

正交试验法优选瓜子金发酵口服液制备工艺研究

郭申娥,朱婷,刘明星

(湖北工业大学生物工程学院,武汉 430068)

摘要:采用正交试验法设计对瓜子金发酵口服液制备工艺进行优化,以产品的外观评分为评价指标,考察了不同的口服液制备工艺对口服液色泽及澄明度的影响,结果表明正交试验优选瓜子金发酵口服液制备工艺的最佳条件,即加水用量为总皂苷的8倍,加蔗糖为总皂苷的1倍,pH 7.0,静置时间为10 h。本研究试验结果可靠,以优化的工艺制备的口服液工艺澄清度好,且生产耗时短,有利于大生产。

关键词:瓜子金;发酵;口服液;正交试验;制备工艺

中图分类号:R944

文献标志码:A

论文编号:2010-3541

Study on Optimum Preparation Process in Oral Liquid of Fermented *Polygala japonica* Houtt. by Orthogonal Design

Guo Shen'e, Zhu Ting, Liu Mingxing

(Department of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068)

Abstract: To optimize the preparation process of oral liquid of fermented *Polygala japonica* Houtt., an orthogonal design was adopted and optimized the process of preparation process in oral liquid of fermented *Polygala japonica* Houtt.. The index of orthogonal experiment in apparent grade was determined to study the influence made by different preparation processes of oral liquid of fermented *Polygala japonica* Houtt. upon the color and the clarity. The optimum conditions for oral liquid of fermented *Polygala japonica* Houtt. by orthogonal test optimized process were as follows: water for eight times the quantity of medicinal materials in the process of decoction, pH with 7.0 and 10 hours. The result of this experiment was reliable. The clarity of the oral solution prepared by the optimized process was better. Manufacturing process consumes shorter time, so it was propitious to the batch production.

Key words: *polygala japonica* Houtt.; fermented; oral liquid; orthogonal design; preparation process

0 引言

瓜子金药材来源于远志科远志属植物瓜子金(*Polygala japonica* Houtt.)或卵叶远志 *P. sibirica* L.的全草,又名瓜子草、来麻回。最早见载于《植物名实图考》,名金锁匙、地藤草,为远志科植物瓜子金的带根全草,具有祛痰止咳、活血化瘀、解毒消肿等作用。在药品开发领域具有广阔的应用前景。目前国内外对瓜子金的研究屡有报道,国内主要集中在复方瓜子金制剂及其临床应用的研究,而国外主要报道了瓜子金有效成分的提取分离、结构鉴定等。但是,关于瓜子金经过

生物转化后制成单方口服制剂的研究国内外尚未见报道。为了充分利用天然植物瓜子金、研究开发其新的制剂,此文通过对瓜子金进行发酵,提取出有药理活性的瓜子金总皂苷,制成口服液并对制成的口服液进行正交试验,优选出最佳工艺。

瓜子金发酵口服液是以瓜子金、甜酒曲、糯米为原料,经固体发酵后,用5%三氯乙酸溶液置冰箱中静置过夜沉淀除蛋白,再用95%酒精置冰箱中静置过夜沉淀多糖后,用正丁醇萃取后蒸干,所得浸膏用蒸馏水溶解,加入蔗糖矫味得到的中药口服液,具有抗菌消炎、

第一作者简介:郭申娥,女,1981年出生,湖北恩施人,硕士,主要从事中药有效成分提取及中药制剂方面的研究。通信地址:430068 湖北省武汉市武昌区湖北工业大学生物工程学院, E-mail: 250645391@qq.com。

通讯作者:刘明星,男,1970年出生,湖北大悟人,教授,博士后,主要从事药物新剂型和药物化学的研究。通信地址:430068 湖北省武汉市武昌区湖北工业大学生物工程学院, Tel: 027-88032320, E-mail: lmxing@mail.hbut.edu.cn。

收稿日期:2010-12-09,修回日期:2011-01-14。

镇痛清热等功效。为了保证产品的质量,参考文献的经验,将按照正交试验的方法,对口服液中加入纯化水的量、加入矫味剂蔗糖的量、pH值和静置时间四项指标进行了系统地考察,得出这四个方面分别对于口服液质量指标的影响程度,并进行显著性检验,摸索出制备瓜子金发酵口服液的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用瓜子金药材从安徽亳州华申药业有限公司购入,根据药典药材的检验指标进行检测,符合标准;瓜子金皂苷已标准品自己精制制备(含量 $\geq 98\%$);硅胶G(青岛海洋化工厂);其余试剂均为分析纯。参照药典^[1-2],制备了瓜子金发酵口服液,其处方为:瓜子金发酵总皂苷 125 g、蔗糖 125 g、加入无菌蒸馏水共制成 1000 mL。

