

正交试验优选复方牛黄胶囊的提取工艺

陈菲¹, 龙海林², 雷海民³, 李强^{3*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选复方牛黄胶囊的提取工艺。方法: 采用UV测定总皂苷含量, 检测波长分别为560, 545 nm。以总皂苷质量为评价指标, 选择加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选复方牛黄胶囊的水提工艺; 选择乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选醇提工艺。结果: 最佳水提条件为加10倍量水浸泡0.5 h, 煎煮3次, 每次2 h; 最佳醇提工艺为加8倍量70%乙醇煎煮3次, 每次2 h。结论: 优化的提取工艺稳定可行, 为复方牛黄胶囊的临床推广提供实验依据。

[关键词] 复方牛黄胶囊; 总皂苷; 黄芪甲苷; 人参皂苷 Rg₁

[中图分类号] R283.6; R944.5; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0028-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190028

Optimization of Extraction Process of Compound Niu Huang Capsules

CHEN Fei¹, LONG Hai-lin², LEI Hai-min³, LI Qiang^{3*}

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of compound Niu Huang capsules. **Method:** UV

[收稿日期] 20140224(020)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(30701083); 教育部博士点新教师基金项目(20070026021); 北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-15)

[第一作者] 陈菲, 在职硕士, 主管药师, 从事中药化学物质研究, Tel: 010-84013412, E-mail: feiluo520@sina.com

[通讯作者] *李强, 教授, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 010-84738640, E-mail: lq_cn@126.com

- [6] 前田利男. 半夏具有糖皮质激素样作用[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1988, 10(2): 48.
- [7] 王浴生, 邓文龙, 薛春生, 等. 中药药理与应用[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 395.
- [8] 杨守业, 叶文华, 吴子伦, 等. 半夏炮制前后对小白鼠急性、亚急性和蓄积性毒性的研究[J]. 中成药, 1988(7): 18.
- [9] 杨守业, 何民, 王来苏, 等. 半夏对大白鼠妊娠及胚胎的毒性研究[J]. 中西医结合杂志, 1989, 9(8): 481.
- [10] 吴皓, 钟凌云, 李伟, 等. 半夏炮制解毒机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1402.
- [11] 吴皓, 李伟, 韩洪涛, 等. 半夏刺激性成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(12): 725.
- [12] 张科卫, 吴皓, 沈绣红. 半夏中总游离有机酸的作用研究[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2001, 17(3): 159.
- [13] 李国亮. 半夏的毒性及临床应用[J]. 中草药, 1999, 14(2): 156.
- [14] 李超荆, 徐亚铭, 孙月丽, 等. 掌叶半夏抗子宫颈癌成分的研究 II. β -谷甾醇的分离、鉴定及疗效观察[J]. 上海第一医学院学报, 1981, 8(6): 421.

[责任编辑 刘德文]

was employed to determine the content of total saponins with detection wavelength at 560 nm and 545 nm. Taking quality of total saponins as index, orthogonal test was adopted to optimize water extraction process with the amount of water, soaking time, extraction time and times as factors; the same method was used to investigate effects of ethanol concentration, ethanol amount, extraction time and times on alcohol extraction process. **Result:** The best water extraction process was: soaked 0.5 h with 10 times the amount of water, decocted two hours for three times; optimum alcohol extraction process was as following: decocted thrice with 8 times the amount of 70% ethanol for 2 h each time. **Conclusion:** These extraction process is stable and feasible, this study can provide an experimental basis for clinical application of compound Niuhuang capsules.

[**Key words**] compound Niuhuang capsules; total saponins; astragaloside; ginsenosides Rg₁

复方牛黄胶囊由牛黄丸经剂型改进而得,由牛黄^[1]、麝香^[2]、黄芪^[3]、乳香^[4]、没药^[5]、重楼^[6]、三七^[7]组成,具有镇静、抗惊厥、抗肿瘤等作用。由于该复方的药味繁多,成分复杂,有必要在生产前考察该方的提取工艺,充分提取各药味的有效成分,使生产的复方制剂达到最佳疗效。本实验以复方牛黄胶囊中主要成分——总皂苷为评价指标,通过正交试验优选提取工艺条件,为该制剂的质量评价体系建立提供参考。

1 材料

752型紫外-可见分光光度计(上海棱光),UV-VIS8500型紫外分光光度计(上海天美)。黄芪、重楼、乳香、没药、三七药材由东直门医院药房提供,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定,分别为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge., 百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 的干燥根茎,橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw. 树皮渗出的树脂,橄榄科植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl. 的干燥树脂,五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。黄芪甲苷、人参皂苷 Rg₁ 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为0781-9505,703-8903),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 干膏收率测定 将提取浓缩液分别置于已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣于105℃干燥3h,取出,置于干燥器中放置30min,称定质量,计算干膏收率。

