

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.09

合欢磁牡口服液提取工艺研究

罗永祥^{1,2}, 许加娟^{1,2}, 胡智鹏²

(1.湖南圣雅凯院士工作站, 湖南湘潭 411228; 2.湖南圣雅凯生物科技有限公司, 湖南湘潭 411228)

[收稿日期] 2019-03-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0054-06 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为探究不同的提取条件对合欢磁牡口服液质量的影响, 以确定最佳的提取工艺。通过不同的提取工艺、浓缩工艺及提取工艺验证试验处理后, 检测合欢磁牡口服液中(-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷($C_{33}H_{44}O_{17}$)的含量。结果显示, 煎煮次数 C 对提取工艺有显著影响($P < 0.01$); 煎煮时间 B 和加水量 A 对提取工艺无显著影响($P > 0.05$); 不同的浓缩温度对合欢磁牡口服液含量无显著影响($P > 0.05$), 采用本试验确定的最佳工艺提取的合欢磁牡口服液中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 的转移率平均值为 72.37%, *RSD* 为 0.83%。因此, 确定的最佳提取生产工艺为 8 倍量水, 提取 3 次, 每次煮沸 1 h。

[关键词] 合欢磁牡口服液; 提取工艺; 浓缩工艺

Study on Extraction Technology of Hehuancimu Oral Liquid

LUO Yong-xiang^{1,2}, XU Jia-juan^{1,2}, HU Zhi-peng²

(1. Hunan Shengyakai Academician Workstation, Xiangtan, Hunan 411228, China;

2. Hunan Shengyakai Biotechnology Co., Ltd. Xiangtan, Hunan 411228, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to investigate the effect of different extraction conditions on the quality of Hehuancimu oral liquid to determine the best extraction technology. After different extraction, concentration and the verification tests of extraction technology, the content of (-)-eugenol-4-O-beta-D-furanin glycosyl-(1→2)-beta-D-pyran glucose ($C_{33}H_{44}O_{17}$) in Hehuancimu oral liquid was determined. The results showed that the times of decoction (C) had a significant effect on the extraction technology ($P < 0.01$); the time of decoction (B) and the amount of water added (A) had no significant effect on the extraction technology ($P > 0.05$); and there was no significant difference in the effect of different concentration temperature on the content of Hehuancimu oral liquid ($P > 0.05$); the average transfer rate of $C_{33}H_{44}O_{17}$ extracted by the best extraction technology was 72.37% and *RSD* was 0.83%. Therefore, the optimal extraction production technology was determined as 8 times water, 3 times extraction, 1 hour boiling each time.

Key words: Hehuancimu oral liquid; extraction technology; concentration technology

基金项目: 现代中兽药研究与国家新兽药创制

作者简介: 罗永祥, 高级工程师, 从事中药、化药、抗生素及药物制剂的药学方面研究。E-mail: luoyx_2006@126.com

近年来,我国家禽集约化、规模化养殖发展迅速,但各种应激因素对家禽造成的危害却并没有得到解决,如免疫接种、转群换料以及长途运输等所致的应激刺激是不可避免的。由此造成家禽生长缓慢,采食量降低,饲料转化率下降,更甚者导致机体免疫功能下降,传染病流行。如今,越来越多研究将中药复方制剂和应激联系起来,中药复方制剂也逐渐替代西药应用于家禽养殖生产中^[1]。合欢磁牡口服液是由合欢皮、磁石和牡蛎经一定工艺制成,用于缓解家禽抗应激反应的一个纯中药制剂,其中,合欢皮解郁安神做君药,磁石、牡蛎镇心安神辅佐合欢皮镇静安神。三药合用,经口服,药物直接作用于脾胃、肠道,并经胃肠道吸收,可有效缓解应激原所引起的躁动不安,心神不宁等应激反应,避免家禽许多潜在疾病的发生^[2-3]。因此,最佳的提取工艺是有效控制合欢磁牡口服液产品质量的重要保证。

1 材料与方 法

1.1 药 物 合欢皮、磁石、牡蛎均购于湖南湘众医药有限公司,合欢磁牡口服液由湖南圣雅凯生物科技有限公司制备。

1.2 对 照 品 与 试 剂 (-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷($C_{33}H_{44}O_{17}$)购自中国食品药品检定研究院,供含量用,批号:111911-201603;乙腈,色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;磷酸,分析纯,天津市光复精细化工研究所。

1.3 主 要 仪 器 与 设 备 水环式真空旋转蒸发仪,北京;电子天平(日本岛津 AUW220D);高效液相 6000 LDI PUMP(美国)检测器型号:紫外;色谱柱:Uranus, C18 5 μ m 4.6 mm \times 250 mm;色谱条件:18/82 乙腈/0.04%磷酸溶液;多功能提取罐购自湖南衡阳中一药品机械有限公司;真空浓缩罐购自浙江温州森博轻工机械有限公司;口服液配制罐购自浙江温州标新机械有限公司;口服液灌装机购自湖南长沙中和药品机械有限公司。