1.2 方法

1.2.1 原制备工艺 将瓜子金的茎洗净,在 60℃以下干燥大约 12 h,再将烘干的瓜子金茎研磨成粉末,称重,备用。糯米筛选淘洗干净后,用足够量的净水(一般浸泡糯米的水高出米面 5 cm)浸润 10~12 h 浸泡一定要充分,应该使大米中的淀粉颗粒细胞充分吸水膨胀以易于进行常压蒸饭,浸泡后的米粒吸水充足,颗粒保持完整,手指掐捏米粒即碎。上蒸笼蒸至熟而不糊、米粒饱满、无夹心、颗粒分开,手捏柔软有弹性且不粘时,立即取出用凉开水冲凉至 35℃左右,静置至无大量水滤出,备用。按照瓜子金 20 g,糯米 300 g,酒曲 2.1 g 的比例,在摊凉好的糯米中加入瓜子金和酒曲粉末,充分搅

拌均匀后,密封保存在已灭菌的三角瓶中,28℃发酵 72 h。

瓜子金发酵完全后,用纱布挤出发酵液,残渣用 50%的酒精浸泡 5 h,纱布挤出浸出液,旋转蒸干酒精,合并两次发酵液,测 pH 值;向浓缩后的发酵液中加入其二分之一体积的 5%三氯乙酸溶液,置冰箱中静置过夜,6000 r/min 冷冻离心 15 min,沉淀蛋白质;上清液抽滤,用氢氧化钠调 pH 值至原始值,备用。向上述沉淀蛋白质后的发酵液中加入 2 倍体积的 95%酒精,置冰箱中静置过夜,沉淀多糖;上清液回收酒精;回收酒精后的发酵液用石油醚萃取(去脂),每次约三分之一体积的石油醚,保留下层;再用正丁醇萃取三次,每次约二分之一体积正丁醇,保留上层,合并三次上层液,挥干正丁醇,得到的浸膏为瓜子金发酵总皂苷。称取瓜子金发酵总皂苷 125 g,优质蔗糖 125 g,加入无菌纯化水 1000 mL,搅拌使其充分溶解,过滤后用 40%的 NaOH 溶液调节 pH 值到 7.0 左右,搅拌均匀,放入冰箱中(4~8℃)冷藏 72 h 后,再过滤沉淀,充分搅拌使其溶解,常温静置 12 h 后,过滤除去杂质,灌装成 10 mL/支的规格,灌装好的口服液在 121℃下热压灭菌,即得瓜子金发酵总皂苷口服液。

1.2.2 正交试验法优选制备工艺 由实践中得到的经验以及参阅文献,选用 L₉(3⁴)正交试验表进行试验,选用口服液的澄清度(色泽)和澄明度作为评判口服液质量的指标进行评价,选用瓜子金发酵总皂苷的加水量倍数、加矫味剂糖倍数、pH 值、静置时间四个方面进行比较,因素水平见表 1。对其澄清度和澄明度进行综合

表 1 因素水平

水平	因素			
	A(加水用量倍数)	B(加糖量倍数)	C(pH值)	D(静置时间/h)
1	8	0.5	7	10
2	6	1	6	12
3	4	1.5	5	14

分析,两项都分为 10 个程度,每个程度为 1 个正号,满分为 10 个正号。澄清度按颜色由深到浅正号逐渐减小;澄明度由澄清至浑浊正号逐渐减小。根据这两方面正号的加减情况酌情加分或减分^[2-4],试验结果见表 2。

1.2.3 薄层色谱鉴别进行质量控制 瓜子金发酵口服液性状为:棕黄色的澄清液体,味甘甜,微苦。口服液的质量要求为 pH 7.0 左右,相对密度不低于 1.04,无异臭、酸败或其它变质的现象。为了全面有效地控制口服液的质量,对研制的瓜子金发酵口服液进行了 TLC

