

贯叶金丝桃滴丸的提取工艺优选

曹广尚¹, 杨培民^{1*}, 李芳^{1,2}, 倪健³

(1. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355;
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 优选贯叶金丝桃滴丸的提取工艺, 为该制剂的剂型改制提供参考。方法: 利用药效学试验比较贯叶金丝桃滴丸水提物和醇提物对小鼠感染病毒肺指数的影响, 筛选提取方式。以金丝桃苷、绵马贯众素及黄芩苷提取量的综合评分为指标, 采用正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间及提取次数对贯叶金丝桃滴丸提取工艺的影响。采用 HPLC 测定金丝桃苷、绵马贯众素及黄芩苷含量, 流动相乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (15:85), 检测波长 280 nm。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h。金丝桃苷、绵马贯众素及黄芩苷提取量分别为 1.50, 74.57, 167.23 mg·g⁻¹。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 适用于贯叶金丝桃滴丸的工业化生产。

[关键词] 贯叶金丝桃滴丸; 肺指数; 抗流感病毒; 绵马贯众素

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0008-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040008

Optimization of Extraction Process of Hyperici Perforati Herba Dropping Pills CAO Guang-shang¹, YANG Pei-min^{1*}, LI Fang^{1,2}, NI Jian³ (1. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250011, China*; 2. *College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China*; 3. *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Hyperici Perforati Herba dropping pills.

Method: Effects of aqueous extract and alcohol extract of Hyperici Perforati Herba dropping pills on lung index of virus infection in mice were compared by pharmacodynamic trials, which was in order to select extraction method. Taking composite score of extracting amounts of hyperoside, dryocrassin and baicalin as index, effects of ethanol concentration, solvent volume, extracting times and time on extraction process were investigated by orthogonal design. HPLC was employed to determine contents of hyperoside, dryocrassin and baicalin with mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (15:85) and detection wavelength of 280 nm. **Result:** Optimum extraction process was refluxing extracted 3 times with 8 times the amount of 70% ethanol for 1.5 h each time. Extracting amounts of hyperoside, dryocrassin and baicalin were 1.50, 74.57, 167.23 mg·g⁻¹, respectively.

Conclusion: This optimized extraction technology is stable, feasible and suitable for industrial production of Hyperici Perforati Herba dropping pills.

[Key words] Hyperici Perforati Herba dropping pills; lung index; anti-influenza virus; dryocrassin

贯叶金丝桃滴丸处方为山东中医药大学附属医院名老中医临床验方, 由贯叶金丝桃、绵马贯众、黄芩组成, 具有清热、解毒、透表之功效, 主要用于治疗邪毒所致的感冒发烧、咽喉肿痛、流行性感冒见上述证候者, 临床应用多年, 疗效显著。原方以汤剂服用, 存在携带不便、易发霉等问题; 拟改制为贯叶金丝桃滴丸, 具有工艺周期短、生产率高、质量稳定、生

物利用度高等优势。现代药理研究表明该处方主要活性成分为金丝桃苷^[1-3]、绵马贯众素^[4-5]及黄芩苷^[6-7]等, 高体积分数乙醇对这些成分的提取率较好。但该方临床应用常以汤剂服用, 故本实验拟通过药效学试验比较水煎煮和醇提工艺对贯叶金丝桃滴丸治疗效果的影响, 以金丝桃苷、绵马贯众素和黄芩苷提取量为评价指标, 利用正交试验优选提取工

[收稿日期] 20140611(001)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-142); 山东省科技攻关计划项目(2012GGGB14018)

[第一作者] 曹广尚, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂及质量标准研究, Tel:0531-68617919, E-mail: cgs198041@126.com

[通讯作者] * 杨培民, 博士, 主任药师, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂研发研究, Tel:0531-68617607, E-mail: jnymp7777@126.com

艺,为该制剂的临床应用与开发提供参考。

1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), AB135-S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。贯叶金丝桃、绵马贯众、黄芩购自安徽沪淮中药饮片公司,经山东中医药大学附属医院马传江副主任药师鉴定分别为藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* 的干燥地上部分、鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* 的干燥根茎和叶柄残基、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根。金丝桃苷、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111521-200303,110715-200514),绵马贯众素对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号10438-070234,纯度>98%),乙腈、磷酸为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。健康昆明种小白鼠,体重18~22g,雌雄各半,购于山东大学动物实验中心,合格证号SCXK(鲁)2009-0001。流感病毒亚甲型鼠肺适应株FM1由北京中医药大学中医药抗病毒教育部重点实验室提供,-70℃冰箱保存。复苏后在鸡胚中传代2次,病毒原液血凝滴度1:1280,对小鼠的半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)10^{-5.25}。

