

正交试验法优选抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊提取工艺

包巨太¹, 韦灵玉², 刘倩¹, 李志慧², 刘晓亚², 曹艳玲³, 谢飞¹, 王巍¹, 张玉杰^{2*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;
3. 哈尔滨商业大学生命科学与环境研究中心, 哈尔滨 150028)

[摘要] 目的: 优选抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN)的提取工艺。方法: 采用紫外-可见分光光度法测定乙醇提取物中皂苷、黄酮、木质素类成分含量; 正交试验设计优选抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊的提取工艺。结果: 乙醇提取最佳工艺为 10 倍量 70% 乙醇加热回流 2 次, 每次 1.5 h。结论: 优选的提取工艺稳定, 安全, 简便易行。

[关键词] 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊; 正交试验; 提取工艺; 总皂苷; 总黄酮; 总木质素; 总多糖

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0021-04

Optimization of Extraction Technology for K-CoxB-JN by Orthogonal Test

BAO Ju-tai¹, WEI Ling-yu², LIU Qian¹, LI Zhi-hui², LIU Xiao-ya²,
CAO Yan-ling³, XIE Fei¹, WANG Wei¹, ZHANG Yu-jie^{2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine,
Beijing 100102, China; 3. Research Center for Life Science and Environmental Sciences,
Haerbin University of Commerce, Haerbin 150028, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of K-CoxB-JN. **Method:** The contents of saponins, flavonoids and lignins in ethanol extract, were determined by UV-VIS spectrophotometry. Extraction technology of K-CoxB-JN was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum ethanol extraction conditions were: heating refluxed 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 1.5 h per time. **Conclusion:** Optimized extraction technology was simple, stable and safe.

[Key words] K-CoxB-JN; orthogonal test; extraction technology; total saponins; total flavonoids; total lignins; total polysaccharides

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊(K-CoxB-JN), 来源于临床经验方, 由西洋参、麦冬、五味子、黄芪等 7 味中药组成, 有益气养阴、补益心气、增加机体免疫功能等作用, 疗效稳定确切^[1], 并有明显的镇痛、抗应激作用^[2]。处方中药材既含有皂苷、黄酮和木质素等醇溶性成分, 同时含有多糖等水溶性成分, 故采用先醇提再水煎的提取方法。试验采用正交设计法优选工艺条件。其中醇提正交试验中, 以总皂苷、总黄酮、总木质素含量及出膏率为检测指标, 选取提

取次数、提取时间、乙醇体积分数、加醇量 4 个因素, 每因素 3 个水平, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验; 水提工艺正交试验中, 以多糖含量为分析指标, 选择提取次数、提取时间、加水量 3 个因素, 每因素 3 个水平, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 同时对水提物醇沉条件进行考察。

1 材料

TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), BS 110S 型电子天平

[收稿日期] 20110909(003)

[基金项目] 国家重大新药创制科技重大专项(2009ZX09103-442)

[第一作者] 包巨太, 硕士, 教授, 从事药防治心血管疾病研究, Tel: 0315-3725030, E-mail: baojutai@sohu.com

[通讯作者] * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价研究, Tel: 010-84738618, E-mail: zhyj227@126.com

(规格 110 g, d = 0.1 mg, 北京赛多利斯仪器系统有限公司), DZ-1BC 型真空干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司), 人参皂苷 Re、芦丁、五味子酯甲、D-无水葡萄糖等对照品(均购自中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110754-200822, 0081-200304, 111529-200503, 111529-200511), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备 对照品溶液制备 精密称取人参皂苷 Re 对照品适量, 加甲醇制成 0.57 g·L⁻¹ 溶液, 作为人参皂苷 Re 对照品溶液; 精密称取 120 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 10 mg, 加 85% 乙醇溶解, 定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 即为 0.2 g·L⁻¹ 芦丁对照品溶液; 精密称取五味子酯甲对照品适量, 加甲醇制成 0.5 g·L⁻¹ 的五味子酯甲对照品溶液。