2.2 黄芪、重楼水提工艺优选

2.2.1 总皂苷的含量测定^[8] 精密称取样品5.0mg,加甲醇溶解并定容至10mL。精密量取3mL至10mL量瓶中,置于干燥器中挥去溶剂,加入5%香草醛冰醋酸溶液0.20mL和高氯酸

0.80mL,密塞,于70℃水浴恒温加热20min,取出立即冰水浴冷却5min,加入冰乙酸5.0mL,摇匀,随行阴性空白对照,于560nm处测定吸光度(A),计算总皂苷含量。

2.2.2 线性关系考察 精密称取于105℃干燥至恒重的黄芪甲苷对照品1.9g,加甲醇定容至5mL量瓶中。精密吸取该对照品溶液0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6mL,分别置于具塞试管中,按**2.2.1**项下方法于560nm处测定A,以A为纵坐标,黄芪甲苷质量为横坐标,得回归方程 $Y = 2.807X - 0.015$ ($r = 0.9998$),线性范围0.04~0.23mg。

2.2.3 精密度考察 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液0.20mL置于具塞试管中,按**2.2.1**项下方法于560nm处测定A,连续测定6次,计算RSD 2.91%,表明本法精密度良好。

2.2.4 稳定性考察 取同一样品溶液,分别于配制后0,4,8,12,16,24h按**2.2.1**项下方法测定A,计算RSD 1.25%,表明样品溶液在24h内稳定。

2.2.5 重复性考察 取同一样品溶液6份,按**2.2.1**项下方法于560nm处测定A,计算RSD 2.29%,表明本方法重复性良好。

2.2.6 回收率试验 精密称取已知含量的同一样品6份,每份约5mg,各加入一定量黄芪甲苷对照品,按**2.2.1**项下方法于560nm处测定A,计算总皂苷含量,结果见表1,表明该方法回收率良好。

表1 黄芪、重楼水提液中黄芪甲苷回收率试验

No.	称样量 /mg	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5.01	0.393	0.390	0.780	99.23	99.48	2.69
2	5.05	0.396	0.391	0.783	98.98		
3	4.95	0.388	0.385	0.760	96.62		
4	5.10	0.400	0.398	0.810	104.59		
5	5.02	0.394	0.392	0.781	98.72		
6	5.08	0.398	0.395	0.788	98.73		

2.2.7 正交试验 按处方比例称取黄芪饮片 84 g 和重楼饮片 29.4 g, 加 1 L 水浸泡至透心, 滤过, 测得吸水率 226%。以总皂苷提取量为评价指标, 选择加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 取日处方量 20 倍(黄芪 84 g, 重楼 29.4 g)的药材, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行水提(第 1 次加水时, 按药材吸水率 226% 补加水 256 mL), 药液用 300 目滤布滤过, 精密量取滤液 100 mL 浓缩并蒸干, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 复方牛黄胶囊中黄芪、重楼水提工艺
正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 浸泡时间 /h	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	总皂苷 /g
1	8	0.5	1.0	1	1.949
2	8	1.0	1.5	2	2.375
3	8	1.5	2.0	3	2.720
4	10	0.5	1.5	3	2.774
5	10	1.0	2.0	1	2.105
6	10	1.5	1.0	2	2.168
7	12	0.5	2.0	2	2.539
8	12	1.0	1.0	3	2.705
9	12	1.5	1.5	1	1.919
K_1	7.044	7.262	6.823	5.973	
K_2	7.047	7.184	7.067	7.082	
K_3	7.163	6.807	7.364	8.198	
R	0.001	0.152	0.180	0.742	

表 3 水提工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A(误差)	0.003	0.002		
B	0.040	0.020	12.683	>0.05
C	0.049	0.025	15.731	>0.05
D	0.826	0.413	265.399	<0.01

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$, 表 6 同。

由直观分析可知, 影响水提效果的因素顺序为 $D > C > B > A$ 。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析, 结果发现因素 D 具有极显著性影响, 为降低能耗, 选择最佳组合 $A_2B_1C_3D_3$, 即加 10 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 3 次, 每次 2 h。

2.3 三七、乳香、没药醇提工艺优选

2.3.1 样品测定^[9] 精密称取干膏粉 0.2 g, 加甲

醇溶解并定容至 100 mL, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 置于干燥器中挥去溶剂, 加入 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.20 和高氯酸 0.80 mL, 密塞, 于 60 °C 水浴恒温加热 20 min, 取出立即冰水浴冷却 5 min, 加入冰乙酸 5.00 mL, 摇匀, 随行阴性空白对照, 于 545 nm 处测定吸光度(A), 计算总皂苷含量。

2.3.2 线性关系考察 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的人参皂苷 R_{g_1} 对照品 2.840 mg, 加甲醇定容至 5 mL 量瓶中, 精密吸取该对照品溶液 0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.26, 0.28 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 按 2.3.1 项下方法于 545 nm 处测定 A, 以 A 为纵坐标, 对照品质量为横坐标, 得回归方程 $Y = 6.859X - 0.149 (r = 0.9995)$, 线性范围 0.068 ~ 0.16 mg。