1.4 方 法

1.4.1 组 方 合欢皮 500 g、磁石 250 g、牡蛎 250 g,

制成 1000 mL。即每毫升含 1 g 原生药材。

1.4.2 水 提 工 艺 的 研 究 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 为合欢皮主要成分,故以测定 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量为考察指标,用正交设计法筛选加水量、煎煮时间、煎煮次数等工艺条件。采用 $L_9(3^4)$ 进行正交试验^[4-5]。因素水平安排见表 1:

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

Tab 1 Level of $L_9(3^4)$ Orthogonal Experimental Factors

水平	因素		
	加水倍数(A)	煎煮时间 h(B)	煎煮次数(C)
1	8(A1)	1(B1)	1(C1)
2	10(A2)	1.5(B2)	2(C2)
3	12(A3)	2(B3)	3(C3)

1.4.3 浓 缩 工 艺 的 研 究 提取按确定的生产工艺,浓缩采用单因素工艺研究,故选择在 60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C、100 $^{\circ}$ C(控制适宜的真空度)工艺条件下各浓缩 3 批次至相对密度为 1.04~1.06(60~70 $^{\circ}$ C),加防腐剂羟苯甲酯+羟苯丙酯(9:1)适量,加纯化水配制成合欢磁牡口服液,每批平行测定 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量^[6],求得平均值和 RSD,考察浓缩温度对合欢磁牡口服液 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量的影响。

1.4.4 提 取 工 艺 验 证 试 验^[7-8] 按最佳工艺连续生产 10 批,以 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量为考察项目。制定合欢磁牡口服液 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量指标。

1.5 统 计 分 析 使用 Excel 数据库记录数据,并使用 SPSS19.0 分析软件(IBM Corporation, Armonk, NY, USA)进行统计分析。显著性水平为 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 。

2 结 果 与 分 析

2.1 提 取 工 艺 正 交 试 验 由表 2 极差 R 的数据分析可知:各因素的影响程度依次为 $C > A > B$,即煎煮次数 $>$ 加水倍数 $>$ 煎煮时间。由表 3 方差分析结果表明:影响因素煎煮次数 C 对产品中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量有显著影响($P < 0.01$),煎煮次数为 C3 时 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量最高;煎煮时间 B 和加水量 A 对产品中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量无显著影响($P > 0.05$)。

2.2 浓缩工艺研究 表 4 结果显示,不同的浓缩温度对合欢磁牡口服液中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量的无显著影响 ($P>0.05$)。

表 2 合欢磁牡口服液提取工艺正交试验及结果

Tab 2 Orthogonal experimental and results of extraction process of Hehuacimu oral liquid

试验号	因素				结果
	A	B	C	D	$C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	1	1	1	1	209.1
2	1	2	2	2	373.3
3	1	3	3	3	457.1
4	2	1	2	3	375.1
5	2	2	3	1	433.5
6	2	3	1	2	226.6
7	3	1	3	2	480.7
8	3	2	1	3	270.5
9	3	3	2	1	405.3
K1	346.50	354.97	235.40	249.30	
K2	345.07	359.10	384.57	360.20	
K3	385.50	363.00	457.10	367.57	
Rj	40.43	8.03	221.70	18.27	

表 3 正交试验方差分析

Tab 3 Variance analysis of orthogonal experiment

因素	偏差平方和	自由度	MS	F	F 临界值	显著性
加水倍数	3157.91	2	1578.95	6.23	F0.05(2,2)= 19.00	$P>0.05$
煎煮时间	96.83	2	48.41	0.19	F0.01(2,2)= 99.00	$P>0.05$
煎煮次数	76662.67	2	38331.33	151.28		$P<0.01$
误差	506.75	2	253.37			
总和	80424.16	8				

表 4 不同浓缩温度对合欢磁牡口服液含量的影响

Tab 4 Effects of different concentrated temperature on the content of Hehuacimu oral liquid

浓缩温度(± 2 °C)		60	70	80	90	100
含量	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	156.4	155.0	154.3	150.8	157.3
		156.5	153.4	153.6	147.1	157.2
		157.1	153.3	155.4	148.2	157.6
		156.6	153.4	152.8	152.2	157.3
		155.8	153.3	153.5	151.6	158.2
		155.5	153.7	153.7	149.6	157.0
		平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	156.3	153.7	153.9	150.0
	RSD/%	0.37	0.44	0.57	1.33	0.27

