

正交试验优选蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷的提取工艺

韩光明*,张艳艳,刘加秀(日照市中医医院,山东日照 276800)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4421-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.33

摘要 目的:优选蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷提取工艺。方法:以乙醇体积分数、浸渍时间、流速为因素,以浸膏得率和落新妇苷提取量为指标,设计正交试验优化蒲苓盆炎康胶囊组方药材(土茯苓、川芎、杜仲、三七、车前子)中落新妇苷的提取工艺。结果:最优提取工艺为加2倍量70%乙醇浸渍24h,再加70%乙醇溶液渗漉,流速3 ml/min,收集10倍生药量的渗漉液体积。验证试验中浸膏得率分别为6.79%、6.92%、6.84%,均值为(6.85±0.96)% (n=3);落新妇苷提取量分别为39.23、39.67、39.69 mg,均值为(39.53±0.66) mg (n=3)。结论:优化的蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷提取工艺稳定,可操作性强。

关键词 蒲苓盆炎康胶囊;土茯苓;落新妇苷;提取量;提取工艺;浸膏得率;正交试验

Optimization of the Extraction Technology of Astilbin in Puling Penyankang Capsules by Orthogonal Test

HAN Guang-ming, ZHANG Yan-yan, LIU Jia-xiu (Rizhao Hospital of TCM, Shandong Rizhao 276800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of astilbin from medicinal herbs in Puling penyankang capsules. METHODS: The extraction technology of astilbin from ingredients (*Smilacis glabrae rhizoma*, *chuanxiong rhizoma*, *Eucommiae cortex*, *notoginseng radix et rhizoma*, *Plantaginis semen*) of Puling penyankang capsules was optimized with concentration of ethanol, immersion time and percolation speed as factors, and using the yield of extractum and the extraction amount of astilbin as index. RESULTS: The optimized extraction technology was as follows as 2-fold 70% ethanol, immersed for 24 h, percolated with 70% ethanol with percolation speed of 3 ml/min, 10-fold percolate volume was collected. In verification test, the yield of extractum were 6.79%, 6.92% and 6.84%, respectively, with average value of (6.85±0.96)% (n=3); the extraction amounts of astilbin were 39.23, 39.67 and 39.69 mg, with average value of (39.53±0.66) mg (n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology of astilbin in Puling penyankang capsules is stable and practical.

KEYWORDS Puling penyankang capsules; *Smilacis glabrae rhizoma*; Astilbin; Extraction amount; Extraction technology; Yield of extractum; Orthogonal test

蒲苓盆炎康胶囊系由蒲苓盆炎康颗粒改剂型而成,临床上用于治疗慢性盆腔炎。大量的研究及临床应用证明该组方具有解痉、抗炎、镇痛、改善微循环、调节内分泌等多种功效^[1-3]。蒲苓盆炎康颗粒在制剂中存在以下不足:组方中君药土茯苓中的镇痛、利尿及抗炎主要成分落新妇苷在水溶液中不稳定,尤其在加热的条件下,所以在原生产工艺生产的蒲苓盆炎康颗粒中,落新妇苷几乎被破坏。因此,有研究者改进制剂工艺方法,由颗粒改为胶囊,将土茯苓与方中其他药材车前子、杜

仲、三七、川芎一起用乙醇提取,并进行了渗漉法与浸渍法提取效果的比较研究^[3-5]。经工艺改进后,蒲苓盆炎康胶囊具有有效成分提取完全、生产周期缩短、服用量小、适应人群更广泛、服用更方便等优点。在本文中,笔者采用浸渍、渗漉法提取君药土茯苓中的落新妇苷^[6-7],再对提取工艺采用正交试验法进行优化,以确定更优提取工艺,使制剂工艺更加合理。

1 材料

1.1 仪器

究进展[J].中国药房,2013,24(13):1 225.
[8] 王绚,陈军,蔡宝昌.中药生物碱类成分贴剂的研究进展[J].中草药,2011,42(9):1 857.
[9] 许凉凉,伊辛,戎堃,等.微球载体材料研究概况及其在中药领域中的展望[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):239.
[10] Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release[J]. *Int J Pharm*, 2004, 282(1/2):1.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录23.