2 方法与结果

2.1 水提液和醇提液的制备 按处方比例称取贯叶金丝桃、绵马贯众、黄芩共100g,共2份,1份加10倍量水煎煮2次,每次2h,合并煎煮液,浓缩成0.001g·L⁻¹水提液。另1份加8倍量70%乙醇回流提取2次,每次2h,合并提取液,减压回收乙醇并浓缩成0.001g·L⁻¹醇提液。

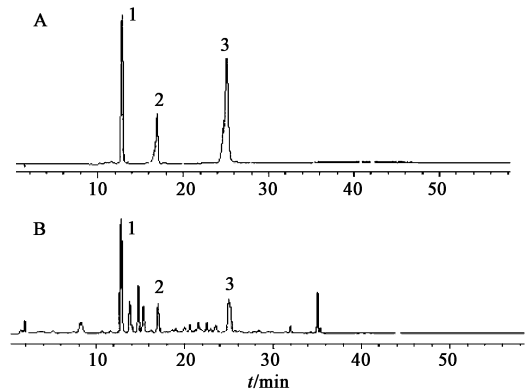
2.2 初步药效学试验^[8-9] 取昆明种小鼠40只,雌雄各半,随机等分为4组,包括正常组、病毒组、水提组及醇提组,正常组按10mL·kg⁻¹给予水,其余3组乙醚浅麻醉下滴鼻感染流感病毒鼠肺适应株FM1,于感染日开始灌胃给药,分别按10mL·kg⁻¹给予水及2.1项下水提液和醇提液,每日1次,连续5d;末次给药2h后,颈椎脱臼处死小鼠后称定体重,解剖去全肺,称定质量,肺指数($\bar{x} \pm s, n = 10$)分别为(1.12 ± 0.05)%, (1.45 ± 0.07)%, (1.37 ± 0.04)%, (1.24 ± 0.12)%,计算肺指数抑制率分别为0, 0, 5.52%, 14.48%。结果与病毒组比较,醇提组对小鼠感染病毒肺指数的影响有显著性,而水提组则无显著性差异;表明醇提组较水提组对小鼠肺脏损伤具有明显保护作用,提示前者具有更好的抗流感病毒作用,故确定采用高体积分数乙醇提取。

$$\text{肺指数} = \text{肺重} / \text{体重} \times 100\%$$

$$\text{肺指数抑制率} = (\text{病毒组肺指数均值} - \text{试验组肺指数均值}) / \text{病毒组肺指数均值} \times 100\%$$

2.3 指标成分的测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm),流动相乙腈-0.2%磷酸水溶液(15:85),进样量10μL,检测波长280nm,流速1.0mL·min⁻¹,柱温30℃,见图1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 金丝桃苷; 2. 绵马贯众素; 3. 黄芩苷

图1 贯叶金丝桃滴丸醇提液 HPLC

Fig. 1 HPLC of alcohol extract of *Hyperici Perforati Herba* dropping pills

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷、金丝桃苷及绵马贯众素对照品适量,置25mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得质量浓度分别为153.2, 126.2, 56.6mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3.3 标准曲线绘制 精密吸取混合对照品溶液1, 2, 3, 4, 5, 6mL,分别置于10mL量瓶中,加甲醇定容,得系列混合对照品溶液,按2.3.1项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得金丝桃苷、绵马贯众素及黄芩苷的回归方程分别为 $Y = 7948.75X - 942.8$ ($r = 0.9998$), $Y = 188675X - 4345$ ($r = 0.9998$), $Y = 23469X - 6542$ ($r = 0.9999$),线性范围依次为0.1262~0.7572, 0.0566~0.3396, 0.1532~0.9192μg。

2.3.4 供试品溶液的制备 取干浸膏粉50mg,置具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入甲醇25mL,密塞,称定质量,超声处理20min,放冷,加甲醇补足缺失的质量,摇匀,经0.22μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4 正交试验 以金丝桃苷、绵马贯众素、黄芩苷提取量的综合评分为指标,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。按处方比例称取贯叶金丝桃、绵马贯众、黄芩药材饮片适量,共9份,每份100g,按正交试验设计进行乙醇回流提取,合并提取液,滤过,回收乙醇,浓缩成稠膏状,