1、各温度工艺条件下控制适宜的真空度;2、含量:指以 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 计

2.3 水提取工艺验证 根据以上提取和浓缩工艺的试验研究结果,最终采用加 8 倍量的水,煎煮时间 1 h,煎煮 3 次,真空浓缩的工艺进行水提取工艺验证试验。结果见表 5。结果显示,采用该工艺提取的 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 的转移率平均值为 72.37%,*RSD* 为 0.83%,对 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量无显著影响($P>0.05$)。

表 5 水提取工艺验证试验结果

Tab 5 Verification experimental results of water extraction process

批次	$C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	转移率/%
01	318.6	71.95
02	316.3	71.45
03	318.8	71.65
04	324.2	72.85
05	324.2	72.85
06	321.1	72.15
07	319.8	72.04
08	323.4	72.68
09	325.4	72.75
10	327.7	73.27
<i>RSD</i> %	1.11	0.83

合欢皮中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量为 0.089%

3 讨论与结论

《神农本草经》描述合欢皮作用:“主安五脏,和心志,令人欢乐无忧。”中医药理论将合欢皮归为安神药物,现代药物书籍将合欢皮归类安神药。合欢皮为合欢磁牡口服液方中君药,其主要成分为三萜皂苷、生物碱、黄酮类、木脂素和多糖等多类化学成分^[9]。现代药理学研究结果表明,水溶性的木脂素类成分为合欢皮解忧安神作用的主要活性成分^[10]。夏洁等人^[11]研究结果显示,通过活性筛选实验,发现合欢皮的安神作用与合欢皮中具有镇静功能的活性成份木脂素类化合物有关,其中木脂素苷的含量最高。《中国兽药典》2015 年版中合欢皮

项下的含量测定以 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 为质量考察指标。故本次试验选择 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量测定作为产品质量考察指标。

木脂素是由苯丙素氧化聚合而成的一类化合物。多数呈游离状态,游离的木脂素亲脂性强,水溶性差。从分子结构上分析 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 中连接了吡喃葡萄糖苷结构,由于葡萄糖是多羟基醛单糖,木脂素苷类水溶性大大增强, $C_{33}H_{44}O_{17}$ 易溶于水,水是易得且价格低廉的溶剂,故选择水作溶剂。本水提取工艺试验结果表明,影响因素煎煮次数对合欢磁牡口服液的提取工艺影响显著,选择煎煮 3 次时, $C_{33}H_{44}O_{17}$ 的含量显著升高,因此最佳参数为煎煮 3 次;加水量和煎煮时间对提取工艺的影响不显著,但从经济角度考虑,选择加 8 倍量的水,煎煮 1 h。不同的浓缩温度对合欢磁牡口服液含量的影响无显著差异。然而,考虑到真空浓缩过程中药物处于密闭设备中,无外界污染风险,故将浓缩工艺确定为真空浓缩。采用本试验总结出的此最佳工艺 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 的转移率平均值为 72.37%,*RSD* 为 0.83%,对 10 个批次的 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量影响的差异不显著,提示此工艺的重现性较好,工艺稳定。

合欢磁牡口服液标准草案中含量测定规定:合欢磁牡口服液每毫升含合欢皮以 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 计,不得低于 140 μg 。此含量是依照《中国兽药典》2015 年版合欢皮质量标准和道地药材合欢皮企业内控技术要求,且结合本工艺活性成分 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 转移率制定。这也提示合欢磁牡口服液中标准 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量定量基本合理。本试验水提取工艺验证结果显示,10 个批次的产品中每毫升含合欢皮以 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 计的含量都远远高于 140 μg ,证明本工艺质量可控,为制定标准定量指标提供可靠依据,建议在取得新兽药证书及生产批件后,收集道地药材合欢皮 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量数据,制定更高的合欢皮企业内控标准,为提升产品质量内控标准提供依据。

合欢磁牡口服液中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量的检测结果

在前后试验中出现一定偏差,主要是由于不同产地的合欢皮中 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 含量差距较大。通过数据分析得出,2017 年试验结果显示 $C_{33}H_{44}O_{17}$ 转移率为 71.96%,与之前的转移率 72.37% 比较,偏差较小。这也表明了此提取合欢磁牡口服液的工艺重现性好,工艺稳定的优点。

