

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.20.015

复方金线莲口服液水提工艺优化及薄层色谱鉴别*

李 景,黄德福[△]

(福建医科大学孟超肝胆医院药学部,福建 福州 350025)

摘要:目的 优选复方金线莲口服液提取工艺,并进行薄层色谱(TLC)鉴别。方法 以加水量、煎煮时间、提取次数为考察因素,总多糖含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选复方金线莲口服液水提工艺,并验证;采用TLC法对制剂中金线莲和灵芝进行定性鉴别。结果 优选的水提工艺为加20倍量水,煎煮1.5 h,提取2次;验证试验中,总多糖平均含量为6.57 mg/mL, RSD为1.18% ($n=3$)。TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。结论 优选的提取工艺稳定、操作简单,薄层鉴别方法可行、准确有效,可用于复方金线莲口服液的质量控制。

关键词:复方金线莲口服液;正交试验;水提工艺;薄层色谱法

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)20-0057-04

Optimization of Water Extraction Process and TLC Identification of Compound Jinxianlian Oral Liquid

LI Jing, HUANG Defu

(Department of Pharmacy, Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, China 350025)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Compound Jinxianlian Oral Liquid, and to identify it by the thin-layer chromatography (TLC) method. **Methods** With the addition amount of water, decocting time, times of extraction as the factors, and with the total polysaccharide content as the evaluation index, the $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted to optimize and verify the water extraction process of Compound Jinxianlian Oral Liquid. TLC method was used to qualitatively identify *Anoectochium roxburghii* and *Ganoderma lucidum* in the preparation. **Results** The optimal water extraction process was as follows: adding 20 times of water, decocting for 1.5 h, and extracting twice. In the validation test, the average content of total polysaccharide was 6.57 mg/mL with an RSD of 1.18% ($n=3$). TLC spots were clear with good separation, and the negative control had no interference. **Conclusion** The optimal extraction process is stable and simple, the TLC identification method is feasible, accurate and effective, which can be used for the quality control of Compound Jinxianlian Oral Liquid.

Key words: Compound Jinxianlian Oral Liquid; orthogonal test; water extraction process; TLC

复方金线莲口服液具有清热解毒、益气凉血功效,临床对急慢性肝炎、乙型肝炎病毒携带者热毒气虚证有良好疗效。其由金线莲与灵芝组方,两者均含有大量多糖。早期复方金线莲口服液为灵芝水提浓缩液与金线莲鲜草榨汁液经过滤混合、配制、灌装等步骤制成。但在实际生产过程中,金线莲鲜草清洗晾干后榨汁,晾干程度不同,导致榨汁量相差较大,最终造成药品批间稳定性差,且残留大量多糖。水能将多糖提取完全,根据复方中两味药材活性成分和中医药临床用药习惯,将金线莲鲜草与灵芝一起水煎煮,提取浓缩,简化工艺。本研究在单因素考察结果的基础上,以总多糖含量为评价指标,采用正交试验法优选复方金线莲口服液的提取工艺,为后期申报工艺变更及生产提供试验依据,同时对制剂中的金线莲和灵芝进行薄层色谱(TLC)鉴别,进一步优化质量控制方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

L5S型紫外-可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);ZF-20D型暗箱式紫外线分析仪(上海耀壮检测仪器设备有限公司);HH-4型数显恒温水浴锅(拓赫机电科技上海有限公司);XS205型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);硅胶G薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试剂

金线莲对照药材(北京中科质检生物有限公司,批号为200815);D-无水葡萄糖对照品(批号为110833-201908,含量99.8%)、灵芝对照药材(批号为120968-201809),均购自中国食品药品检定研究院;复方金线莲口服液(医院自制,批号为20210602,规格为每瓶10 mL);其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

*基金项目:福建省中医重点专科建设项目[闽卫中医函[2019]262号]。

第一作者:李景,女,大学本科,药师,研究方向为中药制剂与分析学,(电子信箱) chouchoujing1990@163.com。

[△]通信作者:黄德福,男,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱) hdf8833@126.com。

2 方法与结果

2.1 总多糖含量测定

2.1.1 溶液制备

取D-无水葡萄糖对照品适量,精密称定,加水超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)溶解,制成质量浓度为107 μg/mL的对照品溶液。精密移取样品提取原液3 mL,置50 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,即得供试品溶液。以水作空白对照溶液。

