

补肾养血颗粒的提取工艺优化研究^Δ

刘霞*,杨敏,冷静,范智琴,徐冲[#](重庆市中医院药剂科,重庆 400021)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0349-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.14

摘要 目的:优化补肾养血颗粒的提取工艺,为其开发成医院制剂提供依据。方法:以金丝桃苷含量、总黄酮含量和出膏率的综合评分为评价指标,以加水量、提取时间和提取次数为考察因素,设计正交试验优化补肾养血颗粒的提取工艺并进行验证。结果:补肾养血颗粒最优提取工艺为每次加水10倍量,提取2次,每次1h。验证试验结果显示,金丝桃苷、总黄酮含量分别为0.154、11.094 mg/g(RSD=0.010%、0.008%, $n=3$);出膏率均值为37.76%(RSD=0.008%, $n=3$)。结论:优化后的提取工艺稳定、可行,可为补肾养血颗粒的制剂开发提供依据。

关键词 补肾养血颗粒;提取工艺;金丝桃苷;总黄酮;正交试验

Study on Optimization of the Extraction Technology of Bushen Yangxue Granules

LIU Xia, YANG Min, LENG Jing, FAN Zhiqin, XU Chong (Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of TCM, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Bushen yangxue granules, and to provide reference for developing hospital preparations. METHODS: The orthogonal test was designed to optimize the extraction technology of Bushen yangxue granules using the comprehensive score including the content of hyperoside and total flavonoids, extract yield as evaluation indexes, water amount, extraction time and extraction times as factors. Verification test was also conducted. RESULTS: The extraction technology of Bushen yangxue granules was 10-fold water, extracting for 2 times and 1 hour each time. The results of verification test indicated that the contents of hyperoside and total flavonoids were 0.154 mg/g (RSD=0.010%, $n=3$) and 11.094 mg/g (RSD=0.008%, $n=3$). The average extract yield was 37.76% (RSD=0.008%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable and feasible, which can provide the basis for developing hospital preparations of Bushen yangxue granules.

KEYWORDS Bushen yangxue granules; Extraction technology; Hyperoside; Total flavonoids; Orthogonal test

补肾养血颗粒系由我院主任中医师朱光德创立的经验方——“补肾养血方”制作而来,朱光德致力于脱发病的研究,在“发为血之余”的基础上,发展出“肾亏血虚,湿热熏蒸”的理论,并以该理论为指导,形成此方。全方由制首乌、熟地黄、菟丝子、桑椹、枸杞子、制黄精、丹参等19味药组成,具有补肾养血、乌发生发、填精补脑之功效,主要用于肝肾不足、气血两虚或脾虚生湿所致脱发,症见毛发松动或呈稀疏状脱落、毛发干燥或油腻、头皮瘙痒;斑秃,早秃,脂溢性脱发与病后、产后脱发见上述证候者。该方经过十几年临床应用,疗效显著、安全可靠^[1-2],现拟开发成医院制剂。本研究采用正交试验法,以提取物中金丝桃苷含量、总黄酮含量^[3-4]和出膏率为综合评价指标,优化补肾养血颗粒的提取工艺条件,为其开发成医院制剂提供依据。

Δ 基金项目:重庆市科学技术委员会基本科研业务费计划项目(No.cstc2015jbyk330025009);中药炮制技术传承基地建设项目

* 药师,硕士。研究方向:中药成分分析、质量控制。E-mail: lx19870905@126.com

通信作者:主管中药师,博士。研究方向:中药药效物质基础、医院制剂研发。E-mail: Loran587@aliyun.com

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agilent 公司);UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);XA205DU 精密电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);AS10200AT 超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

制首乌、熟地黄、菟丝子、当归、红参、丹参、赤芍、制黄精、陈皮、苦参、茯苓、桑椹、枸杞子、防风、苍术、川芎、天麻、黑芝麻、核桃仁饮片均购自重庆中药饮片厂有限公司,批号分别为:1410035、1501049、1501007、1502041、1411056、1412126、1411113、1501047、1501020、1502022、1501079、15020101、14010132、15020128、15010106、14080113、15080142、15080122、15060202,经我院药检室陈玲副主任中药师鉴定为真品;金丝桃苷对照品、芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111521、0080-9504,纯度: >94.3%、>98%);乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 出膏率的测定

