

中药乳腺康注射液中间体的制备工艺优选

刘涛¹, 游丽玲¹, 刘应武¹, 刘婷¹, 李娟², 伍利华³, 徐玉玲^{4*}

(1. 成都大学生物产业学院, 成都 610106; 2. 南京海陵中药制药工艺技术研究有限公司, 南京 210049;
3. 广西中医药大学, 南宁 530001; 4. 成都大学实验技术中心, 成都 610106)

[摘要] 目的: 优选中药乳腺康注射液中间体的制备工艺。方法: 以总含固量和橙皮苷含量的综合评分为指标, 通过正交试验和单因素试验考察乙醇用量、提取时间、提取次数及乙醇体积分数对甘草和青皮的混合提取工艺的影响; 以总黄酮质量和总含固量为综合评价指标, 采用正交试验考察加水量、提取时间及提取次数对蒲公英提取工艺的影响, 通过单因素试验考察含醇量对蒲公英提取液醇沉工艺的影响。采用 HPLC 测定橙皮苷含量, 流动相甲醇-水(50:50), 检测波长 284 nm。结果: 甘草和青皮的最佳提取工艺为加 6 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 2 h。蒲公英最佳提取工艺为加 16 倍量水浸泡 0.5 h 后提取 3 次, 每次 0.5 h; 提取液减压浓缩至相对密度 1.15 ~ 1.25 (60 ~ 80 °C), 85% 乙醇沉淀, 回收乙醇至相对密度 1.25 (60 ~ 80 °C)。结论: 优选的提取、纯化工艺稳定可行, 为中药乳腺康注射液的制备提供参考。

[关键词] 乳腺康注射液; 橙皮苷; 总黄酮; 正交试验; 总含固量; 醇沉工艺; 甘草; 蒲公英; 青皮

[中图分类号] R283.6; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0022-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1502.005.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:02

Optimization of Preparation Technology for Intermediates of Ruxiankang Injections

LIU Tao¹, YOU Li-ling¹, LIU Ying-wu¹, LIU Ting¹, LI Juan², WU Li-hua³, XU Yu-ling^{4*}

(1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China;
2. Nanjing Hailing Pharmaceutical Technology Research for Chinese Traditional Medicine Co. Ltd, Nanjing 210049, China; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;
4. Experiment Technology Center of Chengdu University, Chengdu 610106, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of intermediates of Ruxiankang injections.

Method: With composite score of contents of total solids and hesperidin as index, orthogonal test and single factor test were adopted to investigate effects of extracting time, extraction times, ethanol concentration and amount on technology of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Citri Reticulatae Pericarpium Viride. Taking contents of total flavonoids and solids as comprehensive evaluation index, effects of the amount of water, extracting time and times on extraction process of Taraxaci Herba was investigated by orthogonal test, single factor test was adopted to optimize alcohol precipitation process. HPLC was employed to determine the content of hesperidin with mobile phase of methanol-water (50:50) and detection wavelength at 284 nm. **Result:** Optimum extraction technology of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Citri Reticulatae Pericarpium Viride was as following: extracted 3 times with 6 times the amount of 60% ethanol for 2 h each time. Optimum extraction process of Taraxaci Herba was adding 16

[收稿日期] 20131015(002)

[基金项目] 四川省卫生厅科研项目(130405)

[第一作者] 刘涛, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价研究, Tel:028-61302236, E-mail:liutao0578@sina.com

[通讯作者] * 徐玉玲, 高级工程师, 从事中成药质量研究, Tel:028-61302236, E-mail:xuyuling@cd.edu.cn

times the amount of water for soaking 0.5 h, extracted 3 times with 0.5 h for each time. Extract was concentrated under vacuum to a relative density of 1.15-1.25 (60-80 °C), added 95% ethanol slowly to ethanol amount of 85%, recovered ethanol to a relative density of 1.25 (60-80 °C). **Conclusion:** These optimized processes were stable and feasible, it could provide a reference for preparation of Ruxiankang injections.

