

壳聚糖絮凝法精制补肾养血颗粒水提液的工艺研究

杜艳娇^{1,2}, 康琛², 杜茂波², 沈硕², 李曼玲², 梁丽娜³, 刘淑芝²

1.江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2.中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

3.中国中医科学院眼科医院, 北京 100040

摘要: 目的 优选壳聚糖精制补肾养血颗粒水提液的工艺。方法 以淫羊藿苷为指标, 应用高效液相色谱法测定其含量, 采用正交设计法考察加水量、提取时间、提取次数对水提工艺的影响; 以淫羊藿苷为指标, 结合总多糖含量, 选择药液浓度、絮凝温度、澄清剂加入量 3 个因素, 优选壳聚糖的絮凝澄清条件。结果 最佳水提工艺条件为 A₂B₁C₃, 即加入 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h; 最佳絮凝工艺为 A₁B₂C₃, 即药液浓度为 0.4 g/mL, 絮凝温度为 40 ℃, 壳聚糖加入量为 0.1%。结论 本研究优选的精制工艺稳定可行。

关键词: 补肾养血颗粒; 淫羊藿苷; 壳聚糖; 精制工艺; 正交试验

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2016.04.026

中图分类号: R283.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2016)04-0098-04

Study on Refining Water Extract of *Bushen Yangxue* Granules by Chitosan Flocculation

DU Yan-jiao^{1,2}, KANG Chen², DU Mao-bo², SHEN Shuo², LI Man-ling², LIANG Li-na³, LIU Shu-zhi² (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

Abstract: **Objective** To optimize refinement of water extract from *Bushen Yangxue* Granules by chitosan flocculation. **Methods** According to the content of icariin detected by HPLC, the waters amount, extraction time and extraction times were evaluated by orthogonal design. The effects of the solution concentration, clarifying temperature and the amount of clarifying agent on the flocculation clarification processes were optimized with the content of icariin and polysaccharides. **Results** The optimum water extraction processes A₂B₁C₃ were follows: 10 times amount of water, three times extraction and 1 h for each extraction process. The optimized flocculation clarification processes A₁B₂C₃ were as follows: solution concentration was 0.4 g/mL, the clarifying temperature was 40 ℃ and the addition of chitosan was 0.1%. **Conclusion** The optimized refining process is stable and feasible.

Key words: *Bushen Yangxue* Granules; icariin; chitosan; refining process; orthogonal test

补肾养血颗粒由枸杞子、淫羊藿、当归、黄芪、石斛等药材组成, 是中国中医科学院眼科医院庄曾渊研究员的临床经验方, 具有补肾益精、养血明目功效, 眼科临床常用于治疗视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性等疾病。壳聚糖是甲壳素 N-脱乙酰基后的衍生物, 性质稳定, 具有良好的生物可降解性和相容性, 毒性极小且来源广泛, 是自然界罕见的带正电荷纤维结构化合物, 不溶于水和碱溶液, 但可溶于稀酸。利用壳聚糖的电荷和大分子架桥的作用, 在中药水提取液中加入一定量的壳聚糖, 吸附和絮凝去除溶液中的

不溶性颗粒和鞣质、蛋白质、树脂等杂质, 得到澄清的溶液, 在中药复方精制工艺中得到广泛应用。与醇沉法相比, 能耗小, 成本低, 能够保留大部分多糖等有效成分, 作为中药水提液澄清剂具有良好的应用前景^[1]。因此, 本研究以淫羊藿苷含量为指标, 优选补肾养血颗粒壳聚糖澄清法精制工艺。

1 仪器与试药

Waters Alliance 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), 1515 型检测泵, 2487 型检测器, 717 型自动进样器; BP211D 型十万分之一电子天平, BSS210 型万分之一电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司); Agilent 8453E 型紫外分光光度计; DZKW-4 型电子恒温水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司); HJ-6 型六联磁力加热搅拌器 (金坛市万华实验仪器厂)。

基金项目: 北京市中医药科技发展项目 (JJ2013-67)

通讯作者: 刘淑芝, E-mail: liushuzhi2004@sina.com;

梁丽娜, E-mail: lianglina163@163.com

淫羊藿苷对照品(批号 0737-9508, 中国食品药品检定研究院, 供含量测定用), 无水葡萄糖(批号 991122, 北京化学试剂公司), 苯酚(批号 030805, 北京化学试剂公司), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 硫酸、乙醚均为分析纯。处方药材均购自安徽亳州芳益堂。壳聚糖为药用级(批号 20131012, 北京凤礼精求商贸有限责任公司), 临用前用 1%醋酸加热配成 1%溶液^[2], 放置 24 h 使其充分溶胀, 备用。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷含量测定