称取处方量的饮片,加入一定量的水进行提取,计量体积,备用。精密量取提取液 250 mL,按 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0831 干燥失重测定法项下^[5]方法测定出膏量,计算出膏率(出膏量/处方量 $\times 100\%$)。

2.2 金丝桃苷含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液(17:83, V/V)^[6];二极管阵列检测器,检测波长:360 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.121 7 mg 的金丝桃苷对照品溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取提取后的浸膏约 5 g,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加 80% 甲醇 50 mL,超声处理(240 W, 45 kHz)1 h,放冷,加 80% 甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液制备 按补肾养血颗粒水提处方的提取制备工艺制得缺菟丝子的阴性样品,按“2.2.3”项下操作方法制得阴性样品溶液。

2.2.5 专属性考察 取上述 3 种溶液(其中供试品溶液为正交试验 9 号样品),进样测定。结果,所测成分色谱峰与样品中其他组分色谱峰基线分离,且阴性样品无干扰,色谱见图 1。

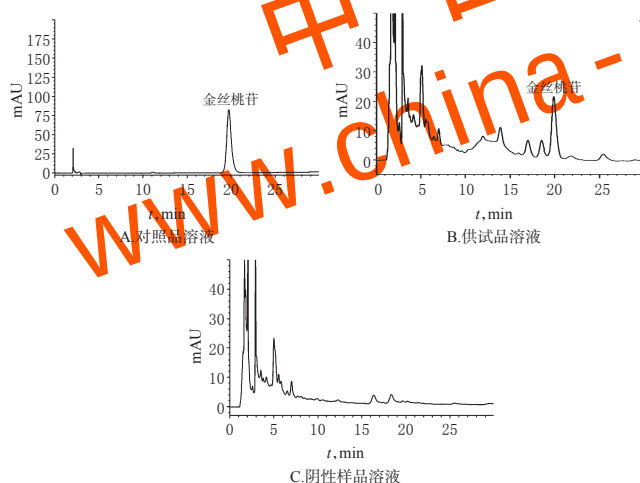


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.6 线性关系考察 精密吸取金丝桃苷“2.2.2”项下对照品溶液 5 mL 至 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。再分别精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.5、3.0 mL 至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样测定。以进样量为横坐标(x , ng)、峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,得回归方程 $y=59.653x-15.592$ ($r=0.999\ 5$),结果表明金丝桃苷进样量线性范围为 24.34~146.04 ng。

2.2.7 精密度试验 精密吸取金丝桃苷对照品溶液,重复进样 6 次,测得金丝桃苷峰面积的 $RSD=0.62\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性试验 称取同一份样品 6 份,每份约 5 g,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定。测得金丝桃苷峰面积的 $RSD=1.65\%$ ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于放置 0、2、4、6、8 h 进样测定,计算得金丝桃苷峰面积的 $RSD=1.82\%$ ($n=5$),表明供试品溶液 8 h 内基本稳定。

2.2.10 准确度考察 采用加样回收法。取已知含量的浸膏 9 份,每份含金丝桃苷 4.86 μ g/g,精密称定,分别置于 50 mL 具塞三角瓶中,分成 3 组,每组 3 份,每组分别添加金丝桃苷对照品溶液(24.34 μ g/mL) 1.4、1.8、2.0 mL,按“2.2.3”项下方法操作,进样测定,计算加样回收率。结果,金丝桃苷的平均加样回收率为 97.50% ($RSD=2.0\%$, $n=9$),表明该方法准确度良好。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品,精密称定,加 30% 乙醇制成每 1 mL 含芦丁 0.313 2 mg 的溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取浸膏约 5 g,精密称定,加 60% 乙醇 100 mL,超声处理(240 W, 45 kHz)1 h,放冷,滤过;滤液用 60% 乙醇定容至 100 mL 量瓶中,摇匀。精密量取 25 mL,置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀作为供试品溶液。

