

# 柏薏灌肠液的提取工艺研究

李燕<sup>1\*</sup>, 赵利刚<sup>2</sup>, 王慧丽<sup>1</sup>, 郑丽娜<sup>1</sup>, 阚淑月<sup>1</sup> (1.唐山市妇幼保健院药剂科, 河北唐山 063000; 2.华北理工大学药学院, 河北唐山 063000)

中图分类号 TQ461 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3145-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.36

**摘要** 目的:优化柏薏灌肠液的提取工艺。方法:采用星点设计-响应面法。以盐酸小檗碱、阿魏酸和干膏率的总评归一值(OD)为评价指标,考察加水量和提取时间对提取工艺的影响;同时进行验证试验。结果:最优提取工艺为第1次加11倍水煎煮70 min,第2次加5倍水煎煮30 min。验证试验中第1次提取的OD值为0.940 0,与预测值偏差-2.07%;第2次提取的OD值为0.851 8,与预测值偏差-2.41%。结论:柏薏灌肠液的提取工艺合理可行,适用于工业化生产。

**关键词** 柏薏灌肠液;星点设计-响应面法;盐酸小檗碱;阿魏酸;干膏率

## Optimization of Extraction Technology for Baiyi Rectal Solution

LI Yan<sup>1</sup>, ZHAO Ligang<sup>2</sup>, WANG Huili<sup>1</sup>, ZHENG Lina<sup>1</sup>, KAN Shuyue<sup>1</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2.College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Baiyi rectal solution. METHODS: The effects of water amount and extraction time on extraction technology were investigated by central composite design-response surface method using OD value of berberine hydrochloride and ferulic acid and the extract yield as index. Validation test was also conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as 11-fold water, decocting 70 min for the first time; 5-fold water, decocting 30 min for the second time. In validation test, OD value of first extraction was 0.940 0, and the bias between observed and predicted values was -2.07%; that of second extraction was 0.851 8, and the bias was -2.41%. CONCLUSIONS: The extraction technology of Baiyi rectal solution is reasonable, feasible and suitable for industrial production.

**KEYWORDS** Baiyi rectal solution; Central composite design-response surface methodology; Berberine hydrochloride; Ferulic acid; Extract yield

柏薏灌肠液处方由黄柏、薏苡仁、蒲公英、紫花地丁、三棱、莪术、桃仁、红花、路路通、益母草、车前子、牛膝等12味药材组成,具有清热利湿、消炎止痛之功效,治疗湿热蕴结型盆腔炎症显著。该方剂在唐山市妇幼保健院临床应用已有十余年,疗效确切。但以往一直凭医师、药师经验对方中药材进行煎煮提取,缺乏系统性。为对提取工艺进行系统研究,笔者采用星点设计-响应面分析法<sup>[1-3]</sup>,优化了柏薏灌肠液的提取工艺。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪,配置LC-20AT泵、SPD-20A紫外可见光检测器、SL-20A自动进样器,岛津LC Solution色谱工作站(日本岛津公司);BP211D型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);HH-S型恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂)。

### 1.2 药品、试剂与药材

盐酸小檗碱对照品(批号:110713-201212,纯度:96.7%)、阿魏酸对照品(批号:110773-201313,纯度:99.6%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,甲醇、三氯甲烷、磷酸、盐酸、乙醚为分析纯,均购自天津四友公司;黄柏(批号:20140201)、薏苡仁(批号:20140401)、蒲公英(批号:20140101)、紫花地丁(批号:20140101)、三棱(批号:20140301)、莪术(批号:20140301)、桃仁(批号:20140201)、红花(批号:20140401)、路路通(批号:20140401)、益母草(批号:20140301)、车前子(批号:20140201)、牛膝(批号:20140401)均购自石家庄柏林药材加工厂,经我院药材鉴别师鉴定均符

\*主管药师,硕士。研究方向:医院制剂。电话:0315-3726722。E-mail:liyan\_syphu@163.com

合2010年版《中国药典》(一部)各项下规定。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取液的制备