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈-水(28:72)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 35 °C, 理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 1500。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取提取物干膏粉约 0.2 g, 精密称定, 置塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例分别称取除淫羊藿外的其余药味, 按提取精制工艺制成缺淫羊藿的阴性样品, 按“2.1.3”项下方法制成缺淫羊藿的阴性对照溶液。

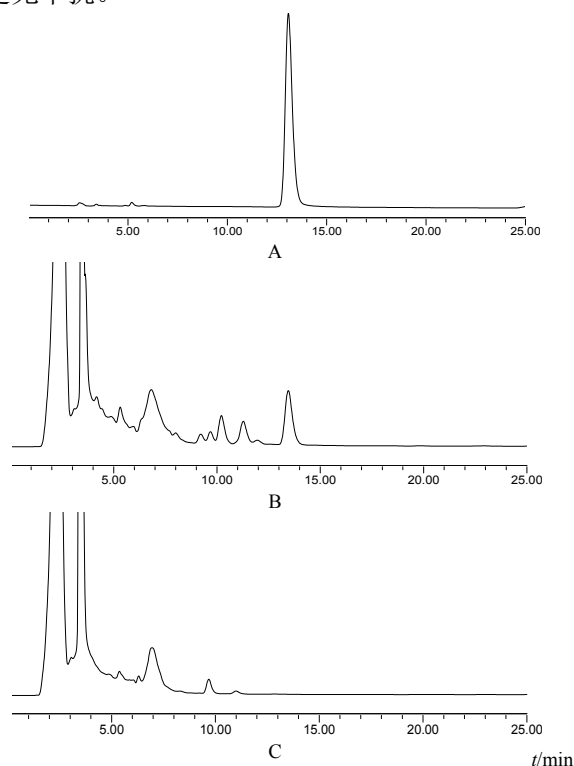
2.1.5 线性关系考察 按“2.1.2”项下方法配制对照品溶液, 按上述色谱条件, 分别进样 2、4、6、10、15、20 μ L, 记录淫羊藿苷峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=2.2 \times 10^5 X + 55\,471$ ($r=0.999\,7$, $n=6$), 表明淫羊藿苷在 0.2~2 μ g 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 每次 10 μ L, 记录淫羊藿苷峰面积, 结果淫羊藿苷峰面积 RSD=1.73%, 表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品, 按“2.1.3”项下制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别进样 20 μ L, 记录淫羊藿苷峰的面积, 结果淫羊藿苷平均含量为 1.218 mg/g 原药材, RSD=0.58%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样 20 μ L, 记录淫羊藿苷的峰面积, 结果淫羊藿苷峰面积 RSD=0.98%, 表明淫羊藿苷在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 空白试验 取阴性对照溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样 20 μ L, 记录色谱图(见图 1)。结果表明, 在淫羊藿苷的保留时间处无色谱峰, 说明对测定无干扰。



注: A.对照品; B.供试品; C.阴性对照

图 1 补肾养血颗粒中淫羊藿苷 HPLC 图

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份, 各精密加入淫羊藿苷对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 结果见表 1, 表明本法具有良好的回收率。

表 1 淫羊藿苷加样回收率试验

取样量 /g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
0.115 4	0.275 8	0.27	0.555 2	103.5	101.6	1.76
0.116 5	0.278 4	0.27	0.558 0	103.6		
0.117 6	0.281 1	0.26	0.539 4	99.3		
0.117 9	0.281 8	0.29	0.574 5	101.0		
0.119 4	0.285 4	0.27	0.555 4	100.0		
0.117 7	0.281 3	0.24	0.526 4	102.1		

2.2 总多糖含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取无水葡萄糖对照品 25 mg, 精密称定, 置 250 mL 量瓶中, 加适量水溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1 mL 中含无水葡萄糖 0.1 mg)。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL, 分别置具塞试管中, 分别加水补至 2.0 mL, 各精密加入 5%苯酚溶液 1 mL,

摇匀,迅速精密加入硫酸 5 mL,摇匀,放置 10 min,置 40 ℃ 水浴中保温 15 min,取出,迅速冷却至室温,以相应的试剂为空白,照紫外-可见分光光度法[2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)附录 V A],在 490 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=65.285X-0.052$ ($r=0.9987$),线性范围 2.475~14.85 mg/L。

2.2.3 测定法 取本品粗粉约 0.5 g,精密称定,加乙醚 100 mL,加热回流 1 h,静置,放冷,小心弃去乙醚液,残渣连同滤纸置烧瓶中,加水 150 mL,加热回流 2 h。趁热过滤,用少量热水洗涤滤器,合并滤液与洗液,放冷,移至 250 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置具塞试管中,加水 1.0 mL,按“2.2.2”项下方法,自“各精密加入 5%苯酚溶液 1 mL”起,依法测定吸光度,从标准曲线上读出供试品溶液中葡萄糖质量,计算,即得。