2.3.3 波长的选择 精密量取对照品溶液 3 mL 和供试品溶液 6 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加 30% 乙醇至 6.0 mL,参考文献[6]方法显色,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,再加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠溶液 10 mL,再加 30% 乙醇至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,以紫外-可见分光光度法于 400~700 nm 波长间扫描。

结果,供试品溶液与芦丁对照品溶液显色后吸收图谱基本一致,在 509 nm 波长处均有最大吸收,因此,选 509 nm 为测定供试品总黄酮含量的波长。

2.3.4 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.5、1、2、2.5、5、5.5 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加 30% 乙醇至 6.0 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,再加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min。加氢氧化钠试液 10 mL,再加 30% 乙醇至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,采用紫外-可见分光光度法,在 509 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标(y)、进样量(x , mg)为横坐标,绘制标准曲线。按照最小二乘法进行回归,得回归方程 $y=0.449\ 3x+0.004$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,总黄酮进样量线性范围为 0.156 6~1.722 6 mg。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	因素				指标			
	A	B	C	D	金丝桃苷含量,mg/g	总黄酮含量,mg/g	出膏率,%	综合评分
1	1	1	1	1	0.065	7.86	22.58	48.79
2	1	2	2	2	0.084	11.44	35.25	69.35
3	1	3	3	3	0.141	9.44	42.23	82.31
4	2	1	2	3	0.068	8.13	33.31	55.38
5	2	2	3	1	0.080	12.13	41.18	72.95
6	2	3	1	2	0.068	9.83	30.24	58.46
7	3	1	3	2	0.096	14.98	40.20	84.30
8	3	2	1	3	0.107	11.08	29.41	71.67
9	3	3	2	1	0.152	10.98	37.37	87.02
K ₁	66.817	62.823	59.640	69.587				
K ₂	62.263	71.323	70.583	70.703				
K ₃	80.997	75.930	79.853	69.787				
R	18.734	13.107	20.213	1.116				

表3 方差分析结果

Tab 3 Result of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	572.743	2	286.371	269.273	<0.05
B	265.256	2	132.628	124.709	<0.05
C	614.268	2	307.134	288.795	<0.05
D	2.127	2	1.063	1.000	
误差	2.13	2	1.065		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.000$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.000$

金丝桃苷总量/菟丝子药材中含金丝桃苷总量×100%)。结果,金丝桃苷、总黄酮含量和出膏率分别为0.154、11.094 mg/g和37.76% (RSD=0.010%、0.008%、0.008%, $n=3$),表明本研究所确定的提取工艺效率较高,稳定可行,详见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of verification test

试验号	金丝桃苷含量,mg/g	总黄酮含量,mg/g	出膏率,%	金丝桃苷转移率,%
1	0.154	11.100	37.78	90.45
2	0.155	11.180	38.05	90.18
3	0.152	11.003	37.45	89.07
平均值	0.154	11.094	37.76	89.90
RSD,%	0.010	0.008	0.008	0.008

3 讨论

中医认为脱发证见多端,但根据脏腑理论,脱发的病因仍以肝肾不足为本,血瘀、血热、湿热为标。然而本病多为虚实夹杂或本虚标实证,随着社会发展、工作节奏、生活方式等外部环境的变化,脱发不仅仅是由虚所致,更是由于精神压力的增加以及饮食的失衡所导致的一种虚实夹杂的脱发病症^[1]。

本方治疗脱发,便是基于“肾亏血虚,湿热熏蒸”的理论,从气、血、肝、肾、心、脾入手,养血生发贯穿始终,既养肝肾之阴,以生阴血;亦补后天脾胃,使气血生化有源^[1]。