[12] 肖潮达,周雪,沈祥春,等.阿司匹林缓释微球的制备及其体外释药性能研究[J].中国药房,2014,25(45):4 275.
[13] 张德华,李茹,王永梅,等.生物碱的分类和鉴定方法研究进展[J].皖西学院学报,2010,26(5):69.
[14] 李俊松,冯怡,徐德生.中药缓、控释制剂研究现状及思考[J].中成药,2007,29(4):563.
[15] 贺秀婷,翟光喜,曹忠诚,等.中药微球制剂的研究进展[J].上海中医药杂志,2013,47(8):90.
[16] 艾国,梅兴国.缓释胸腺五肽微球的制备及体外释放的研究[J].中国药学杂志,2007,42(11):836.

*副主任中药师。研究方向:中药制剂。电话:0633-8290867。
E-mail:hgm1976@163.com

(收稿日期:2015-01-19 修回日期:2015-08-15)
(编辑:刘 萍)

LC-20Atvp型高效液相色谱仪、SPD-20Avp型紫外检测器(日本岛津公司);KC-250W型超声波清洗机(济宁高新区科源超声仪器设备厂);XS105型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);SZ-97型自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);HH-601型超级恒温水浴器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

土茯苓(上海养和堂中药饮片有限公司,批号:SH131011);川芎(批号:130503-1)、三七(批号:130801-3)均购于安徽亳州中药材饮片有限公司;杜仲(十堰市宏康医药有限责任公司,批号:20130614);车前子(安国市华仁药材有限公司,批号:01435),以上各味饮片均符合2010年版《中国药典》(一部)质量标准,由本院主管中药药师刘加秀鉴定为真品。落新妇苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111798-201303,纯度:92.4%);甲醇为色谱纯,水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 蒲苓盆炎康胶囊剂与颗粒剂工艺对比

根据落新妇苷的性质,即易溶于乙醇、极微溶于水^[8]、在水溶液中易氧化的特点,对蒲苓盆炎康颗粒剂提取工艺的不足进行了改进^[9-10]。胶囊剂与颗粒剂工艺比较见表1。

表1 胶囊剂与颗粒剂工艺比较

Tab 1 Comparison of extraction technology between capsules and granules

工艺条件	胶囊剂	颗粒剂
提取工艺	①丹参,90%乙醇渗漉 ②土茯苓、车前子、杜仲、三七、川芎,70%乙醇渗漉 ③夏枯草、蒲公英、粉萆薢及丹参药渣、土茯苓等药渣,用10倍、8倍、8倍水煎煮3次	①丹参,90%乙醇渗漉 ②车前子、杜仲、三七、川芎,70%乙醇浸渍 ③土茯苓、夏枯草、蒲公英、粉萆薢及丹参药渣、土茯苓等药渣,用10倍、10倍、10倍水煎煮3次
纯化工艺	水提醇沉去杂质	直接浓缩
干燥工艺	喷雾干燥	真空干燥
成型工艺	二氧化硅	蔗糖粉、糊精

原颗粒剂每日口服量为30 g(64 g生药),改进后的胶囊剂每日口服量为6.75 g(64 g生药),改进后有效剂量不变,但服用量更小。

2.2 落新妇苷含量测定

2.2.1 色谱条件^[11] 色谱柱:Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%冰醋酸溶液(39:61);流速:1.0 ml/min;紫外检测器,检测波长:291 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μl。

2.2.2 对照品溶液的制备 取落新妇苷对照品适量,精密称定,加60%甲醇制成每1 ml含0.2 mg的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品提取物干浸膏约0.3 g,精密称定,置于50 ml量瓶中,加60%甲醇45 ml,超声(功率:150 W,频率:40 kHz)处理15 min,取出,放冷,加60%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密称取落新妇苷对照品适量,加60%甲醇分别制成质量浓度为0.084、0.126、0.168、0.210、0.252、0.294 mg/ml的对照品溶液,进样,记录色谱图。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $y=20\ 125x-39.255(r=0.999\ 7)$ 。结果表明,

落新妇苷检测质量浓度线性范围为0.084~0.294 μg/ml。

2.2.5 精密度试验 取落新妇苷对照品溶液(0.21 mg/ml)连续进样6次,记录落新妇苷的峰面积,计算其RSD=0.96%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.6 溶液稳定性试验 取落新妇苷对照品溶液(0.21 mg/ml)分别于制备后0、1、2、4、6、8 h进样,记录峰面积,计算得RSD=0.76%(n=6),结果表明溶液在8 h内稳定。

