

培土清心颗粒提取工艺优选

莫秀梅¹, 陈达灿^{1*}, 李智勇², 王洛临², 刘俊峰¹, 刘焯¹, 薛素琴¹

(1. 广东省中医院, 广州 510120; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的: 优选培土清心颗粒的提取工艺条件。方法: 以挥发油收率为指标, 采用单因素试验考察加水量、浸泡及蒸馏时间对挥发油提取工艺的影响; 以连翘苷提取率和出膏率为综合评价指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察提取次数、提取时间、加水量、浸泡时间对水提取工艺的影响。结果: 挥发油最佳提取工艺为加 8 倍量水浸泡 0.5 h, 蒸馏 6 h; 最佳水提取工艺为加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h。结论: 优选的提取工艺简单、稳定、可行, 为培土清心颗粒的成型工艺研究奠定基础。

[关键词] 培土清心颗粒; 提取工艺; 连翘苷; 挥发油; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0023-04

[doi] 10.11653/syfy2013150023

Optimization of Extraction Technology of Peitu Qingxin Granules

MO Xiu-mei¹, CHEN Da-can^{1*}, LI Zhi-yong², WANG Luo-lin¹, LIU Jun-feng¹, LIU Chi¹, XUE Su-qin¹

(1. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510120, China;

2. Guangdong Provincial Institute of TCM, Guangzhou 510095, China)

[收稿日期] 20130319(104)

[基金项目] 广东省科技厅项目(2011KT488); 广东省科技厅-广东省中医药科学院联合专项(2011KT2120); 广东省财政厅项目(粤财工[2011]572号)

[第一作者] 莫秀梅, 博士, 主治医师, 从事变态反应性皮肤病的临床研究, Tel: 13650755038, E-mail: moxiumeilsamay@163.com

[通讯作者] * 陈达灿, 教授, 博士生导师, 从事皮肤病的临床研究, Tel: 020-81887233, E-mail: 4910702@163.com

分复杂, 指标成分含量均较低, 接受液直接过滤后进样, 难以检测到指标成分, 经预试, 样品处理确定为将取出接受液减压浓缩蒸干, 用 70% 甲醇溶解并定容于 2 mL 量瓶中。

[参考文献]

- [1] 刘淑芝, 郭春燕, 金日显. 中药巴布剂研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5): 62.
- [2] 李智勇, 孙冬梅, 杜建平. 均匀设计法优选癌痛巴布剂的基质处方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 1.
- [3] 杨犬凯, 刘志辉, 刘汉清. 消炎镇痛巴布膏剂的体外透皮吸收研究[J]. 中草药, 2011, 42(5): 881.
- [4] 邢建国, 王新春, 赵媛, 等. 复方卡力孜然凝胶剂主要活性成分体外经皮渗透[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 19.

- [5] 楼步青, 黄海波, 李玲慧, 等. 双黄巴布剂体外经皮渗透实验方法研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2490.
- [6] 张伟, 唐明, 张莉, 等. 通窍活血巴布剂体外透皮释药研究[J]. 中医外治杂志, 2011, 21(3): 5.
- [7] 何百寅, 谢友良, 刘常青, 等. 三七提取液中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的透皮规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 130.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 124.
- [9] 楼步青, 黄海波. 双黄巴布剂体外透皮促进剂的筛选[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2247.
- [10] 吕游春, 刘幸平, 张兴德. 靛玉红体外透皮研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 29.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of Peitu Qingxin granules. **Method:** With yield of volatile oil as index, single factor tests were adopted to investigate effect of the amount of water, soaking time and distillation time on extraction technology of volatile oil. With yield of phillyrin and extract rate as comprehensive evaluation index, based on single factor tests, effect of extraction time, the amount of water, extraction times and soaking time on water extraction technology was investigated by orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology of volatile oil was as following: soaked 0.5 h with 8 times the amount of water, then distilled 6 h. Optimum water extraction technology conditions were as follows: boiled 3 times with 10 times the amount of water, 1 each time. **Conclusion:** Optimized extraction technology was simple, stable and feasible, it could settle foundation for molding technology of Peitu Qingxin granules.

