

阿胶补血颗粒多糖提取工艺的研究

★ 简晖^{1,2*} 刘帅英¹ 龚建平² 罗晓健² 胡鹏翼¹ 张国松² 肖雄^{1**} (1. 江西中医学院 南昌 330006; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 南昌 330006)

摘要:目的:确定阿胶补血颗粒(当归、黄芪、大枣)中多糖的理想提取工艺。方法:以多糖提取率、提取浸膏得率为指标,采用单因素考察提取溶媒,以溶媒量(A)、提取次数(B)和提取时间(C)为考察因素,采用正交设计法优化提取工艺。结果:确定提取溶媒为水,B因素和C因素对多糖含量的影响有显著性意义,A因素的影响不大。结论:理想提取工艺为 $A_3B_2C_3$,即提取2次,每次2h,加水量为10倍量。

关键词:阿胶补血颗粒;多糖;正交设计法;提取工艺

中图分类号:R 284.2 **文献标识码:**A

Study on Extracting Craft of Polysaccharides in Ajiabuxue Granula

JIAN Hui^{1,2}, LIU Shuai-ying¹, GONG Jian-ping², LUO Xiao-jian², HU Peng-yi¹, ZHANG Guo-song², XIAO Xiong¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

2. National Center of Pharmaceutical Engineering Research, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To fix optimum extracting craft of polysaccharides in Ajiabuxue Granula. Methods: The orthogonal design was used and menstruum capacity(A), extraction time(B) and refluxing time(C) were defined as factors of the design. Results: Ensure water as menstruum, B factor and C factor had notabled influence on the content of polysaccharides. Conclusion: Optimum extracting craft was defined as follows: $A_3B_2C_3$.

Key words: Ajiabuxue Granula; Polysaccharides; Orthogonal test; Extracting craft

阿胶补血颗粒处方由阿胶、当归、黄芪、大枣、葡萄糖酸 亚铁五味药组成,符合中国传统补血养生习惯,中西医结合,

* 作者简介:简晖,男,副教授,主要从事中药复方新型制剂的研究。

** 通讯作者:肖雄,男,讲师, Tel:13970953086。

本实验研究中曾研究了药液浓度、盐离子浓度对吸附容量的影响实验,发现药液浓度、盐离子浓度在较大的范围内对吸附容量影响不大,且 D-301 型树脂用于富集芍药苷具有吸附快、解吸率高、吸附容量大、再生简便的特点,因而具有工业应用推广价值。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 化学工业出版社, 2005.
- [2] 金继曙, 都述虎, 种明才. 用大孔吸附树脂分离白芍总甙[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 31.
- [3] 姜焕荣, 裴旭红, 胡海伟, 等. 大孔吸附树脂用于赤芍总甙分离方

法的探索[J]. 中成药, 1999, 21(12): 644.

- [4] 裴晓玉, 尚诚, 王雅亮, 等. 大孔吸附树脂分离白芍中药药苷实验研究[J]. 中成药, 2005, 27(3): 350 - 351.
- [5] 刘永刚, 金向群, 叶瑾, 等. 大孔树脂纯化赤芍总苷的研究. 中药材, 2005, 28(3): 195 - 196.
- [6] 滕坤, 张莲珠, 张海丰, 等. HPLC 考察 DA201 大孔树脂对芍药苷的吸附容量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(4): 871 - 872.
- [7] 桂双英, 周亚球, 柯仲成, 等. D101 型树脂对芍药苷吸附分离性能的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 25 - 27.
- [8] 刘成红, 程斌, 曹红, 等. 大孔树脂吸附法精制牡丹皮总苷的研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(10): 807 - 809.

