

山苦蕒标准提取物的制备与质量控制方法

杨海明, 李秀敏, 孙宏冉, 陈志强* (内蒙古华天制药有限公司, 内蒙古赤峰 024070)

摘要 [目的]制定山苦蕒标准提取物的制备工艺并建立其质量控制方法。[方法]采用正交试验设计建立山苦蕒标准提取物的制备工艺;采用紫外分光光度法、TCL、微生物法建立山苦蕒提取物的质量控制指标。[结果]制备工艺为原料药材的处方量用20倍量水连续提取3次,100℃,每次1h,减压浓缩温度与干燥温度均为65℃;山苦蕒提取物在30~70 μg/mL的浓度与吸光度线性良好,回收率为98.4%,RSD为0.64%。标准提取物溶液在198与294 nm紫外波长最大吸光度比值为4.1,干燥失重为0.4%,灰分为0.8%,酸碱度为5.2,细菌菌落总数为12个/g,霉菌总数无,大肠杆菌无,沙门氏菌无。[结论]优选溶剂水及相应的温度提取和控制是山苦蕒标准提取物制备的安全有效方法。建立的检测项可以用于山苦蕒标准提取物的指标控制。

关键词 山苦蕒标准提取物;制备工艺;质量控制方法

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)21-104-03

Preparation and Quality Control of Standard Extracts from *Ixeris denticulata*

YANG Hai-ming, LI Xiu-min, SUN Hong-ran, CHEN Zhi-qiang* (Inner Mongolia Huatian Pharmaceutical Co. Ltd., Chifeng, Inner Mongolia 024070)

Abstract [Objective] The aim was to develop standard extractive preparation technology of *Ixeris denticulata* and establish its quality control method. [Method] The preparation technology of *I. denticulata* standard extractive was established by orthogonal experiment; quality control index of *I. denticulata* extractive was established by ultraviolet spectrophotometric method, TCL, microbial method. [Result] The preparation technology was using 20 times water of raw material medicine to extract 3 times under 100℃, 1 hour each time, the reduced pressure concentration and drying temperature is 65℃; 30-70 μg/mL *I. denticulata* extractive had good linearity with absorbance, recovery rate was 98.4%, RSD 0.64%. The maximum absorbance ratio of standard extract solution at 198 and 294 nm UV wavelength was 4.1, dry weight loss was 0.4%, ash content was 0.8%, pH value was 5.2, the total number of bacterial colonies was 12 ind/g, mould, *Escherichia coli* and *Salmonella* were not got involved. [Conclusion] The optimal solvent water and corresponding temperature are key points of safe and effective method for *I. denticulata* standard extractive. The established test items can be used to control the index of *I. denticulata* standard extractive.

Key words Standard extractive of *Ixeris denticulata*; Preparation technique; Quality control method

山苦蕒 [*Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai] 为菊科苦蕒菜属植物,盛产于我国东北、华北等地,具清热解毒、排毒、凉血、止痛之功效,用于治疗肠黄、痢疾、肺出血、腹痛、疮疗肿痛^[1]。山苦蕒的化学成分比较复杂,主要含有倍半萜内酯、黄酮、三萜、木脂素等各类型化合物^[2]。近年来,张垠^[3]从乙醚中分离出4种化合物,从乙酸乙酯中分离出3种化合物且是首次从该植物中得到。兽药国家标准中只是采用薄层色谱进行山苦蕒的定性鉴定,无含量测定方法,部分文献研究了山苦蕒的药用成分及药用价值^[4-5]。药材来源相对复杂,质量不稳定,为保证中成药生产原料用药的质量均一性,迫切需要可以体现原药材特定中医功效、具有相对明确药效物质基础及严格质量标准的提取物作为中间体,替代原生药使用^[6],使其提取物可能成为未来代替抗生素类^[7]药物。该研究以山苦蕒素为控制指标,首次采用紫外分光光度法波峰相加法、波峰相比法测定了山苦蕒提取物的含量和鉴别等方法,制定了山苦蕒标准提取物的制备工艺与质量控制指标。

1 材料与方 法

1.1 仪器 UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);RE52-99 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);PHS-3CpH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);HH-6 数字恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);DH4000 型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);BT25S 电子分析

天平(sartorius);ZY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪(北京先驱威锋技术开发公司)。

