

六味地黄方醇沉工艺研究

韦迎春^{1,2}, 闫明^{1,2}, 胡军华^{1,2}, 李雪峰^{1,2}, 吴云^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 通过对六味地黄方醇沉工艺合理化研究, 得到稳定的、可产业化的醇沉工艺。**方法** 以马钱苷、芍药苷、莫诺苷、甘露三糖、多糖质量分数、相对分子质量分布及浸出物等为评价指标, 对乙醇加入方式、离心方式及是否加入乙醇洗涤工艺进行考察, 筛选出最佳醇沉工艺。**结果** 醇沉工艺中以体积计算加入乙醇的量较合理; 采用乙醇洗涤法可有效完成多糖部位与醇沉上清液的分离; 改进工艺后, 多糖浸出物质达标, 苷类、甘露三糖的质量分数达标。**结论** 经优化后的乙醇醇沉工艺具有易操作、可控性好、重复性好的特点, 可以开展产业化推广。

关键词: 六味地黄方; 中试工艺; 生产工艺; 多糖; 醇沉

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1161-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.012

Study on alcohol precipitation technology of Liuwei Dihuang Prescription

WEI Ying-chun^{1,2}, YAN Ming^{1,2}, HU Jun-hua^{1,2}, LI Xue-feng^{1,2}, WU Yun^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective Through studying the rationalization of alcohol precipitation process of Liuwei Dihuang Prescription to obtain the stability alcohol precipitation process which could be used to promote industrialization. **Methods** It screens the most reasonable alcohol precipitation process taking the contents, the relative molecular weight distribution, and the extract of loganin, peoniflorin, morroniside, mannitriose, and polysaccharide as the evaluation index to investigate the way of adding ethanol, centrifugation, and whether to carry out the ethanol washing process. **Results** The alcohol precipitation process is reasonable by calculating the alcohol volume method. The polysaccharides and alcohol precipitation supernatant could be efficiently separated by ethanol washing method. The polysaccharide extract and the contents of glycosides and mannitriose were up to the standard after the process improved. **Conclusion** The optimized alcohol precipitation process is easy operation with good controllability and repeatability. It is worthy of popularization and application of industrialization.

Key words: Liuwei Dihuang Prescription; pilot process; production process; polysaccharide; alcohol precipitation

六味地黄方是中医“滋阴补肾”的经典名方, 由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮6味中药组成, 除了丸剂, 还有胶囊等剂型^[1]。中医用于治疗因肾阴不足、虚火上炎所致的头晕、耳鸣、腰膝酸软、盗汗、遗精、手足心热等证。现代研究该方有改善肾功能、保肝、抗衰老、抗疲劳、抗低温、耐缺氧、调血脂、降血压、降血糖、增强免疫、促进新陈代谢等作用^[2]。

经研究证明方中6味药均含有多糖, 均具有增

强免疫、抗肿瘤、抗衰老等作用^[3-4]。天然药物中提取的多糖通常是以中性糖和酸性杂多糖的形式存在, 而酸性杂多糖(下文简称酸性糖)中主要是以糖醛酸^[5-6]为主, 糖醛酸自身或含有糖醛酸结构单元的低聚糖或多糖常显示出一些重要的生物活性^[7], 而中性糖则具有一定的抗氧化作用^[8]。此外, 二者在定量方法上也存在差异^[5-6,9]。牡丹皮中的芍药苷具有扩张血管、镇静镇痛、抗炎抗溃疡、解热解痉、利尿的作用。山茱萸中含有马钱苷、莫诺苷, 马钱

收稿日期: 2014-11-22

基金项目: 科技部重大新药创制(2013ZX09402203)

作者简介: 韦迎春(1984—), 女, 山东泰安人, 助理级研究员, 硕士, 研究方向为中药制剂。E-mail: wyinc4@163.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

苷具有对非特异性免疫功能增强作用,能促进巨噬细胞吞噬功能,延缓衰老,有良好的防癌防辐射功效,并具有良好的抗炎、抗菌、镇咳、祛痰等作用;莫诺苷具有保护细胞免于 H_2O_2 诱导的细胞毒性和细胞凋亡的作用;熟地黄中的甘露三糖具有促进造血细胞增殖、提高免疫力、降血糖、抗肿瘤等作用。

