

葛根降糖胶囊水提醇沉工艺的研究

□陈建真* (浙江中医药大学 杭州 310053)

陈建明 (浙江省中医院 杭州 310006)

摘要:目的:研究葛根降糖胶囊水提醇沉的工艺条件。方法:选用 L9(3⁴) 正交表,以提取葛根素总量为评价指标,葛根素含量测定采用高效液相色谱法(HPLC)。结果:因素 A(煎煮次数)和 B(提取时间)对水提工艺有显著影响,煎煮工艺确定为 A₃B₂C₃。因素 A(醇沉浓度)对醇沉工艺有显著影响,醇沉工艺确定为 A₃B₃C₁。结论:该水提醇沉工艺科学、合理。

关键词:葛根降糖胶囊 水提醇沉 正交试验 葛根素

葛根降糖胶囊是由葛根、麦冬、山药等组成的中药复方制剂,具有益气生津、滋阴补肾之功效,主要用于糖尿病气阴两虚所导致的气短懒言,口渴喜饮,形体消瘦,五心烦热,心悸失眠等症。葛根为方中主药,含葛根素等黄酮类成分,现代药理研究表明,葛根具有明确的降血糖作用,为治糖尿病主要的药物^[1-2]。为使该方更好地发挥疗效,最大限度地保留有效成分,本实验对葛根降糖胶囊进行了水提醇沉工艺研究,以提取葛根素总量为评价指标,确定了最佳工艺条件。

一、仪器与材料

美国 Agilent 公司 HP1100 高效液相色谱仪,包括 Agilent G1310A IsoPump, G1314A VWD 可变波长检测器,AE-163 电子天平(瑞士),KQ2500B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。甲醇为色谱纯,水为

二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号为 20040512)、葛根降糖胶囊(本校自制)、药材均购自浙江中医药大学中药饮片厂,经鉴定符合《中国药典》2005 年版(一部)有关规定。

二、方法与结果

1. 水提工艺条件的优选

(1) 正交试验设计。

对水提过程中的主要影响因素(煎煮次数、煎煮时间和用水量)进行考察,选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验,见表 1。按表 1 设计的工艺条件,以处方比例称取药材共 15g,水煎煮提取,合并提取液,离心(3500 r/min) 15 min,滤过,滤液浓缩至含生药量 1g/mL。

(2) 浸膏得率测定。

按《中国药典》2005 年版 I 部附录 XA,精密吸取水提液 10 mL 置于已称重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃ 真空干燥 3 h,置干燥器中,冷却至室温后,迅速

收稿日期:2006-03-13

修回日期:2006-05-28

* 联系人:陈建真,副教授,研究方向:中药有效成分和质量控制研究,中药新药研究,Tel:0571-866133657,E-mail:chjzloz@yahoo.com.cn。

精密称重,计算浸膏得率,结果见表2。

(3) 葛根素含量测定^[3-4]。

① 色谱条件。色谱柱: Hypersil BDS C18 柱 (250mm × 4.6mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (25:75); 检测波长: 250nm; 流速: 1.0mL · min; 柱温: 25℃, 进样量: 10 μ L。

② 对照品溶液制备。精密称取葛根素对照品 12.6mg 置 25mL 容量瓶中, 加甲醇制成 0.504mg/mL 的溶液, 作为对照品贮存液。

③ 供试品溶液制备。取提取所得浸膏约 0.2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50mL, 密塞, 称定重量, 超声提取 30min, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 以微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 即得。

④ 标准曲线的绘制。精密吸取对照品贮存液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 分别置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别进样上述不同浓度的对照品溶液 10 μ L, 按上述色谱条件测定, 以峰面积积分值为纵坐标 Y, 进样浓度 X (μ g/mL) 为横坐标, 得回归方程为 $Y = 4264.58X - 1562$, $r = 0.9998$, 线性范围为 50.4 ~ 302.4 μ g/mL。

⑤ 精密度试验。吸取同一供试品溶液, 按上述色谱条件, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD = 1.89%。

⑥ 稳定性试验。取新鲜制备的供试品溶液, 每隔 1h 测定 1 次, 持续 8h, RSD = 1.56%, 表明本法稳定性较好。

⑦ 重现性试验。精密称取同一批号样品 6 份, 按“供试品溶液制备”和“样品含量测定”项下方法测定, 考察供试品测定方法的重现性, 结果 RSD = 2.65%。

