醒脑灵颗粒渗漉提取工艺

江志强[1],张建军[2]
(1. 广州中医药大学,广州 510405; 2. 广东省中医研究所,广州 510095)

[摘要] 目的:优选醒脑灵颗粒的最佳渗漉提取工艺。方法:采用单因素试验法,以丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率、大黄总蒽醌提取率和得膏率为考察指标,对影响醒脑灵颗粒渗漉提取工艺的因素进行研究。结果:最佳渗漉工艺为药材粗粉碎,用2倍量70%乙醇浸泡24 h,以3.0 $mL·min^{-1}·kg^{-1}$速度渗漉,收集6倍量渗漉液。结论:优选的渗漉提取工艺提取效率高,验证试验结果表明该提取工艺重复性好、稳定可行。

[关键词] 醒脑灵颗粒;丹参酮 $Ⅱ_A$;大黄总蒽醌;渗漉法
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)16-0040-04

Percolation Extraction Process of Xingnaoling Granules

JIANG Zhi-qiang[1], *ZHANG Jian-jun*[2]
(1. *Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guangzhou* 510405, *China*;
2. *Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Guangzhou* 510095, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To optimize the conditions for the percolation extraction processes of Xingnaoling granules. **Method**: The content of total anthraquinones in Rhei Radix et Rhizome and tanshinone $Ⅱ_A$ and the yield of dry ointment were used as indexes to select the optimal extraction processes with single factor test. **Result**: The

[收稿日期] 20101108(011)
[第一作者] 江志强,博士研究生,从事中药新制剂的研究,Tel:020-83590129,E-mail:149866965@qq.com

实际测得平均OD值为0.785 9,与理论预测值(0.806 4)偏差为-2.54%。证明所选提取工艺可行。

3 讨论

本实验考虑到虎杖苷及蛇床子素的含量测定均以乙腈和水组成流动相,通过调整该流动相的比例和时间进行梯度洗脱,可以同时测定虎杖苷及蛇床子素的含量,且分离效果好,达到了节省测定时间和次数的效果。

星点设计-效应面优化法中,模型的拟合首先运用多元线性回归分析,以 F 检验判断模型的优劣,如果因变量与变量的线性拟合较好,表明因变量与变量之间呈线性关系,分析就此结束。如果线性拟合较差,要用二次回归模型分析即二项式拟合,通过复相关系数判断拟合效果,根据方差检验判断方程的显著性。如果二次回归模型分析效果不佳,则根据二次回归模型方程描绘效应面,从效应面的三维图来选择最佳区域,从而得出最佳工艺的条件。

本实验提示星点设计-效应面法优选妇雅净泡腾片的提取工艺,方法简便,预测性良好,可在中药制剂的新药研发中进一步推广应用。

[参考文献]

[1] 王志萍,梁裕芬,梁丹,等. 妇雅净浸膏体外抑菌杀虫作用的实验研究[J]. 广西中医药, 2007,30(3): 54.
[2] 田秀峰,边宝林. 中药泡腾片及工艺研究进展[J]. 中国中药杂志,2004,29(7):624.
[3] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学:药学分册,2000,27(5):292.
[4] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化:星点设计和总评"归一值"的应用[J]. 中国药学杂志,2000,35(8):530.
[5] 中国药典. 一部[S]. 2005:145,219.

[责任编辑 仝燕]

optimal percolation extraction conditions are as follows: the medicinal herbs were crushed into coarse grains and soaked by two folds amount of 70% alcohol for 24 hours, collecting 6 folds of percolation fluid at a rate of 3.0 $mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$. **Conclusion**: The optimal percolation extraction technology is efficient with high yields, and the results of verification experiment show that the technology is reproducible and stable.

