** The optimal extraction is objective, feasible, stable and reliable, which provides experimental basis for industrial production of compound dendrobium.

Key Words Compound dendrobium; Crude polysaccharide; Flavonoids; Dendrobine; Extraction process

中图分类号:R284.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.039

复方石斛是本课题组正在研发的治疗高血脂的中药新药,其能有效调节大鼠血脂代谢水平,且能提高机体的抗氧化能力和改善肝组织脂肪变性,具有良好的发展前景。故本实验以粗多糖、总黄酮、石斛碱和得膏率为指标,选择乙醇浓度、提取时间及溶剂用量为考察因素,通过正交设计试验优选复方石斛的提取工艺,为该制剂工业生产提供实验依据。

1 材料

1.1 受试药物 金钗石斛购于贵州省赤水市信天中药产业开发有限公司,山楂、决明子等药材均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经遵义医学院药剂教研室王森副教授鉴定均符合《中国药典》2010 年版相关要求;D-无水葡萄糖对照品:上海君创生物科技有限公司,批号:7443C;石斛碱对照品:中国食品药品检定研究院,批号:111876-201102;芦丁对照品:国药集团化学试剂公司,批号:F20110406;甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。

1.2 仪器 Agilent-7890A 型气相色谱仪:安捷伦科技有限公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计:北京普系统用仪器有限责任公司;TDL-80-2B 型低速台式离心机:上海安亭科学仪器厂;

ME204E 电子天平:梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

2 方法

2.1 粗多糖含量测定

2.1.1 葡萄糖对照品溶液的制备 精密称取 D-无水葡萄糖对照品 15 mg,加水定容至 100 mL。

2.1.2 供试品溶液的制备 按处方量称取药材 20 g 提取,精密量取提取液 3 mL,加无水乙醇 15 mL 摇匀,4 ℃ 放置 12 h,3 500 r/min 离心 10 min,沉淀用 20 mL 无水乙醇洗涤、离心,沉淀物加水定容至 50 mL 容量瓶中,过 0.45 μm 滤膜,待测。

2.1.3 测定方法 在 10 mL 的具塞比色管中加入 400 μL 的葡萄糖对照品溶液,并用蒸馏水补至 800 μL,加入 800 μL 的 5% 苯酚溶液,再加入 2 mL 的浓硫酸,混匀,室温放置 5 min,沸水中煮 15 min,取出,置冰浴中冷却 5 min,同法以蒸馏水为空白对照,于 400 ~ 700 nm 波长范围内扫描得到紫外吸收光谱。在最大吸收波长 490 nm 处测定吸光度为 A。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密移取葡萄糖对照品溶液 160, 240, 320, 400, 480, 560, 640 μL,按照“2.1.3”项下方法测定吸光度值,并根据 A 和浓度

基金项目:贵州省赤水市科技局项目(编号:赤中药科合^[2013]号);贵州省中医药管理局项目(编号:QZY2012-52)

作者简介:徐小婷(199007—),女,本科,初级药师,在读研究生,研究方向:新药研究与开发,E-mail:920434389@qq.com

通信作者:徐应淑(197609—),女,硕士,教授,主任,研究方向:新药研究与开发,E-mail:527822816@qq.com

(c : mg/mL) 绘制标准曲线, 线性回归方程 $A = 2.9229c - 0.003$, 相关系数 $r = 0.9995$, 线性范围 $0.030 \sim 0.135$ mg/mL。

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 芦丁对照品溶液的配制 精密称取芦丁对照品 10 mg, 用无水乙醇定容至 50 mL 量瓶中。

2.2.2 供试品溶液的制备 取“2.1.2”中的上清液及洗涤液用无水乙醇定容至 50 mL 量瓶中, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 待测。

2.2.3 测定方法 在 10 mL 的具塞比色管中加入 1.0 mL 芦丁对照品溶液, 并用蒸馏水补至 2.4 mL, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL, 混匀, 放置 6 min, 再移取 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL, 摇匀, 放置 6 min, 再取氢氧化钠试液 4 mL, 再加水至刻度线, 摇匀, 放置 15 min, 同法以蒸馏水为空白对照, 于 $400 \sim 700$ nm 波长范围内扫描得到紫外吸收光谱。在最大吸收波长 510 nm 处测定吸光度为 A 。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密移取芦丁对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL, 按照“2.2.3”项下方法测定吸光度值, 并根据 A 和浓度 (c : mg/mL) 绘制标准曲线, 线性回归方程为 $A = 3.1291c + 0.0464$, 相关系数 $r = 0.9997$, 线性范围 $0.0589 \sim 0.2063$ mg/mL。