[**Key words**] Ruxiankang injections; hesperidin; total flavonoids; orthogonal test; total solids content; alcohol precipitation; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; *Taraxaci Herba*; *Citri Reticulatae Pericarpium Viride*

乳腺康注射液源自临床经验方,由青皮、甘草及蒲公英组成,具有清热解毒、活血化瘀散结、消肿下乳等功效。调查发现临床型乳房炎会造成奶产量的降低,乳品质的改变,甚至导致泌乳机能的丧失,食用一些含有病原菌的牛奶会直接危害到人体健康^[1-2]。奶牛乳腺炎的常用治疗方法为注射或服用抗生素类药物,但这类药物易产生耐药性,且会在奶牛体内产生药物残留。而中药不易使致病菌产生耐药性,体内代谢较快,高效低毒无残留,能从根本上治疗乳腺炎^[3]。故本实验拟通过优选乳腺康注射液中间体的制备工艺,为奶牛乳腺炎提供一种有效的治疗方式。

1 材料

DZF-6050 型真空干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司生产),FA2004 型分析电子天平(上海良平仪器仪表有限公司生产),P230II 型高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司),UV-1100D 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)。

蒲公英、甘草、青皮药材均购自四川省中药饮片有限责任公司,经刘涛研究员鉴定分别为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz. 的干燥全草,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根或根茎,芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥幼果或未成熟果实的果皮;橙皮苷、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110721-200512,100080-200707),甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 橙皮苷的含量测定

2.1.1 色谱条件^[4] SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 甲醇-水(50:50),检测波长 284 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取橙皮苷对照品 3 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声使溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取提取液适量滤过,精

密度取续滤液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 青皮、甘草提取工艺优选^[5]

2.2.1 乙醇体积分数考察 称取青皮、甘草药材各 50 g,共 3 份,分别加 60%,70%,80% 的乙醇 800 mL 回流提取 3 次,提取时间依次为 1,1,0.5 h,合并提取液,冷却至室温,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果分别为橙皮苷质量 1 189.48,1 130.68,1 116.83 mg,总含固量 29.04,27.97,24.41 g,故选择 60% 乙醇为提取溶媒。

2.2.2 正交试验 在单因素试验基础上,选择乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素,每个因素设定 3 个水平,因素水平见表 1。称取青皮、甘草药材各 100 g,共 9 份,采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验设计,以总含固量和橙皮苷含量的综合评分为指标,权重系数分别为 0.3,0.7,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 青皮、甘草混合提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量/倍	B 提取时间/min	C 提取次数/次
1	6	60	1
2	8	90	2
3	10	120	3

由直观分析可知,各因素对提取效果的影响程度依次为 C > B > A。方差分析表明各因素均对提取工艺无显著性影响,结合生产成本考虑,选择最佳提取工艺组合 A₁B₃C₃,即加 6 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 2 h。

2.2.3 验证试验 按 1:1 称取青皮、甘草药材各 3 份,每份质量分别为 100,50,100 g,按最佳提取工艺进行验证试验,结果橙皮苷质量分别为 3 377.47,1 518.09,3 469.46 mg,总含固量依次为 60.92,29.93,61.12 g,说明优选的提取工艺较稳定。

2.3 总黄酮的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密移取已配制好的 1.163 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液 2.5 mL 于 25 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得。

表 2 青皮、甘草混合提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总含固量/g	橙皮苷/mg	综合评分
1	1	1	1	1	16.732	1 033.513	50.25
2	1	2	2	2	25.773	1 680.389	80.20
3	1	3	3	3	28.696	2 208.555	100.00
4	2	1	2	3	25.467	1 631.829	78.35
5	2	2	3	1	28.460	1 760.209	85.54
6	2	3	1	2	22.738	1 418.425	68.73
7	3	1	3	2	28.087	1 680.695	82.63
8	3	2	1	3	21.160	1 216.086	60.67
9	3	3	2	1	27.832	1 662.131	81.78
K_1	230.454	211.228	179.644	217.571			
K_2	232.617	226.413	240.327	231.566			
K_3	225.076	250.506	268.176	239.011			
R	7.540	39.278	88.532	21.441			

