

3首中药方剂代煎后的稳定性研究^Δ

吴绍康^{1*}, 万晓青¹, 毛根祥¹, 李佳媚², 顾亚君¹(1.浙江医院药剂科, 杭州 310013; 2.浙江中医药大学中药体外代谢实验室, 杭州 310053)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2674-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.23

摘要 目的:初步考察3首中药方剂代煎后的稳定性,为保证代煎药液储存质量、提高用药安全性提供参考。方法:选用3首出自《伤寒杂病论》的经典方剂葛根黄芩黄连汤(A方)、五苓散(B方)、抵当汤(C方),以自动煎药机煎煮并包装后分别置于常温(25℃)与冷藏(4℃)条件下储存,分别于第1、7、14、21、28天检测药液中微生物、沉淀量、pH及总黄酮、生物碱、多糖、总蛋白含量。结果:与第1天比较,在第28天时,A方常温组总黄酮、多糖含量显著升高($P<0.05$),冷藏组多糖含量显著升高($P<0.05$);B方常温组多糖含量显著降低($P<0.05$);C方常温组与冷藏组的pH及总蛋白含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);其余指标在试验期内均未见明显变化。结论:在常温与冷藏条件下,上述代煎中药保存至第4周时,药液成分开始出现变化,提示中药代煎后的保质期以3周内为宜。

关键词 代煎;中药方剂;储存温度;储存时间;稳定性

Stability Study on 3 Pieces of Chinese Medicinal Formula after Decoction

WU Shaokang¹, WAN Xiaqing¹, MAO Genxiang¹, LI Jiamei², GU Yajun¹(1.Dept. of Pharmacy, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2.Metabolism Laboratory of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To preliminarily study the stability of 3 pieces of Chinese medicinal formula (CMF) after decoction, and provide reference for guaranteeing storage quality of decocted liquid and improving safety of drug use. METHODS: 3 representative formulas of Gegen Huangqin Huanglian decoction (A formula), Wuling powder (B formula) and Didang decoction (C formula) from *Shanghan Zabing Lun* were selected, the decocted liquid were stored under ambient temperature (25℃) and refrigerated temperature (4℃) after decocting by automatic boiling-machine and packing. The microorganism, precipitation, pH and contents of total flavonoids, alkaloid, polysaccharide, total protein after 1, 7, 14, 21, 28 d were detected. RESULTS: Compared with the first day, contents of total flavonoids, polysaccharide in formula A at ambient temperature group were significantly increased on the 28th ($P<0.05$), content of polysaccharide in refrigerated temperature group was significantly increased ($P<0.05$). Content of polysaccharide in formula B at ambient temperature group was significantly decreased ($P<0.05$). The pH and content of total flavonoids in formula C at ambient temperature group and refrigerated temperature group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Other indexes showed no obvious changes during the trial period. CONCLUSIONS: Under ambient temperature and refrigerated temperature, liquid ingredients of above decocted CMF will change when storing for 4 weeks. It indicates that the storage time of decocted CMF should not be more than 3 weeks.

KEYWORDS Decoction; Chinese medicinal formulae; Storage temperature; Storage time; Stability

汤剂是中医临床普遍使用的剂型之一,其组方灵活,能适应辨证施治、随症加减的用药需要,一直沿用至今^[1]。但汤剂不宜久置,必须随煎随服,这为其应用带来诸多不便。为克服这一缺点,许多医疗机构开展了自动煎药机代煎中药服务,患者只需将煎好并封装好的药液在服用前加热即可。目前,代煎中药缺乏统一的质量标准,对代煎后的存放条件、保质期限等诸多问题并没有统一明确的研究结论,国内外相关文献报道也很少^[2]。一般情况下,代煎中药包装袋上会标注“本包装应常温避光或者冷藏保存”,但是并没有标明在这两种保存情

况下具体的保存期限;而且如果煎剂中含动物类蛋白质、淀粉类或者糖分含量较高,其理论上的保存时间也会相应调整。因此,本试验选取3首含常见中药成分的方剂为代表,初步考察其代煎后在常温(25℃)与冷藏(4℃)条件下放置不同时间后的稳定性,为确保代煎中药后期质量、提高临床服用的安全性提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

YJD20-GL十功能自动煎药机(北京东华原医疗设备有限责任公司);TB-214精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Allegratm Centrifuge高速离心机(美国Beckman公司);759紫外-可见分光光度计(上海奥普勒仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

^Δ 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(No.2015DTA001);浙江医院医药卫生科学研究基金(No.2014YJ016)