供试品溶液的制备 分别精密吸取正交试验各提取液 2.0 mL, 蒸干, 残渣加 10 mL 水溶解, 转移至分液漏斗中, 水饱和正丁醇振摇萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇萃取液, 氨试液洗 3 次, 每次 15 mL, 正丁醇饱和水洗至中性, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得总皂苷供试品溶液。

分别精密吸取正交试验各提取液 5.0 mL, 蒸干, 残渣用 10 mL 水溶解, 上聚酰胺柱(2 g, 20 ~ 60 目), 加水 50 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 乙醇 50 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 即得总黄酮供试品溶液。

分别精密吸取正交试验各提取液 3.0 mL, 蒸干, 残渣用 10 mL 水溶解, 转移至分液漏斗中, 滴入 5 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 10 滴沉淀皂苷类成分, 乙酸乙酯振摇萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯萃取液, 水浴蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得总木脂素供试品溶液。

2.2 总皂苷含量测定^[3] 标准曲线的制备 分别精密吸取人参皂苷 Re 对照品溶液(0.57 g·L⁻¹) 100, 200, 300, 400, 500 μL 于试管中, 水浴蒸干, 加 8% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 置 60 °C 水浴保温 20 min, 立即取出, 冰水浴冷却 5 min, 随行试剂空白, 加冰醋酸 5 mL, 摇匀, 反应 20 min 后, 570 nm 波长处测定吸光度, 以吸收度为纵坐标, 人参皂苷 Re 质量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 4.293X - 0.0328 (R^2 = 0.9997)$ 。人参皂苷 Re 在 57 ~ 399 μg 有良好的线性关系。

供试品的测定 精密吸取供试品溶液 0.1 mL,

照标准曲线项下的方法加样、显色, 测定吸收度, 由回归方程计算含量。

2.3 黄酮含量测定^[4] 标准曲线的制备 精密吸取芦丁对照品溶液(0.204 g·L⁻¹) 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 5% 亚硝酸钠 0.5 mL, 放置 5 min, 加 10% 硝酸铝 0.5 mL, 放置 5 min, 加 4% 的氢氧化钠 4 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min。于 510 nm 处测定吸光度。得回归方程 $Y = 3.0079X - 0.2655 (R^2 = 0.9987)$, 芦丁在 100 ~ 800 μg 有良好线性关系。

供试品的测定 精密吸取供试品溶液 0.5 mL, 照标准曲线项下的方法加样、显色, 测定吸收度, 由回归方程计算含量。

2.4 乙醇提取物中总木脂素含量测定^[5] 标准曲线的制备 精确吸取五味子酯甲对照品溶液(0.5 g·L⁻¹) 20, 40, 60, 80, 100 μL 置具塞试管中。另取一试管加甲醇 20 μL 作空白, 待溶剂挥发完后, 依次加入 10% 变色酸水溶液 0.5 mL, 浓硫酸 3 mL, 蒸馏水 1.5 mL, 沸水浴中放置 30 min, 取出用流水冷却, 于 570 nm 处测吸光度值。以测定结果计算得回归方程 $Y = 8.4112X - 0.0709 (R^2 = 0.9990)$, 五味子酯甲在 10 ~ 50 μg 有良好线性关系。

供试品的测定 分别精取样液 100 μL 置具塞试管内, 按总木脂素标准曲线项下操作测定吸光度值, 由回归方程计算含量。

2.5 出膏率测定 分别精密吸取正交试验各提取液 10 mL, 各 2 份, 水浴蒸干, 于 105 °C 烘箱干燥 3 h, 取出, 放冷, 称重, 计算干膏质量和出膏率。

2.6 正交试验设计 按处方比例, 称取各药材, 总计 72 g, 共 9 个样品, 按正交试验表(表 1) 各条件提取, 合并提取液, 减压回收乙醇并定容至 120 mL。结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 K-CoxB-JN 乙醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 加醇量 /倍	C 提取次数 /次	D 提取时间 /h
1	30	4	1	1.0
2	50	6	2	1.5
3	70	8	3	2.0