⑧ 回收率试验。精密称取已知含量的样品 6 份, 加入一定浓度的葛根素对照品溶液, 按“供试品溶液制备和样品含量测定”项下方法测定, 计算样品回收率, 结果平均回收率为 99.41%, RSD 为 2.52% (n = 6), 表明本法具有良好的回收率。

⑨ 样品含量测定。精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以外标二点法计算样品中葛根素含量, 见表 2。

表 1 水提因素水平表

水平	A 煎煮次数 (次)	B 煎煮时间 (h)	C 加水量 (倍)
1	1	1.0	6
2	2	1.5	8
3	3	2.0	10

表 2 水提正交试验表及结果

试验号	A	B	C	D 空白	浸膏得率 (%)	葛根素 (mg/g 浸膏)	综合评分
1	1	1	1	1	16.41	14.10	34.71
2	1	2	2	2	22.55	16.31	55.17
3	1	3	3	3	26.63	19.20	76.69
4	2	1	2	3	22.32	22.57	75.56
5	2	2	3	1	26.68	25.89	103.61
6	2	3	1	2	27.03	23.27	90.86
7	3	1	3	2	31.52	20.76	98.15
8	3	2	1	3	32.12	25.57	113.56
9	3	3	2	1	32.89	23.24	114.65
均值 1	55.52	69.47	79.71	84.32			
均值 2	90.01	90.78	81.79	71.39			
均值 3	108.79	94.07	92.82	88.60			
R	53.26	24.59	13.17	7.21			

(4) 结果分析。

以全方药材(15g)提取所得葛根素总量为评分标准,进行直观分析和方差分析,结果见表2和表3。

由分析结果可知各因素影响程度为: $A > B > C$,且A、B两因素有显著影响, $A_3B_3C_3$ 为各因素的最佳水平,由于 B_2 与 B_3 结果相差较小,从实际情况出发,选择 B_2 能缩短生产周期,降低成本,更适合于工业生产。故水提工艺最佳条件确定为 $A_3B_2C_3$,即加药材10倍量的水,煎煮3次,每次1.5h。

(5) 验证试验。

称取药材按照 $A_3B_2C_3$ 进行验证试验,结果浸膏得率为32.16%,每克浸膏中葛根素含量为24.36mg,葛根素总量为117.51mg,说明该水提工艺可行。

2. 醇沉条件的优选

(1) 正交试验设计。

为了除去杂质并最大限度地保留有效成分,减小服用剂量,在浓缩的水提液中加入适量乙醇以除去其中的淀粉、树胶等多糖类和蛋白质等杂质,选用 $L_9(3^4)$ 正交表对影响醇沉的主要因素,乙醇浓度(A)、浓缩物相对密度(B)、静置时间(C)进行考察,见表4,按上述优选的水提取工艺制备药液,将其等分成9份,按表4条件进行醇沉,静置后药液抽滤,取上清液,沉淀用少量乙醇洗涤,过滤,洗液与滤液合并,减压回收至无醇味,加水调整至含生药量1g/mL。

(2) 指标测定和结果分析。

按取醇沉淀方法测定浸膏得率和浸膏中葛根素含量,按对测定结果进行分析,结果见表5、表6。

由分析结果可知各因素影响程度为: $A > B > C$,A因素有显著影响,各因素最佳水平为 $A_3B_3C_1$,即提取液浓缩至相对密度为1.2(50℃),加乙醇至浓度为55% 沉淀,静置24h。

表3 水提方差分析表

方差来源	偏差平方和 SS	自由度	F	P
A	4418.14	2	76.17	$P < 0.05$
B	1137.18	2	19.60	$P < 0.05$
C	265.00	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$

表4 醇沉因素水平表

水平	A 醇沉浓度(%)	因素 B 相对密度	C 静置时间(h)
1	75	1.1	24
2	65	1.15	16
3	55	1.2	8

表5 醇沉方差分析表

方差来源	偏差平方和 SS	自由度	F	P
A	4784.00	2	32.35	$P < 0.05$
B	954.21	2	6.45	
C	138.16	2	0.93	
误差	147.88	2		