[Key words] Peitu Qingxin granules; extraction technology; phillyrin; volatile oil; orthogonal test

培土清心颗粒为广东省中医院皮肤科临床经验方,由炒白术、连翘、太子参、薏苡仁等组成,具有调养心脾、除湿止痒等功效,主要用于治疗儿童特应性皮炎等。原处方以汤剂内服,临床疗效较好,但汤剂煎煮、携带、使用不方便。根据临床实际应用情况,拟将其制备成稳定性好、服用和携带方便的颗粒剂。本实验根据方中药材的化学性质和药理活性,提取工艺采用双提法,采用单因素试验优选挥发油的提取工艺参数,通过单因素试验和正交试验优选水提工艺参数,为该制剂的进一步研究提供实验依据。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Eclipse-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Agilent), AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo), DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司), DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

连翘苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110821-200507), 乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,药材均购自广州中芝源中药饮片有限公司,经广东省中医研究所王洛临主任中药师鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取工艺优选^[1-2] 处方中炒白术、连翘先进行挥发油提取再水煎煮,挥发油采用水蒸气蒸馏法提取。

2.1.1 吸水率测定 按处方比例称取炒白术和连翘饮片 3 份,每份 200 g,分别加 10 倍量水浸泡,每隔 1 h 观察 1 次浸透情况,直至药材全部浸透,滤过,称取湿药材质量,计算药材吸水率分别为 106%, 103%, 104%。

2.1.2 加水量考察 按处方比例称取炒白术和连翘饮片 4 份,每份 200 g,分别置 2 L 圆底烧瓶中,分

别加 4, 6, 8, 10 倍量水浸泡 0.5 h, 蒸馏提取 6 h, 记录挥发油提取量分别为 0.94, 1.00, 1.06, 1.08 mL, 提取率分别为 0.47%, 0.50%, 0.53%, 0.54%, 故加 8 倍量水提取。

2.1.3 浸泡时间考察 按处方比例称取炒白术和连翘饮片 4 份,每份 200 g,分别置 2 L 圆底烧瓶中,加 8 倍量水分别浸泡 0, 0.5, 1, 2 h, 蒸馏提取 6 h, 记录挥发油体积,计算挥发油提取率分别为 0.46%, 0.53%, 0.53%, 0.52%, 故确定浸泡 0.5 h。

2.1.4 蒸馏时间考察 按处方比例称取炒白术和连翘饮片 3 份,每份 200 g,分别置 2 L 圆底烧瓶中,加 8 倍量水浸泡 0.5 h, 结果提取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 后挥发油平均提取量分别为 0.3, 0.61, 0.76, 0.94, 1.02, 1.07, 1.08, 1.09 mL, 故确定蒸馏 6 h。

2.1.5 验证试验 按处方比例称取炒白术和连翘饮片 3 份,按优选的挥发油提取工艺进行验证试验,结果挥发油提取量分别为 1.62, 1.58, 1.59 mL, 提取率分别为 0.54%, 0.53%, 0.53%, 说明该工艺稳定可靠。

2.2 水提工艺考察 药效学筛选结果显示,培土清心颗粒不同工艺制剂对小鼠接触性湿疹均有明显抑制作用,且不同工艺制剂等剂量组比较无显著性差异,以水提物对小鼠接触性湿疹的抑制作用最优,因此拟定培土清心颗粒的提取工艺为方中珍珠粉磨成细粉,炒白术等 8 味药材采用水提取工艺。

2.2.1 样品的制备 按处方比例称取炒白术、连翘、太子参、山药、薏苡仁、白茅根、甘草、白鲜皮等饮片,加适量水提取一定时间,滤过,滤液浓缩并定容至一定体积,备用。

2.2.2 干膏得率的测定^[3-4] 精密吸取样品浓缩液 20 mL,置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,照干燥失重测定法(《中国药典》2010 年版一部附录 IX G 干燥失重测定法)测定,计算干膏得率。