表 3 青皮、甘草混合提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	10.044	2	5.022	0.127	>0.05
B	261.573	2	130.787	3.309	>0.05
C	1 726.017	2	863.009	18.398	>0.05
D(误差)	79.053	2	39.526	1.000	

注： $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表 6 同)。

表 4 蒲公英提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/min	C 提取次数/次
1	16	30	1
2	20	60	2
3	24	90	3

由直观分析可知,各因素对提取效果的影响程度为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 对提取工艺的影响显著,因素 A, B 则无显著性影响,结合生产成本考虑,确定最优提取工艺组合 $A_1B_1C_3$,即加 16 倍量水浸泡 0.5 h 后提取 3 次,每次 0.5 h。

2.4.2 验证试验 称取蒲公英药材 5 份,每份质量分别为 100, 100, 100, 200, 200 g,按最佳提取工艺进行验证试验,结果总黄酮质量分别为 2.888, 2.988, 2.799, 5.763, 5.981 g,总含固量依次为 31.37, 30.16, 30.33, 56.51, 54.38 g,表明该工艺较稳定。

2.4.3 精制工艺考察^[9-10]

2.4.3.1 供试品溶液的制备 将蒲公英提取液减压浓缩至相对密度 1.15 ~ 1.25 (60 ~ 80 °C)^[10],称取一定量浓缩液,共 3 份,缓慢加入 95% 乙醇,使含醇量分别为 85%, 75%, 65%,静置过夜,滤过,分别精密移取滤液 2 mL 于 100 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得。

2.4.3.2 除杂率测定 精密称取一定量浓缩液和各供试品溶液 100 mL,分别置于恒重后的蒸发皿中,于水浴锅上蒸至近干,置烘箱中于 105 °C 干燥 3 h,取出,冷至室温后迅速称量,计算除杂率,结果见表 7,表明醇沉浓度为 85% 时除杂率最高。

2.3.2 供试品溶液的制备 取提取液适量,滤过,精密量取续滤液 5 mL 于 100 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 标准曲线的制备^[6] 精密量取芦丁对照品溶液 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加入 5% NaNO_2 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min;加入 10% AlCl_3 溶液 0.4 mL,摇匀,放置 6 min;加入 4% NaOH 溶液 4 mL,加水稀释至刻度,摇匀,放置 15 min。以加了相应显色剂的水为空白,于 510 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 11.612C + 0.0075$ ($R^2 = 0.9997$),线性范围 0.005 ~ 0.050 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 蒲公英中间体的制备

2.4.1 提取工艺优选^[7-8] 查阅相关文献,综合生产成本等考虑,选择水为提取溶剂,以加水量、提取时间及提取次数为考察因素,每个因素设定 3 个水平,因素水平见表 4。在预试验基础上,称取蒲公英药材 100 g,共 9 份,加水浸泡 0.5 h,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以总含固量和总黄酮质量的综合评分为指标,权重分别为 0.3 和 0.7,试验安排及结果见表 5,方差分析见表 6。

表5 蒲公英提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总含固量/g	总黄酮/g	综合评分
1	1	1	1	1	21.042	2.675	61.75
2	1	2	2	2	27.596	3.593	82.39
3	1	3	3	3	34.086	3.650	88.72
4	2	1	2	3	26.075	3.525	80.02
5	2	2	3	1	36.203	3.951	95.45
6	2	3	1	2	23.553	2.990	69.06
7	3	1	3	2	34.699	3.873	92.91
8	3	2	1	3	25.497	2.904	69.25
9	3	3	2	1	36.239	4.223	100.00
K_1	232.86	234.68	200.06	257.20			
K_2	244.53	247.09	262.41	244.36			
K_3	262.16	257.78	277.08	237.99			
R	29.30	23.10	77.02	19.21			

