

# 复方五指毛桃颗粒的提取工艺研究<sup>Δ</sup>

孙丽娜<sup>1\*</sup>, 刘小虹<sup>1</sup>, 刘建博<sup>2</sup>, 邵瑶昕<sup>3</sup>, 黄慧婷<sup>2</sup>, 张志强<sup>1</sup>, 王硕辉<sup>1</sup>, 王振华<sup>1#</sup>(1.广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2.广州中医药大学第一附属医院呼吸科, 广州 510405; 3.广州中医药大学科技产业园有限公司, 广州 510445)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3976-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.24

**摘要** 目的:优化复方五指毛桃颗粒的提取工艺。方法:以复方五指毛桃颗粒提取液中补骨脂素、苦杏仁苷的转移率及出膏率为指标,采用 $U_{12}(6 \times 4 \times 3)$ 均匀设计表安排试验,考察加水倍量、提取时间、提取次数3个因素对提取工艺的影响,并通过3次放大试验对优化工艺进行验证。结果:优化工艺为加10倍量水、提取3次、每次60 min。在此条件下,提取液中补骨脂素、苦杏仁苷的转移率及出膏率分别为82.51% (RSD=1.45%,  $n=3$ )、93.69% (RSD=0.85%,  $n=3$ )、18.89% (RSD=0.74%,  $n=3$ ),工艺验证结果均置于预测值的95%置信区间内。结论:优化的提取工艺稳定、可行,为该制剂的后续开发提供了科学依据。

**关键词** 复方五指毛桃颗粒;均匀设计;提取工艺;补骨脂素;苦杏仁苷

## Study on the Extraction Technology of Compound Radix Fici Hirta Granule

SUN Lina<sup>1</sup>, LIU Xiaohong<sup>1</sup>, LIU Jianbo<sup>2</sup>, SHAO Yaoxin<sup>3</sup>, HUANG Huiting<sup>2</sup>, ZHANG Zhiqiang<sup>1</sup>, WANG Shuohui<sup>1</sup>, WANG Zhenhua<sup>1</sup>(1.College of TCM, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2.Dept. of Respiratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3.Science and Technology Park Co., Ltd., Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510445, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound radix fici hirta granule. METHODS: Using the transfer rate of psoralen and amygdalin in extraction liquid of Compound radix fici hirta granule and extraction rate as indexes,  $U_{12}(6 \times 4 \times 3)$  uniform design was used for the test, the effects of amount of adding water, extraction time, extraction times on the

- 版.北京:中国医药科技出版社,2015:166.
- [2] 肖芳,黄勤挽,范润勇,等.HPLC法同时测定杜仲3个药用部位中8种成分[J].中成药,2016,38(8):1782-1786.
- [3] 袁天翊,方莲花,吕扬,等.杜仲叶的药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(6):81-85.
- [4] 黄勤挽,王瑾,苏娟双,等.双波长HPLC法同时测定杜仲雄花中3种成分的含量[J].中国药房,2011,22(27):2565-2567.
- [5] 郑杰,刘端,赵肃清,等.杜仲叶桃叶珊瑚苷的酶法提取及其抑菌活性[J].中药材,2012,35(2):304-306.
- [6] 孙彦超,李钦,杜红岩,等.RP-HPLC测定杜仲叶中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷的含量[J].中成药,2009,31(10):1608-1609.
- [7] 李文娜,韩宇东,刘银花,等.杜仲叶绿原酸提取物对脂代谢关键酶活性的影响[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):30-33.
- [8] Li Y, Kamo S, Metori K, et al. The promoting effect of eucommiol from Eucommiae cortex on collagen synthesis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(1): 54-59.
- [9] 严瑞娟,张水寒,罗跃龙,等.不同产地初加工方式处理杜仲叶的HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2013,44(15):2485-2491.
- [10] 王柏强,刘福,江承平,等.正交试验优选杜仲叶绿原酸的提取工艺[J].中国药房,2014,25(27):2527-2530.
- [11] 唐芳瑞,荣华,邵峰,等.不同产地杜仲叶高效液相色谱指纹图谱分析[J].时珍国医国药,2016,27(6):1496-1498.
- [12] 阿来·赛坎,文娥,田树革.高效液相色谱法同时测定杜仲叶中4种有效成分的含量[J].国际药学研究杂志,2016,43(3):571-574.
- [13] Wang JL, Liu EW, Wu S, et al. Development of HPLC method to evaluate drug-processing technique of Eucommiae cortex [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 221-225.
- [14] 杜红岩,刘昌勇,李钦,等.杜仲叶中3种主要活性成分含量的季节变化[J].中南林业科技大学学报,2011,31(8):6-9.
- [15] 宣志红,寿辉,姚璇,等.不同干燥加工与贮藏方法对杜仲叶药材质量变化的研究[J].中草药,2013,44(11):1431-1434.

