

乙肝转阴颗粒提取工艺优选

王丽惠, 罗旭艳, 杨欣, 黄仁彬*

(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 筛选和优化乙肝转阴颗粒的提取工艺。方法: 采用正交试验设计方法, 以水提取物中浸膏得率, 槲皮素含量为指标, 确定最佳提取工艺参数。结果: 乙肝转阴颗粒的最佳水提取工艺参数为 10 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 1 h。结论: 该提取方法稳定、合理, 可作为乙肝转阴颗粒的最佳提取工艺。

[关键词] 乙肝转阴颗粒; 槲皮素; 提取工艺; 正交设计

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)02-0048-03

Optimization of Extraction Process of Yiganzhuanyin Granules by Orthogonal Test

WANG Li-hui, LUO Xu-yan, YANG Xin, HUANG Ren-bin*

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To screen and optimize the extract technique of Yiganzhuanyin Granules. **Method:** The extract technique of Yiganzhuanyin Granules was investigated using orthogonal design with the dry extract

[收稿日期] 20100907(007)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0992003A-2)

[第一作者] 王丽惠, 硕士, 研究方向: 药物质量控制, Tel: 15878750214, E-mail: hellowanglihui@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗肝纤维化和心血管药物研究, Tel: 13807713926, E-mail: huangrenbin518@163.com

3 讨论

3.1 药物混悬性考察 为了保证制备过程中含量的均匀, 色泽的一致, 对提取物在液态基质中的混悬性进行试验, 将提取物加到熔融的 PEG4000 和 PEG6000 中混匀, 保温放置 6 h 后观察, 结果提取物在液态 PEG 中色泽均匀, 无明显分层和沉淀现象。

3.2 冷却剂的选择 对比了液体石蜡和二甲基硅油, 结果表明液体石蜡沉降速度适中、圆整度好、硬度好, 故选择液体石蜡为冷凝剂。

3.3 外观质量评价 主要考核硬度、色泽均匀度、圆整度、粘丸、拖尾等, 5 人评分, 取平均值, 尽可能减少主观因素干扰。

通过正交试验确定了四磨汤滴丸最佳成型工艺, 验证试验表明最佳工艺稳定可行。四磨汤滴丸剂型较口服液剂型在病人携带和服用方便性方面有较大提高, 同时也大大降低物流仓储成本, 有必要进

行产业化开发。

[参考文献]

- [1] 盛义朝, 汪文涛, 崇巍. 一种治疗婴幼儿气滞腹痛、腕腹胀满和术后腹胀的口服液. 中国, 94110842. 2 [P]. 2001-6-13.
- [2] 任智红. 四磨汤与金双歧辅助治疗新生儿黄疸[J]. 南京军医学院学报, 2002, 12(24): 217.
- [3] 秀成玲. 四磨汤辅助治疗新生儿高胆红素血症 36 例[J]. 陕西中医, 2001, 12(22): 714.
- [4] 崔华秀, 闫大志. 四磨汤加味治疗胃神经官能症 33 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(1): 81.
- [5] 吴学琴. 四磨汤加西沙比利治疗便秘型肠易激综合征 28 例[J]. 河北医药, 2003, 3(25): 203.
- [6] 刘干. 四磨汤临证应用举隅[J]. 新中医, 2008, 7(40): 97.
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2005. 附录 : 71.

[责任编辑 仝燕]

yielding rate and quercetin content as the index. **Result:** The optimal condition for the extraction of Yiganzhuanyin Granules was 10 folds amount of water, 3 times, 1 hour each time. **Conclusion:** The optimum extraction procedure is stable and reliable, and can be used in the extraction procedure of Yiganzhuanyin Granules.

[Key words] Yiganzhuanyin Granules; quercetin; extract technique; orthogonal design

乙肝转阴胶囊系根据民间治疗肝炎经验和中医理论研制的复方制剂, 由白花蛇舌草、半枝莲、海金沙、夏枯草、蒲公英、土茵陈、马鞭草、三枝枪等多种中草药配伍组成, 主要用于治疗乙型病毒性肝炎、肝硬化等。为方便临床用药和患者携带, 根据各味药材所含成分的理化性质, 拟采用水煎煮提取。

1 材料

1.1 仪器与设备 日本岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 包括紫外检测器, 五元泵, 在线真空脱气机, Lcsolution 色谱工作站; JA1003 电子天平(上海天平仪器厂)。