2.1.2 试验条件

取对照品溶液1.5 mL,置具塞试管中,分别加入0.2%新鲜配制的蒽酮硫酸溶液6 mL,摇匀,于沸水浴中加热20 min,取出,立即在冰水浴中放冷15 min。取适量,于400~700 nm波长范围内进行扫描,测得其在620 nm波长处有最大吸收,故选择620 nm作为检测波长^[1-4]。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密移取对照品溶液0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 mL于试管中,加水稀释至2 mL,按2.1.2项下试验条件进样测定。记录吸光度(OD)值。以OD值(A)为纵坐标、D-无水葡萄糖对照品质量浓度(C, mg/mL)为横坐标进行线性回归。得回归方程 $A = 8.7562C + 0.0484$ ($r = 0.9993$)。结果表明,葡萄糖质量浓度在32.1~85.6 μg/mL范围内与OD值线性关系良好。

检测限和定量限考察:以响应值偏差/标准曲线斜率(δ/S , $\delta = 0.0023$, $S = 8.7562$)的3.3倍和10倍时的质量浓度分别为检测限和定量限。结果检测限为0.87 μg/mL,定量限为2.63 μg/mL。

精密度试验:精密移取对照品溶液0.8 mL,按2.1.2项下试验条件连续进样测定6次($n = 6$),同时,连续测定3 d,记录OD值。结果日内精密度的RSD为0.12% ($n = 6$),日间精密度的RSD为1.26% ($n = 3$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一份供试品溶液,分别在室温下放置0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min时,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值。结果的RSD为1.56% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置120 min内基本稳定。

重复性试验:取同一份样品提取原液3 mL,共6份,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值,并计算总多糖含量。结果总多糖平均含量为6.28 mg/mL, RSD为1.63% ($n = 6$)。表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量样品提取原液0.01 mL,共6份,分别加入对照品溶液适量,按2.1.1项下

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
70.29	70	140	99.58	98.58	2.05
70.09	70	138	97.01		
70.09	70	139	98.44		
69.82	70	141	101.69		
69.82	70	139	98.83		
69.87	70	137	95.90		

方法制备供试品溶液,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值并计算加样回收率。结果见表1。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 单因素试验

加水量:按制剂处方配比称取,共5份,分别加入5, 10, 15, 20, 25倍量水,煎煮1.5 h,提取2次,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值,并计算总多糖含量。结果分别为2.94, 3.92, 4.38, 6.45, 5.27 mg/mL,可见,加水量在5~20倍时,总多糖含量逐渐升高,当超20倍量后总多糖含量趋于平缓,故选择加水量15, 20, 25倍量作为三水平。

煎煮时间:按制剂处方配比称取,共5份,分别加20倍量水,煎煮0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h,提取2次,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值,并计算总多糖含量。结果分别为1.97, 4.84, 6.56, 5.75, 5.68 mg/mL。可见,煎煮时间在0.5~1.5 h时,总多糖含量逐渐升高,当超1.5 h后总多糖含量趋于平缓,故选择煎煮时间1, 1.5, 2 h作为三水平。

提取次数:按制剂处方配比称取,共5份,分别加20倍量水,煎煮1.5 h,提取1, 2, 3, 4, 5次,按2.1.2项下试验条件进样测定,记录OD值,并计算总多糖含量。结果分别为5.28, 6.59, 6.58, 6.29, 6.23 mg/mL,可见,提取次数在1~2次时,总多糖含量逐渐升高,超2次后趋于平缓,故选择提取次数1, 2, 3次作为三水平。

2.2.2 正交试验方法与结果

根据单因素考察结果,以加水量(因素A)、煎煮时间(因素B)和提取次数(因素C)为考察因素,总多糖含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选复方金钱莲口服液水提工艺^[5-6]。因素与水平见表2,正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

由表3可知,各因素对总多糖提取效果的影响为 $A > B > C$,即加水量 > 煎煮时间 > 提取次数,结合各因素K值大小,初步选取的提取条件为 $A_2B_2C_3$ 。由表4可知,因素A、因素B对提取效果有显著影响($P < 0.05$),从实际生产角度,考虑能耗成本和生产周期,最终选择提取工艺为 $A_2B_2C_2$,即加20倍量水,每次煎煮1.5 h,提取2次。

表 2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	因素 A(倍)	因素 B(h)	因素 C(次)
1	15	1	1
2	20	1.5	2
3	25	2	3

表 3 正交试验设计及结果

Tab. 3 Design and results of the orthogonal test

编号	因素				总多糖含量 (mg/mL)
	A	B	C	D(空白)	
1	1	1	1	1	2.08
2	1	2	2	2	4.30
3	1	3	3	3	3.91
4	2	1	2	3	4.98
5	2	2	3	1	6.52
6	2	3	1	2	5.54
7	3	1	3	2	4.65
8	3	2	1	3	5.15
9	3	3	2	1	4.93
K_1	10.29	11.71	12.77	13.53	
K_2	17.04	15.97	14.21	14.49	
K_3	14.73	14.38	15.08	14.04	
R	6.75	4.26	2.31	0.96	