2.3 水提工艺优化

根据浸提理论及查阅相关文献^[3-6],影响水提工艺的因素主要有加水量、提取时间、提取次数等,故本试验选取加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)3个因素进行考察。按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,按处方比例称取 9 份枸杞子等水提药材,每份共 70 g,置圆底烧瓶中,加热回流,过滤,滤液经水浴浓缩,真空干燥,得干膏,称重,粉碎成干膏粉。以淫羊藿苷含量为考察指标,优选最佳水提工艺,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

由直观分析法可知,影响淫羊藿苷含量的主次顺序为 $C>B>A$,即提取次数>提取时间>加水量,其中 C 因素是最主要因素;经方差分析可知, A 因素和 B 因素对提取工艺均无显著影响 ($P>0.05$), C 因素对提取工艺具有显著影响 ($P<0.05$),故确定最佳工艺为 $A_2B_1C_3$,即加 10 倍量水,提取 3 次,每次 1 h。

2.4 絮凝工艺优化

根据相关文献^[7-9],影响壳聚糖纯化效果的因素主要有药液浓度、絮凝温度、壳聚糖加入量、药液的 pH 值、放置时间,絮凝搅拌速度等。本试验选取药液浓度(A)、絮凝温度(B)、壳聚糖加入量(C)3个因素,每个因素考察 3 个水平。称取处方药材 540 g,置 10000 mL 圆底烧瓶中,按优选出的最佳水提工艺条件进行提取,即加入 5400 mL 水,加热回流提取 3 次,每次 1 h,过 180 目筛,合并滤液,将滤液浓缩至一定浓度,离心,按正交试验设计安排将药液浓缩

至 0.4、0.2、0.1 g/mL 的溶液,测定淫羊藿苷含量及总多糖含量。因素水平见表 5,试验安排及结果见表 6,方差分析见表 7、表 8。

表 2 水提工艺正交试验因素水平表

水平	加水量/倍	提取时间/h	提取次数
	A	B	C
1	8	1.0	1
2	10	1.5	2
3	12	2.0	3

表 3 水提工艺正交试验安排及直观分析

试验号	A	B	C	D	淫羊藿苷/ (mg/g 原药材)
1	1	1	1	1	1.006
2	1	2	2	2	1.525
3	1	3	3	3	1.647
4	2	1	2	3	1.728
5	2	2	3	1	1.789
6	2	3	1	2	1.111
7	3	1	3	2	1.966
8	3	2	1	3	1.102
9	3	3	2	1	1.391
K1	4.18	4.70	3.22	4.19	
K2	4.63	4.42	4.64	4.60	
K3	4.46	4.15	5.40	4.48	
R	0.15	0.18	0.73	0.14	

表 4 水提工艺方差分析

方差来源	偏差平方和	均方	F 值	P 值
A	0.034 4	0.017 2	1.13	>0.05
B	0.050 6	0.025 3	1.67	>0.05
C	0.819 0	0.409 5	26.96	<0.05
D(误差)	0.030 4	0.015 2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$

由直观分析法可知, $R_A>R_B=R_C$,影响淫羊藿苷含量的主次顺序为 $A>B=C$,即药液浓度>絮凝温度=壳聚糖加入量,其中 A 因素是最主要因素;经方差分析可知, A、B、C 因素对絮凝工艺均无显著影响 ($P>0.05$),故最佳工艺为 $A_2B_2C_3$,即药液浓度为 0.2 g/mL,絮凝温度为 40 ℃,壳聚糖加入量为 0.1%。

表 5 絮凝工艺正交试验因素水平

水平	药液浓度/(g/mL)	絮凝温度/℃	壳聚糖加入量/%
	A	B	C
1	0.4	30	0.20
2	0.2	40	0.15
3	0.1	50	0.10

表 6 絮凝工艺正交试验安排及直观分析 (mg/g 原药材)

试验号	A	B	C	D	淫羊藿苷	总多糖
1	1	1	1	1	1.032	19.613
2	1	2	2	2	1.043	22.536
3	1	3	3	3	1.092	19.300
4	2	1	2	3	1.114	17.204
5	2	2	3	1	1.183	18.617
6	2	3	1	2	1.068	14.400
7	3	1	3	2	1.064	17.584
8	3	2	1	3	1.111	16.755
9	3	3	2	1	1.002	13.416
淫羊藿苷	K1	3.17	3.21	3.21	3.22	
	K2	3.37	3.34	3.16	3.18	
	K3	3.18	3.16	3.34	3.32	
	R	0.07	0.06	0.06	0.05	
总多糖	K1	61.45	54.40	50.77	51.65	
	K2	50.22	57.91	53.16	54.52	
	K3	47.76	47.12	55.50	53.26	
	R	4.56	3.60	1.58	0.96	

