

清脑复神液提取工艺再评价

伍利华¹, 黄英², 刘婷³, 聂忠莉³, 徐玉玲⁴, 邹鹏³, 刘涛^{3*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 四川新中方医药科技股份有限公司, 四川 广元 628000;
3. 成都大学, 成都 610106; 4. 南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**对清脑复神液提取工艺进行再评价研究,为改进该制剂的生产工业提供实验依据。**方法:**采用 HPLC 测定黄芩苷含量,流动相甲醇-0.37% 磷酸(47:53),检测波长 280 nm。以干膏量和黄芩苷提取量的综合评分为指标,通过正交试验考察溶媒用量、渗漉速度、乙醇体积分数对清脑复神液渗漉工艺的影响,利用紫外全波长扫描、近红外扫描和红外扫描比较不同提取液的理化性质。**结果:**最佳提取工艺为加 8 倍量 40% 乙醇于 2.27 mL·min⁻¹·kg⁻¹ 渗漉;黄芩苷提取量分别为 31.23 mg,干膏量 21.64 g。渗漉法与浸渍法所得药液的干膏量及紫外全波长扫描、近红外扫描、红外扫描图谱均基本一致。**结论:**清脑复神液的渗漉工艺与原浸渍工艺提取的有效成分基本一致,可用渗漉工艺替代浸渍工艺。

[关键词] 清脑复神液; 浸渍法; 渗漉法; 黄芩苷

[中图分类号] R283.6;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2015010010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141113.1436.001.html>

[网络出版时间] 2014-11-13 14:36

Re-evaluation on Extraction Process of Qingnao Fushen Liquids WU Li-hua¹, HUANG Ying², LIU Ting³, NIE Zhong-li³, XU Yu-ling⁴, ZOU Peng³, LIU Tao^{3*} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Sichuan Xinzhongfang Pharmaceutical Technologies Co. Ltd., Guangyuan 628000, China; 3. Chengdu University, Chengdu 610106, China; 4. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study on re-evaluation of extraction process of Qingnao Fushen liquids, to provide experimental basis for improving industrial production of this preparation. **Method:** Determination of baicalin by HPLC, mobile phase of methanol-0.37% phosphoric acid (47:53), detection wavelength of 280 nm. Taking composite score of amounts of dry extract and baicalin as indexes, orthogonal test was adopted to optimize percolation process with the amount of solvent, percolation velocity, ethanol concentration as factors. Physical and chemical properties of different extracts were compared through ultraviolet scanning, near infrared scanning and infrared scanning. **Result:** Optimum extraction condition was as following: percolated by 8 times the amount of 40% ethanol at 2.27 mL·min⁻¹·kg⁻¹; amounts of dry extract and baicalin were 21.64 g and 31.23 mg. Ultraviolet full wavelength scanning, near infrared scanning, infrared scanning and dry extract amount of percolate and immersion fluid were most the same. **Conclusion:** Effective ingredients extracted from these two kinds of extraction process are all most the same, so percolation process can substitute immersion method.

[Key words] Qingnao Fushen liquids; immersion method; percolation; baicalin

清脑复神液收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第9册,由人参、黄芪、当归、鹿茸、菊花、薄荷、柴胡、决明子等48味中药组成,具有清心安神、

化痰醒脑、活血通络的功效,临床用于治疗脑震荡后遗症所致头痛、眩晕、健忘、失眠等。清脑复神液现用提取工艺为取48味药材,粉碎成粗粉,加入白酒

[收稿日期] 20140408(007)

[基金项目] 四川省经信委创新能力提升专项(2013NL021)

[第一作者] 伍利华,在读硕士,从事中药药剂学研究,Tel:13257789769,E-mail:wulihua6368@sina.com

[通讯作者] *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

适量,密闭,浸泡30 d,滤过,药渣压榨……;该工艺未明确提取溶媒浓度及用量等参数,虽然浸泡法操作较简单,但存在提取时间过长、占用大量提取设备、不容易操作等缺点,故拟对其进行再评价研究。渗漉法是将适度粉碎的药材置渗漉筒中,由上部不断添加溶剂,溶剂渗过药材层向下流动过程中浸出药材成分的方法,具有操作安全、节能降耗、可减少成分的破坏等优点^[1]。王永炎等^[2]指出药物上市后再评价是药品研究的一个重要环节,是确保用药安全有效的有效手段,也是对新药评价的扩大和延伸。故本实验基于药学再评价理论^[3]对清脑复神液的提取工艺进行再评价,并与原工艺药液进行理化性质的比较,为该制剂的工业生产提供参考。

1 材料

PE spectrum 2型红外扫描仪,UV-2003型紫外扫描仪,Luminar 5030型AOTF近红外光谱仪均购自美国Brimrose公司;BS-6KH型电子天平(上海友声衡器有限公司),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),DZF-0050A型真空干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司)。人参、黄芪、当归药材均购自成都市荷花池中药材市场,经成都大学刘涛研究员检定均符合2010年版《中国药典》相关项下要求;黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号10715-200212),甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