醇沉是中药制剂中常用的精制工艺,使不溶于乙醇的物质如糖类、蛋白质等沉降下来,达到精制浓缩液的目的。六味地黄方中的成分复杂,经过醇沉后,可提高有效成分的量,发挥其有效成分的治疗作用。课题组前期实验对六味地黄方醇沉工艺进行中试及放大生产研究,多项检测指标均发生了改变,无法达到预期质量要求,分析原因可能由于生产设备、操作及环境的变化造成的。为适应大生产需要,本实验通过考察生产工艺参数对六味地黄方有效成分质量的影响,优化醇沉生产工艺,开展产业化推广。

1 仪器与材料

U3000 型高效液相色谱仪,美国 Cohesive Technologies 公司, Waters Symmetry C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)。

甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;纯化水(自制)。甘露三糖对照品(product of Sigma Aldrich,批号 1450717,质量分数 >95%),莫诺苷对照品(北京格润得科技发展公司,质量分数为 98.8%),马钱苷对照品(11640-200503,质量分数为 99.2%)、芍药苷对照品(110736-200934,质量分数为 96.4%),均购于中国食品药品检定研究院。

药材饮片均经康缘大药房吴舟药师鉴定,熟地黄(批号 Y130301,产地河南)为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的干燥块根经加工蒸晒而成,山茱萸(批号 Y130301,产地河南)为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,山药(批号 Y130301,产地安徽)为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根,泽泻(批号 Y1301089,产地福建)为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎,均购于精华制药亳州康普有限公司;牡丹皮(批号 Y130306,产地安徽)为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,购于亳州弘惠药业;茯苓(批号 Y1303064,产地湖北)为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,购于湖北英山县百草堂实业有限公司。

2 方法与结果

2.1 芍药苷、马钱苷、莫诺苷定量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件^[10-11] 采用 U3000 型高效液相色谱仪, Waters Symmetry C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相为水-甲醇-乙腈,梯度洗脱:0~10 min, 74%水、21%甲醇、5%乙腈;10~30 min, 74%~69%水、21%~26%甲醇、5%乙腈;检测波长为 236 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 理论板数按莫诺苷、马钱苷、芍药苷峰计算均应不低于 3 000。

2.1.2 混合对照品溶液的配制 分别精密称取芍药苷、马钱苷、莫诺苷对照品适量,用甲醇制成含芍药苷 51.25 μ g/mL、马钱苷 47.90 μ g/mL、莫诺苷 57.70 μ g/mL 的混合对照品溶液,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,滤液备用。

2.1.3 供试品溶液的配制 取本品中间体,研细,取 0.50 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取上清液 5 mL,加甲醇稀释至 20 mL,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 1、2、4、8、10、20 mL 定容至 25 mL 量瓶中,用甲醇定容,混匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,精密吸取续滤液 10 μ L 注入液相色谱仪记录峰面积,以质量浓度 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归,得回归方程分别为芍药苷 $Y=0.236X+0.601$, $r=0.9995$;马钱苷 $Y=3.954X-2.371$, $r=0.9995$;莫诺苷 $Y=0.241X+1.049$, $r=0.9995$;线性范围分别为 2.05~41.00、1.02~10.22、2.31~46.16 μ g/mL。

2.1.5 精密度考察 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L,连续进样 6 次,测定芍药苷、马钱苷、莫诺苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.36%、1.45%、1.20%,表明精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一中间体约 0.50 g,按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定,测定芍药苷、马钱苷、莫诺苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.54%、1.69%、1.23%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一中间体约 0.50 g,精密称定 6 份,按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液进样测定,按照 3 种指标成分的质量分数计算,RSD 分别为芍药苷 1.87%、马钱苷 1.45%、莫诺苷 1.61%。

表明测定方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知质量分数的中间体约 0.20 g, 精密称定 6 份, 分别精密加入芍药苷、马钱苷、莫诺苷对照品适量, 按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液, 精密吸取续滤液 10 μ L 注入液相色谱仪, 按峰面积外标法计算, 平均回收率分别为 97.78%、97.67%、97.89%, RSD 分别为 1.02%、1.31%、0.86%。