2.2.3 连翘苷的含量测定^[5] 照高效液相色谱法(2010年版《中国药典》附录VI D)测定。

2.2.3.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(23:77),检测波长277 nm,流速1 mL·min⁻¹。

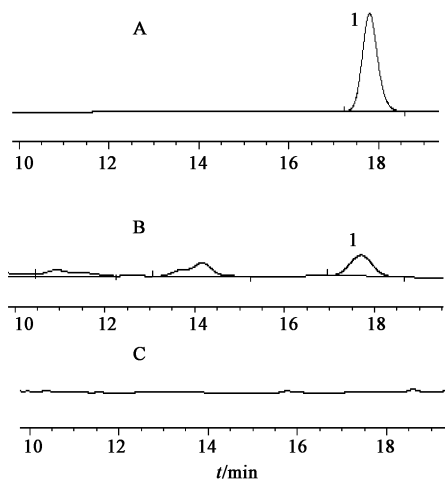
2.2.3.2 对照品溶液的配制 称取连翘苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成0.243 2 g·L⁻¹的溶液,摇匀,即得。

2.2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取培土清心颗粒浓缩液5 mL,置25 mL量瓶中,加入甲醇18 mL,超声处理(220 W,50 kHz)1 h,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3.4 阴性对照溶液的制备 处方中除去连翘药材,按2.2.1项下方法制备阴性对照样品,按2.2.3.3项下方法制得阴性对照溶液。

2.2.3.5 标准曲线的绘制 分别精密吸取连翘苷对照品溶液1,2,4,6,8,10 mL置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL进样,测定峰面积,以连翘苷峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 7.3917X + 6.106$ ($r = 1$),表明连翘苷在24.32~243.20 mg·L⁻¹与峰面积呈良好线性关系。

2.2.3.6 专属性试验 吸取上述对照品、供试品及阴性对照溶液各10 μL注入液相色谱仪,记录色谱图,结果见图1,表明该方法选择性良好,阴性无干扰。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性对照;1. 连翘苷

图1 培土清心颗粒 HPLC

2.2.4 吸水率的考察 称取处方药材3份,每份190 g,分别加10倍量水浸泡,每隔1 h观察1次浸透情况,直至药材全部浸透,滤过,称取湿药材质量,计算药材吸水率分别为116.32%,

115.26%,111.05%。

2.2.5 加水量的考察 称取处方药材6份,每份190 g,分别加入8,10,12,14,16,20倍量水加热回流提取2次,每次1.5 h,滤过,合并滤液,浓缩,转移至500 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,测得干膏得率分别为20.33%,24.3%,24.71%,25.5%,25.2%,26.42%,连翘苷提取率依次为46.97%,47.4%,46.24%,54.36%,51.07%,51.49%,故加水量取值10~14倍。

2.2.6 提取次数的考察 称取处方药材2份,每份190 g,分别加10倍量水回流提取1,2,3,4次,每次1 h,滤过,各次滤液分别浓缩,转移至250 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,测得平均干膏得率分别为14.86%,6.35%,3.53%,2.40%,连翘苷平均提取率分别为30.17%,18.71%,14.45%,5.97%,故提取数可选在1~3次。

2.2.7 正交试验设计^[6-7] 选取提取次数、提取时间、加水倍数、浸泡时间为考察因素,各因素均取3个水平,进行L₉(3⁴)正交试验,以连翘苷提取率和干膏得率的综合评分为考察指标,因素水平见表1,试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

表1 培土清心颗粒水提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 提取数 /次	B 提取时间 /h	C 加水量 /倍	D 浸泡时间 /h
1	1	0.5	10	0
2	2	1.0	12	1
3	3	1.5	14	2

由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为A>B>D>C,最佳工艺组合为A₃B₂C₃D₁。以极值最小的D因素为误差项进行方差分析,结果表明A因素对提取工艺具有显著性影响,其余因素则均无显著影响,综合考虑,确定优选工艺组合为A₃B₂C₁D₁,即加10倍量水提取3次,每次1 h。