鉴别^[5]。根据文献报道,瓜子金中主要含有皂苷类成分和黄酮类成分,皂苷类是其活性成分^[6-7],瓜子金发酵后其皂苷成分可能会发生生物转化,但经实验检验,其主要成分仍为皂苷类,而瓜子金皂苷已是总皂苷中活性较强的一类,因此选择瓜子金皂苷己作为控制瓜子金发酵口服液质量指标对照品。取瓜子金发酵总皂苷浸膏 1.0 g,加浓度为 70%甲醇 5 mL 使其充分溶解,作为供试品溶液。另取瓜子金对照药材 1.0 g,加浓度为 70%的甲醇 20 mL,超声 30 min,过滤除去残渣,然后将滤液挥干,残渣中加 70%甲醇 1 mL 充分溶

表2 正交试验及结果

序号	因素				实验结果	
	A	B	C	D	澄清度	澄明度
1	1	1	1	1	8+	7+
2	1	2	2	2	7+	6+
3	1	3	3	3	5+	4+
4	2	1	2	3	4+	4+
5	2	2	3	1	3+	3+
6	2	3	1	2	5+	5+
7	3	1	3	2	2+	3+
8	3	2	1	3	4+	6+
9	3	3	2	1	4+	6+
K1	37	28	35		31	
K2	24	29	31		28	
K3	25	29	20		27	
K1/3	12.3	9.3	11.7		10.3	
K2/3	8	9.7	10.3		9.3	
K3/3	7.6	9.7	6.7		9	
极差	4.7	0.4	5		1.3	
优方差	A1	B2	C1		D1	

解,作为对照药材溶液。再取瓜子金皂苷己对照品,用70%的甲醇制成跟对照药材相同浓度的溶液备用。照薄层色谱法(中国药典2005年第一部附录VIB)的方法,分别吸取供试品和对照品以及对照药材溶液各5 μ L,分别点于同一块硅胶G薄层板上,用正丁醇(4):醋酸(5):水(1)充分混匀后分层,取上层溶液为展开剂,将硅胶G薄层板放入层析缸中充分展开,取出,晾干溶液,用10%硫酸乙醇溶液显色,在105℃加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照药材色谱以及对照品色谱相应的位置上,显相同颜色(红色)的斑点。

1.2.4 相对密度测定 取洁净、干燥并精密称定的比重瓶,装满供试品(温度应低于20℃)后,插入中心有毛细孔的瓶塞,用滤纸将从孔溢出的液体擦干,置20℃的水浴中,放置10~20 min,随着供试液温度的上升,过多的液体将不断从塞孔溢出,随时用滤纸将瓶塞顶端擦干,待液体不再由塞孔溢出,迅速将比重瓶自水浴中取

出,再用滤纸将比重瓶的外面擦干,精密称定,减去比重瓶的重量,求得供试品的重量后,将供试品倾去,洗净比重瓶,装满新沸过的冷水,再照上法测得同一温度时水的重量。按下式计算即得。

供试品的相对密度=供试品的重量/水重量

测得比重瓶净重16.213 g、供试品重41.346 g、水重40.493 g,根据公式计算出供试品的相密度为1.05,不低于1.04,符合标准。测得pH值6.92,符合标准。

2 结果与分析

2.1 制备工艺条件优选结果

正交试验所得的结果见表2,对表2所列数据进行方差分析,见表3,表2正交试验及结果表明,最佳工艺为A1B2C1D1,即加纯化水量为总皂苷的8倍,pH值7左右,静置时间10 h,加糖量为总皂苷的1倍时,口服液的澄清度和澄明度均能达到最好效果;RC=5>RA=4.7>RD=1.3>RB=0.4,经过方差分析,影响口服液质量

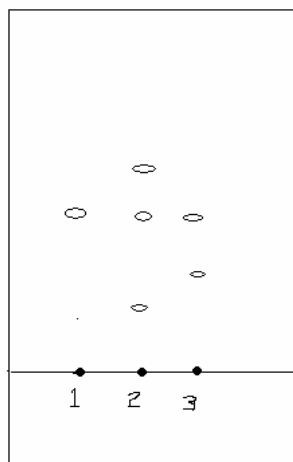
表3 方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A因素	34.8	2	17.4	174	<0.05
C因素	40.2	2	20.1	201	<0.05
D因素	2.8	2	1.4	14	—
B因素(误差)	0.2	2	0.1	—	—

