

二母颗粒中知母水提工艺优化

卢君蓉, 傅超美*, 陈秋薇, 徐晓秋, 胡慧玲

(成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选二母颗粒中知母的水提工艺。方法: 以 HPLC 测定知母皂苷 B II、芒果苷的含量及干膏收率为指标进行综合评价, 采用正交试验法, 考察溶媒用量、浸润时间、提取时间及提取次数等水提工艺参数。结果: 提取次数对水提工艺有显著性影响, 确定较佳提取工艺为 $A_1B_1C_1D_3$, 即知母饮片加 6 倍量水, 不浸泡, 提取 3 次, 每次 30 min。结论: 该优选水提工艺稳定、合理可行。

[关键词] 二母颗粒; 知母; 知母皂苷 B II; 芒果苷; 正交设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0031-04

Optimization of Water Extraction Process for *Anemarrhena asphodeloides* in Ermu Granule

LU Jun-rong, FU Chao-mei*, CHEN Qiu-wei, XU Xiao-qiu, HU Hui-ling

(Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Provincial and State Constructed Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research and Development of Chinese Herbal Medicine Resource, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize water extraction process of *Anemarrhena asphodeloides* in Ermu granule. **Method:** With the content of timosaponin B II, mangiferin and yield of dry extract as indexes to do comprehensive evaluation, orthogonal test was designed to investigate water extraction parameters, such as solvent usage, infiltration time, extraction time and extraction times. **Result:** Extraction times had significant effect on water extraction process, and optimum extraction process was $A_1B_1C_1D_3$, that *A. asphodeloides* pieces was added six times the amount of water without infiltration, extracted three times with 30 min each time. **Conclusion:** This optimized process was stable, reasonable and feasible.

[Key words] Ermu granule; *Anemarrhena asphodeloides*; timosaponin B II; mangiferin; orthogonal test

二母颗粒主要由川贝母、知母等中药加工而成, 具有清肺润燥、化痰止咳之功效, 用于肺热咳嗽、喘急咳嗽、痰涎壅盛等。原方首见于《急救仙方》卷六

之二母散项下^[1], 《妇人大全良方》、《景岳全书》、《汤液本草》中亦有记载。据文献考证, 该方及其加减化裁方在临床上应用广泛、疗效卓著^[2-4]。该制剂中川贝母打粉入药, 知母为该方重要的组成之一, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效, 在临床上大多煎煮入药。知母主含皂苷类和双苯吡酮类成分, 具有较好的抗炎、抗菌及镇痛解热、抗衰老、降血糖等作用^[5-9], 文献报道知母的水提取工艺多以知母总皂苷元或芒果苷^[10-12]等单一成分作为指标性成分, 采用紫外-分光光度法进行含量测定。在此基础上, 本文选择知母中代表性成分知母皂苷 B II 和芒果苷作为其指标性成分, 分别采用 HPLC-ESLD 和 HPLC 进

[收稿日期] 20120201(013)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划重点项目 (2006BAI06A13)

[第一作者] 卢君蓉, 在读硕士研究生, 从事中药新制剂和新剂型的研究, Tel: 13688167921, E-mail: 634589580@qq.com

[通讯作者] * 傅超美, 教授, 博士, 博士生导师, 从事中药新制剂和新剂型研究, Tel: 028-61800236, E-mail: chaomeifu@126.com

行测定,以优选知母的水提取工艺。

1 材料

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),75LT-ELSD 型低温型蒸发光散射检测器(法国 SEDERE 公司)。

知母饮片(成都国嘉集团新荷花饮片公司,批号 1009047,产地河北),知母皂苷 B II 对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 201006,纯度 $\geq 98\%$),芒果苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 1218-081014,纯度 $\geq 98\%$),乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8]

2.1.1 知母皂苷 B II WelchromTM HPLC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ L),柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相乙腈-水(25:75),流速 1 mL \cdot min⁻¹,漂移管温度 40 $^{\circ}$ C,蒸发光检测器气压 3.5 MPa。