2.2 甘露三糖定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪, Kromasil NH₂ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以乙腈-水 (60:40) 为流动相; HP1047A 示差折光检测器; 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温箱与检测器温度均为 35 $^{\circ}$ C; 理论板数按甘露三糖峰计算应不低于 1500。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取甘露三糖对照品适量, 精密称定, 用流动相乙腈-水 (60:40) 制成含甘露三糖 1.856 mg/mL 的溶液, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取本品中间体约 0.20 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入流动相乙腈-水 (60:40) 25 mL, 密塞, 称定定量, 超声 (功率 100 W, 频率 30 kHz) 处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用乙腈-水 (60:40) 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取上清液 5 mL, 加乙腈-水 (60:40) 稀释至 20 mL, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.25、2.5、3.75、5.0 mL 定容至 5 mL 量瓶中, 用乙腈-水 (60:40) 定容, 混匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 精密吸取续滤液 10 μ L 注入液相色谱仪记录峰面积, 以甘露三糖质量浓度 (X) 对峰面积积分值 (Y) 进行线性回归, 得到回归方程为 $Y=1\ 343 X-111.5$, $r=0.999\ 5$, 结果表明甘露三糖在 0.37~1.86 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L, 连续进样 6 次, 峰面积的 RSD 为 1.75%, 表明精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一中间体约 0.20 g, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 峰面积的 RSD 为 1.65%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一中间体约 0.20 g, 精密

称定 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定, 甘露三糖质量分数的 RSD 为 1.84%, 表明测定方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知质量分数的中间体约 0.10 g, 精密称定 6 份, 精密加入甘露三糖对照品适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取续滤液 10 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按峰面积外标法计算, 甘露三糖的平均回收率为 96.94%, RSD 为 1.52%。

2.3 醇沉制备多糖部位的方法

取熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓, 加 10 倍量沸水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并提取液并浓缩成清膏 A。清膏 A 调乙醇体积分数至 30% 后醇沉, 吸出上清液, 上清液浓缩成稠膏 B, 沉淀弃去。稠膏 B 调乙醇体积分数至 60% 后醇沉, 吸出上清液, 浓缩后备用; 沉淀加水溶解, 减压浓缩至稠膏并真空干燥, 得多糖部位。

2.4 多糖制备工艺考察

2.4.1 第 1 步醇沉工艺考察 取 5 份等量清膏 A, 按以下进行操作: ① 清膏 A 用乙醇调至含乙醇量为 30% (按体积折算含乙醇量), 过夜离心, 上清液备用; 沉淀用 30% 乙醇冲洗并直接离心, 沉淀弃去, 上清液备用; 合并 2 次上清液浓缩到相对密度为 1.09~1.10 (设为 A1); ② 清膏 A 用乙醇调至含乙醇量为 30% (按体积折算含乙醇量), 放置过夜不离心, 真空吸取上清液备用, 其他同 ① 操作 (设为 A2); ③ 清膏 A 用乙醇调至含乙醇量为 30% (用酒精计测定乙醇量), 其他同 ① 操作 (设为 A3); ④ 清膏 A 用乙醇调至含乙醇量为 30% (按体积折算含乙醇量), 过夜离心, 沉淀不进行 30% 乙醇冲洗直接弃去, 将上清液浓缩到相对密度为 1.09~1.10 (设为 A4); ⑤ 浸膏 A 用乙醇调至含乙醇量为 30% (按体积折算含乙醇量), 直接离心, 其他同 ④ 操作 (设为 A5)。

2.4.2 第 1 步醇沉工艺考察结果 由表 1 结果可知, A1 的莫诺苷、马钱苷、芍药苷、甘露三糖、多糖总糖 (采用硫酸-苯酚法测定^[9]) 的量均高于 A3, 初步推测按体积折算确定加乙醇量较合理; A5 的莫诺苷、马钱苷、芍药苷、甘露三糖、多糖总糖的量均高于 A4, 推测直接离心优于过夜离心; A1 的莫诺苷、马钱苷、芍药苷、甘露三糖、多糖总糖的量均高于 A4, 推测加入乙醇洗涤可有效提高有效成分的量; A1 的莫诺苷、马钱苷、芍药苷、甘露三糖、多

表1 30%醇沉工艺考察 (n=3)

Table 1 Investigation of 30% alcohol precipitation (n=3)