按照处方比例称取药材,加水煎煮得第1次提取液,滤过、浓缩、备用;第1次煎煮所得滤渣加水煎煮得第2次提取液,滤过、浓缩、备用。

### 2.2 盐酸小檗碱含量的测定<sup>[4]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱:ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(40:60, V/V);检测波长:265 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取盐酸小檗碱对照品12.10 mg于100 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品贮备液;精密量取对照品贮备液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 分别精密量取“2.1”项下制备的第1次、第2次提取液各20 ml,加浓氨溶液5 ml,用三氯甲烷振摇提取3次,每次20 ml;合并三氯甲烷提取液,过滤,蒸干滤液,残渣加甲醇溶解至10 ml量瓶中,稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm针式滤器过滤,取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.4 方法学考察** 根据相应方法进行试验。结果盐酸小檗碱的回归方程为 $y=1.435 \times 10^4 x - 2.324 \times 10^4$  ( $r=0.999 8$ ),线性范围为6.05~60.5 μg/ml;精密密度试验中峰面积RSD=0.7% ( $n=9$ );重复性试验中盐酸小檗碱含量RSD=1.3% ( $n=6$ );平均加样回收率为98.3%, RSD=1.5% ( $n=6$ );检测限(信噪比为3时)为0.101 μg/ml,定量限(信噪比为10时)为0.336 μg/ml;盐酸小檗碱与相邻杂质峰的分离度为2.01,表明该方法可用于

柏薏灌肠液中盐酸小檗碱的含量测定。

### 2.3 阿魏酸含量的测定<sup>[5-6]</sup>

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液(30:70, V/V); 检测波长: 322 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 10.40 mg 于 100 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品贮备液; 精密量取对照品贮备液 0.2、0.4、0.8、1.5、2.0 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得系列对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.1”项下制备的提取液 50 ml, 加浓盐酸(37.5%) 2.5 ml, 用乙醚振荡提取 3 次, 每次 50 ml; 合并乙醚提取液, 过滤, 蒸干, 残渣加甲醇溶解(第 1 次提取液至 10 ml 量瓶中, 第 2 次提取液至 5 ml 量瓶中) 稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 针式滤器过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.4 方法学考察结果 根据相应方法进行试验。结果阿魏酸的回归方程为  $y = 1.682 \times 10^4 x - 2.632 \times 10^4$  ( $r = 0.999 4$ ), 线性范围为 6.05~60.5 μg/ml; 精密度试验中峰面积 RSD = 0.9% ( $n = 9$ ); 重复性试验中阿魏酸含量 RSD = 1.7% ( $n = 6$ ); 平均加样回收率为 98.6%, RSD = 1.8% ( $n = 6$ ); 检测限(信噪比为 3 时)为 0.125 μg/ml, 定量限(信噪比为 10 时)为 0.416 μg/ml; 阿魏酸与相邻杂质峰的分离度为 3.20, 表明该方法可用于柏薏灌肠液中阿魏酸的含量测定。

### 2.4 干膏率的测定

精密量取“2.1”项下制备的提取液 20 ml, 置于干燥至恒质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105 ℃ 干燥至恒质量, 计算干膏率(%) = 干膏质量/复方药材质量 × 100%。

### 2.5 提取工艺优化

2.5.1 因素及水平考察 根据处方中药材特性, 结合实际生产经验, 采用水煎提取法, 影响提取工艺的主要因素有加水倍数(A)、提取时间(B)和提取次数。其中提取次数为非连续变量, 不适合回归处理, 故预先对提取次数进行单因素考察, 结果以 2 次为佳。根据预试验结果, 确定第 1 次和第 2 次提取的加水倍数和提取时间的水平, 因素与水平见表 1、表 2。

表 1 第 1 次提取的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of the first extraction

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
加水倍数(A), 倍	6.00	6.88	9.00	11.12	12.00
提取时间(B), min	30.00	43.18	75.00	106.82	120.00

表 2 第 2 次提取的因素与水平

Tab 2 Factors and levels of the second extraction

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
加水倍数(A), 倍	2.01	2.59	4.00	5.41	6.00
提取时间(B), min	20.00	25.86	40.00	54.14	60.00