2.2.8 验证试验 按处方比例称取除珍珠粉外的各味药材共3份,每份475 g,按优选的工艺进行提取,合并提取液,浓缩,转移至1 L量瓶中,加水至刻度,结果连翘苷提取率分别为61.43%,60.96%,61.25%,出膏率分别为26.30%,26.81%,27.28%,说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

处方中药材含有挥发油^[8-9]、黄酮^[10]、木质素、多糖^[11]、生物碱、皂苷、有机酸等功效成分,且作用靶点尚不清晰,以连翘苷提取率和出膏率为综合评

表 2 培土清心颗粒水提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	连翘苷	干膏	综合 评分
					提取率 /%	得率 /%	
1	1	1	1	1	23.46	13.38	41.87
2	1	2	2	2	30.98	16.56	54.07
3	1	3	3	3	30.78	19.55	57.13
4	2	1	2	3	43.23	22.99	75.32
5	2	2	3	1	60.55	24.10	96.56
6	2	3	1	2	54.81	23.29	89.03
7	3	1	3	2	55.74	26.18	93.30
8	3	2	1	3	57.09	26.83	95.58
9	3	3	2	1	58.76	27.22	97.93
K_1	153.07	210.48	226.48	236.37			
K_2	260.91	246.21	227.32	236.40			
K_3	286.80	244.09	246.99	228.02			
R	44.58	11.91	6.84	2.79			

注:综合评分 = 连翘苷提取率/最大连翘苷提取率 $\times 0.7 \times 100\% +$ 得膏率/最大得膏率 $\times 0.3 \times 100\%$ 。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	3 353.86	2	1 676.93	216.05	<0.01
B	267.83	2	133.91	17.25	>0.05
C	89.84	2	44.92	5.79	>0.05
D(误差)	15.52	2	7.76	1.00	

注: $F_{0.1}(2,2) = 9.00, F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

价指标,鉴于连翘苷为君药的主要成分之一,因此在设计权重系数时较大,以充分地反映药物提取情况。

在连翘苷的含量测定过程中,曾选用《中国药典》2010 年版一部连翘项下流动相进行测定,但由于该复方中成分较单药更为复杂,对连翘苷色谱峰处有干扰,经调整,减小流动相中有机相比例,使得连翘苷色谱峰延迟,结果显示色谱峰分离度高,前后无干扰。

[参考文献]

[1] 王凌,周震.加味藿香正气滴丸提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):58.
 [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国中医药出版社,2010:附录 63.
 [3] 王洛临,施之琪,李智勇,等.黄芩解毒颗粒提取工艺研究[J].中成药,2012,34(10):2028.
 [4] 秦英,林宏英,杨雁芳,等.妇淋颗粒提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(17):15.
 [5] 肖飞,陈桦,李其凤,等.抗病毒分散片质量标准研究[J].中国药业,2012,21(21):25.
 [6] 王卫锋,葛莉,李芳,等.正交实验法优选妇宁舒颗粒的提取工艺[J].陕西中医,2012,33(4):484.
 [7] 朱璐璐,宋英,袁强华,等.咽灵合剂提取工艺研究[J].中国中医药信息杂志,2012,19(11):54.
 [8] 孟祥乐,李俊平,李丹,等.连翘的化学成分及其药理活性研究进展[J].中国药房,2010,21(43):4117.
 [9] 宿廷敏,王敏娟,阮时宝.白术的化学成分及药理作用研究概述[J].贵阳学院学报:自然科学版,2008,3(2):32.
 [10] 刘荣华,付丽娜,陈兰英,等.白茅根化学成分与药理研究进展[J].江西中医学院学报,2010,22(4):80.
 [11] 赵宏,谢晓玲,万金志,等.山药的化学成分及药理研究进展[J].今日药学,2009,19(3):49.

[责任编辑 仝燕]