[**Key words**] Xingnaoling Granules; tanshinone II_A; total anthraquinones in Rhei Radix et Rhizome; percolation

醒脑灵颗粒是根据临床治疗缺血性脑中风的有效验方制备而成，由丹参、大黄、三七、桃仁等 10 味中药组成，具有活血化瘀、行气止痛、醒脑开窍之功效。根据方中各味中药所含化学成分的理化性质，分水煎煮提取、乙醇渗漉提取 2 个部分。丹参等药材采用乙醇渗漉法提取。本研究将对丹参等药材用渗漉法提取进行研究，以确定其最佳渗漉提取工艺，使制剂工艺更合理。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司），Sartorius BP211D 电子分析天平（德国赛多利斯公司）。

药材由广东省第二中医院中药房提供，经广东省中医研究所孙冬梅主任中药师鉴定合格；大黄素对照品（中国药品生物制品检定所，批号 0765-9204）、丹参酮 II_A 对照品（中国药品生物制品检定所，批号 110766-200416），水为超纯水，甲醇为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹参酮 II_A 含量的测定[2]

2.1.1 色谱条件 Eclipse XDB 色谱柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm），流动相甲醇-水（75∶25），柱温 30 ℃，流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$，检测波长 270 nm，进样量 10.0 μL。

2.1.2 丹参酮 II_A 对照品溶液 取丹参酮 II_A 对照品适量，精密称定，置棕色量瓶中，加甲醇制成每 1 mL 含丹参酮 II_A 16.56 μg 的溶液。

2.1.3 供试液的制备 取各提取液适量，加乙醇稀释，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 标准曲线的建立 精密吸取丹参酮 II_A 对照液 4.0，8.0，12.0，16.0，20.0 μL，按上述色谱条件测定。以峰面积（Y）对丹参酮 II_A 进样量（X）进行线性回归，得回归方程 $Y = 5.7089X - 4.5133$（$r = 0.99995$）。结果表明，丹参酮 II_A 进样量在66.24 ~ 331.2 ng 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一丹参酮 II_A 对照品溶液，按上述色谱条件重复进样 6 次，每次 10.0 μL，测定丹参酮 II_A 峰面积，RSD 1.59%，结果表明该方法精密度良好。

2.1.6 重复性试验 分别精密量取同一提取液 6 份，制备供试液，按上述色谱条件测定丹参酮 II_A 的峰面积，RSD 1.85%，结果表明该方法的重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密量取同一提取液（含丹参酮 II_A 0.18 $g \cdot L^{-1}$）6 份，分别准确加入丹参酮 II_A 对照品适量，按照供试液制备方法制备供试液，计算加样回收率，平均回收率为 99.10 %，RSD 1.94%。

2.1.8 稳定性试验 取供试品溶液，在 0，2，4，6，8，10，24 h 分别进样，测定丹参酮 II_A 的峰面积，RSD 为 1.71%，结果表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2 大黄总蒽醌含量的测定

2.2.1 供试液的制备 精密量取各提取液适量于蒸发皿中，水浴蒸干，加冰醋酸-25% 盐酸（10∶21）20 mL 使溶解[1]，沸水浴中回流 1 h，立即置冰水浴中冷却，用乙醚萃取 4 次，20 mL/次，合并萃取液，加无水硫酸钠脱水，滤过，挥干，加 0.8% 醋酸镁甲醇溶液溶解残渣并定容至 25 mL，摇匀，即得。

2.2.2 大黄素对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含 85.08 μg 的对照品溶液。

2.2.3 最佳测定波长的确定 取大黄素对照品溶液适量，水浴挥干，以 0.8% 醋酸镁甲醇溶液溶解残渣并定容至 10 mL，摇匀；以 0.8% 醋酸镁甲醇溶液作参比溶液，在 400 ~ 600 nm 分别对以上处理后的大黄素对照品溶液和供试液进行扫描，两者在 505 nm 处均有最大吸收，故选择 505 nm 作为测定波长。

2.2.4 标准曲线的制备 精密量取大黄素对照品溶液 1.0，2.0，4.0，6.0，8.0 mL，水浴挥干，以 0.8% 醋

酸镁甲醇溶液溶解残渣并定容至 25 mL,摇匀,以 0.8%醋酸镁甲醇溶液作参比溶液,照分光光度法于 505 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A=0.045\ 8C-0.007\ 6(r=0.999\ 6)$。结果表明大黄素在 3.40 ~27.22 $mg \cdot L^{-1}$ 具有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验　精密吸取大黄素对照品溶液 2 mL,按上述大黄总蒽醌含量测定方法重复测定 6 次,计算得吸光度的 RSD 0.71%,结果表明该方法精密度良好。