2.3 石斛碱含量测定

2.3.1 石斛碱对照品溶液的配制 精密称取石斛碱对照品 5 mg, 用无水甲醇定容至 50 mL 量瓶中。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密量取提取液 4 mL 于 25 mL 量瓶中, 加入 0.05% 甲酸的甲醇溶液适量, 超声 30 min 后, 放冷, 用 0.05% 甲酸的甲醇溶液定容, 混匀, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 待测。

2.3.3 阴性溶液的制备 称取处方量缺金钗石斛的其他药材提取, 按“2.3.2”项下方法制备阴性溶液。

2.3.4 色谱条件与系统适应性实验 HP-5 毛细管柱 (5% 甲基苯硅氧烷为固定相, 柱长为 30 m, 内径为 0.32 mm , 膜厚度为 $0.25 \mu\text{m}$), 程序升温: 初始温度为 80°C , 以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升温至 250°C , 保持 5 min; 进样口温度为 250°C , 检测器温度为 250°C ; 氢气: $30 \text{ mL}/\text{min}$, 空气: $400 \text{ mL}/\text{min}$, 尾吹: $25 \text{ mL}/\text{min}$; 进样方式: 直接进样。按此色谱条件对供试品溶液进行测定, 石斛碱色谱峰分离良好, 见图 1~3。

2.3.5 标准曲线的绘制 精密移取石斛碱对照品溶液 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mL, 用甲醇定容与 10 mL 容量瓶中, 过滤后分别进样 $1 \mu\text{L}$, 测峰面积。以石

斛碱的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得出回归方程 $Y = 2.298X - 5.528$, $r = 0.9995$, 线性范围 $0.005 \sim 0.030$ mg/mL。

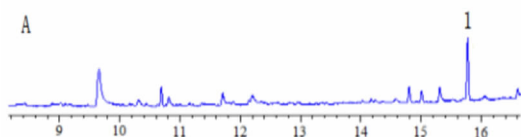


图1 供试品溶液的气相色谱图

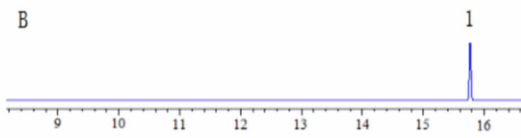


图2 石斛碱对照品的气相色谱图

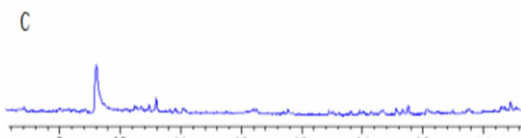


图3 不含金钗石斛的阴性溶液的气相色谱图

2.4 浸膏得率的测定^[1] 精密量取样品液 25 mL 至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后在 105°C 干燥箱中干燥 5 h, 于干燥器内冷却至室温, 待恒重时精密称定, 计算总固体得率。

2.5 提取工艺研究

2.5.1 因素水平的确设定和正交试验结果 通过查找文献^[2-5]及前期研究中的单因素试验结果, 确定了该复方采用先醇提后水提, 并筛选出各因素中的三个水平进行正交设计, 选取醇浓度 (A)、提取时间 (B)、溶剂用量 (C) 为考察因素, 以粗多糖、总黄酮、石斛碱和干膏率的综合评分为指标, 综合评分 = 粗多糖 $\times 2.5$ + 总黄酮 $\times 3.5$ + 石斛碱 $\times 2$ + 干膏率 $\times 2$ 。按照处方比例精密称取 5 味药材, 共 9 份, 每份 20 g, 选择 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 并按上述方法检测各指标, 结果见表 1, 方差分析见表 2。

由直观分析可知, 各因素对粗多糖、总黄酮、石斛碱含量及干膏率的影响顺序为 $A > B > C$; 以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 表明 A 和 B 因素对提取工艺具有显著性影响, C 因素则无显著性影响, 结合生产成本考虑, 确定最佳工艺组合为 10 倍量的 70% 醇和水各回流 120 min。

2.5.2 验证实验 按优选的提取工艺进行 3 次重复试验, 结果粗多糖、总黄酮、石斛碱及干膏率的平均值分别为 20.50 mg/g 、 34.03 mg/g 、 55.17 g/g 、 31.5% , RSD 分别为 3.39% 、 1.70% 、 2.39% 、 1.2% , 表明该工艺稳定可行。