2.1.2 芒果苷 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ L),柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相乙腈-0.2% 冰醋酸水溶液(15:85),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 258 nm。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 知母皂苷 B II 取知母皂苷 B II 对照品适量,精密称定,加入 30% 丙酮制成每 1 mL 含知母皂苷 B II 0.552 mg 的溶液,即得。

2.2.2 芒果苷 取芒果苷对照品适量,精密称定,加入稀乙醇制成每 1 mL 含芒果苷 0.524 mg 的溶液,即得。

2.3 线性关系的考察

2.3.1 知母皂苷 B II 精密吸取上述知母皂苷 B II 对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25 μ L 注入液相色谱仪,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱图及其峰面积积分值,以进样量的对数值作为横坐标(X),峰面积的对数值作为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 1.1177X + 7.7076$ ($r = 0.9993$),结果表明在 2.76 ~ 13.8 μ g 知母皂苷 B II 峰面积与进样量呈良好线性关系。

2.3.2 芒果苷 精密吸取上述芒果苷对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μ L 注入液相色谱仪,按 2.1.2 项下色谱条件进行测定,记录色谱图及其峰面积积分值,以进样量作为横坐标(X),峰面积值作为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 2772.7X - 18.404$ ($r = 0.9998$),结果表明在 0.0524 ~ 0.5240 μ g 芒果苷峰面积与进样量呈良好线性关系。

2.4 方法学考察 本试验对知母皂苷 B II 和芒果苷的含量测定方法参照《中国药典》2010 年版一部^[8]知母药材项下,试验中对其精密性、稳定性和重复性等进行考察,结果 RSD 均 $< 2\%$,加样回收率均在 95% ~ 105%,表明方法学良好。

2.5 正交试验考察提取工艺

2.5.1 正交试验的因素水平 根据预试验结果,选用影响知母水提效果的溶媒用量、浸润时间、提取时间及提取次数等 4 个主要因素,每个因素选择 3 个水平,按 L₉(3⁴) 正交表安排试验。每组试验取知母饮片 30 g,平行 3 份,进行煎煮,因素水平见表 1。

表 1 二母颗粒中知母水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 溶媒 用量/倍	B 浸润时间 /min	C 提取时间 /min	D 提取数 /次
1	6	0	30	1
2	8	15	45	2
3	10	30	60	3

2.5.2 知母水提液样品处理及测定 称取知母饮片 30 g,每组平行 3 份,精密称定,按正交表进行试验,将提取液加蒸馏水定容至 1 000 mL。

2.5.2.1 知母皂苷 B II 供试品制备与测定 精密量取定容后提取液 50 mL,水浴挥至液体约剩 25 mL,加硅藻土约 10 g,搅拌均匀,于 70 $^{\circ}$ C 烘箱内烘至搅拌时无多余水分,全部转移至具塞锥形瓶内,加 30% 丙酮 100 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液定容至 100 mL,精密吸取 20 μ L 注入液相色谱仪,按 2.1.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱图及其峰面积积分值,计算样品中知母皂苷 B II 含量。

2.5.2.2 芒果苷供试品制备与测定 精密量取定容后提取液 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,加蒸馏水定容,精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪,按 2.1.2 项下色谱条件进行测定,记录色谱图及其峰面积积分值,计算样品中芒果苷的含量。

2.5.2.3 干膏收率测定 精密量取定容后提取液 25 mL,置于已恒重蒸发皿内,水浴上烘干,于 105 $^{\circ}$ C 烘箱内烘 3 h,取出,置于干燥器内,冷却后称定质量,计算干膏收得率。