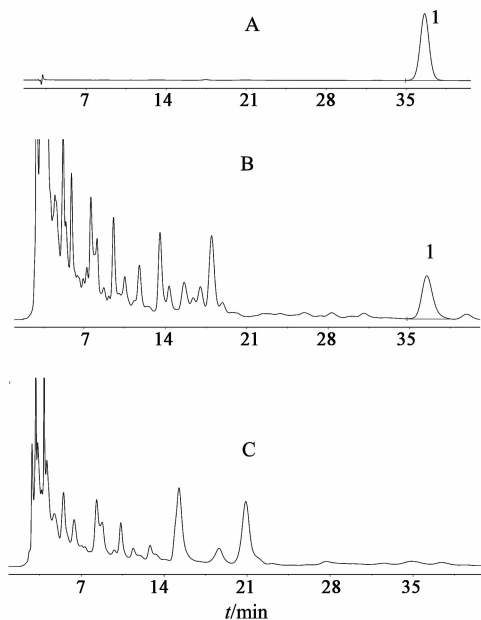
2.1 黄芩苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.37%磷酸(47:53),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长280 nm,进样量10 μL,见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取适量黄芩苷对照品,加甲醇溶解并稀释定容,摇匀,制成0.0567 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取药材粗粉约110 g,置渗漉筒中,按一定条件渗漉提取,收集渗漉液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取黄芩苷对照品溶液5, 10, 15, 20, 25, 30 μL,按2.1.1项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 143.8X + 20.59$ ($r = 0.9990$),线性范围0.2835 ~ 1.701 μg。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 黄芩苷

图1 清脑复神液 HPLC

Fig. 1 HPLC of Qingnao Fushen liquids

2.1.5 精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液10 μL,按2.1.1项下色谱条件重复进样6次,计算黄芩苷峰面积的RSD 0.3%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于0, 2, 4, 6, 8, 12 h按2.1.1项下色谱条件测定,计算黄芩苷峰面积的RSD 2.6%,表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 按处方比例称取药材粗粉共6份,每份约110 g,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,计算黄芩苷峰面积的RSD 3.4%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知黄芩苷质量(0.075 mg)的同一批样品5 mL,平行6份,各精密加入黄芩苷对照品溶液5 mL(0.2835 mg),摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按2.1.1项下色谱条件测定,结果测得量分别为0.371, 0.367, 0.355, 0.358, 0.357, 0.358 mg,计算平均回收率100.92%,RSD 2.3%,说明本方法回收率良好。

2.2 正交试验 在预试验基础上,选取溶媒用量、渗漉速度、乙醇体积分数为考察因素,以黄芩苷提取量和干膏量的综合评分为指标,权重系数分别为0.7, 0.3。按处方比例称取全方药材约110 g,共9份,按L₉(3⁴)正交表安排试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。由直观分析可知,各因素对提

取工艺的影响顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A 具有显著性影响,其他因素则均影响不显著,故

选择最佳提取工艺条件 $A_3B_2C_3$,即加 8 倍量 40% 乙醇于 $15 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ($2.27 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) 渗漉。

表 1 清脑复神液提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of Qingnao Fushen liquids

No.	A 溶媒用量/倍	B 流速/ $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	C 乙醇体积分数/%	D(空白)	干膏量/g	黄芩苷/mg	综合评分
1	4	10	15	1	16.33	7.46	39.26
2	4	15	25	2	14.07	13.42	49.82
3	4	20	40	3	14.28	13.53	49.95
4	6	10	25	3	17.42	9.77	46.05
5	6	15	40	1	17.36	15.38	58.90
6	6	20	15	2	19.07	8.85	46.16
7	8	10	40	2	21.71	30.38	99.34
8	8	15	15	3	22.20	22.48	80.95
9	8	20	25	1	20.80	18.73	71.26

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	2 544.095	1 272.048	27.902	<0.05
B	91.178	45.589	1.00	>0.05
C	423.345	211.673	4.643	>0.05
D(误差)	118.289	59.144		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.3 验证试验 按处方比例称取原药材粗粉共 3 份,每份约 110 g,加入 40% 乙醇 880 mL 浸泡 2 h,按优选的工艺条件开始渗漉,收集渗漉液,按 2.1.1 项下方法测得黄芩苷质量分别为 31.45, 30.98, 31.26 mg,干膏量依次为 21.98, 22.05, 20.88 g,说明本工艺稳定可行。

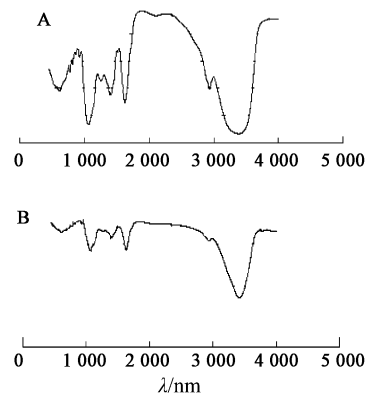
2.4 渗漉工艺药液与原工艺药液性质比较

2.4.1 样品的制备 称取处方量药材,共 218.95 g,混合均匀,置于圆底烧瓶中,加入 40% 乙醇按原工艺浸泡 30 d,收集药液,得药液 698 mL,备用。称取处方量药材,共 218.95 g,按优选的工艺条件渗漉,收集渗漉液。取以上 2 种药液,用 40% 乙醇调节药液体积,使二者体积一致。