表 2 结果显示, 各因素作用主次顺序为 $B > A > C > D$ 。以 R 值最小的 D 因素为误差项的方差分析表明, A, B, C 3 个因素对结果均无显著的影响, 结合实际生产, 选取最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2D_2$, 即 8 倍量

表 2 K-CoxB-JN 乙醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总皂苷/mg	总黄酮/mg	总木脂素/mg
1	1	1	1	1	617.47	33.36	154.35
2	1	2	2	2	1 045.14	48.80	189.05
3	1	3	3	3	1 077.29	62.69	346.19
4	2	1	2	3	1 091.26	55.63	274.76
5	2	2	3	1	969.67	75.26	290.41
6	2	3	1	2	1 148.57	69.75	224.42
7	3	1	3	2	1 025.58	80.33	244.83
8	3	2	1	3	1 049.34	57.84	298.57
9	3	3	2	1	1 205.87	69.08	414.90
K_1	3 574.34	3 577.57	3 653.67	3 830.37			
K_2	4 199.73	4 024.08	4 394.49	4 076.47			
K_3	4 446.34	4 618.76	4 172.25	4 313.57			
R	872	1 041.19	740.82	483.2			

注:K,R 值以 3 类成分总量计算。

表 3 乙醇提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	134 701.5	2	67 350.73	3.461	>0.05
B	181 899.1	2	90 949.56	4.674	>0.05
C	96 347.79	2	48 173.89	2.476	>0.05
D(误差)	38 918.21	2	19 459.1		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

70% 乙醇,提取 2 次,每次 1.5 h。

2.1.7 验证试验 按处方比例称取各药材,总药材量为 240 g,共 3 份,按上述优选提取工艺进行重复性验证试验。结果总皂苷质量分别为 3 416,3 472,3 326 mg;总黄酮分别为 182,193,195 mg;总木质素分别为 1 344,1 420,1 465 mg;出膏率分别为 26.67%,27.83%,26.77%。结果说明该优选工艺条件稳定可靠。

3 讨论

处方药材既含有皂苷、黄酮、三萜、木质素等醇溶性成分,又含有多糖、水溶性生物碱等水溶性成分。预试验表明,皂苷类、黄酮类等成分为治疗柯萨奇 B 病毒性心肌炎的有效成分,故试验用乙醇提取醇溶性成分,并分别进行提取条件的优选,确定最佳提取工艺,为进一步研究奠定基础。

所选 3 个醇提检测指标中总皂苷含量最高,其

次为总木脂素,总黄酮含量最低,由于药效初筛结果 3 类成分均显示抗病毒活性,因此以其含量之和作为考察指标。本试验根据各类成分的性质,筛选多个指标进行试验,符合中药“多靶点”原则,比采用某单一成分的含量确定提取工艺的研究更为科学合理,更能保证药效的充分发挥^[6]。

[参考文献]

- [1] 邢纪萍,包巨大,李志田,等.抗柯萨奇 B 中药胶囊治疗病毒性心肌炎的临床疗效评价[J].中国临床药理学与治疗学,2003,8(6):701.
- [2] 张博男,韩淑英,李洁,等.抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方水提物的镇痛和抗应激作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):133.
- [3] 高丽萍,刘华,封云芳.人参总皂苷含量测定[J].浙江工程学院学报,2002,19(3):171.
- [4] 田圣志,杨玉涛,张振凌,等.黄芪药材主、侧根中黄酮类成分含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):92.
- [5] 刘旭,林森,赵余庆.北五味子不同部位总木脂素的含量测定[J].中国现代中药,2009,11(5):39.
- [6] 刘丽花,王红丽.多指标正交试验优选润肺止咳片的水提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):42.

[责任编辑 全燕]