2.5.3 正交试验数据分析 以各组重复 3 次试验所得知母皂苷 B II、芒果苷含量和干膏收得率的各自平均值作为指标进行综合评分,根据实际情况并参常用比例将知母皂苷 B II、芒果苷含量和干膏收得率的权重系数分别定为 0.5, 0.3, 0.2, 即综合评分 $Y = (0.5 \times Y_1/Y_{1max} + 0.3 \times Y_2/Y_{2max} + 0.2 \times Y_3/Y_{3max})$

$Y_{3max}) \times 100$,以筛选出知母较佳的水提取工艺。正交试验设计结果及方差分析分别见表2,3。

表2 二母颗粒中知母水提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	Y ₁ 知母皂苷 B II 含量/mg	Y ₂ 芒果苷 含量/mg	Y ₃ 干膏收率 /%	Y 加权值
1	1	1	1	1	560.74	76.82	27.204	33.63
2	1	2	2	2	1284.92	177.93	42.672	70.32
3	1	3	3	3	1911.13	240.94	50.28	97.04
4	2	1	2	3	1571.37	247.29	56.454	91.11
5	2	2	3	1	766.72	149.91	31.602	49.44
6	2	3	1	2	1271.25	207.56	45.312	74.49
7	3	1	3	2	1664.11	218.45	51.090	88.14
8	3	2	1	3	1789.64	205.87	50.532	89.70
9	3	3	2	1	775.21	142.05	35.472	50.08
K ₁	66.997	70.960	65.940	44.383				
K ₂	71.680	69.820	70.503	77.650				
K ₃	75.973	73.870	78.207	92.617				
R	8.976	4.050	12.267	48.234				

表3 水提取工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	120.947	2	4.622	19.000	
B(误差)	26.170	2	1.000	19.000	
C	230.636	2	8.813	19.000	
D	3657.127	2	139.745	19.000	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

由正交试验结果可知,各因素对提取工艺影响顺序为 $D > C > A > B$,以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,因素 D 对提取有显著性影响。综合考虑生产成本及工业化要求,确定提取工艺条件为 $A_1B_1C_1D_3$,即知母饮片不浸泡,直接加6倍量水煎煮提取3次,每次30 min。

2.5.4 验证试验 为验证上述优选工艺的可行性及合理性,按上述确定工艺条件 $A_1B_1C_1D_3$,进行3次验证试验,知母饮片投料量均为50 g。结果知母皂苷 B II 平均提出量为2372.14 mg, RSD 1.38%; 芒果苷平均提出量242.80 mg, RSD 1.68%; 干膏平均收率为49.04%, RSD 1.01%。结果表明优选的知母水提取工艺稳定,合理可行。

3 讨论

目前对知母水提取工艺进行研究时,多采用拔毒皂苷元的含量及干膏收率为评价指标,本研究采用知母皂苷 B II、芒果苷的含量及干膏收率的加权评分值作为知母水提取工艺的评价指标,简化了供

试品测定前的操作步骤,从而减少由于蒸干、显色等造成的试验误差,试验优选的水提工艺中,知母不需浸泡,可能与其为根茎类药材,主要含黏液细胞、木纤维素及厚壁细胞、木栓细胞等结构,饮片状态下成分容易煎出有关。

由于皂苷类成分在紫外几乎没有吸收,故本试验采用 HPLC-ELSD 对知母皂苷 B II 进行含量测定,与知母药材中知母皂苷 B II 的测定方法相同^[8,13],但预试验结果表明,知母皂苷 B II 在高温下有一定程度的破坏,且试验过程中发现,知母皂苷 B II 所呈现的色谱峰有时主峰旁会出现一很小峰或峰顶有所裂开的现象,推测可能由于蒸发光散射检测器喷头被污染所致,故建议在每次测定前后,在不进流动相的情况下使检测器运转 > 30 min。

二母颗粒是在二母散的基础上研制而得,目前市场上尚无销售。本试验采用正交试验法,以主要药效成分知母皂苷 B II、芒果苷的含量及干膏收率的加权评分值为评价指标,对其所含重要药味的提取工艺进行研究,为其进一步研究与质量控制提供参考。

[参考文献]

[1] 钱塘丁. 当归草堂医学丛书[M]. 南京:江苏广陵古籍刻印社,1982:3.
 [2] 周莉. 玄麦二地二母散治疗颈动脉炎引起的剧咳[J]. 四川中医,1996,14(10):22.