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省中医药强省建设专项资金医院中药制剂建设项目(No.粤中医办函[2015]102号);广东省科技计划项目(No.2014B050-502013,2014B040404066,2015B020234003)

\* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型、新技术。E-mail: 1083532885@qq.com

# 通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:药物新剂型、新技术。E-mail: wzh@gzucm.edu.cn

(收稿日期:2017-01-05 修回日期:2017-04-20)  
(编辑:刘 萍)

extraction technology were investigated, and optimized technology was verified by three pilot scale tests. RESULTS: The optimal technology was as follow as 10-fold water, extracting for 3 times, 60 min each time. Under the conditions, transfer rate of psoralen and amygdalin and extraction rate were 82.51% (RSD=1.45%, n=3), 93.69% (RSD=0.85%, n=3), 18.89% (RSD=0.74%, n=3), respectively. The validated results were in the 95% confidence interval of predictive value. CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable and feasible, and provides the scientific basis for the follow-up development of the preparation.

**KEYWORDS** Compound radix fici hirta granule; Uniform design; Extraction technology; Psoralen; Amygdalin

复方五指毛桃颗粒由五指毛桃、茯苓、煨苦杏仁、炒紫苏子等6味药组成,常用于肺脾气虚型稳定期慢性阻塞性肺疾病的治疗,临床疗效显著<sup>[1]</sup>。原方以煎剂内服用于临床,但煎煮、携带、使用均不方便。由于本方日服剂量较大、出膏多,根据处方的特点,现拟将这一临床验方开发成颗粒,方便用药。本文旨在以五指毛桃中补骨脂素及煨苦杏仁中苦杏仁苷的转移率和出膏率为指标,采用均匀设计安排试验,对复方五指毛桃颗粒的提取工艺进行优化,为后续制剂开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); MU4100P 实验室超纯水系统(上海森康实业公司); HDM-1000 数显控温电热套(金坛市荣华仪器公司); HH-6A 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

### 1.2 药材、对照品与试剂

五指毛桃、茯苓、煨苦杏仁、炒紫苏子、太子参及白术药材饮片(均购自广州市药材公司中药饮片,批号分别为:YPA4A0001、YPA4D0001、YPA5D0001、YPA2F0001、YPA3A0001、YPA3C0001),经广州中医药大学王振华副教授鉴定及检验;五指毛桃符合《广西壮族自治区壮药质量标准(第二卷)》项下相应规定,其他药材均符合2015年版《中国药典》(一部)项下相应规定;补骨脂素对照品(批号:110739-201416,纯度:99.9%)、苦杏仁苷对照品(批号:110820-201506,纯度:93.4%)均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取液中苦杏仁苷的含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 取苦杏仁苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为75.39 μg/mL的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 按处方比例称取五指毛桃、茯苓、煨苦杏仁、炒紫苏子等6味药材共97 g,加8倍量水,加热提取2次,每次1 h,合并滤液。精密量取水提液5 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀、过滤,作为供试品溶液。