表 1 复方石斛提取工艺的实验安排与直观分析结果

NO.	A (%)	B (min)	C (倍)	D (空白)	粗多糖含量 (mg/g)	总黄酮含量 (mg/g)	石斛碱 (g/g)	得膏率 (%)	综合评分
1	50	60	10	1	30.58	45.15	33.35	20.77	38.58
2	50	90	13	2	29.16	42.31	32.56	29.62	38.77
3	50	120	16	3	51.50	49.32	71.41	34.71	60.28
4	70	60	13	3	33.99	52.04	59.27	31.60	55.37
5	70	90	16	1	31.50	60.38	33.98	32.60	67.93
6	70	120	10	2	42.21	62.32	96.96	33.28	77.08
7	90	60	16	2	31.14	47.00	60.50	41.03	55.64
8	90	90	10	3	35.41	48.38	61.10	25.85	53.47
9	90	120	13	1	38.73	50.95	62.90	31.23	56.46
K1	45.88	49.86	56.38	54.32					
K2	66.79	53.39	50.20	57.16					
K3	55.19	64.61	61.28	56.37					
R	20.92	14.74	11.08	2.84					

表 2 正交设计方差分析

方差来源	离均差平方和	<i>f</i>	<i>F</i> 值	显著性 <i>P</i>
A	658.88	2	51.11	<0.05
B	355.62	2	27.58	<0.05
C	185.07	2	14.36	>0.05
D(误差)	12.89	2		

注： $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

3 讨论

在复方石斛中山楂和银杏叶为君药,其黄酮类化合物可通过不同通道,不同位点阻止脂质沉积,到达防治高血脂症状^[6-9],故综合评分时其权重系数为 3.5;考虑该复方后续将研制成颗粒剂,而金钗石斛、丹参等中的多糖不仅具有降血脂和护肝作用,还能起到较味功能^[10-11],故权重系数为 2.5;金钗石斛是珍稀名贵中药材,为便于控制其在制剂中的含量,防止在生产过程中,贵重药材不投料或少投料的现象发生^[12],选取其石斛碱作为检测指标之一,且权重系数为 2;干膏率的大小与服用量的密切相关,因而权重系数为 2。此外,考虑以粗多糖、总黄酮、石斛碱的含量为指标,同时兼顾到其均有较成熟、稳定的定量方法^[13-14]。

中药提取是生产过程中的关键环节。本文的工艺路线设计充分考虑到处方中各位药材的主要成分,其即包含脂溶性成分又含有水溶性成分,故采用醇提完再水提,使其有效成分得到有效保留,充分发挥药效作用。预实验中对该复方还进行了单因素研究,其中也包括对提取次数的研究,以乙醇和水为溶媒进行分别提取为一次,共提取三次,得出当提取次数增加时,其粗多糖、总黄酮、石斛碱的含量基本不变,因而正交试验中不考虑提取次数这一因素。中药药味较多,其中所含的活性成分复杂,采用多个有

效的指标考察其提取工艺,能够更合理、科学地考察提取工艺。本文以总黄酮、粗多糖、石斛碱及干膏率为评价指标,通过其权重的差异进行综合评分优选提取工艺,并进行方差分析,结果显示优选的提取工艺重复性好,可操作性强,该工艺适合工业大生产。

参考文献

[1]杜志谦,牛琼琼,夏华玲.骨松强骨颗粒的醇提取工艺研究[J].世界中医药,2013,8(11):1348-1350.

[2]侯莉伟,杨明,熊永爱,等.Box-Behnken 设计优化回流提取山楂降脂有效成分的工艺研究[J].江西中医药学报,2013,25(6):48-51.

[3]赵宏,张宇,王宇亮,等.银杏叶总黄酮闪式提取工艺的正交设计法优化[J].时珍国医国药,2013,24(8):1852-1853.

[4]郭俊峰,尹琼,李升和.决明子水煎液对 CCl₄ 所致急性肝损伤大鼠血液生化指标的影响[J].贵州畜牧兽医,2012,35(2):13-16.

[5]甘方良,李丽.正交试验法优化丹参乙醇回流提取工艺[J].中国医院药学杂志,2011,31(8):646-649.

[6]罗先钦,黄崇刚,伍小波.山楂总黄酮对复合因素致大鼠脂肪肝模型脂质代谢与低密度脂蛋白受体表达的影响[J].中草药,2011,42(7):1367-1373.

[7]宋敏,曹宝鑫.山楂对高血脂症小鼠模型血脂代谢及降脂酶的影响[J].中国现代药物应用,2012,6(20):119-120.

[8]孟爱红,陈芝芸,严茂祥,等.银杏叶提取物对肝纤维化大鼠肝组织 COX-2 表达的影响[J].中华中医药学刊,2013,31(8):1698-1700.