2.5.2 试验设计 根据星点设计法则设计试验, 按处方比例称取药材饮片(黄柏 30 g、薏苡仁 60 g、蒲公英 60 g、紫花地丁 60 g、三棱 20 g、莪术 20 g、桃仁 20 g、红花 20 g、路路通 20 g、益母草 24 g、车前子 24 g、牛膝 20 g, 相当于 1 000 ml 制剂量), 按照不同的加水倍数和提取时间进行提取。第 1 次提取液浓缩至 1 000 ml, 滤过, 进样测定; 第 2 次提取液浓缩至 500 ml, 滤过, 进样测定。将盐酸小檗碱和阿魏酸的含量及干膏得率的总评归一值(OD)作为评价指标。将盐酸小檗碱含量、阿魏酸含量、干膏得率 3 个指标用 Hansan 法进行归一化, 每个指标均标准化为 0~1 之间的归一值, 公式为:  $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$  ( $d_i$  为各指标的归一值,  $Y_i$  为各指标的实测值,  $Y_{\min}$  为各指标

中的最小值,  $Y_{\max}$  为各指标中的最大值)。再以各指标归一值求算几何平均数, 公式为:  $OD = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_k) / k$  ( $k$  为指标数)<sup>[7-8]</sup>。试验安排与结果见表 3、表 4。

表 3 第 1 次提取的试验安排与结果

Tab 3 Arrangement and results of the first extraction

序号	加水量(A), 倍	提取时间(B), min	盐酸小檗碱含量, μg/ml	阿魏酸含量, μg/ml	干膏率, %	OD 值
1	9.00	75.00	18.60	2.93	12.69	0.862 9
2	9.00	75.00	18.10	2.75	13.07	0.841 3
3	9.00	120.00	14.57	2.51	12.25	0.584 9
4	9.00	30.00	17.30	2.42	11.54	0.586 1
5	12.00	75.00	19.47	2.97	12.82	0.913 2
6	6.88	43.18	13.33	2.07	10.63	0.291 2
7	11.12	106.82	16.80	2.53	12.45	0.689 6
8	9.00	75.00	18.66	2.90	13.38	0.923 4
9	9.00	75.00	17.67	2.79	13.12	0.840 0
10	11.12	43.18	20.46	2.84	13.00	0.931 5
11	6.88	106.82	9.92	1.58	9.87	0
12	6.00	75.00	14.26	2.24	10.81	0.374 1
13	9.00	75.00	16.49	2.44	11.58	0.572 8

表 4 第 2 次提取的试验安排与结果

Tab 4 Arrangement and results of the second extraction

序号	加水量(A), 倍	提取时间(B), min	盐酸小檗碱含量, μg/ml	阿魏酸含量, μg/ml	干膏率, %	OD 值
1	4.00	40.00	6.45	0.84	3.51	0.722 0
2	4.00	40.00	6.70	0.81	3.50	0.719 0
3	4.00	40.00	6.45	0.81	3.61	0.722 5
4	4.00	20.00	7.07	0.77	3.22	0.645 6
5	4.00	60.00	5.95	0.75	3.31	0.574 1
6	2.01	40.00	4.90	0.64	2.84	0.305 5
7	5.41	54.14	6.82	0.84	3.47	0.742 4
8	2.59	54.14	3.60	0.48	2.44	0
9	3.99	40.00	6.76	0.81	3.61	0.747 8
10	2.59	25.86	5.39	0.70	3.26	0.480 1
11	4.00	40.00	7.87	0.88	3.62	0.884 0
12	5.41	25.86	8.74	0.92	3.73	1.000 0
13	4.00	40.00	6.45	0.77	3.31	0.627 0

2.5.3 模型拟合及方差分析 以 OD 值为因变量, 使用 Desgin Expert 8.0.6 对 2 次提取的因素进行二次式拟合,  $Y_1$  和  $Y_2$  分别为第 1 次和第 2 次提取的拟合方程的因变量。结果  $Y_1 = -2.925 91 + 0.575 60A + 0.017 797B + 1.827 05 \times 10^{-4}AB - 0.025 886A^2 - 1.436 18 \times 10^{-4}B^2$ ;  $Y_2 = -0.580 52 + 0.487 45A + 7.705 23 \times 10^{-3}B + 2.789 98 \times 10^{-3}AB - 0.053 962A^2 - 3.285 05 \times 10^{-4}B^2$ 。方差分析结果见表 5、表 6。