表 4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	7.846	2	3.923	51.013	< 0.05
B	3.089	2	1.545	20.087	< 0.05
C	0.907	2	0.454	5.9	> 0.05
误差	0.154	2	0.077		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.2.3 验证试验

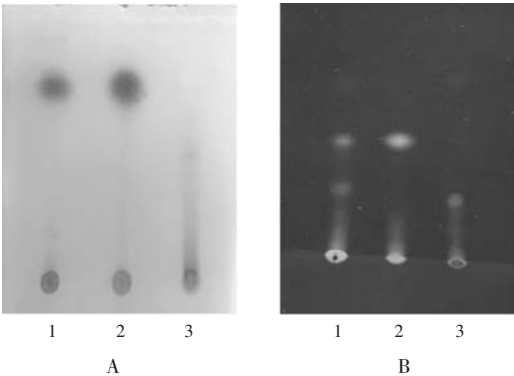
按处方量称取药材,共 3 份,按最佳水提工艺提取。结果总多糖含量分别为 6.48、6.59、6.63 mg/mL,平均 6.57 mg/mL, RSD 为 1.18%。表明优选出的工艺科学、稳定可靠,可用于复方金线莲口服液的提取制备。

2.3 TLC 鉴别

2.3.1 金线莲

取制剂(批号 20210602)100 mL,加入三氯甲烷振荡提取 2 次,每次 25 mL,合并上层水溶液,浓缩蒸干,加甲醇 2 mL 超声溶解,得供试品溶液。取金线莲对照药材 2 g,加水 500 mL 煎煮 30 min,滤过,滤液浓缩至 100 mL,并按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按复方金线莲口服液处方及制备工艺制备缺金线莲的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成缺金线莲阴性对照

品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502^[7],精密吸取上述溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-乙酸(85:13:2, $V/V/V$)为展开剂,展开,晾干,喷以新配制的 2% 3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液,再喷以 5% 氢氧化钾乙醇溶液。置日光灯下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上,显相同颜色斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1 A。



1. 供试品溶液 2. 对照药材溶液 3. 阴性对照品溶液

A. 金线莲 B. 灵芝

图 1 薄层色谱图

1. Test solution 2. Reference medicinal material solution 3. Negative reference solution

A. *Nelumbo roxburghii* B. *Ganoderma lucidum*

Fig. 1 TLC chromatograms

2.3.2 灵芝

取制剂(批号 20210602)100 mL,加入乙酸乙酯 50 mL,加热回流 60 min,放冷,转移至分液漏斗中,静置分层,取上层乙酸乙酯,浓缩蒸干,加甲醇 2 mL 超声溶解,得供试品溶液。取灵芝对照药材 3 g,加水 500 mL 煎煮 30 min,滤过,滤液浓缩至 100 mL,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按复方金线莲口服液处方及制备工艺制备缺灵芝的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成缺灵芝的阴性对照品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》通则 0502 TLC 法^[7],精密吸取上述溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, $V/V/V$)的上层溶液为展开剂,展开,晾干,在置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色荧光斑点,且阴性对照无干扰。详见图 1 B。

3 讨论

3.1 评价指标选择

复方金线莲口服液由金线莲与灵芝两味中药组方,金线莲为闽台珍稀药用植物,具有清热凉血及解毒功效,为方中君药,其主要药理活性成分为多糖及糖苷

类^[8-11]。臣药灵芝有补气安神、止咳平喘功效,主要有效成分为多糖、三萜及甾醇类^[12-14],其中多糖含量为2020年版《中国药典(一部)》中灵芝的质量评价指标之一。金线莲、灵芝多糖均对肝损伤有较好的预防和保护作用^[15-22],这与本制剂适应证吻合,故选择总多糖含量作为该制剂提取工艺优化的评价指标。

3.2 总多糖含量测定方法选择

总多糖含量测定常用的方法有硫酸-苯酚法与蒽酮-硫酸法等^[23-25],预试验中同时采用2种方法对制剂总多糖含量进行测定,结果发现采用硫酸-苯酚法测定时结果数值波动较大,稳定性差。故最终采用2020年版《中国药典(一部)》中灵芝含量测定项下蒽酮-硫酸法。

3.3 沸水浴时间选择

采用蒽酮-硫酸法测定制剂中总多糖含量时,考察不同沸水浴时间(10, 15, 20, 25, 30 min)对最大吸收波长的影响。结果沸水浴时间为20 min时,样品与对照品的最大吸收峰均可出现在620 nm检测波长处。故选择沸水浴加热显色20 min。