2.2.6 重复性试验　分别精密量取同一提取液 6 份,按供试液的制备方法制备供试液,按上述大黄总蒽醌含量测定方法测定,计算得吸光度的 RSD 1.95%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验　精密量取同一提取液(含大黄总蒽醌 84.26 $g \cdot L^{-1}$)1 mL,共 6 份,分别加入大黄素对照品溶液适量,按照供试液制备方法制备供试液,按上述大黄总蒽醌含量测定方法测定,计算加样回收率,平均回收率为 99.35 %,RSD 1.91%。

2.2.8 稳定性试验　精密吸取大黄素对照品溶液和供试液适量,分别于显色后 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h 测定吸光度,大黄素对照溶液和供试液的 RSD 分别为 1.38%,1.56%。结果表明显色产物的颜色在 3 h 内稳定。

2.3 得膏率测定法　精密量取提取液适量,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 ℃下烘 5 h,取出,置干燥器中冷却,称重,按下式计算得膏率:

得膏率 = 干膏重/原药材重 × 100%

2.4 提取工艺条件的选择

2.4.1 乙醇体积分数的选择　按处方比例称取丹参等药材粗粉约 22.5 g,共 12 份,分别加入药材 6 倍量的40%,50%,60%,70%,80%,90%乙醇,每个乙醇体积分数平行 2 次试验,浸泡 24 h,滤过,滤液定容至 100 mL,分别按丹参酮 $Ⅱ_A$ 含量测定法,大黄总蒽醌含量测定法和得膏率测定法测定各指标成分,结果见表 1。

表 1　醒脑灵颗粒渗漉提取工艺中乙醇体积分数的选择

乙醇体积分数/%	丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率/%		大黄总蒽醌提取率/%		得膏率/%		综合评分 1	综合评分 2
	1	2	1	2	1	2		
40	3.16	3.21	31.19	31.11	24.60	24.64	37.23	37.33
50	14.37	14.33	39.85	39.86	26.98	26.92	56.01	55.96
60	32.58	32.50	47.57	47.63	25.71	25.75	79.57	79.54
70	42.15	42.19	60.73	60.69	18.60	18.55	91.67	91.64
80	44.01	44.08	55.38	55.45	17.50	17.53	90.33	90.43
90	41.25	41.22	43.59	43.52	9.58	9.62	75.50	75.42

注:采用综合加权评分对试验结果进行分析,综合评分 =(丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率/最大丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率)×50 +(大黄总蒽醌提取率/最大大黄总蒽醌提取率)×30 +(得膏率/最大得膏率)×20。

从表 1 可知,70%乙醇的综合评分最高,提取效率最高。单因素方差分析结果显示,乙醇体积分数对丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率、大黄总蒽醌提取率及得膏率均具有显著性影响($P<0.05$)。对各乙醇体积分数结果进行两两间多重比较,采用 Tamhame 统计方法检验,结果显示,以 70%乙醇的结果为优。所以,乙醇体积分数选取 70%。

2.4.2 浸泡时间的选择　按处方比例称取丹参等药材粗粉约 45.0 g,共 2 份,加 70%乙醇 100 mL 浸泡,分别于 0,2,4,6,8,24,48,72 h 称定浸泡后药材质量。按时间顺序,药材平均增重分别为 0.00,31.95,35.36,38.38,38.92,44.74,46.21,47.60。当浸泡 24 h 后,药材质量增加较少。单因素方差分析结果显示,浸泡时间对药材质量的增加有显著性影响($P<0.05$)。对各时间点结果进行两两间多重比较,采用 Tamhame 统计方法检验,结果显示,浸泡 24 h 药材基本浸透,所以浸泡时间选择 24 h。

2.4.3 渗漉收液倍量及流速的优选　照 2005 年版《中国药典》流浸膏和浸膏剂(一部附录Ⅹ)项下渗漉法操作,按处方比例称取丹参等药材粗粉约 90.00 g,共 3 份,分别加入 70%乙醇 200 mL,浸渍 24 h,加 70%乙醇进行渗漉,渗漉速度分别为 1,2,3 $mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$,按药材倍量分别收集渗漉液,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 ℃下烘 5 h,取出,置干燥器中冷却,称重,结果见表 2。