1.2 试药 白花蛇舌草、小田基黄、鸡骨草、半支莲等多味药材均购自南宁市, 经广西医科大学药学院蒋伟哲教授鉴定符合 2005 年版《中国药典》(一部) 有关规定; 槲皮素对照品(100081-200406, 中国药品生物制品检定所); 甲醇(色谱纯, Fisher Scientific, 7157L-6804); 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 试验设计 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对水煎煮提取工艺进行优选。选取加水量(A)、煎煮时间(B)和煎煮次数(C) 3 个因素, 每个因素取 3 个水平进行正交设计(见表 1), 以干膏得率和槲皮素含量作为考察指标, 优化煎煮工艺。

表 1 水煎煮工艺正交设计因素水平表

水平	A 加水量 / 倍	B 煎煮时间 / h	C 煎煮次数 / 次
1	10	1	1
2	8	1.5	2
3	6	2	3

2.2 方法与结果

2.2.1 吸水率的测定 按照处方称取药材 1 份, 准确加入适量水, 密闭浸泡过夜, 滤过, 量取滤液, 则药材的吸水率 = (加水量 - 滤液量) / 药材质量 × 100%^[11]。在本次试验中, 加入 1 200 水, 滤液为 1 000 mL, 药材量为 121.62 g, 计算得吸水率为 164.45%, 即 1 kg 药材吸水量为 1 645.50 mL。

2.2.2 干膏得率的测定 按处方称取药材 27 份

(每组试验平行操作 3 次), 每份重 110 g, 按正交试验表(表 2) 分别加入不同倍量水, 每份按质量多加入水 $1.6445 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 浸泡过夜, 煎煮不同时间和不同次数, 滤过, 离心, 取上清液置于已恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 60 ℃ 恒温干燥至恒重, 取出, 置干燥器中冷却 0.5 h, 迅速精密称定干膏质量, 干膏得率 = 干膏质量 / 每份药材质量 × 100%^[2]。

2.3 槲皮素含量的测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; Hanbon Sci. &Tech. Dubhe C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇 - 0.4% 磷酸(45 : 55) 为流动相; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 紫外检测波长 360 nm; 柱温 35 ℃^[3]; 进样 20 μL, 此色谱条件下, 理论塔板数按槲皮素峰计算, 应不得低于 4 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素对照品 25 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀后, 制成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 既得。

2.3.3 供试品溶液的制备 按正交表条件提取, 精

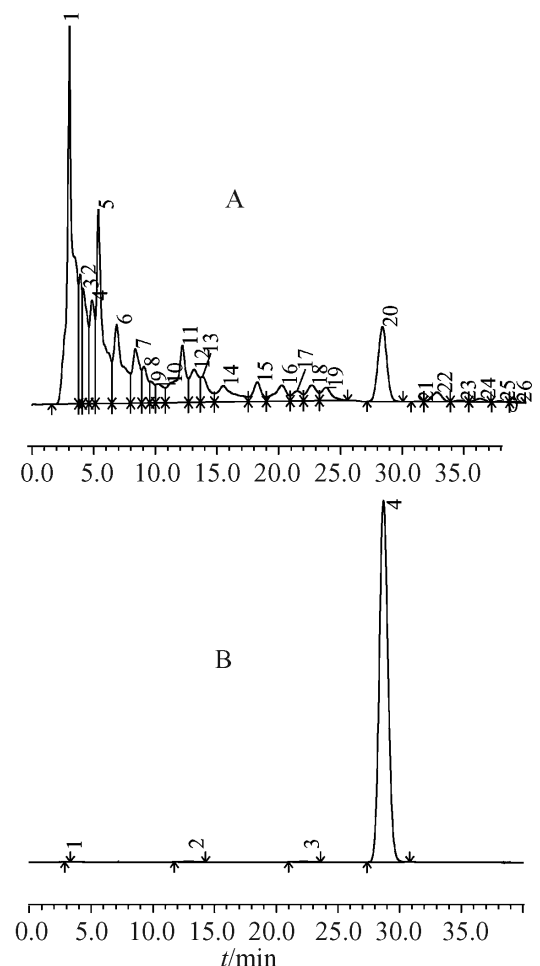


图 1 乙肝转阴颗粒槲皮素含量测定 HPLC
A. 供试品; 20. 槲皮素峰; B. 对照品; 4. 槲皮素

密称取干膏 2 g, 加 80% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 1 h, 放冷称定质量, 用 80% 甲醇补足所失质量, 摇匀, 过滤, 取滤液 25 mL, 加入 HCl 5 mL, 摇匀, 于 90 °C 水浴中加热回流 1 h, 取出后流水冷却, 转移至 50 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释至刻度, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 既得。