1.2 试材 山苦蕒(内蒙古恒光大现代农业有限公司);山苦蕒对照药材(中国兽药监察所);山苦蕒素对照品(中国生物制品检定研究院)。95%乙醇、三氯化铝、五氧化二磷、氯化钠、蛋白胨,均是分析纯,购自天津市科密欧化学试剂有限公司;大肠埃希菌[CVCC1570]、金黄色葡萄球菌[CVCC1882]、枯草芽孢杆菌[CVCC717]、白色念珠菌[CMCC98001]、黑曲霉[CMCC98003],来源于中国兽药监察所。

1.3 方 法

1.3.1 制备工艺。称取净制干燥山苦蕒中药材1000g,加一定倍量纯化水一定温度下进行煎煮,煎煮3次,每次1h,合并滤液,减压浓缩至浸膏,减压干燥至恒重。根据山苦蕒提取物的干膏得率为试验指标,选取加水倍数(A)、提取温度(B)、减压浓缩温度(C)、减压干燥温度(D)为4个因素,每个因素选择3个水平,按照 $L_9(3^4)$ 正交表(表1)设计试验,考察各因素对干膏得率的影响,选出山苦蕒最优制备工艺。

1.3.2 溶液制备。

1.3.2.1 对照品溶液。分别精密称取芹菜素、山苦蕒素对照品,加水配制成含有50 μg/mL的溶液作为对照品溶液。

1.3.2.2 供试品溶液。精密称取山苦蕒提取物,加水制成含有100 μg/mL的溶液作为供试品储备液。

1.3.3 方法学考察。

1.3.3.1 稳定性试验。精密量取供试品储备液制成含有

作者简介 杨海明(1988-),男,内蒙古赤峰人,助理工程师,从事中药研发工作。*通讯作者,工程师,从事新药研发工作。

收稿日期 2016-06-22

50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 在 198 和 294 nm 处测定吸光度。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平 Level	A(加水倍数) Adding water multiples	B(提取温度) Extracting temperature $^{\circ}\text{C}$	C(减压浓缩 温度) Reduced pressure concentration temperature $^{\circ}\text{C}$	D(减压干燥 温度) Reduced pressure drying temperature $^{\circ}\text{C}$
1	10	80	75	75
2	15	90	70	70
3	20	100	65	65

1.3.3.2 精密度试验。精密量取供试品储备液制成含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,连续 6 次在 198 和 294 nm 处测定吸光度。

1.3.3.3 重复性试验。精密称取供试品制成含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在 198 和 294 nm 处测定吸光度。

1.3.3.4 线性试验。精密称取山苦荬素对照品制成分别含有 30、40、50、60、70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在 198 和 294 nm 处测定吸光度。

1.3.3.5 回收率。按测定浓度的 80%、100%、120% 的份量,各精密称取山苦荬素对照品平行 3 份,分别加入按处方比例混合均匀的空白辅料,分别加水制成浓度分别为 40、50、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液,摇匀,过滤,作为供试品溶液;另取山苦荬素对照品适量,加水超声溶解并稀释制成含 0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液作为对照品溶液,在 198 和 294 nm 处测定吸光度。

1.3.4 质量控制。

1.3.4.1 紫外分光光度法鉴别。取山苦荬标准提取物、山苦荬对照品加水稀释成含山苦荬素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,按照紫外-可见分光光度法(中国兽药典 2010 版)在 190 ~ 450 nm 范围内测定。

1.3.4.2 TLC 鉴别。取山苦荬标准提取物 0.4 g,加乙醇 10 mL,加热回流 10 min,滤过。取滤液 1 滴,点于聚乙烯胺薄膜上,喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液,晾干,置紫外光灯(254 nm)下观察。

1.3.5 质量控制指标测定。

1.3.5.1 干燥失重。取本品适量,以五氧化二磷为干燥剂在 65 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥至恒重,减失的重量不得大于 5.0%^[8]。

1.3.5.2 灰分。按照中国兽药典 2010 版灰分测定法^[8]测定总灰分,其量不得超过 2.0%。

1.3.5.3 酸碱度。取本品加水配成 0.05 g/mL 的溶液,按照中国药典 2010 版一部 pH 测定法^[8]测定,应为 4.5 ~ 7.5。

1.3.5.4 微生物检查。细菌总数按照中国兽药典 2010 版微生物检查法^[8]测定,细菌菌落总数不得过 1 000 个/g,霉菌总数不得过 100 个/g;大肠杆菌应无;沙门氏菌应无。