的四个因素大小顺序为C>A>D>B。其中pH值、加水倍数对口服液的澄清度和澄明度有较为显著的影响。

2.2 薄层色谱鉴别结果

经过反复实验,得到的薄层色谱结果如图1,供试品色谱有两个明显的斑点,对照品瓜子金皂苷已有一个明显的斑点,对照药材瓜子金有三个斑点,供试品与对照品和对照药材在相同的位置显相同颜色(红色)的斑点。此实验说明该鉴定方法操作简单方便,准确可靠且重现性好。薄层色谱鉴别可作为瓜子金发酵口服液成品及其中间体的质量控制方法,为进一步完善瓜子金发酵口服液的质量标准提供了可靠的参考依据。



1.瓜子金皂苷己,2.瓜子金对照药材,3.瓜子金发酵总皂苷

图1 瓜子金发酵总皂苷的薄层色谱

3 结论与讨论

此文通过正交试验优选出的瓜子金发酵总皂苷口服液最佳工艺为:加水量为总皂苷的8倍,pH值控制在7.0左右,静置时间10h,加糖量1倍。通过综合评价瓜子金皂苷口服液的澄清度及澄明度,选出了最好的制备工艺,按选出的工艺进行了多次重复试验,证明该实验方法科学简便,制备出的口服液稳定性好,符合口服液制备质量标准。通过薄层色谱进行鉴别,结果表明该方法准确可靠,可作为瓜子金皂苷口服液的质量控制方法,为进一步完善瓜子金发酵总皂苷口服液的质量标准提供了可靠的参考依据。

目前国内只有关于复方瓜子金剂型的研究和开发,本实验是通过发酵的方法提取出瓜子金药材中有

药理活性的成分瓜子金总皂苷,将总皂苷制成口服液,推动了瓜子金及其新剂型全面深入的研究和开发。

此实验只是按照一般传统发酵的条件进行发酵,发酵后提取的总皂苷的含量不是很高,使用的提取方法比较繁琐,提取周期较长,这些都是目前还不是很完善的地方。要使其含量更近一步提高,发酵条件、原材料的配比等还需要进一步优化,今后还需要更进一步进行探索。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2005年版一部[S].北京:化学工业出版社,2005:117-118.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2005年版一部[S].北京:化学工业出版社,2005(附录):418-420.
- [3] 徐利,石玉芹.抗病毒口服液纯化工艺的改进[J].实用医技杂志,2003,10(8):875-876.
- [4] 张进,李晓华.正交试验法优选抗病毒口服液工艺研究[J].湖北中医杂志,2000,22(8):48-49.
- [5] 吕武清.龙新华中成药中的药材薄层色谱鉴别[M].北京:人民卫生出版社.1997.508-510.
- [6] Wang H L, Gao J, Zhu D N, et al. Quality evaluation of Polygalajaponica tarnish simultaneous determination of six bioactive triterpenoid saponins by HPLC-ELSD[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2007,43:1552.
- [7] Wang H, Gao J, Kou J, et al. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from Polygala japonica[J]. Phytomedicine, 2008,15:321.
- [8] 申劲松,杜培刚.民族药瓜子金的生药研究[J].中国民族民间医药杂志,2000(44):167-168.
- [9] 郝海鸥,杨转云,王灿岭.瓜子金的生药学研究[J].国医论坛,2001,16(3):46-47.
- [10] 韩德森.复方瓜子金冲剂治疗急性上呼吸道感染临床观察[J].中国自然医学杂志,2005,7(3):238.
- [11] 刘庆华,刘彦辰.实用植物草本[M].天津:天津科学技术出版社,1998:177.
- [12] 刘青梅,杨性民,陈伟,等.杜仲米酒发酵工艺优化研究[J].酿酒科技,2008(8):31-34.
- [13] 江成英,郭宏文,江洁,等.洋葱糯米酒发酵工艺的研究[J].中国调味品,2008(8):65-69.
- [14] 卢梅花,魏东芝,蒋晓萌.中药有效成分提取分离技术(第二版)[M].北京:化学工业出版社,2008:317-333.
- [15] 李宇伟,连瑞丽.正交试验法优选双黄连口服液制备工艺研究[J].中国农学通报,2009,25(16):25-27.