全方共19味药材,其中3味贵细药材(红参、天麻、

2.3.5 精密度试验 精密吸取芦丁对照品溶液(0.313 2 mg/mL)2.0 mL,共6份,分别置于25 mL量瓶中,参照“2.3.3”项下方法进行显色,509 nm波长下测定吸光度。结果,吸光度的RSD=1.61% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取浸膏(正交试验9号)按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、10、20、30、40、50、60 min后测定吸光度。结果,吸光度的RSD=1.52% ($n=7$),表明供试品溶液60 min内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取同一批浸膏(正交试验9号),按“2.3.2”项下方法分别制备6份供试品溶液,测定总黄酮吸光度。结果,吸光度的RSD=1.56% ($n=6$),表明本方法重复性好。

2.3.8 准确度试验 精密称取浸膏3份,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,每份样品分别取3份,每份3 mL置于25 mL量瓶中,再分别精密加入芦丁对照品溶液(0.313 2 mg/mL)1.5、2.0、2.5 mL,加30%乙醇至6.0 mL,509 nm波长下测定总黄酮的量,计算回收率。结果,加样回收率为104.43%~109.57%,平均加样回收率为106.49% (RSD<2%, $n=9$),符合含量测定要求。

2.4 正交试验优化提取工艺

称取补肾养血颗粒处方102 g,根据前期预试验结果,确定以加水量(A)、提取时间(即煎煮时间,B)、提取次数(C)为考察因素,每因素取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以提取物中金丝桃苷的含量、总黄酮含量和出膏率的综合评分为评价指标,综合评分=(金丝桃苷含量/金丝桃苷含量最大值×0.4+总黄酮含量/总黄酮含量最大值×0.4+出膏率/出膏率最大值×0.2)×100。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2(注:表中含量是以浸膏量中的含量计),方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水量),倍	B(提取时间),h	C(提取次数)
1	6	0.5	1
2	8	1	2
3	10	1.5	3

由表2直观分析可知, $A_3>A_1>A_2$, $B_3>B_2>B_1$, $C_3>C_2>C_1$,影响提取效果的顺序为:提取次数(C)>加水量(A)>提取时间(B),最优工艺为: $A_3B_3C_3$ 。表3方差分析结果表明,因素A、B、C对提取结果有显著影响,综合考虑生产效率和节能等各方面的因素,确定优选工艺为 $A_3B_3C_2$,即每次加水10倍量,提取2次,每次1 h。

2.5 验证试验

为验证上述优化工艺的可行性,进行3批10倍处方的放大试验,按最优工艺条件提取,测定金丝桃苷、总黄酮含量和出膏率;再计算金丝桃苷转移率(浸膏中含

茯苓)制粒时直接粉碎入药,采用煎煮有16味,其中的12味药(制首乌、熟地黄、菟丝子、桑葚、陈皮、枸杞子、当归、川芎、黄精、丹参、芝麻、核桃仁)含黄酮^[7-17]。文献报道,黄酮类化合物对心血管系统、消化系统、神经系统、免疫系统等均有调节作用^[18-23]。其抗氧化和清除自由基作用可改善细胞相关功能,促进组织正常功能的恢复;黄酮类化合物,特别是异黄酮,化学结构与雌激素相似,能够对人体内分泌进行调节;黄酮类成分可促进血液循环,激活毛母细胞,使毛发生长能力衰退的毛囊复活,补充营养成分,从而发挥养发生发的作用^[24-25];此外,黄酮类化合物可抗抑郁、延缓衰老^[26],从而在一定程度上可缓和因工作节奏、生活方式等外部环境的变化引起的精神压力增加以及饮食的失衡所导致的脱发。

因此,课题组选取总黄酮为检测指标之一,然而此方药味众多,无法准确测得总黄酮转移率,不能很好地评价提取工艺的适用性和可靠性,故另外选取同为黄酮类成分的金丝桃苷(臣药菟丝子的有效成分)作为评价指标二,用以计算转移率;二者结合评价提取工艺更具实际意义。