2 结果与分析

2.1 山苦荬标准提取物的制备工艺 由表 2 可知,各因素对山苦荬标准提取物干膏得率的影响从大到小依次为 B、A、

D、C,即提取温度影响最大,其次是加水倍数、减压干燥温度、减压浓缩温度;最佳工艺条件为 A₃B₃C₃D₃。通过方差分析得出,提取温度和加水量有显著的差异,而加浓缩温度和干燥温度无显著的差异。

表 2 正交试验结果

Table 2 The orthogonal test results

试验号 Test No.	A	B	C	D	干膏得率 Dry extract yield//%
1	1	1	1	1	45.69
2	1	2	2	2	46.56
3	1	3	3	3	47.88
4	2	1	2	3	46.85
5	2	2	3	1	47.68
6	2	3	1	2	48.68
7	3	1	3	2	46.87
8	3	2	1	3	47.88
9	3	3	2	1	48.52
k_1	46.710	46.470	47.417	47.297	
k_2	47.737	47.373	47.310	47.370	
k_3	47.757	48.360	47.477	47.537	
R	1.047	1.890	0.167	0.240	

2.2 方法学考察

2.2.1 稳定性试验。按照“1.3.3.1”操作,计算得出 RSD 为 0.33%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.2 精密度试验。按照“1.3.3.2”操作,计算得出 RSD 为 0.02%,表明供试品进样精密度良好。

2.2.3 重复性试验。按照“1.3.3.3”操作,计算得出 RSD 为 0.38%,表明重复性好。

2.2.4 线性试验。按照“1.3.3.4”操作,计算得出山苦荬提取物浓度在 30 ~ 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性良好,相关系数 r 为 0.999 7(图 1)。

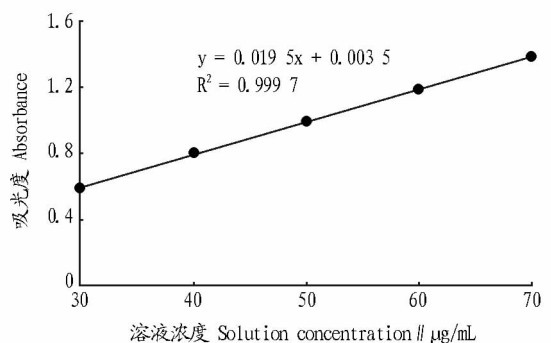


图 1 山苦荬提取物溶液线性关系

Fig. 1 The linear relationship of *I. denticulata* extracts solution

2.2.5 回收率。由表 3 可见,平均回收率为 98.4%,RSD = 0.64%,表明试验结果良好。通过该方法测定山苦荬提取物中山苦荬素的含量为 35.6%。

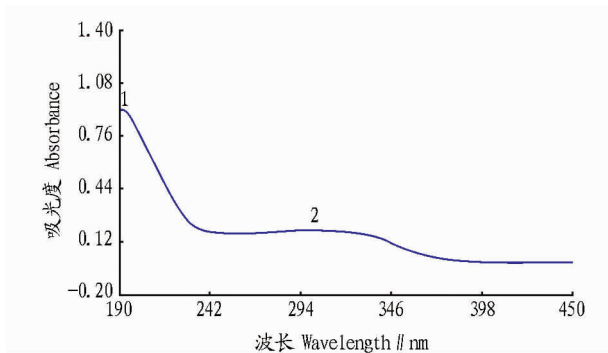
2.3 质量鉴别

2.3.1 紫外-可见分光光度法鉴别。由图 2 可见,供试品与对照品在 198 与 290 nm 的吸光度比值约为 4.1。由于对照品和对照药材均能够在 198 与 290 nm 处产生吸收,可以作为含量测定的方法。

表3 山苦苣提取物回收率试验结果

Table 3 The results of recovery rate test of *I. denticulata* extracts

测得量 Measured quantity %	加入量 Added amount A mg	实测量 Actual measured quantity // mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
80	12.6	12.3	97.6	98.4	0.64
	12.8	12.7	99.2		
	12.9	12.7	98.4		
100	15.7	15.5	98.7		
	15.5	15.3	98.7		
	15.9	15.5	97.5		
120	18.2	17.8	97.8		
	18.3	18.1	98.9		
	18.8	18.6	98.9		



注:1 为山苦苣素 A;2 为山苦苣素 B。

Note:1. *I. denticulata* A;2. *I. denticulata* B.