表6 醇沉正交试验及结果表

试验号	A	B	C	D 空白	浸膏得率(%)	葛根素含量(mg/g 浸膏)	综合评分
1	1	1	1	1	13.89	30.98	64.55
2	1	2	2	2	15.15	32.10	72.95
3	1	3	3	3	16.32	33.03	83.33
4	2	1	2	3	15.01	37.52	84.48
5	2	2	3	1	15.86	36.03	85.72
6	2	3	1	2	19.95	40.96	122.57
7	3	1	3	2	21.06	38.52	121.68
8	3	2	1	3	20.35	42.72	130.40
9	3	3	2	1	22.56	40.65	137.56
均值1	73.61	90.24	105.84	95.94			
均值2	97.59	96.36	98.33	105.73			
均值3	129.88	114.49	96.91	99.40			
R	56.27	24.25	8.93	9.79			

3. 验证试验

称取药材按 $A_3B_3C_1$ 进行验证试验,结果浸膏得率为 21.69%,每克浸膏中葛根素含量为 42.75mg,葛根素总量为 139.09mg,说明该醇沉工艺可行。

三、讨 论

1. 测定葛根素时对提取溶剂及时间进行了考察,分别用甲醇、乙醚脱脂后乙醇提、乙醚脱脂后甲醇提,进行比较,结果表明 3 种不同的溶剂无明显区别。比较了 10,20,30,40,60min 等不同超声提取时间对提取效果的影响,结果提取 10,20 min 测得样品的含量稍微偏低,提取 30 min 以后结果基本一致,所以确定用甲醇超声提取时间为 30min。

2. 按本工艺条件制得 3 批浸膏,结果葛根素含量为 42.75mg/g 浸膏,实验用葛根药材按药典方法^[3]测定含量为 41.39mg/g,推算葛根素含量从药材到本工艺的转移率为 67.1%,表明本工艺条件科学合理。

3. 根据实验结果以及实际生产,确定葛根降糖胶

囊水提醇沉的最佳工艺为:药材加 10 倍量水煎煮提取 3 次,每次 1.5 h,合并滤液浓缩至相对密度为 1.2,加乙醇使药液含醇量达 55%,静置 24 h,滤过,滤液浓缩至稠浸膏,置真空干燥箱中干燥(干浸膏水分 < 9%,按中国药典 2005 年版一部附录 47 页水分测定方法控制),干浸膏粉碎后装 0 号胶囊即得。这样既保存了有效成分,减少了药粉体积,又保持了原方的治疗效果。

参考文献

- 1 江苏新医学院编著:中药大辞典. 上海:上海科学技术出版社,1998:2307.
- 2 刘淑霞,段惠军,张玉军,等. 葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织 MMP-3、TIMP-1 表达的影响. 天然产物研究与开发. 2003,15(6):531.
- 3 国家药典委编. 中国药典(一部). 2005:233.
- 4 黄亚非,张永明,何朝,等. 采用高效液相色谱法测定心脉通口服液 中葛根素的含量. 中国中药杂志 2001,26(11):760.

Water Extracting and Alcohol Precipitation Techniques for Gegenjiangtang Capsule Making

Chen Jianzhen

(Zhejiang University of TCM, Hangzhou, 310053)

Chen Jianming

(Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou, 310006)

This paper introduces a technical process of water extracting and alcohol precipitation for gegenjiangtang capsule making. An orthogonal design $L_9(3^4)$ is used in both water extracting and alcohol precipitation. The total concentration of puerarin is measured to assess the efficacy of water extracting and alcohol precipitation techniques. The findings suggest that the total concentration of puerarin is noticeably affected by factor A (times of extraction) and B (timing of extraction) in water extracting, and by factor A (concentration of alcohol precipitation) in alcohol precipitation. The most desirable setting for water extracting is $A_3B_2C_3$, and for alcohol precipitation $A_3B_3C_1$. It is believed that the process of water extracting and alcohol precipitation is built on a scientific and rational basis.

Keywords: Gegenjiangtang capsules; water extracting/alcohol precipitation; orthogonal test; puerarin

(责任编辑:张述庆,责任编审:叶祖光,责任译审:邹春申)

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 49