3.4 试验方法选择

单因素试验的试验次数多,成本高,周期长,且所筛选出的最优提取工艺条件仅是各单因素最优条件的集合,并未考虑各因素之间交互作用及影响程度。正交试验是研究多因素多水平试验的重要方法,能分析出因素间的相互关系,各因素的影响顺序及程度,能减少试验次数,并最大程度减少试验误差,达到高效、快速、经济的目的。本试验中先通过单因素试验,确定了加水量、煎煮时间、提取次数3因素及水平。基于单因素考察结果,进行正交试验,进一步确认各因素对总多糖提取工艺的影响顺序为加水量>煎煮时间>提取次数,并分析得出加水量、煎煮时间对其有显著影响。确定的最佳提取工艺为加20倍量水,每次煎煮1.5 h,提取2次,经验证,该方法稳定可行。

参考文献

- [1] 林蔚,王晶晶,何官榕,等. 金线莲不同栽培模式及不同组织的多糖含量[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020,49(1):40-44.
- [2] 张赛男. 不同地区金线莲多糖含量对比研究[J]. 北京农业, 2014(33):125-126.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:195-196.
- [4] 姜玮,周桂生,陈骁鹏,等. 紫外-可见分光光度法测定灵芝片中多糖、三萜及甾醇含量[J]. 中国药业,2018,27(14):9-12.
- [5] 王强,张湛,杨彬,等. 基于AHP-CRITIC混合加权法

的正交试验优选神气汤提取工艺[J]. 中国药业,2021,30(19):51-55.

- [6] 张帆,毛卓炯,刘亚平,等. 正交试验优选地稔多糖提取工艺[J]. 中国药业,2021,30(4):49-53.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:482.
- [8] 刘英孟,张海燕,汪镇朝,等. 金线莲的研究进展[J]. 中成药, 2022,44(1):186-192.
- [9] 张政. 金线莲水溶性多糖的结构及其免疫活性研究[D]. 南昌:南昌大学,2021.
- [10] 陈育青,林艺华,邹毅辉,等. 金线莲生药鉴定、活性成分影响因素及药理作用研究进展[J]. 中成药,2020,42(8):2141-2144.
- [11] 李秋静,郑晓艳,刘桂君,等. 福建药用植物金线莲研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2018,20(8):1364-1372.
- [12] 王婷婷,陈特欣,肖建勇,等. 灵芝多糖化学结构及药理活性研究进展[J]. 中国食用菌,2022,41(1):7-16.
- [13] 张瑞婷,周涛,宋潇潇,等. 灵芝活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 安徽农业科学,2018,46(3):18-19.
- [14] 王颖,魏佳韵,吴思佳,等. 灵芝多糖结构特征及药理作用的研究进展[J]. 中成药,2019,41(3):627-635.
- [15] 俞晓玲,姜文倩,游晨,等. 金线莲多糖的药理作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究,2021,44(5):1117-1121.
- [16] 杨晓灵. 金线莲多糖对酒精诱导小鼠肝损伤的保护作用及其颗粒冲剂的研制[D]. 福州:福建医科大学,2017.
- [17] 马娟. 金线莲(*Anoetochilus roxburghii*)提取物保肝护肝作用及其物质基础研究[D]. 武汉:华中科技大学,2014.
- [18] 蔡德雷,张世鑫,夏勇,等. 灵芝多糖对小鼠肝纤维化过程肝功能、纤维蛋白原I型和抗氧化的作用[J]. 预防医学, 2020,32(8):858-862.
- [19] 孙艳辉,张宏波. 灵芝多糖对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏脂肪沉积及NLRP3炎性小体表达的影响[J]. 世界中医药, 2020,15(6):842-845.
- [20] 许梦丽,徐琼,崔翠,等. 灵芝多糖对妊娠期糖尿病大鼠肝脏损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(20):3242-3245.
- [21] 邱赛红,黄湘珺,黄宇明,等. 灵芝及其提取物减轻肝损伤作用的研究概况[J]. 湖南中医药大学学报,2017,37(4):461-464.
- [22] 陈玉胜,陈全战. 灵芝多糖对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠的抗炎和保肝活性[J]. 食品科学,2017,38(17):210-215.
- [23] 万晓莹,刘振丽,宋志前,等. 中药多糖含量测定方法研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2021,27(7):1175-1178.
- [24] 李德旺,邓芳,汪胜. 蒽酮-硫酸显色法测定栽培白及的白及多糖含量[J]. 中国药业,2018,27(7):5-7.
- [25] 马建丽,李翔,段斯庭,等. 正交试验优化洋葱多糖提取工艺研究[J]. 中国药业,2018,27(22):5-7.

(收稿日期:2022-01-04;修回日期:2022-04-16)