最优提取工艺经验证试验结果表明,出膏率、金丝桃苷转移率均较高,表明所确定的提取工艺条件可行,可用于进一步的制剂生产。

参考文献

- [1] 朱良春.名师与高徒:首届著名中医药学家学术传承高层论坛选粹[M].长沙:中南大学出版社,2005:631-633.
- [2] 范智琴.梅花针配合中药治疗脱发80例[J].实用中医药杂志,2005,21(9):539.
- [3] 韦瑀龙,黄小鸥,蓝晓庆.固本补肾口服液的总黄酮含量测定方法研究[J].实用药物与临床,2016,19(10):1287-1289.
- [4] 史万忠,刘瑾,吕海阳,等.大孔吸附树脂纯化补肾方中总黄酮的工艺研究[J].中成药,2009,31(7):1024-1028.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103.
- [6] 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,2015:309,525.
- [7] 董东,董顺福,韩丽琴,等.何首乌中总黄酮与微量元素含量分析及其药效机理研究[J].时珍国医国药,2008,19(9):2218-2219.
- [8] 黄灿,王斌,贺建云,等.熟地总黄酮的含量测定及其超声提取工艺优化[J].化学与生物工程,2009,26(4):70-73.
- [9] 王瑞坡.桑椹黄酮的制备及其降血糖和降尿酸作用研究[D].上海:华东师范大学,2011.
- [10] 郑国栋,蒋林,杨得坡,等. HPLC法同时测定不同产地广

- 陈皮中5种活性黄酮成分[J].中草药,2010,41(4):652-655.
- [11] 刘兰英,曹有龙,赵友谊.枸杞黄酮提取工艺研究[J].安徽农业科学,2011,39(30):18490-18491.
- [12] 李谷才,魏文亨,高堂杰,等.当归总黄酮提取及其体外抑菌活性研究[J].时珍国医国药,2011,22(2):310-311.
- [13] 许丽璇,李伟斌,蔡建秀.川芎总黄酮提取优化及小鼠体外抗氧化作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(18):1524-1528.
- [14] 陈克克,史丽,李莺,等.黄精总黄酮和总酚的含量测定[J].陕西农业科学,2012,58(1):58-60.
- [15] 李欣,薛治浦,朱文学.丹参不同部位总酚酸和总黄酮含量分析及其抗氧化活性研究[J].食品科学,2011,32(3):108-111.
- [16] 晨光.芝麻、余甘子和苦瓜中的黄酮类化合物对健康有益[J].国外医学(中医中药分册),2001,23(5):308.
- [17] 阿布力克木·阿布力孜,迪丽努尔·塔力甫,阿布力米提·阿布都卡德尔.核桃仁内隔膜中总黄酮最佳提取工艺的研究[J].生物技术,2009,19(4):60-63.
- [18] 陈丛瑾,王琪,李欣.黄酮类化合物抗氧化和抑菌生物活性研究进展[J].中国药典,2011,22(35):3346-3348.
- [19] 陈永钧,龙晓英,潘素静,等.黄酮类化合物的药效机制及构效关系研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(11):337-344.
- [20] 何佳珂,干洋,陈西敬,等.黄酮类化合物的药物代谢研究进展[J].中国中药杂志,2010,35(21):2789-2794.
- [21] 延益,刘会青,邹永青,等.黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J].有机化学,2008,28(9):1534-1544.
- [22] 刘星雨,周敏,孙体健.天然黄酮类化合物的药理活性及分离提取[J].中国药物与临床,2014,14(5):621-624.
- [23] 刘一杰,薛永常.植物黄酮类化合物的研究进展[J].中国生物工程杂志,2016,36(9):81-86.
- [24] 陈兴芬,单承莺,马世宏,等.侧柏叶化学成分生理活性及防脱发功能研究进展[J].中国野生植物资源,2010,29(3):1-5.
- [25] 赵永光,赵莹,张建平,等.侧柏叶总黄酮在功能性洗发香波中的应用研究[J].安徽农业科学,2008,36(24):10295-10296.
- [26] KAWAGUCHI K, KIKUCHI SI, HASUNUMA R, et al. Suppression of infection-induced endotoxin shock in mice by a citrus flavanone naringin[J]. *Planta Medica*, 2014, 70(1):17-22.

(收稿日期:2017-05-22 修回日期:2017-07-25)

(编辑:刘 萍)