2.1.3 缺煨苦杏仁阴性样品溶液制备 按处方比例称取五指毛桃、茯苓、紫苏子等5味药材(缺煨苦杏仁)87 g,同“2.1.2”项下方法提取、制备成缺煨苦杏仁阴性样品

溶液。

2.1.4 色谱条件 参考文献[2-3]确定色谱条件。色谱柱:YMC-Pack Pro C<sub>18</sub> RS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水溶液(20:80, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:207 nm;进样量:10 μL。理论板数以苦杏仁苷峰计应不低于6 000。

2.1.5 方法学考察 取上述3种溶液进样测定,结果阴性样品无干扰,专属性良好,色谱图见图1。

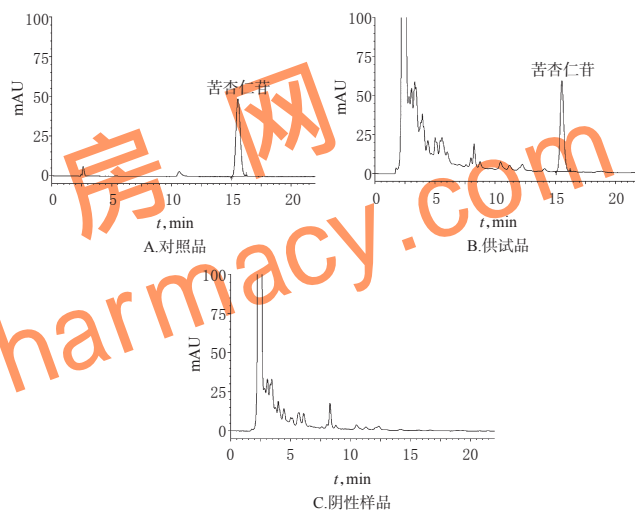


图1 苦杏仁苷高效液相色谱图

### Fig 1 HPLC chromatograms of amygdalin

精密称取苦杏仁苷对照品适量,加甲醇制备成质量浓度为9.42、18.85、37.70、75.39、113.09、150.78、188.48 μg/mL的对照品溶液,进样测定。以苦杏仁苷的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,得回归方程为 $y=10\ 219x+2\ 370.2$ ( $r=0.999\ 9$ ),表明苦杏仁苷的检测质量浓度线性范围为9.42~188.48 μg/mL。按照相关要求方法进行方法学考察,结果,在精密度试验中,对照品溶液峰面积的RSD为0.12%(n=6);重复性试验中供试品溶液峰面积的RSD为0.46%(n=6);稳定性试验中,供试品溶液放置16 h内含量的RSD为0.13%(n=6);准确度试验中平均加样回收率为102.15%(RSD=1.43%, n=6)。

### 2.2 提取液中补骨脂素的含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 取补骨脂素对照品适量,精密称定,加甲醇制备成质量浓度为5.02 μg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 同“2.1.2”项下。

2.2.3 阴性对照溶液制备 按处方比例称取茯苓、燀苦杏仁、紫苏子等5味药材(缺五指毛桃)共67 g,同“2.1.2”项下方法提取、制备成缺五指毛桃阴性样品。

2.2.4 色谱条件 参考文献[4]确定色谱条件。色谱柱: YMC-Pack ODS-AM(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-水(30:70, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:245 nm;进样量:10 μL。理论板数以补骨脂素峰计应不低于8 000。