2.3.3 精密度试验 精密吸取人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液 0.20 mL, 置于具塞试管中, 按 2.3.1 项下方法测定 A, 连续测定 6 次, 计算 RSD 2.45%, 表明本法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一样品溶液, 分别于配制后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.3.1 项下方法测定 A, 计算 RSD 2.25%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一样品溶液 6 份, 按 2.3.1 项下方法测定 A, 计算 RSD 1.72%, 表明本法重复性良好。

2.3.6 回收率试验 取已知含量的同一批号样品 6 份, 每份约 20 mg, 各加入一定量人参皂苷 R_{g_1} 对照品, 按 2.3.1 项下方法测定 A, 计算加样回收率, 结果见表 4, 表明该方法回收率良好。

表 4 三七、乳香、没药醇提液中人参皂苷 R_{g_1} 回收率试验

No.	称样量 /mg	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	20.03	2.41	2.02	4.35	96.04		
2	20.10	2.38	2.10	4.40	96.19		
3	19.95	2.37	1.98	4.44	104.55	97.96	3.47
4	19.98	2.37	2.04	4.38	98.53		
5	20.05	2.38	2.00	4.29	95.50		
6	20.00	2.37	1.95	4.26	96.92		

2.3.7 正交试验考察 选择乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素, 每个因素取 3 个水平, 取本方日服用量 20 倍的药材(三七 84 g, 乳香 58.8 g, 没药 58.8 g), 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 提取液用 300 目滤布滤过, 取滤液 200 mL 浓缩

并蒸干,测定总皂苷含量,试验安排及结果见表5,方差分析见表6。

表5 复方牛黄胶囊中三七、乳香、没药醇提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	总皂苷 /g
1	50	6	1	1	0.899
2	50	8	1.5	2	1.157
3	50	10	2	3	1.407
4	60	6	1.5	3	1.836
5	60	8	2	1	1.390
6	60	10	1	2	1.635
7	70	6	2	2	1.990
8	70	8	1	3	1.749
9	70	10	1.5	1	1.150
K_1	3.463	4.729	4.283	3.438	
K_2	4.861	4.297	4.143	4.785	
K_3	4.892	4.191	4.790	4.992	
R	0.466	0.179	0.216	0.518	

表6 醇提工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.444	0.222	8.210	>0.05
B(误差)	0.054	0.027		
C	0.077	0.039	1.426	>0.05
D	0.475	0.237	8.771	>0.05

由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为 $D > A > C > B$ 。以极差最小的B因素为误差项进行方差分析,结果发现各因素对提取效果均无显著性影响,结合生产成本考虑,选择 $A_3B_2C_3D_3$,即加8倍量70%乙醇煎煮3次,每次2h。

3 讨论

复方制剂原药材繁多,化学成分复杂,有效成分

的提取效率严重影响药物的疗效,故在生产复方制剂前,筛选最佳提取工艺很有必要。本文采取拆方的方法优化提取工艺,根据复方中药材化学成分性质分别考察提取工艺,达到最佳提取率。黄芪、重楼主要成分皂苷类易溶于水,故采用水提;三七、乳香、没药主要成分三七皂苷、挥发油等溶于乙醇,故采用醇提取。以方中臣药黄芪,三七主要成分黄芪甲苷、人参皂苷 R_{g_1} 为对照品,测定总皂苷含量作为提取工艺优劣的评价指标,采用正交试验确定复方的最佳提取工艺,为复方牛黄胶囊的临床推广提供参考。

[参考文献]

- [1] 赵艳红,阮金秀.牛黄及其代用品的药理作用及临床应用[J].军事医学科学院院刊,2007,31(2):175.
- [2] 巩海涛,王雁群,贺广彬,等.麝香药理及代用品的研究近况[J].山东医药工业,2002,21(1):26.
- [3] 李燕玉,徐丽梅,刘又宁.黄芪的药理作用及其在呼吸系统疾病中的应用[J].空军总医院学报,2007,23(2):99.
- [4] 李亮,屈彩琴,周昆.乳香没药的临床不良反应及其毒性研究[J].毒理学杂志,2008,22(6):495.
- [5] 陈建,朱莉,韩金声,等.乳香没药加工经验谈[J].中国中药杂志,2000,25(9):573.
- [6] 张彦军,高文远,王羽,等.滇重楼的抗肿瘤活性成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(14):1425.
- [7] 周家明,曾江,崔秀明,等.三七根茎的化学成分研究I[J].中国中药杂志,2007,32(4):349.
- [8] 殷放宙,李林,李伟东,等.多指标正交法优选盐制补骨脂饮片的炮制工艺[J].中国中药杂志,2013,38(3):346.
- [9] 张德全,马阿丽,杨永寿,等.HPLC测定不同产地滇牡丹中没食子酸和丹皮酚含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):57.

[责任编辑 刘德文]

欢迎投稿

欢迎订阅