样品	莫诺昔/ (mg·g ⁻¹)	马钱昔/ (mg·g ⁻¹)	芍药昔/ (mg·g ⁻¹)	甘露三糖/ (mg·g ⁻¹)	多糖总糖/ (mg·mL ⁻¹)
A1	2.83	1.30	1.01	37.58	0.20
A2	2.45	1.12	0.87	30.29	0.13
A3	2.68	1.23	0.94	35.90	0.16
A4	1.87	0.86	0.65	23.97	0.10
A5	2.62	1.20	0.90	33.44	0.14

糖总糖的量均高于 A2, 推测离心操作可有效提高有效成分的量。

2.4.3 第2步醇沉工艺考察 取5份等量稠膏 B, 按以下进行操作: ① 稠膏 B 用 95%乙醇调至含乙醇量为 60% (按体积折算含乙醇量), 过夜离心, 上清液备用; 沉淀用 60%乙醇冲洗并直接离心, 上清液备用, 沉淀加水溶解并浓缩到相对密度为 1.20~1.21 (设为 B1), 合并 2 次上清液并浓缩到相对密度为 1.12~1.13 (设为 b1); ② 稠膏 B 用 95%乙醇调至含乙醇量为 60% (按体积折算含乙醇量), 醇沉后放置过夜不离心, 真空吸取上清液, 其他同 ① 操作 (设为 B2、b2); ③ 稠膏 B 用 95%乙醇调至含乙醇量为 60% (用酒精计测定含乙醇量), 其他同 ① 操作 (设为 B3、b3); ④ 稠膏 B 用 95%乙醇调至含乙醇量为 60% (按体积折算含乙醇量), 过夜离心, 上清液浓缩到相对密度为 1.12~1.13 (设为 b4), 沉淀不进行 60%乙醇冲洗直接加水溶解并浓缩到相对密度为 1.20~1.21 (设为 B4); ⑤ 稠膏 B 用 95%乙醇调至含乙醇量为 60% (按体积折算含乙醇量) 后直接离心, 其他同 ④ 操作 (设为 B5、b5)。

2.4.4 第2步醇沉工艺中苷类和甘露三糖的量考察结果 60%醇沉上清浓缩液主要成分是苷类和甘露三糖, 其质量分数是评价多糖生产工艺的指标, 结果见表 2。b1 的莫诺昔、马钱昔、芍药昔、甘露三糖质量分数均高于 b3, 故初步推测按体积折算加乙醇量较合理; b5 的莫诺昔、马钱昔、芍药昔、甘露三糖的量均高于 b4, 故推测直接离心优于过夜离心; b1 的莫诺昔、马钱昔、芍药昔、甘露三糖的量均高于 b4, 故加入乙醇洗涤有利于多糖的纯化。b1 的莫诺昔、马钱昔、芍药昔、甘露三糖的量均高于 b2, 推测离心操作可有效提高有效成分的量。

2.4.5 第2步醇沉工艺中多糖量的考察结果 由于酸性糖和中性糖在定量测定中相互干扰, 所以本研

究采用硫酸-苯酚法测定中性糖的量^[9], 采用间羟基联苯法测定酸性糖的量^[5-6], 由表 3 可知, B1 的中性糖、酸性糖、多糖总糖质量分数均高于 B3, 推测按体积折算加乙醇量较合理; B4 的中性糖、酸性糖、多糖总糖量均高于 B5, 推测放置时间越长对多糖的质量分数越有利, 故过夜离心优于直接离心; B1 的中性糖、酸性糖、多糖总糖的量均高于 B4, 加入乙醇洗涤可提高多糖有效成分的量。B1 的中性糖、酸性糖、多糖总糖的量均高于 B2, 推测离心操作可有效提高有效成分的量。

表2 60%醇沉工艺中苷类和甘露三糖量的考察 (n=3)

Table 2 Investigation of glycosides and mannanotriose contents in 60% alcohol precipitation (n=3)

样品	莫诺昔/ (mg·g ⁻¹)	马钱昔/ (mg·g ⁻¹)	芍药昔/ (mg·g ⁻¹)	甘露三糖/ (mg·g ⁻¹)
b1	5.94	3.30	3.02	94.39
b2	5.08	2.38	2.10	89.86
b3	5.24	2.75	2.16	78.13
b4	5.01	2.36	2.06	83.72
b5	5.52	2.62	2.24	93.95

表3 60%醇沉工艺中多糖量的考察 (n=3)