2.2.5 方法学考察 取上述3种溶液进样测定,结果阴性样品未见干扰,专属性良好,色谱图见图2。

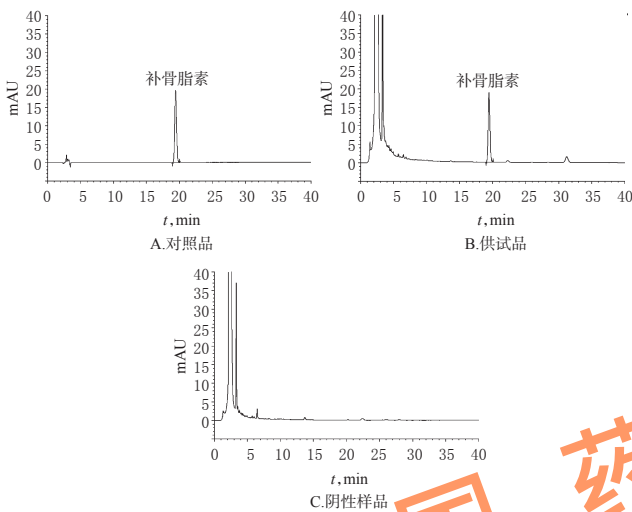


图2 补骨脂素高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of psoralen

精密称取补骨脂素对照品适量,加甲醇制备成质量浓度为0.50、1.00、2.01、5.02、8.02、12.04、15.04 μg/mL的对照品溶液,进样测定。以补骨脂素质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得回归方程为 $y=77\ 006.9x+566.9$ ( $r=0.999\ 9$ ),表明补骨脂素的检测质量浓度线性范围为0.50~15.04 μg/mL。按照相关要求方法进行方法学考察,结果,在精密度试验中,对照品溶液峰面积的RSD为0.13%( $n=6$ );重复性试验中供试品溶液峰面积的RSD为0.31%( $n=6$ );稳定性试验中供试品溶液放置16 h内含量的RSD为0.16%( $n=6$ );准确度试验中平均加样回收率为101.13%(RSD=1.43%, $n=6$ )。

### 2.3 出膏率测定

精密量取后文均匀试验中的提取液50 mL,置于恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于105 ℃干燥至恒质量,计算出膏率 $[(m_1 - m_2) \times V_1 / (V_2 \times m) \times 100\%]$ ,其中 $m$ 为药材量, $m_1$ 为蒸发皿恒质量与干膏质量之和, $m_2$ 为蒸发皿恒质量, $V_1$ 为提取液总体积, $V_2$ 为量取的提取液体积。

### 2.4 提取工艺均匀试验

2.4.1 因素与水平选择 通常对中药材提取影响比较大的因素有提取时间、提取次数、溶剂量等,参考文献[5-7]及预试验结果,以提取液中补骨脂素、苦杏仁苷的转移率[转移率=( $m_s/m_0$ )×100%, $m_s$ 为提取液中指标成

分含量, $m_0$ 为处方对应药材中指标成分含量(五指毛桃中补骨脂素含量为0.069%、燀苦杏仁中苦杏仁苷含量为2.99%)]及出膏率为指标对以上述3个因素进行考察,各因素的水平选取见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	加水量,倍	提取时间,min	提取次数,次
1	5	30	1
2	6	60	2
3	7	90	3
4	8	120	
5	9		
6	10		

由于试验考察的因素水平较多,故采用均匀设计安排试验。根据均匀设计方法<sup>[8]</sup>,按 $U_{12}(6 \times 4 \times 3)$ 设计安排试验。

2.4.2 均匀试验设计与结果 按处方比例称取五指毛桃、茯苓、燀苦杏仁、炒紫苏子等6味药材共97 g,根据表1设计试验,加水提取、过滤、合并滤液。按“2.1”“2.2”项下方法测定提取液中苦杏仁苷和补骨脂素的含量并计算转移率,按“2.3”项下方法测定出膏率,试验设计与结果见表2。

表2 均匀试验设计与结果

Tab 2 Design and results of uniform test

试验号	加水量,倍	提取时间,min	提取次数,次	补骨脂素转移率,%	苦杏仁苷转移率,%	出膏率,%
1	5	30	3	56.05	79.73	18.09
2	5	60	2	56.26	75.06	17.50
3	6	90	1	33.06	53.19	13.69
4	6	120	3	72.64	80.72	21.16
5	7	30	2	63.89	76.53	15.72
6	7	60	1	37.99	57.86	13.06
7	8	90	3	80.38	88.79	20.33
8	8	120	2	76.20	73.32	19.43
9	9	30	1	39.65	60.93	10.84
10	9	60	3	82.74	94.26	19.55
11	10	90	2	74.94	87.99	19.28
12	10	120	1	50.06	58.52	16.05