(收稿日期:2007-03-20)

葡萄糖酸亚铁起效快,阿胶是补血圣药,大枣有补血、调和脾胃的作用,当归、黄芪具有补气生血的作用,可谓长短互补、疗效显著,达到标本兼治的目的。

方中当归、黄芪、大枣药材均含有多糖,是阿胶补血颗粒的主要有效成分。近 20 年来随着天然药物研究的不断深入以及中药产业的迅速发展,多糖作为中药中一种重要的成分引起了人们极大的关注。药理研究表明^[1~9],多糖具有复杂的、多方面的生物活性和功能,如补血活血作用、增强免疫作用、抗肿瘤作用、抗放射性损伤作用等,预示良好的前景。为提高药材中多糖的提取率,我们将单因素和正交试验相结合,对多糖提取工艺进行研究,以改良的苯酚-硫酸法对多糖进行含量测定,并以多糖提取率和浸膏得率来确定多糖提取的理想条件。

1 仪器与试剂

UV-2550 紫外分光光度计,SHIMADZU;KDM 型调温电热套,山东新华电热仪器厂。

葡聚糖对照品,北京拜耳迪生物公司;苯酚(分析纯),重庆天府精细化学品厂;浓硫酸(分析纯),广东西陇化工厂;五水硫酸铜(分析纯),上海振欣化工厂;氢氧化钠(分析纯),天津化学试剂批发经销部;无水乙醇(分析纯),上海振欣化工厂;蒸馏水。

当归饮片,江西药都樟树中药饮片有限公司;黄芪饮片,安徽省亳州市中药饮片厂;大枣,山东沾化阳光食品有限公司。

2 方法和结果

2.1 浸膏得率的测定方法

参照《中国药典》(2005 年版一部)附录 IX 浸出物测定法,精密吸取提取液 25.0 ml,置 105℃干燥至恒重的蒸发皿中水浴蒸干,于 105℃烘箱中干燥 3 h,移至干燥器中冷却 30 min,精密称定。

2.2 多糖的含量测定方法

2.2.1 试剂配制 NaOH 溶液:称取 10 g NaOH,加水稀释至 100 ml,加入固体无水硫酸钠至饱和,备用。

铜储备液:称取 0.3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,3 g 柠檬酸钠,加水 100 ml 稀释,混匀,备用。

铜试剂溶液:取铜储备液 20 ml,加水 20 ml,混匀后加入固体无水硫酸钠 5 g 并使其溶解,临用新配。

洗涤液:取蒸馏水 50 ml,加入 10 ml 铜试剂溶液,10 ml NaOH 溶液,混匀。

5% 苯酚:取苯酚 5 g,加水稀释至 100 ml 量瓶中,混匀,备用。

硫酸溶液:取 100 ml 浓硫酸加入到 800 ml 水中,混匀,冷却后加水稀释至 1000 ml。

2.2.2 对照品溶液的制备 取分子量 500 000、干燥至恒重的葡聚糖标准品 0.5 g,精密称定,置 50 ml 量瓶中,加蒸馏水溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 (1)沉淀粗多糖:精密吸取提取液 1 ml,加水定容至 50 ml 量瓶中,精密吸取 2 ml,置于 15 mL 离心管中,加入无水乙醇 8 ml,混匀后,以 3 000 r/min 离

心 5 min,弃去上清液,加入 80% 乙醇 8 ml,以 3000 r/min 离心 5 min,反复 3~4 次操作,残渣用水溶解并加水至 2.0 ml,混匀,备用。

(2)沉淀葡聚糖:取以上项下 2.0 ml 溶液,加入 100 g/L NaOH 溶液 2.0 ml、铜试剂 2.0 ml,沸水浴中煮沸 2 min,冷却后以 3 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,残渣用洗涤液数毫升洗涤,离心后弃上清液,反复 3 次操作,残渣用 100 ml/L 硫酸 1.0 ml 溶解并加水至 2.0 ml。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取葡聚糖标准液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml 分别置于 15 ml 比色管中,准确补水至 2.0 ml,加入 5% 苯酚溶液 1.0 ml,混匀,缓缓加入浓硫酸 10.0 ml,混匀,置沸水浴中煮沸 2 min,冷却后用分光光度计在 485 nm 波长处以试剂空白为参比,测定吸收度。以含量(X)为横坐标,吸收度(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 5.5716X + 0.0041$, $r = 0.9994$ 。结果表明,多糖含量以葡聚糖计,在 0.26~1.30 mg 范围内呈良好线性关系。