* 中药师,硕士。研究方向:中药药理与新产品开发。电话:0571-81595019。E-mail:xiaokang.20@163.com

试验所用中药饮片均购自华东医药股份有限公司,批号分别为:葛根 150420,黄芩 150409,黄连 150414,炙甘草 150429,猪苓 150410,炒白术 150407,桂枝 150424,水蛭 150429,虻虫 131219,茯苓 150422,泽泻 150407,桃仁 150406,酒大黄 150427;芦丁(批号:100080-201409,纯度:92.6%)、无水葡萄糖(批号:110833-201205,纯度:99.5%)均来源于中国食品药品检定研究院;盐酸小檗碱对照品(上海施丹德生物技术有限公司,批号:20150307,纯度:98.5%);二喹啉甲酸(BCA)总蛋白定量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20150701);营养琼脂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20140601);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试药液制备

3首方剂均出自《伤寒杂病论》,分别编号为A、B、C。A为葛根黄芩黄连汤(葛根 15 g,黄芩 9 g,黄连 9 g,炙甘草 6 g);B为五苓散(猪苓 9 g,茯苓 9 g,炒白术 9 g,泽泻 15 g,桂枝 6 g);C为抵当汤(水蛭 10 g,虻虫 10 g,桃仁 10 g,酒大黄 6 g)。按上述剂量每方各自取 20 付药量,煎药机冷水浸泡 30 min,加热升温至 115 °C 后继续煎煮 45 min,高温封装,每袋 200 mL,各 40 袋,即得供试药液。各取 3 袋药液于当日(第 1 天)进行微生物、沉淀量、pH、总黄酮、生物碱、多糖及总蛋白的检测;然后将剩余袋装药液分组保存在 25 °C(常温组)、4 °C(冷藏组)恒温条件下,第 7、14、21、28 天取样重复检测上述指标。

2.2 微生物检测

参照文献[3]方法并加以改进。准确称取营养琼脂 38 g,加蒸馏水至 1 000 mL,121 °C 高温灭菌 30 min。取出,冷却至适当温度后转移至无菌培养皿中,冷却。无菌条件下取供试品 200 μL,均匀涂布于琼脂培养皿上,平行制备 3 个平皿,同时取未涂布供试品的空白培养皿为阴性对照。于 37 °C 培养箱中培养 48 h,按照平皿法计数菌落数目。结果试验周期结束后,所有平皿内均未发现菌落生长。

2.3 沉淀量测定

将“2.2”项中取样后剩余的药液轻晃均匀,全部倒入离心瓶中,9 000 r/min(离心半径为 7 cm)离心 15 min;轻轻倒出上清(上清留作后续试验),然后将离心瓶底部的沉淀全部刮下,烘箱 60 °C 干燥 4 h,称定并记录沉淀质量。结果,同组样品在不同取样时间点干燥后的沉淀量差异均无统计学意义($P>0.05$),表明在储存期间药液中未发生可能导致絮凝或沉淀等明显的理化反应。

2.4 pH测定

取“2.3”项上清,按照 2015 年版《中国药典》(四部) pH 测定方法进行测定^[4]。结果,与第 1 天比较,第 28 天时 C 方常温组与冷藏组的 pH 均显著升高($P<0.05$);其他组未发现明显变化($P>0.05$),结果详见表 1。

2.4 总黄酮含量测定

表 1 各方剂在不同储存温度下放置不同时间后 pH 测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of the pH of each formulae under different storage temperatures and stored for different time($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A方(常温)	5.39±0.06	5.37±0.06	5.36±0.06	5.38±0.07	5.41±0.07
A方(冷藏)	5.39±0.06	5.35±0.06	5.41±0.05	5.36±0.07	5.42±0.06
B方(常温)	5.34±0.07	5.26±0.07	5.30±0.10	5.36±0.08	5.39±0.10
B方(冷藏)	5.34±0.07	5.27±0.10	5.31±0.09	5.39±0.08	5.41±0.07
C方(常温)	3.75±0.07	3.71±0.04	3.73±0.09	3.78±0.10	3.94±0.09*
C方(冷藏)	3.75±0.07	3.73±0.10	3.70±0.05	3.77±0.09	3.91±0.07*

注:与第 1 天比较, * $P<0.05$

Note: vs. the first day, * $P<0.05$

取“2.3”项上清,以亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法^[5]测定供试品中总黄酮含量。结果,与第 1 天比较,第 28 天时 A 方常温组总黄酮含量显著升高($P<0.05$),其他组未发现明显变化($P>0.05$),结果详见表 2。