磁石为镇静安神类矿物性中药,始载于《神农本草经》,历代中医文献记载,磁石“主周痹风湿、肢节肿痛、通关节、消痛肿、明目聪耳、止金疮血、治金疮肿毒、敛汗止血。”。其系主含四氧化三铁,具有聪耳明目,潜阳纳气和镇静安神的作用,用于治疗头晕目眩、肾虚气喘等证。牡蛎也首载于《神农本草经》,书中将其列为上品。其中记有“牡蛎,味咸平,主伤寒寒热,温疟洒洒,惊恚怒气,除拘缓鼠痿,女子带下赤白,久服,强骨节,杀邪气,延年。”至汉代,张仲景所著《伤寒论》和《金匮要略》就已经广泛的使用牡蛎组成方剂来治疗疾病。两书中涉及到配伍牡蛎的方剂就达 11 个之多,主要口服汤剂给药。《中国兽药典》和《中国兽药典兽药使用指南》中药卷均有收载^[12-13]。以上著作都不同程度上体现了牡蛎在中医临床上的重要的地位。近代研究还表明,牡蛎可以调节人体免疫水平,可降血脂和血压。我们曾对磁石和牡蛎成分的提取进行研究,结果不理想,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 肖欢. 中兽药在生产 and 应用中存在的问题和对策[J]. 北方牧业, 2015, (1): 27.
- Xiao H. Problems and countermeasures in the production and application of veterinary drugs [J]. Northern Animal Husbandry, 2015, (1): 27.
- [2] 潘蓉. 合欢药用简史研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2014.
- Pan R. A brief history of medicinal use of Acacia [D]. Heilongjiang University Of Chinese Medicine, 2014.
- [3] 吴培培. 张仲景应用牡蛎的规律研究[D]. 北京中医药大学, 2010.

- Wu P P. Zhang Zhongjing's study of the law of applying worm [D]. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2010.
- [4] 王伟, 陈阿丽. 正交试验法优选中药祛痘面霜中药材的提取工艺研究[J]. 海峡医药, 2017, 29(4): 21-24.
- Wang W, Wang C L. Study on the Extraction Technology of Chinese Herbal Medicine Extraction from Chinese Herbal Medicine Exfoliation Cream by Orthogonal Test [J]. Channel Medicine, 2017, 29(4): 21-24.
- [5] 陈坚平, 王思鸿. 正交试验法优选复方当归苦参片中药材的提取工艺研究[J]. 中南药学, 2008, 6(5): 543-546.
- Chen J P, Wang S H. Orthogonal test method to optimize the extraction process of Chinese herbal medicines from Compound Angelica ginseng tablets [J]. South China Pharmacy, 2008, 6(5): 543-546.
- [6] 马碧峰, 李林, 许加娟, 等. 高效液相色谱法测定合欢磁牡口服液含量[J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(5): 68-70.
- Ma B F, Li L, Xu J J, et al. High performance liquid chromatography determination of Hehuan Magnet Oral Liquid [J]. Journal of Veterinary Medicine, 2018, 37(5): 68-70.
- [7] 钟开位, 张潮林. 正交试验法优选复方参术健脾口服液中药材的提取工艺研究[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(15): 2273-2275.
- Zhong K Q, Zhang C L. Orthogonal test method to optimize the extraction process of Chinese herbal medicine from compound Shenshuijian spleen oral liquid [J]. Modern Medicine and Health, 2010, 26(15): 2273-2275.
- [8] 李卿, 周兴, 欧燕, 等. 正交试验优选麻苧平喘颗粒中药材的提取工艺[J]. 中药工艺与制剂, 2014, 25(15): 1377-1379.
- Li Q, Zhou X, Ou Y, et al. Orthogonal test to optimize the extraction process of Chinese herbal medicines of Maxiongingchuan granules [J]. Chinese Medicine Process and Preparation, 2014, 25(15): 1377-1379.
- [9] 钱凯, 干国平, 方志兴, 等. 合欢皮水溶性木脂素类化合物的纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(04): 790-792.
- Qian K, Gan G P, Fang Z X, et al. Purification of water-soluble lignin compounds in Hehuan skin [J]. Shi Zhenguo Medicine, 2015, 26(04): 790-792.
- [10] Kinjo J, Higuchi H, Fukui K, et al. Studies on leguminous plants. Part XXVI. Lignoids from Albizziae Cortex. II. A Biodegradation Pathway of Syringaresinol [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1991, 39(11): 2952-2955.

- [11] 夏洁,舒畅,王庆,等. 合欢皮多糖提取工艺的优化及抗氧化研究[J].武汉轻工大学学报,2018,37(5):89-94.
Xia J, Shu C, Wang Q, *et al.* Optimization and Antioxidant Study on Extraction Technology of Acacia Leather Polysaccharide [J]. Journal of the Wuhan Polytechnic University, 2018, 37 (5): 89-94.
- [12] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一五年版 [S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia Edition 2005[S].
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典兽药使用指南中药卷二〇一五年版(二部)[S].
Chinese Veterinary Medicines Committee. Guidelines for the Use of Veterinary Medicines in the People's Republic of China Veterinary Medicines Volume 2015(Part 2) [S].

(编辑:陈希)