表 5 第 1 次提取的方差分析

Tab 5 Analysis of variance for the first extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.80	5	0.16	5.99	0.018 1
A	0.55	1	0.55	20.53	0.002 7
B	0.036	1	0.036	1.34	0.284 8
AB	$6.076 \times 10^{-4}$	1	$6.076 \times 10^{-4}$	0.023	0.884 3
A <sup>2</sup>	0.094	1	0.094	3.53	0.102 3
B <sup>2</sup>	0.15	1	0.15	5.52	0.051 2
残差	0.19	7	0.027		
失拟项	0.11	3	0.038	2.04	0.251 1
纯误差	0.074	4	0.018		
总值	0.98	12			

由方差分析结果可知, 第 1 次和第 2 次提取的回归方程, 模型项  $P$  均小于 0.05, 失拟项  $P$  均大于 0.05, 相关系数  $r_1 = 0.900 2$ ,  $r_2 = 0.908 6$ , 说明回归方程拟合度良好, 模型准确度较好, 可以用该模型对实际情况进行预测。

表6 第2次提取的方差分析

Tab 6 Analysis of variance for the second extraction

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.64	5	0.13	6.63	0.013 8
A	0.45	1	0.45	22.91	0.002 0
B	0.088	1	0.088	4.52	0.071 0
AB	0.012	1	0.012	0.64	0.451 2
A <sup>2</sup>	0.080	1	0.080	4.12	0.082 0
B <sup>2</sup>	0.030	1	0.030	1.54	0.254 1
残差	0.14	7	0.019		
失拟项	0.10	3	0.034	3.94	0.109 4
纯误差	0.034	4	8.612×10 <sup>-3</sup>		
总值	0.78	12			

2.5.4 提取工艺条件的确定 根据回归方程,绘制相应的响应曲面图,详见图1、图2。通过 Design Expert 8.0 软件分析,得到2次提取的OD值的最大值点。结果,第1次和第2次最佳的加水倍量和提取时间分别为11.36倍、69.16 min, 5.41倍、34.71 min。结合实际生产,确定2次提取的工艺参数分别为11倍、70 min和5倍、30 min。

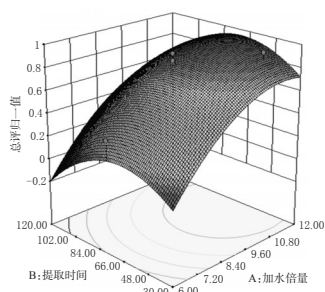


图1 第1次提取的三维响应面图

Fig 1 3D response surface of the first extraction

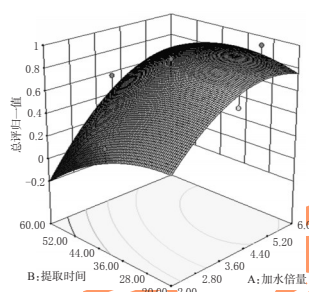


图2 第2次提取的三维响应面图

Fig 2 3D response surface of the second extraction

2.6 验证试验

依照最佳提取工艺参数对第1次和第2次提取工艺进行3次验证试验,结果见表7。第1次提取实际OD值为0.940 0,与预测值0.959 9偏差-2.07%;第2次提取实际OD值为0.851 8,与预测值0.872 8偏差-2.41%,表明本研究建立的数学模型具有良好的预测性,可用于该制剂提取工艺的优化。

表7 工艺验证试验结果

Tab 7 Results of validation test

提取次数	验证次数	加水量 A,倍	提取时间 B,min	盐酸小檗碱含量, μg/ml	阿魏酸含量, μg/ml	干膏率, %	OD值	平均OD值	RSD, %
第1次	1	11	70	19.89	2.96	13.08	0.950 5	0.940 0	1.2
	2	11	70	20.15	2.85	13.04	0.928 7		
	3	11	70	19.86	2.91	13.11	0.940 9		
第2次	1	5	30	8.12	0.85	3.57	0.865 2	0.851 8	1.7
	2	5	30	8.11	0.81	3.59	0.837 1		
	3	5	30	8.15	0.82	3.61	0.852 9		