表 2 各方剂在不同储存温度下放置不同时间后总黄酮含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

Tab 2 Determination results of the content of total flavonoids of each formula under different storage temperatures and stored for different time($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A方(常温)	2.57±0.17	2.59±0.12	2.65±0.14	2.66±0.12	2.91±0.11*
A方(冷藏)	2.57±0.17	2.67±0.15	2.63±0.13	2.62±0.13	2.65±0.14
B方(常温)	0.41±0.02	0.41±0.03	0.40±0.02	0.42±0.03	0.41±0.03
B方(冷藏)	0.41±0.02	0.43±0.03	0.41±0.02	0.42±0.02	0.42±0.02
C方(常温)	0.51±0.02	0.53±0.02	0.52±0.03	0.52±0.02	0.52±0.03
C方(冷藏)	0.51±0.02	0.52±0.02	0.52±0.03	0.51±0.02	0.52±0.02

注:与第 1 天比较, * $P<0.05$

Note: vs. the first day, * $P<0.05$

2.5 生物碱含量测定

精密称取干燥至恒质量的盐酸小檗碱对照品 10.0 mg,以三氯甲烷溶解、定容制成质量浓度为 0.02 mg/mL 的小檗碱对照品溶液。分别精密吸取 0、0.2、0.3、0.6、0.8、1.0 mL 小檗碱对照品溶液至 20 mL 具塞试管中,加入三氯甲烷补足至 5 mL,然后依次加入 pH 4.0 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液 2 mL、0.05% 溴甲酚绿缓冲溶液 5 mL(取溴甲酚绿 0.05 g,用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 6 mL 使溶解,加磷酸二氢钾 1 g,加水使之溶解并稀释至 100 mL,即得),剧烈振摇 5 min 后静置 15 min。取下层液体,于 405 nm 波长处检测吸光度(A)^[6]。以小檗碱质量浓度(c)为横坐标、 A 为纵坐标,绘制标准曲线。经计算得回归方程为 $A=40.119c+0.0081$ ($R^2=0.9917$)。精密量取“2.3”项中相同体积上清,稀释适当倍数,按上述方法测定 A ,计算供试药液中生物碱含量。结果,在试验周期内,A、B 方中生物碱含量均未发生明显变化($P>0.05$),C 方中未检出生物碱,结果详见表 3。

2.6 多糖含量测定

表3 各方剂在不同储存温度下放置不同时间后生物碱含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

Tab 3 Determination results of the content of alkaloid of each formula under different storage temperatures and stored for different time ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A方(常温)	0.48±0.06	0.47±0.03	0.47±0.04	0.47±0.04	0.46±0.05
A方(冷藏)	0.48±0.06	0.49±0.03	0.47±0.06	0.47±0.04	0.47±0.04
B方(常温)	0.12±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01
B方(冷藏)	0.12±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01
C方(常温)	未测出	未测出	未测出	未测出	未测出
C方(冷藏)	未测出	未测出	未测出	未测出	未测出

取“2.3”项上清,加入一定体积无水乙醇,边加边搅,调整乙醇体积分数为75%,静置6 h。离心(同“2.3”项),弃去上清,沉淀用适量蒸馏水重新溶解,并转移至100 mL量瓶定容;再取1 mL,用蒸馏水稀释适当倍数,得粗多糖供试液。参照前期建立的方法^[7],对所有供试药液中多糖含量进行测定。结果,与第1天比较,第28天时A方常温组与冷藏组多糖含量均显著升高($P<0.05$),B方常温组多糖含量则显著降低($P<0.05$),其他组无明显变化($P>0.05$),结果详见表4。

表4 各方剂在不同储存温度下放置不同时间后多糖含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

Tab 4 Determination results of the content of polysaccharide of each formula under different storage temperatures and stored for different time ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A方(常温)	2.82±0.12	2.80±0.16	2.78±0.10	2.85±0.12	3.12±0.13*
A方(冷藏)	2.82±0.12	2.79±0.11	2.84±0.13	2.80±0.08	3.09±0.11*
B方(常温)	10.65±0.32	10.75±0.59	10.61±0.43	10.56±0.39	9.91±0.33*
B方(冷藏)	10.65±0.32	10.80±0.41	10.76±0.51	10.61±0.42	10.33±0.52
C方(常温)	2.20±0.10	2.12±0.15	2.19±0.12	2.16±0.10	2.29±0.13
C方(冷藏)	2.20±0.10	2.16±0.11	2.23±0.10	2.22±0.08	2.25±0.13

注:与第1天比较,* $P<0.05$

Note: vs. the first day,* $P<0.05$

2.7 总蛋白含量测定

取“2.3”项上清,参照试剂盒说明书测定总蛋白含量。结果,与第1天比较,第28天时C方常温组与冷藏组总蛋白含量均升高($P<0.01$),其他组未发现明显变化($P>0.05$),结果详见表5。