2.4.2 干膏量的测定 取浸渍液、渗漉液各 100 mL 置于蒸发皿中,水浴蒸干,于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温干燥 3 h,置于干燥器中冷却 30 min,迅速称定质量,计算干膏量分别为 6.385, 6.275 g,表明 2 种工艺提取的药液中干膏量差别不大。

2.4.3 红外全波长扫描 取 2.4.1 项下药液各 1 滴,置于玛瑙研钵中,挥干,加入适量干燥溴化钾粉

末,充分研磨,转入合适的模具中,使之分布均匀,于 15 Pa 压成透明薄片。红外扫描仪预热 30 min,以空气为空白扣除背景,测定药液的红外扫描曲线。结果显示 2 种药液的峰型基本一致,表明浸渍法与渗漉法两种提取工艺的有效成分基本一致,见图 2。



A. 浸渍液; B. 渗漉液

图 2 清脑复神液不同工艺提取液 IR

Fig. 2 IR of different extracts of Qingnao Fushen liquids

2.4.4 紫外全波长扫描 将紫外全波长扫描仪器预热 30 min,设置波长 200 ~ 900 nm,以 40% 乙醇为参比建立基线,对 2.4.1 项下 2 种药液进行扫描。结果显示二者的紫外全波长扫描图谱峰型基本一致,表明浸泡法与渗漉法提取的有效成分基本一致。

2.4.5 近红外扫描 打开工作软件,设置扫描区间 1 200 ~ 2 200 nm,扫描数 32 次,对 2.4.1 项下 2 种药液进行扫描。结果发现二者的近红外扫描图谱峰型基本一致,表明浸泡法与渗漉法提取的有效成分基本一致。

3 讨论

运用最新中医药技术成果对中成药的安全性、有效性、经济学、质量等方面^[4]进行再评价研究,可降低其生产成本并提高其质量。工艺路线是中药生产工艺科学性、先进性和可行性的基础和核心^[5],确定合理的提取工艺至关重要。清脑复神液原工艺采用浸渍法,存在占用设备台次多、提取溶媒浓度不明确、生产不易操作等不足,故有必要对其提取工艺进行再评价研究。

渗漉属于动态浸出方法,溶剂利用率高、有效成分浸出完全,可直接收集浸出液。清脑复神液属于酒剂,浸渍法时间长,改用渗漉法可提高效率、节省时间和生产成本。影响中药渗漉提取的主要因素有溶媒倍量、渗漉速度、溶媒浓度等^[6-7],故本文选择溶媒用量、流速、溶媒浓度作为考察因素。

清脑复神液含有48味中药,有效成分种类较多。预试验发现部分有效成分的分离效果较差,部分有效成分由于原药材用量较少,峰面积较小,导致在计算过程中产生较大的误差。处方中黄芩的用量较大,且黄芩苷的分离效果比较好,故本文选择黄芩苷为指标成分。

中药指纹图谱的特点是能在同一波长下,使药物中更多的活性成分在此波长下被检测出来。清脑复神液含有48种药材,活性成分十分复杂,在同一波长下,很难被完全检测出来,且由于成分复杂众

多,导致对分离条件选择极为困难,结果重复性差,不能进行系统的定性分析。通过紫外、红外、近红外的扫描方法能检测到200~400,0~5 000,1 200~2 200 nm波长段活性成分的吸收曲线,能直观地与原工艺药液进行比较,结果表明2种工艺所得药液在紫外全波长扫描、近红外扫描、红外扫描的峰型及干膏量基本相同,但为了保证本工艺与原工艺的一致性,还需药效试验和毒理试验的确认。

[参考文献]

- [1] 闫光军,陈建,邵明杰. 渗漉法提取三七总皂苷的工艺研究[J]. 山东医药工业,2003,22(5):4-5.
- [2] 王忠,王永炎. 中药上市后临床再评价研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(1):84-86.
- [3] 刘涛,苟小军,郭晓恒,等. 基于中成药工艺与质量控制的再评价模式商建[J]. 中草药,2011,42(10):1873-1877.
- [4] 李连太,李贻奎,李峰杰. 中药临床再评价的特殊性[J]. 中国中药杂志,2014,39(1):3-4.
- [5] 国家药品审评中心. 中药、天然药物提取、纯化研究技术指导原则[S]. 2005:[Z]GPH2-1.
- [6] 胡钢银,史馨霞,吴光翠. 渗漉法提取枳壳的工艺研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(3):647-648.
- [7] 易跃能,杨华,赵勇,等. 渗漉法提取广枣中黄酮类成分的工艺研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(14):1806-1808.

[责任编辑 刘德文]