表6 蒲公英提取工艺方差分析

变异来源	SS	f	MS	F	P
A	145.055	2	72.528	2.273	>0.05
B	89.099	2	44.550	1.396	>0.05
C	1426.154	2	713.077	22.343	<0.05
D(误差)	63.830	2	31.915	1.000	

表7 蒲公英醇沉工艺含醇量考察

浓缩液 /g	醇沉浓度 /%	醇沉液总黄酮 质量/g	醇沉液总 含固量/g	除杂率 /%
120.0	65	1.490	12.957	64.75
129.6	75	1.403	12.281	69.06
120.0	85	1.501	10.681	70.94

2.4.3.3 总黄酮转移率的测定 精密称取一定量浓缩液2份,分别置于100 mL量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,精密移取20 mL至100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,按2.3项下方法测定总黄酮含量。同法测定各供试品溶液总黄酮含量,结果见表7,表明醇沉乙醇体积分数为85%时总黄酮转移率最高。

2.4.3.4 验证试验 取蒲公英提取液的浓缩液3份,每份85 g,缓慢加入95%乙醇至含醇量85%,静置过夜,滤过,计算总黄酮质量分别为1.098,0.889,0.930 g,除杂率73.49%,72.79%,74.49%。

2.4.4 浓缩工艺考察 取蒲公英醇沉上清液,等分为3份,分别减压浓缩至相对密度1.15,1.25,1.35(60~80℃),按2.3项下方法测定总黄酮转移率分别为90.25%,91.79%,90.56%,说明无显著性差异,但药液相对密度过低作为中间体不易保存,过高则会造成贮运过程中浸膏损失较大,结合生产实际

考虑,故选择将药液浓缩至相对密度1.15。

3 讨论

采用中药兽药注射液治疗动物疾病具有一定的优势,本方依据中医经典名著《外台秘要》中经方化裁而来,对奶牛乳腺炎具有较好的疗效。蒲公英醇沉工艺验证试验与单因素试验中数据存在部分差异,这可能是由醇沉过程中加入乙醇时流速和搅拌速度不同造成的。

[参考文献]

- [1] 袁永隆,张礼华,刘纯传,等.我国奶牛乳房炎常见病原菌的区系调查[J].中国农业科学,1992(4):70.
- [2] 郭志凯,邓常胜,卢永跃,等.奶牛乳房炎病原菌的分离鉴定及药敏试验[J].畜牧与饲料科学,2012,33(10):114.
- [3] 易湘蓉,李娜,刘毅,等.中草药防治奶牛乳房炎的研究综述[J].上海畜牧兽医通讯,2005(4):2.
- [4] 许栋明,程可建. RP-HPLC同时测定温阳汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸[J].中国中药杂志,2011,36(1):45.
- [5] 方芳,宋英,李圆圆,等.正交试验优选糖郁舒颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(3):24.
- [6] 张咏梅,张淑慧,王朝卿,等.不同产地蒲公英中总黄酮的测定[J].中草药,2009,40(增刊):169.
- [7] 金京玲,金南革,金永日,等.蒲公英总黄酮含量测定[J].延边大学医学学报,2001,24(2):100.
- [8] 梁引库,徐仲阳.巨大型蒲公英黄酮提取工艺研究[J].安徽农业科学,2009,37(30):14881.
- [9] 郝艳霜,魏军,李树鹏.藏蒲公英与河北蒲公英多糖的比较[J].江苏农业科学,2012,40(7):286.
- [10] 赵美瑾,许莉,关魏岱,等.中药蒲公英提取工艺研究[J].中国当代医药,2009,16(19):30.

[责任编辑 刘德文]