减压干燥,得干浸膏。方中贯叶金丝桃为君药,绵马贯众为臣药,黄芩为佐药,故将金丝桃苷、绵马贯众

素、黄芩苷的权重系数分别定为 0.4,0.4,0.2。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 贯叶金丝桃滴丸醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of alcohol extraction process of Hyperici Perforati Herba dropping pills

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	金丝桃苷 /mg·g ⁻¹	绵马贯众素 /mg·g ⁻¹	黄芩苷 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	60	8	1	1	1.01	51.07	116.56	68.10
2	60	10	1.5	2	1.17	60.19	135.89	79.55
3	60	12	2	3	1.38	70.39	156.07	93.00
4	70	8	1.5	3	1.51	74.31	168.24	100
5	70	10	2	1	1.33	65.57	155.43	89.00
6	70	12	1	2	1.25	61.86	146.85	83.89
7	80	8	2	2	1.31	64.78	157.91	88.34
8	80	10	1	3	1.34	65.63	148.49	88.48
9	80	12	1.5	1	1.29	63.65	142.19	85.34

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	179.54	89.77	26.80	<0.05
B(误差)	6.70	3.35	1	
C	169.02	84.51	25.23	<0.05
D	277.04	138.52	41.35	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对主要成分提取量的影响顺序为 $D > A > C > B$ 。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A, C, D 均对提取工艺具有显著性影响,综合实际生产考虑,选择最佳提取工艺 $A_2B_1C_2D_3$,即加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。

2.5 验证试验 按处方比例称取各药材,共 3 份,每份 100 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,按 2.3 项下方法测定各指标成分含量,结果提取量分别为金丝桃苷 1.50, 1.49, 1.51 mg·g⁻¹,绵马贯众素 74.29, 74.86, 74.56 mg·g⁻¹,黄芩苷 169.01, 167.38, 165.29 mg·g⁻¹,表明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

传统临床口服中药多为汤剂,将汤剂改制为现代制剂时,在现行研究模式中常以主要有效成分作为考察指标,而且多选择处方要药中单一成分,不能全面整体地反应中药复方所有特质,采用药效学试验则能全面反应中药复方治疗效果^[10-11],将复方有效成分与药效结果相结合优选提取工艺,是对现行制剂工艺研究模式的改进与创新。

金丝桃苷、绵马贯众素和黄芩苷分别为贯叶金丝桃、绵马贯众、黄芩抗流感病毒的主要指标成分,比较发现 3 种指标成分在 70% 乙醇提取物中含量较水提取物中含量要高,与醇提液具有较好的抗流感病毒作用相一致。本文结合抗流感病毒药效学试

验比较贯叶金丝桃滴丸水提和醇提工艺的效果,在此基础上,选择多指标成分的综合评分为指标,采用正交试验优化该制剂的提取工艺,既避免了新工艺有可能对组分协同效应的破坏,又不至于陷入传统用药的束缚,兼顾复方指标成分提取效率和药效的保留,可为传统中药复方研究与开发提供参考。

[参考文献]

[1] 殷志琦,叶文才,赵守训. 贯叶连翘的化学成分研究[J]. 中草药,2001,32(6):9-10.

[2] 马洁,杨建波,吉腾飞,等. 贯叶金丝桃化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(16):2408-2414.

[3] 尹兴斌,曲昌海,张晓燕,等. 贯叶金丝桃中金丝桃苷在比格犬体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):140-143.

[4] 蒋亚生,杨宁. 贯众的药理研究进展[J]. 药学实践杂志,2000,18(1):17-18.

[5] 陈红云,刘光明,石武祥,等. 中药贯众的研究进展[J]. 大理学院学报,2006,5(6):75-77.

[6] 侯艳宁,朱秀媛,程桂芳. 黄芩苷的抗炎机理[J]. 药学学报,2000,35(3):161-164.

[7] 张喜平,田华,程琪辉. 黄芩苷的药理作用研究现状[J]. 中国药理学通报,2003,19(11):1212-1215.

[8] 刘涛,李娟,吴春梅,等. 不同制备工艺对肺毒清体外抗病毒作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(18):42-44.

[9] 晁伟平,牛亚奇,李友林. 重楼克感滴丸对流感病毒 FM₁ 感染小鼠的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2012,27(9):2451-2453.

[10] 冯果,刘文,张永萍,等. 结合药效学指标正交优选复方止呕颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):32-34.

[11] 张旭,侯影,贾天柱. 正交法配合药效指标综合筛选木香切制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):9-12.

[责任编辑 刘德文]