

止得咳颗粒提取工艺的优化^Δ

梁洁^{1,2*}, 陈辉华¹, 徐晖¹, 谢谭芳¹, 祁静¹, 信晨曦¹, 陈日兰³, 赵立春^{1,2#}(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2.广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200; 3.广西中医药大学附属瑞康医院院办, 南宁 530011)

中图分类号 R285.5; R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0832-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.11

摘要 目的:优化止得咳颗粒的提取工艺。方法:采用小鼠氨水引咳实验和二甲苯致耳肿胀实验初步筛选止得咳颗粒的提取方法(水提、醇提、水提醇沉法)。基于该方的制备路线,首先以吸水量为指标,考察含挥发油药材的浸泡时间;再并以挥发油得率为指标,采用单因素试验考察加水量和提取时间,筛选含挥发油药材的最优提取工艺。以次野鸢尾黄素和总黄酮含量为指标,在单因素考察的基础上,采取正交试验考察加水量、提取时间、提取次数等3个因素的影响,优化止得咳颗粒的水提工艺并验证。结果:药效学实验结果显示,水提物低、高剂量组(6.34、12.68 g/kg,以生药量计)和水提醇沉提取物高剂量组(12.68 g/kg,以生药量计)小鼠的咳嗽潜伏期均较模型组显著延长,2 min内咳嗽次数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);水提物低、高剂量组(6.34、12.68 g/kg,以生药量计),醇提物高剂量组(12.68 g/kg,以生药量计)和水提醇沉提取物高剂量组(12.68 g/kg,以生药量计)小鼠的耳肿胀度均较模型组显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),水提物、醇提物和水提醇沉提取物低、高剂量组的肿胀抑制率分别为42.26%、55.08%、33.49%、51.56%、39.57%、44.36%,表明以水提法所得提取物的止咳、抗炎效果更优。含挥发油药材的最优提取工艺为加入5倍量水,浸泡30 min,提取3 h。最佳水提工艺为加入12倍量水,浸泡50 min后提取3次,每次1.0 h;3次验证试验结果显示,最优工艺所得提取物中次野鸢尾黄素的平均含量为76.47 μg/g(RSD=2.15%, $n=3$),总黄酮的平均含量为92.45 mg/g(RSD=0.48%, $n=3$)。结论:优化的止得咳颗粒提取工艺稳定、可行。

关键词 止得咳颗粒;药效学;正交试验;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Zhideke Granules

LIANG Jie^{1,2}, CHEN Huihua¹, XU Hui¹, XIE Tanfang¹, QI Jing¹, XIN Chenxi¹, CHEN Rilun³, ZHAO Lichun^{1,2}
(1. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Center of Zhuang Yao Medicine Engineering and Technology Research, Nanning 530200, China; 3. Hospital Administration Office, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of TCM, Nanning 530011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Zhideke granules. METHODS: The extraction technology (water extraction, alcohol extraction, water extraction and ethanol precipitation) of Zhideke granules was initially screened by ammonia-induced cough experiment and xylene-induced ear swelling experiment in mice. Based on its preparation route, the immersion time of medicinal materials containing volatile oil was investigated with water absorption as index firstly. The single factor test was adopted to investigate the amount of water added and the extraction time taking the volatile oil yield as index to optimize the extraction technology of medicinal materials containing volatile oil. Taking the contents of irisfloreantin and total flavonoids as indicators, on the basis of single factor investigation, orthogonal test was adopted to examine the influence of three factors including the amount of water added, extraction time and extraction frequency, so as to optimize the water extraction technology of Zhideke granules and the validation tests were conducted. RESULTS: The results of pharmacodynamics experiment showed that the cough latency of mice in water extract low-dose and high-dose groups (6.34, 12.68 g/kg, by crude drug) and water-extraction alcohol-precipitation extract high-dose group (12.68 g/kg, by crude drug) were significantly longer than those in