2.2.7 回收率试验 精密称取已知含量为6.62 mg/g(批号:SH131011)土茯苓药材适量6份,分别精密加入落新妇苷对照品溶液(0.21 mg/ml)6份,依法测定含量,计算平均回收率。结果为100.1%(RSD=1.25%,n=6),表明本方法准确度好。

2.2.8 专属性、灵敏度试验 按相关方法进行试验,结果辅料不干扰主成分测定,落新妇苷最低定量限为0.084 μg/ml。

2.3 乙醇渗漉法与浸渍法比较

为了优化土茯苓的提取工艺,笔者以落新妇苷为指标,先对渗漉法与浸渍法进行考察。

称取处方量药材2份,一份加2倍量70%乙醇浸渍24 h,用70%乙醇渗漉,漉速3 ml/min,收集渗漉液,体积为生药量的10倍,浓缩定容至100 ml,即得;另一份加3.3倍量70%乙醇浸渍3次,每次24 h,滤过,合并滤液,浓缩定容至100 ml,即得。结果渗漉法与浸渍法对落新妇苷的提取量分别为42.11、32.46 mg,表明以落新妇苷提取量为考察指标,渗漉法优于浸渍法,所以下采用乙醇渗漉法提取。

2.4 渗漉法中渗漉液收集体积考察

称取1/100处方量药材(即土茯苓10 g、川芎2.0 g、杜仲3.33 g、三七1.33 g、车前子5.33 g),加2倍量一定体积分数(50%、70%、90%)的乙醇浸渍24 h后按设定方案进行渗漉,收集一定体积渗漉液,定容至100 ml。精密吸取20 ml,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,置于干燥器中冷却0.5 h,迅速称质量,测浸膏得率(浸膏得率=干膏质量/生药质量×100%)及落新妇苷提取量(提取量=测得量/干膏称样量×浸膏得率),结果见表2。

表2 乙醇体积分数及渗漉液收集体积考察结果

Tab 2 The test results of volume fraction of ethanol and collected percolate volume

渗漉液收集体积	50%乙醇		70%乙醇		90%乙醇	
	浸膏得率, %	落新妇苷提取量, mg	浸膏得率, %	落新妇苷提取量, mg	浸膏得率, %	落新妇苷提取量, mg
8倍生药量	3.42	27.56	5.01	35.91	2.98	23.38
10倍生药量	4.12	34.33	5.18	41.78	3.89	29.22
12倍生药量	4.83	36.28	5.42	42.72	4.31	34.20

表2结果表明,以浸膏得率、落新妇苷提取量为考察指标,用70%乙醇为溶剂进行渗漉,收集渗漉液体积为10倍生药量的效果较好。

2.5 优化提取工艺

2.5.1 正交试验 根据单因素考察的结果,以乙醇体积分数(A)、浸渍时间(B)、漉速(C)为因素设计L₉(3³)正交试验,并分别以落新妇苷提取量为评价指标,优化提取工艺。提取工艺因素与水平详见表3,正交试验设计与结果详见表4,浸膏得率方差分析结果详见表5,落新妇苷提取量方差分析结果详见表6。

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	A(乙醇体积分数),%	B(浸渍时间),h	C(流速),ml/min
1	50	12	1
2	70	24	2
3	90	48	3

表4 正交试验设计与结果

Tab 4 Design and results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	浸膏得率, %	落新妇苷提取量, %
1	1	1	1	1	2.81	26.58
2	1	2	2	2	4.30	32.27
3	1	3	3	3	4.24	31.15
4	2	1	2	3	5.09	36.82
5	2	2	3	1	6.71	45.17
6	2	3	1	2	5.74	38.91
7	3	1	3	2	2.41	25.79
8	3	2	1	3	3.57	31.03
9	3	3	2	1	3.22	27.69
浸膏得率	均值1	3.783	3.437	4.040	4.247	
	均值2	5.847	4.860	4.203	4.150	
	均值3	3.067	4.400	4.453	4.300	
	极差	2.780	1.423	0.413	0.150	
落新妇苷	均值1	30.00	29.73	32.17	33.15	
提取量	均值2	40.30	36.16	32.26	32.32	
	均值3	28.17	32.58	34.04	33.33	
	极差	12.13	6.43	1.86	0.82	

表5 浸膏得率方差分析结果

Tab 5 Analysis results of variance for the yield of extractum

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	12.50	2	6.25	360.33	<0.01
B	3.17	2	1.58	91.25	<0.05
C	0.26	2	0.13	7.50	>0.05
误差	0.03	2	0.02		