2.3.4 标准曲线绘制 精密量取对照品溶液 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 进样 20 μL 测定。以进样量 (X , μg) 对色谱峰面积 (Y) 进行线性回归。回归方程为: $Y = 6.0 \times 10^6 X + 4.8 \times 10^4$, $R^2 = 0.9994$, 线性范围 0.054 ~ 4.320 μg。

2.4 水煎煮工艺正交试验 正交试验结果见表 2, 用 SPSS13.0 进行方差分析, 方差分析结果见表 3, 4。

表 2 水煎煮工艺正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	干膏得率 / %	槲皮素 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \times 10^{-2}$
1	1	1	1	1	12.86	67.68
2	1	2	2	2	19.07	86.90
3	1	3	3	3	21.02	96.70
4	2	1	2	3	15.91	60.23
5	2	2	3	1	20.56	95.65
6	2	3	1	2	12.18	22.58
7	3	1	3	2	19.09	90.20
8	3	2	1	3	12.47	31.10
9	3	3	2	1	17.62	21.93
干膏得率	K_1	17.6500	15.9533	12.033	17.0133	
	K_2	16.2167	17.3667	17.533	316.7800	
	K_3	16.3933	16.9400	20.223	316.4667	
	R	1.4333	1.4134	7.7200	0.5466	
槲皮素	K_1	83.7600	72.7033	40.4533	61.7533	
	K_2	59.4867	71.2167	56.3533	66.5600	
	K_3	47.7433	47.0700	94.1833	62.6767	
	R	36.0167	25.6333	53.7333	4.8067	

表 3 干膏得率正交试验结果方差分析

变异来源	SS	MS	F	P
A	3.665	1.832	8.118	0.110
B	3.153	1.577	6.984	0.125
C	92.135	46.068	204.080	0.005
D 误差	0.451	0.226	-	-

$F_{0.05}(2, 2) = 19$; $F_{0.01}(2, 2) = 99$ (表 4 同); $f = 2$ 。

表 4 槲皮素含量正交试验结果方差分析

变异来源	SS	MS	F	P
A	2 024.301	1 012.150	51.856	0.019
B	1 242.339	621.170	31.825	0.030
C	4 570.832	2 285.416	117.090	0.008
D 误差	39.037	19.518	-	-

根据以上结果可知, 以干膏得率为评分指标时, C 因素有显著性影响, 影响因素大小排列顺序为: $C > A > B$, 且 $A_1 B_1 C_3$ 最佳, 即最佳提取工艺为 10 倍量水, 提取 1.5 h, 共提取 3 次; 以槲皮素含量为评分指标时, C 因素具有显著性影响, 影响因素大小排列顺序为: $C > A > B$, 且 $A_1 B_1 C_3$ 最佳, 即最佳提取工艺为加 10 倍量水, 提取 1 h, 共提取 3 次。由于 A 因素各水平间差异较小, 从节能、节时的角度考虑, 确定最佳提取工艺为 $A_1 B_1 C_3$, 即 10 倍量水, 水煎煮 1 h, 共提取 3 次。

2.5 最佳提取工艺验证试验 按处方称取药材共 3 份, 按最佳提取工艺 $A_1 B_1 C_3$ 提取, 分别测定干膏得率及干膏中槲皮素含量, 3 次平行试验结果分别为: 干膏得率: 20.42%, 20.80%, 20.32%; 槲皮素: 0.94, 0.96, 0.95 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。RSD 1.2%, 0.8%。

验证试验结果表明, 按最佳提取工艺 $A_1 B_1 C_3$ 所提取的干膏得率及槲皮素含量都接近正交试验中的最大值, 可以认为提取得较为完全, 按优选工艺提取其干膏得率和干浸膏中槲皮素的含量基本稳定, 说明优选工艺基本可行。

3 小结

在正交试验中选用小田基黄中主要成分槲皮素及干膏得率为指标优选提取工艺, 选择可能影响提取的 3 个指标进行优化, 最终确定了乙肝转阴颗粒的最佳提取工艺, 为进一步研究提供了基础。

[参考文献]

- [1] 高希梅, 李飞, 乔延江, 等. 黄连不同炮制品 HPCE 特征图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 158.
- [2] 黄建春, 黄仁彬, 杨铮, 等. 思的明胶囊提取工艺研究 [J]. 中国药房, 2008, 19(33): 2573.
- [3] 李丹, 杨冉, 曾华. RE-HPLC 同时测定金钱通淋颗粒中槲皮素、木犀草素及山奈酚的含量 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 1(45): 145.

[责任编辑 仝燕]