Table 3 Investigation of polysaccharide content in 60% alcohol precipitation (n=3)

样品	中性糖/%	酸性糖/%	多糖总糖/%
B1	3.90	1.80	5.70
B2	3.13	1.71	4.84
B3	3.55	1.46	5.01
B4	2.59	1.30	3.89
B5	2.24	0.94	3.18

2.5 多糖制备工艺改进前后的对比

2.5.1 中试工艺制备多糖 清膏 A 中加入 95%乙醇并调至含乙醇量 30%, 放置过夜, 倾出上清液, 并将剩余部分离心, 合并上清液, 沉淀用 30%乙醇冲洗 3 次, 倾出上清液, 剩余部分离心, 合并上清液, 沉淀弃去。上清液浓缩成稠膏, 用 95%乙醇调乙醇体积分数为 60%, 放置过夜, 离心, 上清液备用, 沉淀加水溶解并浓缩至稠膏状; 按上述方法重复 2 次后, 将所得的沉淀浸膏真空干燥, 得到多糖部位。

2.5.2 改进后生产工艺制备多糖 清膏 A 用 95%乙醇调乙醇体积分数至 30%, 放置过夜, 真空吸出上清液备用, 沉淀用 30%乙醇冲洗, 放置过夜, 吸出上清液备用, 沉淀弃去; 合并 2 次上清液浓缩成稠

膏状，用95%乙醇调乙醇体积分数为60%，放置过夜，真空吸出上清液，沉淀用60%乙醇冲洗，放置过夜，吸出上清液备用，合并2次沉淀加水溶解，并浓缩至稠膏后减压干燥，得多糖部位。

2.5.3 不同制备工艺多糖质量分数及浸出物对比 由表4可知，从中性糖、酸性糖和总糖质量分数比较，改进中试工艺后进行生产的多糖质量分数高于按中试工艺进行生产的多糖，说明改进后的中试工艺可有效提高多糖的质量分数；改进中试工艺后生产所得多糖浸出物优于原生产工艺，且符合多糖浸出物的标准。

2.5.4 不同制备工艺多糖相对分子质量分布对比 由图1可知，中试工艺、改进中试工艺放大生产工

艺、中试工艺放大生产工艺的多糖相对分子质量分布相似，在多糖相对分子质量分布不存在差异^[12-14]。

2.5.5 不同生产工艺对六味地黄方醇沉后有效成分的影响 本实验通过考察生产工艺参数对六味地黄方中有效成分质量的影响，并根据考察结果对醇沉生产工艺进行了一定的改进。改进后的醇沉生产工艺可使六味地黄方中有效成分的质量得到稳定，并能达到了预期生产工艺的要求，适应了大生产的需要，结果见表5。

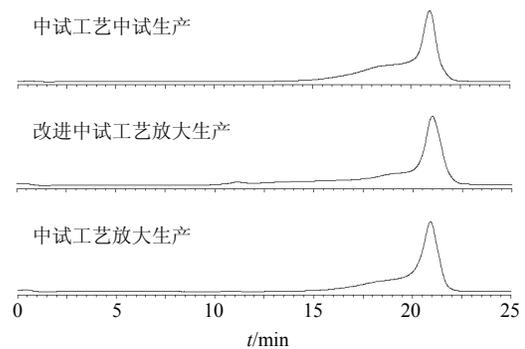


图1 多糖相对分子质量分布

Fig. 1 Distribution of relative molecular weights of polysaccharide

表4 多糖质量分数及浸出物比较

Table 4 Comparison on content and extract of polysaccharide

工艺	中性糖/	酸性糖/	多糖总	浸出物/
	%	%	糖/%	%
改进中试工艺放大生产	48.71	18.75	67.46	73.5
中试工艺中试生产	50.36	19.87	70.23	76.9
中试工艺放大生产	45.65	15.01	60.66	66.4

表5 不同生产工艺对六味地黄方醇沉后有效成分的影响 (n=3)

Table 5 Influence of different production processes on active constituents in Liuwei Dihuang Prescription after alcohol precipitation (n=3)