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

表6 落新妇苷提取量方差分析结果

Tab 6 Analysis results of variance for the extraction amount of astilbin

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	256.58	2	128.29	221.71	<0.01
B	62.21	2	31.11	53.76	<0.05
C	6.64	2	3.32	5.73	>0.05
误差	1.16	2	0.58		

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

以浸膏得率为考察指标,由表中极差值大小显示,影响因素的大小顺序为 $A > B > C$,且 $A_2 > A_1 > A_3$ 、 $B_2 > B_3 > B_1$ 、 $C_3 > C_2 > C_1$;方差分析结果表明,A因素有极显著性影响($P < 0.01$),B因素有显著性影响($P < 0.05$),C因素无显著性影响($P > 0.05$),以 $A_2B_2C_3$ 组合为佳。以落新妇苷提取量为考察指标,由表中极差大小显示,影响因素的大小顺序为 $A > B > C$,且 $A_2 > A_1 > A_3$ 、 $B_2 > B_3 > B_1$ 、 $C_3 > C_2 > C_1$;方差分析结果表明,A因素有极显著影响($P < 0.01$),B因素有显著影响($P < 0.05$),C

因素无显著影响($P > 0.05$),以 $A_2B_2C_3$ 组合为佳。综合考虑,选择 $A_2B_2C_3$ 为提取工艺。

2.5.2 工艺验证试验 取同一批药材,按 $A_2B_2C_3$ 进行验证试验,测定浸膏得率及落新妇苷提取量。结果浸膏得率分别为 6.79%、6.92%、6.84%,均值为 6.85% ($RSD = 0.96\%$, $n = 3$);落新妇苷提取量分别为 39.23、39.67、39.69 mg,均值为 39.53 mg ($RSD = 0.66\%$, $n = 3$)。故确定最优工艺条件为 $A_2B_2C_3$,即加 2 倍量 70% 乙醇浸渍 24 h,再加 70% 乙醇溶液渗漉,漉速 3 ml/min,收集 10 倍生药量的渗漉液体积制备为浸膏。

3 讨论

由于蒲公英炎康颗粒组方药材土茯苓中的有效成分落新妇苷对热不稳定,因此在其胶囊制备中,君药土茯苓由水提改为渗漉法提取,以确保有效成分不被破坏。

本文运用正交设计法对提取工艺筛选优化,后续试验对采用优化后提取工艺制备的蒲公英炎康胶囊进行了体外抑菌、动物感染金黄色葡萄球菌后的体内保护及外周镇痛作用的研究,同时与颗粒剂进行了对比,结果蒲公英炎康胶囊强于颗粒剂(待另文发表),分析后认为可能是有效成分落新妇苷未被破坏、含量更高所致。因此,与颗粒剂比较,胶囊剂中落新妇苷的提取生产工艺更加合理可行,且适于工业生产。

参考文献

- [1] 魏焯,董振咏. 蒲公英炎康颗粒的临床应用研究[J]. 临床合理用药, 2008, 1(1): 59.
- [2] 宋玉娟. 蒲公英炎康治疗慢性盆腔炎 150 例临床分析[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(8): 1 218.
- [3] 于鲁海,徐建国,孙立. 新技术在天然药物提取方面的应用[J]. 新疆医学, 2004, 3(1): 74.
- [4] 岑志芳,郭淑英. 用正交设计法优化黄连的提取工艺研究[J]. 中国民族民间医药, 2009(12): 16.
- [5] 岑志芳. 正交设计法优化黄柏中盐酸小檗碱的提取工艺[J]. 中成药, 2005, 27(6): 732.
- [6] 李清清,孙忠思,李秉超,等. 土茯苓中白藜芦醇提取工艺的研究[J]. 现代农业科技, 2008(19): 13.
- [7] 任玉兰,弥春霞,张启律,等. 土茯苓中鞣质提取工艺的优化[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(12): 39.
- [8] 王永奇,王宝昌,付晓雪,等. 菝葜和肖菝葜属药材中落新妇苷药源植物的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(15): 1 430.
- [9] 刘伟,刘志刚,孙维峰,等. Box-Behnken 效应面法优化复方土茯苓颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 16.
- [10] 刘伟,刘志刚,罗明琮,等. ZTC₁₋₁₁-II 用于复方土茯苓颗粒提取液的澄清工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1 584.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 17-18.

(收稿日期: 2015-01-06 修回日期: 2015-06-08)

(编辑: 刘 萍)