2.2.5 显色络合物的稳定性 精密吸取葡聚糖标准溶液 0.20 ml,按“标准曲线”项下方法测定。于一定时间间隔测定吸光度。结果表明形成的颜色在 90 min 内比较稳定。结果见表 1。

表 1 显色络合物的稳定性

时间/min	吸光度
0	0.252
15	0.25
30	0.248
60	0.25
90	0.246

2.2.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液 2 ml,共 6 份,按标准曲线项下测定,结果 $RSD = 1.78\%$,表明该方法精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按处方比例取当归、黄芪、大枣药材共 17 g,精密称定,共 6 份,按供试品液制备法制备并测定, $RSD = 2.69\%$,结果表明该方法重现性良好。

2.2.8 回收率试验 精密吸取已知含量的提取液,加入葡聚糖对照品适量,按“2.2.3”项下制备并测定,由回归方程计算得平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.71%。

2.3 单因素考察提取溶剂

按处方比例称取当归、黄芪、大枣三味药 17.0 g,精密称定,共 4 份,根据文献资料^[10~13],分别加入 10 倍量水、20% 醇、5% 醇、5% 醇碱,煮沸 2 h,过滤,冷却至室温,测定多糖含量及提取液浸膏得率,结果见表 2。

表 2 提取溶剂的考察

提取溶剂	多糖提取量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	浸膏得率(%)
水	7.001	29.99
20% 醇	6.2084	29.17
5% 醇	5.4671	29.74
5% 醇碱	7.804	32.37

由表 2 结果可知,5% 醇碱的提取多糖含量最高,说明碱溶液对植物细胞起到破壁作用,醇溶液渗透作用较强,在碱与醇的共同作用下,增加了多糖渗透率;水和 5% 醇碱的多糖

提取量比较接近,综合生产成本和用药习惯,本方选择以水为提取溶剂。

2.4 多糖提取工艺优化

根据文献资料和大生产的实际情况,主要影响因素是加水量(A)、提取次数(B)、提取时间(C),采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法进行多糖提取工艺优选,因素水平见表3。

表3 因素水平表

水平	A:加水量/倍	B:提取次数/次	C:提取时间/h
1	6	1	1
2	8	2	1.5
3	10	3	2

2.5 试验方法

2.5.1 吸水率的测定 按阿胶补血颗粒处方称取药材 17.0 g,加水 170 ml,浸泡过夜,过滤,量得滤液体积为 137 mL,试验结果得出药材的吸水率为 194%,即为药材的 1.94 倍。故第一次加水提取时需多加 1.94 倍的水。

2.5.2 正交试验考察 按处方称取药材 17.0 g,以正交表工艺条件提取,以浸膏得率和多糖含量为指标优化工艺。

2.6 多糖的含量测定

以 2.2.3 项下按“标准曲线制备”项下操作并测定吸光度,结果见表4,方差分析见表5、表6。

表4 正交试验结果

实验号	A	B	C	浸膏得率 (%)	多糖提取量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	27.33	2.91
2	1	2	2	41.00	11.62
3	1	3	3	43.69	10.48
4	2	1	2	30.53	5.67
5	2	2	3	38.36	21.39
6	2	3	1	39.62	10.19
7	3	1	3	31.91	5.25
8	3	2	1	35.76	8.54
9	3	3	2	45.22	17.14
K ₁	112.02	89.77	102.71		
K ₂	108.51	115.12	116.75		
K ₃	112.89	128.53	113.96		
R	4.38	38.76	14.04		
K ₁	25.01	13.83	21.64		
K ₂	37.25	41.55	34.43		
K ₃	30.93	37.81	37.12		
R	12.24	27.72	15.48		