表 2　渗漉收液量及流速对得膏率的影响

收液量/倍	渗漉速度/mL·min⁻¹·kg⁻¹		
	1	2	3
1	17.15	17.31	16.33
2	30.66	29.78	28.28
3	38.19	36.13	34.82
4	41.81	39.71	38.36
5	43.42	41.94	40.38
6	44.24	43.20	41.65
7	44.70	43.93	42.46
8	44.99	44.39	43.10
9	45.18	44.72	43.56
10	45.30	44.97	43.89

从表 3 可知，渗漉速度越慢，总得膏率越高；收液倍量越多，总得膏率越高。单变量方差分析结果显示，3 种渗漉速度间无显著性差异（$P = 0.602 > 0.05$），收液倍量有显著性差异（$P < 0.05$）。聚类分析结果显示，收液倍量 6，7，8，9，10 归为一类。因此渗漉速度选 3 $mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$，收液倍量选 6 倍量。

通过以上单因素试验，确定丹参等药材的最佳渗漉提取工艺为药材粗粉碎，加 200 mL 70% 乙醇浸泡 24 h，以 3 $mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$速度渗漉，收集 6 倍量渗漉液。

2.5　验证试验　为了验证上述最佳渗漉提取工艺的可靠性和稳定性，作者对经过单因素试验优选得到的提取工艺进行 3 次平行试验，结果提示通过单因素试验优选的工艺条件稳定、可靠、较理想，试验结果见表 3。

表 3　醒脑灵颗粒渗漉提取工艺验证试验　　%

No.	大黄总蒽醌提取率	丹参酮 $Ⅱ_A$ 提取率	得膏率
1	88.06	81.51	42.15
2	85.24	77.21	41.28
3	83.75	78.54	43.70
平均值	85.68	79.09	42.38
RSD	2.55	2.78	2.89

3　讨论

渗漉法在中药生产中较常使用，其具有提取较完全、不需加热、不易破坏有效成分、节约能耗等优点。该研究中，选取丹参酮 $Ⅱ_A$ 和大黄总蒽醌作为考察指标。丹参所含的化学成分较为复杂，其中丹参酮类化合物是其活血化瘀的主要活性成分之一，丹参酮类亲脂性较强，而且对光热不稳定。大黄主含蒽醌类化合物，现代研究表明，温度和受热时间对大黄蒽醌类成分影响较大，有报道研究表明大黄渗漉法明显优于煎煮法；方中其他药味有效成分醇溶性较强，受热不稳定，故本研究从丹参等药材所含化学成分的理化性质和工业化生产成本综合考虑，选择渗漉法进行研究。本研究采用渗漉法，丹参酮 $Ⅱ_A$ 及大黄总蒽醌提取效率高，优选的工艺条件稳定、可靠，适合于工业生产。

在大黄总蒽醌供试液的制备过程中，存在几个影响试验结果的因素，主要有结合蒽醌水解用酸和水解温度 2 个因素。参考相关文献，我们分别用 8% 盐酸，2.5 $mol \cdot L^{-1}$ 硫酸，醋酸-25% 盐酸（10∶21）对其中所含结合型蒽醌进行水解，发现用醋酸-25% 盐酸（10∶21）水解所得总蒽醌含量明显高于用 8% 盐酸和 2.5 $mol \cdot L^{-1}$硫酸水解所得总蒽醌含量，温度需达到 95 ℃ 水解效果才理想，故本研究选用醋酸-25% 盐酸（10∶21）对大黄结合型蒽醌进行水解，水解温度控制在 95 ℃以上。

丹参具有活血化瘀止痛等功效，对有效促进缺血性脑中风病症的改善和康复起主要作用；大黄具有泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效，能够辅助性地促进该病症的改善。在进行乙醇体积分数选择的单因素试验多指标综合评价时，考虑丹参和大黄在该制剂中所处地位，丹参酮 $Ⅱ_A$ 的权重系数以 50% 计，大黄总蒽醌的权重系数以 30% 计，得膏率作为间接参考指标权重系数以 20% 计。

［参考文献］

［1］　王淑美，冯素香，李淑芳，等. 脑脉通有效部位中总蒽醌的含量测定［J］. 广东药学院学报，2008，24（2）：128.

［2］　中国药典. 一部［S］. 2005：52.

［责任编辑　仝燕］