[9]王树芳,徐海英,李萌,等.银杏叶提取物对急性肝衰竭大鼠 FADD 表达的影响[J].中国现代医学杂志,2012,22(22):23-26.

[10]宋雨鸿,刘强,徐舒,等.丹参多糖对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].中南药学,2013(5):345-348.

[11]李向阳,龚其海,吴芹,等.金钗石斛多糖对大鼠高血脂症和肝脏脂肪变性的影响[J].中国药学杂志,2010,45(15):1142-1144.

- [12]时维静,王甫成. 中药分析与检测[M]. 化学工业出版社,2010: 172-173.
- [13]国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:86,372.

- [14]梁存权. 比色法测定植物多糖含量方法概述[J]. 北方药学, 2011,8(12):4,86.

(2015-06-22 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第146页)

表3、表5可以看出,醋白芍、炙甘草的药效组分与复方药效组分总量变化规律趋势一致。表4、表6可以看出,4种药效组分之间的比例也发生改变,因此,配伍改变了药效组分在复方中的存在状态。配伍后,醋白芍药效组分或炙甘草药效组分的含量明显增加($P < 0.05$),原因可能为:甘草中的甘草酸等药效组分与醋白芍中的芍药苷等药效组分相互作用,增加了药效组分的溶解性,甘草经过炮制后化学成分发生变化,增溶效果更明显。

以上研究可以得出结论:配伍使中药中多种药效组分之间发生物理、化学作用,影响或改变了药效组分的物理、化学性质,进而改变了药效组分的溶出,最终改变了药效组分在复方汤剂中存在状态,从而形成了具有不同疗效的复方。中药治疗作用的关键在于药效组分,包括药效组分的组成及各药效组分之间的比例。药效组分的组成不同,疗效也不同;药效组分的组成相同,但比例不同,疗效也不一样。不同组成的药效组分或不同比例的药效组分分别代表不同的中药,具有不同的临床疗效,其根源在于药效组分的不同,药效组分是中药治疗的根本,应加以区分,临床用药应遵循中医传统理论,根据病情转变调整用药比例。因此,对中药药效组分的研究与探讨是解析中药配伍机制的关键。

参考文献

- [1]朱广伟,张贵君,王晶娟,等. 单因素配伍剂量对经方芍药甘草汤药效组分的影响[J]. 实用药物与临床,2015,18(2):68-173.

- [2]何丽仙,黄忠京,谭倪,等. HPLC研究芍药甘草汤合煎与分煎的化学成分变化[J]. 云南师范大学学报,2009,29(6):32-35.
- [3]董洁,方玉婷,郭立玮. 不同提取分离方法对芍药甘草汤物质组成影响的初步研究[J]. 中成药,2010,32(12):2170-2172.
- [4]严玉平,由会玲,李国川,等. 芍药及不同炮制品在芍药甘草汤中芍药苷含量的差异研究[J]. 中国药房,2009,20(6):463-464.
- [5]朱广伟,张贵君,汪萌. 配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响[J]. 药学与临床研究,2014,4(4):323-325.
- [6]汪萌,闫永红,邹慧琴,等. 芍药甘草汤镇痛作用研究及镇痛效果与配伍比例相关性分析[J]. 中华中医药杂志,2015(5):1767-1773.
- [7]朱广伟,张贵君,汪萌,等. 中药芍药甘草汤基原及药效组分和药理作用研究概况[J]. 中华中医药杂志,2015,30(8):122-126.
- [8]李伟. 芍药甘草汤抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中外医学研究, 2012,10(27):143-144.
- [9]张玉梅,赵娜娜. 芍药甘草汤的临床研究及药理作用[J]. 吉林中医药,2010,30(5):439-441.
- [10]张明发,沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床,2011,26(4):261-268.
- [11]张贵君. 中药药效组分理论与中药组分子学[J]. 中药材,2007,30(2):125-126.
- [12]汪萌,闫永红,邹慧琴,等. 芍药甘草汤功能与药效组分对应性研究[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(1):101-106.
- [13]张贵君. 中药研究的误区思考与创新研发的新思路[J]. 中国中药杂志,2007,32(13):1367-1369.
- [14]崔相微,张贵君. 中药药效组分理论与药效组分的研究模式[J]. 亚太传统医药,2008,4(9):16-17.
- [15]张贵君. 中药质量标准制定须以药效组分为基础[N]. 中国中医药报,2008-02-04(004).

(2014-10-06 收稿 责任编辑:张文婷)