3 讨论

目前代煎中药占中药饮片使用的比例较大,药品从固体饮片变为液体煎剂,质量处于不稳定状态,其后期的质控和管理显得尤为重要。从化学成分与临床应用角度综合考虑,本试验选取了《伤寒杂病论》中3首基础方剂为研究对象。其中葛根黄芩黄连汤由葛根、黄芩、黄连、甘草4味中药材组成,是治疗急性腹泻的经典方剂^[8],黄芩、黄连含有抑菌成分,一定程度上有助于药物储存。五苓散由猪苓、泽泻、白术、茯苓、桂枝5味中药材组成,猪苓与茯苓含糖类较多,易发生降解反应与长

菌^[9]。抵当汤为破血逐瘀之名方,由桃仁、水蛭、虻虫、大黄4味中药材组成,由于含有容易变质的油脂与动物类蛋白^[10-13],会影响药液的储存稳定性。

表5 各方剂在不同储存温度下放置不同时间后总蛋白含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

Tab 5 Determination results of the content of total proteins of each formula under different storage temperatures and stored for different time ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/mL}$)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
A方(常温)	32.90±1.85	34.11±1.75	32.40±1.18	30.51±2.05	33.84±1.26
A方(冷藏)	32.90±1.85	34.60±1.50	31.21±1.77	32.33±1.44	33.18±1.59
B方(常温)	4.67±0.36	4.60±0.29	4.79±0.49	4.57±0.30	4.75±0.29
B方(冷藏)	4.67±0.36	4.64±0.26	4.72±0.39	4.83±0.19	4.95±0.21
C方(常温)	10.79±0.60	11.45±0.50	11.79±0.63	11.84±0.51	13.61±0.57**
C方(冷藏)	10.79±0.60	10.92±0.43	11.80±0.45	11.77±0.52	13.27±0.58**

注:与第1天比较,** $P<0.01$

Note: vs. the first day,** $P<0.01$

对方剂组成进行分析后,本文侧重选取了总黄酮(葛根等)、生物碱(黄连等)、多糖(猪苓、茯苓等)及蛋白质(水蛭、虻虫等及植物类蛋白)为检测指标,通过检测这些指标性成分的变化来反映药液总体稳定性的波动情况。小檗碱是从黄连等植物中提取出的一种异喹啉类生物碱,受水煎液溶出性及检测方法灵敏度影响,在A、B方中的检出值较低;而C方中所有药味均不含生物碱类成分^[11-14],故理论与检测结果相一致,即未检出生物碱。由于高温煎煮条件下药物之间作用复杂,推测受转化程度等因素影响(如多糖与单糖之间),某些指标会随时间延长逐渐发生变化,进而导致药液后期稳定性发生变化,但其具体原因有待进一步研究。另外,由于高温使蛋白质空间结构发生变化,可能导致试验中BCA法蛋白含量检测结果不准,故表5数据仅供参考。

最终结果表明,在常温及冷藏条件下,随着时间延长,所有供试药液均未出现微生物污染情况,提示严格的高温煎煮及无菌包装对煎剂在储存中的质量稳定非常重要;在放置的前3周,所有方剂药液各检测成分均较为稳定,至第4周时个别指标开始出现波动。因此,对本试验中的3首方剂药液保存时间均以3周内为宜,且冷藏条件下的综合稳定性稍优于常温。

此外,本试验作为初步探索,笔者仅设计了2个常见温度进行考察,为了更科学、充分地探讨影响药液保存质量的因素,今后需从扩大样本量、细化观察指标、增加温度梯度等方面进行更为系统的研究。

参考文献

- [1] 赵锦卉.浅谈中药汤剂制备过程中应注意的几个环节[J].齐齐哈尔医学院学报,2000,21(1):22-23.
- [2] 蒋皓,吴振华,倪永兵.关于中药代煎的运行模式和问题思考[J].中国药房,2015,26(31):4333-4335.
- [3] 梁学政,陈惠红,唐勇琛,等.袋装中药煎煮液的微生物限度检查[J].广西中医药大学学报,2013,16(3):48-50.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年

正交试验优化独子藤果实中雷公藤红素的醇提工艺^Δ

许启荣*,周琼,张紫萍,陈 纠(广州市第十二人民医院药剂科,广州 510620)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2677-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.24