2.4.3 数据处理 以补骨脂素转移率( $Y_1$ )、苦杏仁苷转移率( $Y_2$ )、出膏率( $Y_3$ ),对加水倍量( $X_1$ )、提取时间( $X_2$ )、提取次数( $X_3$ )及 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 采用SPSS 20.0软件进行线性逐步多元回归分析<sup>[9-10]</sup>( $P<0.05$ 进入, $P>0.1$ 剔除)。结果如下: $Y_1=17.272X_1 - 0.882X_1^2 + 0.09X_2 + 65.172X_3 - 11.692X_3^2 - 99.558$ ( $R=0.999\ 7, S=1.97, F=171.51, P<0.01$ ); $Y_2=0.182X_1^2 + 0.332X_2 - 0.003X_2^2 + 41.028X_3 - 6.384X_3^2 + 3.096$ ( $R=0.999\ 7, S=1.34, F=223.50, P<0.01$ ); $Y_3=0.044X_2 + 8.731X_3 - 1.386X_3^2 + 2.802$ ( $R=0.989\ 0, S=0.55, F=121.38, P<0.01$ )

根据上述方程可知, $X_1$ 、 $X_3$ 与 $Y_1$ 成二次函数关系,从提高补骨脂素转移率角度考虑,当 $X_1=10$ 、 $X_3=3$ 时 $Y_1$ 有较优解; $X_2$ 、 $X_3$ 与 $Y_2$ 也成二次函数关系,从提高苦杏仁苷

转移率角度考虑,当 $X_2=60$ 、 $X_3=3$ 时 $Y_2$ 有较优解。综合考虑,拟定的提取工艺条件为加10倍量水,提取3次,每次60 min。此时, $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 预测值分别为: $Y_{1\text{预}}=80.65 \pm 3.86$ , $Y_{2\text{预}}=96.06 \pm 2.63$ , $Y_{3\text{预}}=19.16 \pm 1.08$ ; $Y_{\text{预测}}=Y_{\text{方程}} \pm U_{\alpha} \times S[U_{\alpha(0.01)}=2.576, U_{\alpha(0.05)}=1.960]$ 。

2.4.4 结果验证 按处方比例称取五指毛桃、茯苓、煨苦杏仁、紫苏子等6味药材共485 g,各3份,加10倍量水,加热提取3次,每次60 min,合并滤液,同“2.1”“2.2”“2.3”项下方法测定提取液中苦杏仁苷、补骨脂素含量并计算转移率及出膏率,结果见表3。

表3 提取工艺验证结果

Tab 3 Verification results of extraction technology

试验号	补骨脂素转移率, %	苦杏仁苷转移率, %	出膏率, %
1	83.58	92.93	18.76
2	81.22	93.63	19.04
3	82.74	94.52	18.88
均值	82.51	93.69	18.89
预测结果范围	80.65±3.86	96.06±2.63	19.16±1.08

工艺验证结果表明,在优化工艺条件下,补骨脂素、苦杏仁苷的平均转移率及出膏率分别为82.51% (RSD=1.45%,  $n=3$ )、93.69% (RSD=0.85%,  $n=3$ )、18.89% (RSD=0.74%,  $n=3$ ),实测值置于预测结果的95%置信区间内,提示优化后的工艺稳定、可行。

### 3 讨论

#### 3.1 考察指标的选择

提取液化学成分中补骨脂素常被用作评价方中君药五指毛桃质量优劣的指标<sup>[11-12]</sup>,苦杏仁苷为苦杏仁药材中止咳平喘的有效成分<sup>[13]</sup>。因此,从质量控制、药理等方面分析,以二者的转移率作为考察指标均具有一定的意义;且二者极性差异大,能较全面地反映药材被提取的程度。出膏率作为辅助性指标,为剂型的选择提供了依据。