表5 浸膏得率方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	3.585	2	1.792	3.229	0.236
B	258.310	2	129.155	232.670	0.004
C	36.830	2	18.415	33.174	0.029
误差	1.110	2	0.555		

表6 多糖测定结果方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	25.101	2	12.550	0.457	0.686
B	150.755	2	75.378	2.746	0.267
C	45.601	2	22.801	0.831	0.546
误差	54.896	2	27.448		

从浸膏得率分析,影响因素主次为 $B > C > A$,B 因素对结果有显著性影响,其水平优势为 $B_3 > B_2 > B_1$ 。从多糖含量看,影响因素主次仍然为 $B > C > A$,B 因素对结果有显著性影响,综合考虑,确定其多糖提取的最佳条件为: $A_3B_2C_3$,即提取 2 次,每次 2 h,溶媒量为 10 倍量。

2.7 验证实验

取同样 10 倍处方量,按照正交实验优选的最佳工艺条件重复 3 次实验,结果浸膏得率平均值为 36.13%,多糖提取量平均值为 197.25 mg/g。

3 讨论

预实验曾用硫酸-苯酚导数法测定提取液中多糖的含量,结果发现采用一阶导数光谱法所测的含量除大分子多糖成分外,还包括一些单糖、二糖等成分,而发挥药效的主要成分是大分子的多糖,造成了测定结果的假阳性,增大了方法的误差,干扰了对提取工艺优劣的判断。采用改良的硫酸-苯酚法测定,首先,使提取液含醇量达到 80%,沉淀粗多糖,再用碱性二价铜试剂选择性的从粗多糖中沉淀具有葡聚糖结构的多糖,在酸性环境下水解生成单糖,并脱水生成糖醛衍生物,与苯酚缩合成有色化合物。该法测得的含量较准确,方法回收率达到 98.7%。

参考文献

- [1]山田阳城.当归多糖成分研究—主要酸性多糖的抗补体活性[J].国外医学·中医中药分册,1993,8(3):116-118.
- [2]李明峰,梅其炳.当归多糖对小鼠免疫功能的影响[J].第四军医大学学报,1987,8(6):422-424.
- [3]杨铁虹,贾敏.当归多糖对凝血和血小板聚集的影响[J].中药材,2002,25(5):344-345.
- [4]张小梅.黄芪多糖的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展[J].大连大学学报,2004,6(24):101-104.
- [5]陈蔚,夏燕萍.黄芪多糖预防自身免疫性胰岛炎的病理变化[J].中国现代医学杂志,2007,17(2):146-148.
- [6]邹丰,欧阳静萍.黄芪多糖对遗传性糖尿病小鼠肝糖原含量的影响[J].微循环杂志,2007,11(1):12-14.
- [7]陈蔚,李益明.黄芪多糖对糖尿病鼠 T 细胞亚群的免疫调节作用[J].中国现代医学杂志,2007,11(1):28-31.
- [8]苗明山.大枣多糖对免疫抑制小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-1 α 及脾细胞体外增殖的影响[J].中药药理与临床,2004,20(4):21-22.
- [9]徐瑜玲,苗明山.大枣多糖对气血双虚模型小鼠造血功能的影响[J].中国临床康复,2004,8(24):5050-5051.
- [10]李宏燕,樊君.大枣多糖的水提醇沉工艺研究[J].宁夏工程技术,2005,3(4):265-267.
- [11]朱晓霞,罗学刚.多糖提取与纯化技术应用进展[J].食品研究与开发,2007,28(3):186-189.
- [12]伊艳,高文宏.多糖提取技术的研究进展[J].食品工业科技,2007,28(2):248-250.
- [13]田洛,宣依访.醇碱提取法提取黄芪多糖[J].吉林大学学报,2006,44(4):652-657.

(收稿日期:2007-10-09)