3 讨论

柏薏灌肠液以黄柏、薏苡仁解祛湿邪为君药;黄柏性寒、味苦,为清热燥湿、泻火除蒸、解毒疗疮之主药,其有效成分主要为小檗碱、黄柏碱、巴马汀等生物碱类成分<sup>[9]</sup>;薏苡仁具有利水渗湿、健脾止泻、除痹排脓、解毒散结之功。蒲公英、紫花地丁清热解为臣药;蒲公英主要有效成分为咖啡酸、绿原酸、阿魏酸等酚酸类,具有抗菌、抗炎、抗病毒的作用<sup>[10]</sup>。三棱、莪术、桃仁、红花、路路通、益母草、车前子活血祛瘀为佐药。牛

膝补益肝肾为使药。现代研究表明,药材中含有的生物碱类和酚酸类成分均易溶于热水<sup>[11-12]</sup>,故仍然采用传统水煎提取工艺。

君药黄柏的有效成分为盐酸小檗碱,蒲公英、益母草、三棱、牛膝中均含有阿魏酸有效成分,故本研究选择盐酸小檗碱和阿魏酸作为评价指标,分别以生物碱类和有机酸类有效成分的转移率来考察提取工艺。笔者在预实验中曾选择咖啡酸作为评价指标,但咖啡酸在提取过程中不稳定、难以测准,故最终选择测定方法较为成熟稳定的阿魏酸。薏苡仁虽为君药,但因其活性成分含量较少、测定方法复杂,故未对其进行定量测定。由于中药制剂成分复杂、有效成分较多,因此结合干膏率共同作为评价指标。

星点设计-效应面法在试验设计和结果表达方面较正交设计法和均匀设计法更适宜进行非线性模型拟合,能够提高优化预测的精确性,更好地体现因素、指标与效应值的关系<sup>[13-14]</sup>。本研究还通过归一化消除了不同评价指标的量纲不同带来的影响,然后运用OD值对多个评价指标进行综合评分,再进行模型拟合,从而预测最佳提取条件,适合于多成分中药制剂的工艺优化。

本研究采用星点设计-效应面法优化了柏薏灌肠液的2次提取工艺条件,建立的工艺合理可行、提取率高、重现性好,适用于工业化生产。

参考文献

[1] 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.

[2] 薛桂蓬,宋选宗,满尔哈巴·海如拉,等.星点设计-响应面法优化维药刺山柑果生物碱提取工艺[J].中国药房,2015,26(1):96.

[3] 李妍,袁乐,张晓杭,等.复方真元颗粒的提取工艺研究[J].中成药,2015,37(3):660.

[4] 李燕,赵利刚,彭宏峰,等. HPLC法同时测定柏药灌肠液中盐酸小檗碱和乌药醚内酯的含量[J].药物分析杂志,2014,34(10):1 864.

[5] 吕海涛,邓锐,程伟,等.蒲公英中有效成分的提取工艺考察[J].中南药学,2008,6(4):391.

[6] 晏媛,刘世霆,许重远,等.高效液相色谱法同时测定蒲公英中咖啡酸和阿魏酸的含量[J].中国现代应用药学,2006,23(3):229.

[7] 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.

[8] 翟永松,尚雅文,龚慕辛,等.星点设计-效应面法优选肾宁颗粒乙醇提取工艺的研究[J].中成药,2015,37(1):99.

[9] 周海燕.关黄柏化学成分的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2001.

[10] 胡益勇,徐晓玉.阿魏酸的化学和药理研究进展[J].中成药,2006,28(2):253.

[11] 黄嗣航,龙晓英,袁飞,等.盐酸小檗碱的溶解度及油水分配系数与大鼠在体肠吸收之间的相关性研究[J].中国现代应用药学,2012,29(3):233.

[12] 周彩荣,石晓华,王海峰,等.反式阿魏酸在溶剂中的溶解度[J].化学学报,2007,58(11):2 705.

[13] 余小翠,刘高峰.响应面分析法在中药提取和制备工艺中的应用[J].中草药,2010,33(10):1 651.

[14] 彭晓霞,路莎莎.响应面优化法在中药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):296.

(收稿日期:2015-10-19 修回日期:2016-06-14)

(编辑:刘明伟)