提取液中苦杏仁苷既为药效成分,也属于内源性毒性成分,含量过高时易导致氢氰酸中毒<sup>[14]</sup>。因本研究主要针对提取工艺,注重的是药材被提取利用的程度,对于制剂中苦杏仁苷可能造成的毒性效应,后期笔者将通过开展制剂的系统毒理学和药理学研究,合理设计药物临床使用剂量,保证临床用药的安全性和有效性。

#### 3.2 数据分析变量的引入

在进行线性回归分析时,笔者曾选择以 $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$ 对2组分析变量[( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ )、( $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_2X_3$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_1X_2X_3$ )]进行了逐步回归分析,结果前者拟合出的方程线性关系更好,引入方程的变量均具有统计学意义( $P<0.01$ ),因此在数据分析时,选择了前者。

结合表2实测值及数据分析结果可知,加水量及提取次数2个因素对补骨脂素提取率有显著影响,提取时间及提取次数2个因素对苦杏仁苷提取率有显著影响,提取次数为二者共同的显著性因素,故确定药材提取3

次。加水量为10倍量时补骨脂素提取效果最优,提取时间为60 min时苦杏仁苷提取效果最优。因此综合各指标考虑,确定工艺条件为药材加10倍量水,提取3次,每次60 min。

本研究采用均匀设计安排试验,使各试验在试验点范围内充分地均匀分散,并结合生产实际,选取对提取效率影响较大的溶剂倍量、提取时间及提取次数为因素,合理安排各因素水平,对试验结果进行线性回归分析,预测出最优工艺条件参数。通过进行3次放大验证工艺预测,得出补骨脂素、苦杏仁苷的平均转移率及出膏率与均匀设计预测结果一致,优化出了经济、简便、稳定、可行的提取工艺,可为复方五指毛桃颗粒的后续开发奠定基础。

#### 参考文献

- [1] 周伟光.肺康颗粒对COPD稳定期(肺脾气虚型)患者的疗效及血清IL-8的影响[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:491-492.
- [3] 张艳海,张大伟,孟兆青,等.在线二维液相色谱法快速测定桂枝茯苓胶囊中芍药苷、丹皮酚、苦杏仁苷和肉桂酸的含量[J].中国中药杂志,2013,38(23):4088-4092.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.广西壮族自治区壮药质量标准:第二卷[M].南宁:广西科学技术出版社,2011:47-48.
- [5] 刘弘,王俊杰.均匀设计法优选通心舒颗粒中药材的提取工艺[J].中国药房,2014,25(11):1014-1016.
- [6] 王振华,杜勤,许晓峰,等.黄柏提取工艺的均匀设计优选[J].中成药,2000,22(7):466-468.
- [7] 王森,欧水平,袁涛,等.均匀设计法结合动态优化法优选复方独一味凝胶贴膏的提取工艺[J].中国药房,2016,27(31):4439-4442.
- [8] 方开泰.均匀设计与均匀设计表[M].北京:科学出版社,1994:116-119.
- [9] 曾昭钧,刘鹰翔,张为革,等.均匀设计及其应用[M].北京:中国医药科技出版社,2004:35-98.
- [10] 韩明.应用多元统计分析[M].上海:同济大学出版社,2013:24-81.
- [11] 林慧,梅全喜,曾聪彦,等.五指毛桃化学成分及其药理活性研究概况[J].今日药学,2012,22(8):484-486.
- [12] 杨燕军,代军. HPLC法测定五指毛桃中补骨脂素、佛手柑内酯、芹菜素的含量[J].南方医科大学学报,2010,30(11):2565-2567.
- [13] 李贵海,董其宁,孙付军,等.不同炮制对苦杏仁毒性及止咳平喘作用的影响[J].中国中药杂志,2007,32(12):1247-1250.
- [14] Carter JH, McLafferty MA, Goldman P. Role of the gastrointestinal microflora in amygdalin (laetrile)-induced cyanide toxicity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1980, 29(3): 301-304.

(收稿日期:2017-01-25 修回日期:2017-03-07)

(编辑:刘 萍)