工艺	多糖浸出物/%	多糖总糖/%	中性糖/%	酸性糖/%	莫诺昔/%	马钱昔/%	芍药昔/%	甘露三糖/%
质量标准	不得少于70	50~70	30~60	10~25	6.3~13.5	2.4~5.0	2.2~5.0	40.0~60.0
生产放大	61	58	45	13	7.8	3.1	3.0	36
中试生产	75	68	51	20	12.0	4.6	4.4	52
改进后放大生产	73	65	48	19	10.5	4.3	4.2	51

综上所述，对于六味地黄方中的醇沉工艺分析，以体积计算加乙醇量的方法优于酒精计实测加乙醇量；在生产工艺中加入乙醇洗涤步骤，可提高有效成分的量，故醇洗是有必要的；由结果可知，直接离心可减少有效成分与沉淀结合时间，使更多的有效成分从沉淀中游离出来，故直接离心较好；多糖是沉淀部分，需较长的时间让其充分沉降，对于多糖的生产工艺，则过夜离心要优于直接离心。

3 讨论

通过对多糖制备工艺的研究可知，制备工艺中的醇沉是关键步骤^[15-16]。对醇沉进行考察过程中发现，乙醇加入方式对醇沉有一定影响^[17-18]，故通过研究得出六味地黄方中多糖的醇沉按体积法计算加

乙醇量较合理。由于醇沉分离效果不好，故采用乙醇洗涤法可达成多糖部位与醇沉上清液的分离；改进后生产工艺生产的多糖浸出物优于改进前工艺。通过不断的改进及优化多糖生产工艺，使产业化的工艺方法及参数易操作、可控性好，重复性好，故值得产业化推广应用。

参考文献

- [1] 徐灿辉, 何维为, 何云飞. HPLC 法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖昔、马钱昔、芍药昔和丹皮酚 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 257-259.
- [2] 李全斌. 六味地黄方研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(1): 217-219.
- [3] 齐春会, 张永祥, 赵修南, 等. 六味地黄多糖体外对正常及衰老皮细胞免疫功能的影响 [J]. 中国药理学通

- 报, 1999, 15(2): 157-160.
- [4] 齐春会, 张永祥, 李凤仙, 等. 六味地黄多糖体外抗肿瘤作用的初步研究 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 322-325.
- [5] 许会生, 张铁军, 赵广荣, 等. 一种测定酸性多糖中糖醛酸和中性糖含量的改良方法 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(7): 197-199.
- [6] 姜瑞芝, 陈英红, 杨勇杰, 等. 银耳多糖中糖醛酸含量的测定 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 991-993.
- [7] 王慧, 热娜·卡斯木, 樊珍珍, 等. 新疆赤芍多糖中糖醛酸含量的测定 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(2): 12-14.
- [8] 芮海云, 吴国荣, 陈景耀, 等. 白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2003, 26(4): 94-98.
- [9] 马力, 徐楚鸿, 黄煜, 等. 硫酸苯酚法测定金菊花中多糖的含量 [J]. 医药导报, 2008, 27(12): 1511.
- [10] 王淳, 宋志前, 夏磊, 等. HPLC 法测定桂枝芍药知母汤中 5 种有效成分 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3105-3108.
- [11] 邱建国, 张汝学, 贾正平, 等. HPLC 测定不同产地生地黄中地黄寡糖和梓醇的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 110-113.
- [12] 李楠, 李卓, 张燕, 等. 高效分子排阻色谱法同时测定白及多糖分子量和含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1801-1803.
- [13] 徐晓霞, 李炎, 刘华, 等. 高效凝胶色谱法测定多花黄精多糖分子量与分子量分布 [J]. 四川生理科学杂志, 2008, 30(3): 102-103.
- [14] 陈轶兰, 王友茹, 马立人. 用高效凝胶渗透色谱法测定多糖分子量 [J]. 军事医学科学院院刊, 1988, 12(1): 70-73.
- [15] 赵盈, 张海生, 王立霞, 等. 柿子多糖的水提醇沉工艺研究 [J]. 农产品加工学刊, 2010(12): 26-36.
- [16] 孙玉琦, 刘晓娟, 代春梅, 等. 中药醇沉技术应用与评价 [J]. 中成药, 2010, 32(11): 1961-1963.
- [17] 王庆. 浅谈中药的醇沉工艺及设备 [J]. 中国制药装备, 2009(32): 38-40.
- [18] 杜松, 罗爱勤, 刘美凤. 中药浸膏醇沉工艺中醇浓度概念与计算方法辨析 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1652-1655.