均匀试验设计优选产妇康颗粒挥发油的包合工艺

贾永艳*, 祝侠丽, 周红敏, 李九席, 魏超娟, 李翠萍, 田效志
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:优化产妇康颗粒中挥发油的 β -环糊精包合工艺。方法:采用饱和水溶液法包合,以挥发油包合率为指标,以 β -环糊精与挥发油的比例、包合温度、包合时间为考察因素,采用均匀试验优选包合工艺,并对包合物的物相进行验证。结果:最佳工艺为挥发油与 β -CD的比例1:8,包合温度40℃,包合时间140min。在该优选条件下,挥发油包合率达75%,验证结果显示包合物已形成。结论:该优选的包合工艺合理、稳定、可行。

[关键词] 产妇康颗粒;挥发油; β -环糊精包合;均匀试验设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0034-04

Optimization of Inclusion Technology for Volatile Oil from Chanfukang Granule by Uniform Design

JIA Yong-yan*, ZHU Xia-li, ZHOU Hong-min, LI Jiu-xi, WEI Chao-juan, LI Cui-ping, TIAN Xiao-zhi
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize inclusion process of volatile oil from Chanfukang granule. **Method:** Inclusion process was carried out by saturated aqueous solution method, inclusion process was optimized by uniform design with inclusion ratio of volatile oil as index, taking ratio of volatile oil to β -CD, inclusion temperature and inclusion time as factors, and physical phase of inclusion complex was verified. **Result:** Optimum inclusion process was as follows: ratio of volatile oil to β -CD 1:8, inclusion temperature 40℃, inclusion time 140 min. Inclusion rate of volatile oil was as high as 75% under these optimized technology conditions. Validation result

[收稿日期] 20111226(011)

[基金项目] 郑州市科技攻关项目(064SGDS33221-3)

[通讯作者] *贾永艳,副教授,硕士研究生导师,从事药物制剂新技术与新剂型研究, Tel:13526862076, E-mail:hnzyjy@126.com

- [3] 申忠杰,解忠超.三冬二母汤治疗慢性支气管炎[J].浙江中西医结合杂志,2003,13(5):323.
- [4] 刘淑华,刘洪霞,孙立忠.二冬二母汤加减佐治小儿支原体肺炎36例疗效观察[J].儿科药学杂志,2011,17(5):61.
- [5] 徐爱娟,韩丽萍,蒋琳兰.知母的研究进展[J].中药材,2008,31(4):624.
- [6] 王颖异,郭宝林,张立军.知母化学成分的药理研究进展[J].科技导报,2010,28(12):110.
- [7] 吉星,冯毅凡.知母中皂苷类成分研究进展[J].中草药,2010,41(4):附12.
- [8] 中国药典.一部[S].2010:197.
- [9] 佟连琨,高慧,姜永粮,等.知母与盐知母对甲亢阴道大鼠红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶影响的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(9):184.
- [10] 李习平,杨梓懿,石继连,等.正交试验法优选知母水处理工艺[J].湖南中医药大学学报,2010,30(3):45.
- [11] 李丽,韦文俊.正交试验法优选知母水提取工艺[J].广西中医学院学报,2001,4(2):72.
- [12] 薛小娟,陈晓青,李珏.正交试验法优选超声提取知母皂苷的研究[J].天然产物研究与开发,2007,19(3):503.
- [13] 梁雷,边宝林,王宏洁.不同产地知母药材中芒果苷和知母皂苷BⅡ的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):49.

[责任编辑 仝燕]