表 7 淫羊藿苷含量方差分析

方差来源	偏差平方和	均方	F 值	P 值
A	0.008 3	0.004 1	2.34	>0.05
B	0.005 5	0.002 7	1.54	>0.05
C	0.005 7	0.002 9	1.61	>0.05
D (误差)	0.003 5	0.001 8		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$

表 8 总多糖含量方差分析

方差来源	偏差平方和	均方	F 值	P 值
A	35.519 4	17.759 7	25.67	<0.05
B	20.204 2	10.102 1	14.60	>0.05
C	3.733 7	1.866 8	2.70	>0.05
D (误差)	1.383 5	0.691 8		

由直观分析可知,影响总多糖含量的主次顺序为 $A>B>C$,即药液浓度>絮凝温度>壳聚糖加入量,其中 A 因素是最主要因素;经方差分析可知, A 因素对絮凝工艺有显著影响 ($P<0.05$),故确定最佳工艺为 $A_1B_2C_3$,即浸膏浓度为 0.4 g/mL,絮凝温度为 40 ℃,壳聚糖加入量为 0.1%。

综上分析,由于以淫羊藿苷为含量指标时, A 因素对絮凝工艺无显著影响 ($P>0.05$),而考察总多糖含量时, A 因素对絮凝工艺有显著影响 ($P<0.05$),故而最终确定最佳工艺为 $A_1B_2C_3$ 。

2.5 验证试验

按处方比例称取 180 g 水提药材,按最佳提取工艺提取,水提液平均分成 3 份,按优选的最佳絮凝工艺进行验证试验,结果见表 9。说明该工艺稳定可行。

表 9 验证试验结果

试验号	淫羊藿苷		总多糖		
	含量/ (mg/g 原药材)	RSD /%	絮凝前含量/ (mg/g 原药材)	含量/ (mg/g 原药材)	RSD /%
1	1.225			19.783	
2	1.228	0.12	22.826	20.449	2.16
3	1.226			19.643	

3 讨论

本试验在淫羊藿苷含量测定流动相选择时,考察了乙腈-水 (30:70) 和乙腈-水 (28:72) 2 种比例,结果发现,流动相为乙腈-水 (30:70) 时,阴性对照在淫羊藿苷保留时间处有干扰,而流动相为乙腈-水 (28:72) 时无干扰。

壳聚糖澄清剂法虽然具有诸多优点,但目前技术尚不成熟,在精制过程中或多或少会有残留,虽然壳聚糖毒性低且具有良好的生物相容性,但其本身具有一定的药理功效^[10-11],尚需进一步探讨。中药复方水提液体系复杂,壳聚糖对水提液中各成分的影响亦有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张彤,徐莲英,蔡贞贞.壳聚糖澄清剂精制中药水提液的应用前景[J].中国中药杂志,2001,26(8):516-519.

[2] 宋信莉.壳聚糖澄清剂精制天麻钩藤饮工艺的研究[J].贵阳中医学院学报,2013,35(3):314-316.

[3] 李海滨,吕佳.正交设计考察益肾康颗粒剂提取工艺[J].中医药学刊,2006,24(7):1361-1362.

[4] 武海燕,洪筱坤,沈谦,等.正交实验优选乳宁颗粒剂的水提与精制工艺[J].医药导报,2006,25(12):1314-1316.

[5] 孔成福.正交实验法优化淫黄颗粒的提取工艺[J].浙江中医药大学学报,2008,32(4):528-529.

[6] 刘起华,文谨,孙玉雯.正交试验法优选补肾益髓颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):8-11.

[7] 韩乐,孙晓海,韩伟.壳聚糖絮凝法精制合欢皮多糖水提液的工艺[J].生物加工过程,2014,12(2):38-43.

[8] 陈英,李永吉,程淑云,等.壳聚糖絮凝法精制红花水提液工艺的研究[J].时珍国医国药,2007,18(5):1167-1168.

[9] 王勇,邹韵,李永辉.正交试验优选裸花紫珠水提液的壳聚糖絮凝澄清工艺[J].海南医学院学报,2015,21(1):7-13.

[10] 唐大川,杨红.壳聚糖神经保护机制研究进展[J].中华实验眼科杂志,2014,32(3):281-284.

[11] 许剑峰.壳聚糖及其衍生物的药理活性研究进展[J].海峡药学,2006,18(6):13-15.

(收稿日期:2015-08-26)

(修回日期:2015-09-11;编辑:陈静)