摘要 目的:优选独子藤果实中雷公藤红素的醇提工艺。方法:采用高效液相色谱法测定雷公藤红素的含量。以提取时间、提取次数、料液比为考察因素,以雷公藤红素的提取率为考察指标设计正交试验,并进行验证试验。结果:最优醇提工艺为45%甲醇提取3次、每次2 h、料液比1:8;验证试验中,雷公藤红素的平均提取率为0.917 mg/g(RSD=2.85%,n=3)。结论:本研究优化的醇提工艺稳定可行、提取率较高,适用于独子藤果实中雷公藤红素的提取。

关键词 独子藤;雷公藤红素;单因素;正交试验;高效液相色谱法

Optimization of Methanol Extraction Technology for Tripterine in the Fruit of *Celastrus monospermus* by Orthogonal Design

XU Qirong, ZHOU Qiong, ZHANG Zhiping, CHEN Jiu (Dept. of Pharmacy, Guangzhou 12th Hospital, Guangzhou 510620, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the methanol extraction technology of tripterine in the fruit of *Celastrus monospermus*. METHODS: HPLC was adopted to determine the content of tripterine. Using extraction time, extraction times, solid-liquid ratio as investigation factors, extraction rate of tripterine as investigation index, orthogonal test was designed, and verification test was conducted. RESULTS: The optimal methanol extraction technology was as follow as 45% methanol extracting 2 h each time with solid-liquid ratio of 1:8 for 3 times. In the verification test, the average extraction rate of tripterine was 0.917 mg/g (RSD=2.85%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized methanol extraction technology is stable and feasible with high extraction rate, and is suitable for the extraction of tripterine in the fruit of *C. monospermus*.

KEYWORDS *Celastrus monospermus*; Tripterine; Single factor; Orthogonal test; HPLC

独子藤(*Celastrus monospermus* Roxb.)为卫矛科南蛇属植物,分布于越南、印度及我国福建、广东、云南、贵州、广西等省区的林带中^[1]。研究表明,独子藤含有一定量的生物碱和三萜类成分,其中木栓烷型三萜类化合物具有显著的抗癌活性^[2]。

雷公藤红素又名南蛇藤醇/素,外观呈红色针状结晶,不溶于水,易溶于有机溶剂,分子式为C₂₉H₃₈O₄,分子量为450,能与半胱氨酸的巯基发生迈克尔加成反应^[3],具有抗炎、免疫抑制及抗肿瘤等多种药理活性^[4]。目前,对独子藤中雷公藤红素的提取报道较少,其优化提取工

艺报道更少。本文对独子藤果实中雷公藤红素提取工艺的主要影响因素进行单因素和正交试验研究,为更合理有效地提取藤果实中的雷公藤红素提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SartoriusBP211D电子天平(德国赛多利斯公司);1100高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1315B二极管阵列检测器(DAD)、1100色谱工作站(美国安捷伦公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

雷公藤于2008年10月采自广东阳春地区,由广东

版.北京:中国医药科技出版社,2015:77-78.

- [5] 吴绍康,沈先荣,梅威威,等.大孔吸附树脂分离纯化枇杷花总黄酮工艺研究[J].中华中医药学刊,2014,32(9):2185-2188.
- [6] 汪怡.酸性染料比色法测定黄连解毒汤中总生物碱的含量[J].安徽医药,2013,17(5):759-762.
- [7] 梅威威,吴绍康,张浩,等.铁皮石斛多糖提取工艺及脱蛋白方法研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):2869-2872.
- [8] 杜晨晖,闫艳,冯前进,等.葛根苓连汤发酵前后总黄酮和总生物碱含量变化研究[J].中华中医药杂志,2016,31

(11):4850-4853.

- [9] 吴玉仙,刘书珍,孙晋营.五苓散临床应用三则[J].浙江中医杂志,2012,47(4):292.
- [10] 王引弟,张智龙应用抵挡汤临床经验举隅[J].中国中医药信息杂志,2011,18(5):87-88.
- [11] 郭晓庆,孙佳明,张辉.水蛭的化学成分与药理作用[J].吉林中医药,2015,35(1):47-50.
- [12] 李军德,黄璐琦,陈敏,等.中药虻虫研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):228-230.
- [13] 王仁芳,范令刚,高文远,等.桃仁化学成分与药理活性研究进展[J].现代药物与临床,2010,25(6):426-429.
- [14] 胡永淑.大黄炮制前后物质基础变化研究[J].中国药房,2014,25(11):1016-1018.

Δ 基金项目:广东省自筹经费类科技计划项目(No.粤科规财字[2015]110号)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:020-38981270。E-mail:x82521326@126.com

(收稿日期:2016-10-08 修回日期:2016-12-15)
(编辑:刘 萍)