图2 山苦苣对照品溶液紫外波长鉴别

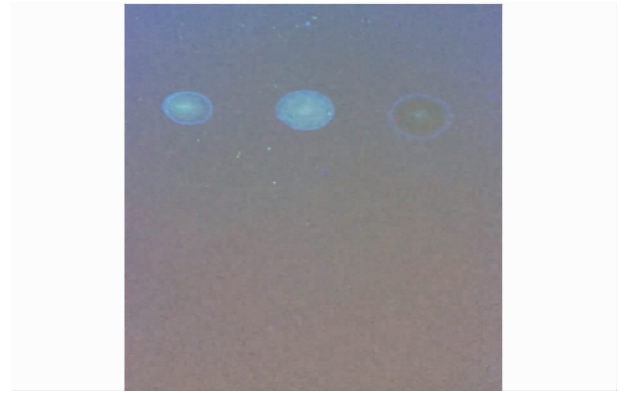
Fig.2 Ultraviolet wavelength identification of *I. denticulata* control solution

2.3.2 TLC 鉴别。通过薄层色谱鉴别(图3),山苦苣提取物斑点与对照药材斑点均显黄绿色荧光。

2.4 质量控制指标 经试验测定,干燥失重为0.4%,灰分为0.8%,酸碱度为5.2;细菌菌落总数为12个/g,霉菌总数为0,无大肠杆菌和沙门氏菌。

3 小结

该研究采用正交试验设计建立山苦苣标准提取物的制备工艺,采用紫外分光光度法、TCL、微生物法建立山苦苣提取物的质量控制指标。结果表明,制备工艺为原料药材的处方量用20倍量水连续提取3次,100℃,每次1h,减压浓缩



注:左边为对照药材斑点;中间为山苦苣提取物斑点;右边为空白溶剂斑点。

Note:On the left is the spot of the control medicine;in the middle is the spot of *I. denticulata* extracts;on the right is the spot of blank solvent.

图3 TLC 鉴别图谱

Fig.3 TLC identification map

温度与干燥温度均为65℃;山苦苣提取物浓度在30~70 μg/mL范围内与吸光度线性良好,回收率为98.4%,RSD为0.64%。标准提取物溶液在198与294 nm紫外波长最大吸光度比值为4.1,干燥失重为0.4%,灰分为0.8%,酸碱度为5.2,细菌菌落总数为12个/g,霉菌总数无,大肠杆菌无,沙门氏菌无。由此可见,优选溶剂水及相应的温度提取和控制是山苦苣标准提取物制备的安全有效方法。建立的检测项可以用于山苦苣标准提取物的指标控制。

参考文献

- [1] 中国药典委员会. 兽药国家标准:第1册[S]. 北京:化学工业出版社,2013:221.
- [2] 封锡志. 抱茎苦苣菜的化学成分和生物活性的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2001.
- [3] 张垠. 藏药山苦苣化学成分的研究[D]. 成都:西南交通大学,2011.
- [4] 王晓飞,王晓静. 中华苦苣菜研究进展[J]. 齐鲁药事,2006(4):238-239.
- [5] 毛小涛,李红,杨伟光,等. 苦苣菜研究进展[J]. 青海草业,2011(4):50-53.
- [6] 张红梅,王长虹,王峰涛. 黄连标准提取物的制备与质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011(8):56-59.
- [7] 李明月,杨葛巍,刘静,等. 大众对养殖业以中药代替抗生素认识度的调查分析[J]. 科教文汇,2016(2):186-188.
- [8] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典:2010年版一部[S]. 北京:中国农业出版社,2011.

(上接第81页)

- [29] 李升东,张卫峰,王法宏,等. 施氮量对小麦氮素利用的影响[J]. 麦类作物学报,2016(2):223-230.
- [30] 闫翠萍,裴雪霞,王姣爱,等. 秸秆还田与施氮对冬小麦生长发育及水肥利用率的影响[J]. 中国生态农业学报,2011(2):271-275.

- [31] 李玮,乔玉强,陈欢,等. 玉米秸秆还田配施氮肥对冬小麦土壤氮素表观盈亏及产量的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2015(3):561-570.
- [32] 吴大付,陈红卫,王小龙. 黄淮海平原水氮耦合对小麦产量和蛋白质含量的影响[J]. 安徽农业科学,2007(3):693-694.