^Δ 基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目(No.桂科AA17202046);广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划(No.桂教人[2019]5号);广西一流学科建设名单(No.桂教科研[2018]12号);广西壮瑶药协同创新中心(No.桂教科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室培育基地(No.桂科基字[2014]32号);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划项目(No.桂教师范[2019]52号);广西第八批自治区特聘专家项目(No.桂人才通字[2019]13号);广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目(No.2018002)

*教授,博士。研究方向:中药药效物质基础与质量控制。电话:0771-4953513。E-mail:liangjie1101@126.com

#通信作者:研究员,博士。研究方向:中药民族药化学成分及药理活性。电话:0771-4953513。E-mail:hyzlc@126.com

model group, and the number of cough within 2 minutes was significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the ear swelling of mice in water extract low-dose and high-dose groups (6.34, 12.68 g/kg, by crude drug), ethanol extract high-dose group (12.68 g/kg, by crude drug) and water-extraction alcohol-precipitation extract high-dose group (12.68 g/kg, by crude drug) were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). The swelling inhibition rates were 42.26%, 55.08%, 33.49%, 51.56%, 39.57% and 44.36% in low-dose and high-dose groups of water extract, alcohol extract, water-extraction and alcohol-precipitation

extract respectively, indicating that the water extract had better antitussive and anti-inflammatory effects. The optimal extraction technology of volatile oil was adding 5-fold water, soaking for 30 minutes, and extracting for 3 hours. The optimal water extraction technology was adding 12-fold water, extracting for 3 times after soaked for 50 min, lasting for 1 h each time. Results of 3 times of validation tests showed that average content of irisfloreantin in the extract obtained by optimal technology was 76.47 $\mu\text{g/g}$ (RSD=2.15%, $n=3$) and the average content of total flavonoids was 92.45 mg/g (RSD=0.48%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimal extraction technology of Zhideke granules is stable and feasible.

KEYWORDS Zhideke granules; Pharmacodynamics; Orthogonal test; Extraction technology

止得咳方为广西中医药大学附属瑞康医院的临床经验方,由龙脷叶、射干、黄芩、桔梗、白前、青天葵、枇杷叶、柴胡、薄荷、荆芥共10味药材配伍而成。该方具有疏风清热、止咳利咽的功效,可用于治疗急慢性支气管炎、上呼吸道感染、肺炎、急性咽炎等风热犯肺者^[1-3]。方中龙脷叶性平,味甘、淡,入肺经,具有清热化痰、止咳平喘之功效;射干味苦,性寒,具有清热解毒、消痰、利咽之功效,亦归肺经;二者共为君药^[9]。研究表明,与单用氨茶碱相比,止得咳方在改善支气管哮喘急性发作期患者临床症状、提高其生活质量方面有一定的优势,且安全性好、毒副作用少;此外,该方治疗风热犯肺型咳嗽变异性哮喘合并支原体感染患者的临床疗效显著,具有一定的临床价值^[1,4]。止得咳方以汤剂形式应用于临床,但该剂型存在煎煮麻烦、口感差、不易携带和保存等不足,影响了患者的用药顺应性,故本研究拟将该方制成适合于工业化生产且便于患者使用的中药复方颗粒剂;同时,为保证制剂的质量和疗效,本研究拟对止得咳颗粒剂的提取工艺进行考察。目前,复方制剂的提取工艺多以指标性成分含量为依据进行筛选,容易忽略最根本的药效学指标。基于此,本研究参考文献[5-10],初步设计了3种止得咳颗粒的提取方法,并对各工艺所制样品进行止咳和抗炎的药效学研究,确定出最优提取工艺方案;再在单因素考察的基础上,以次野鸢尾黄素(君药射干的主要活性成分^[11])和总黄酮(止得咳颗粒的药效活性组分^[12-21])含量为指标,采用正交试验优化止得咳颗粒的提取工艺,为该颗粒剂提取工艺的优化提供合理依据。

1 材料

1.1 主要仪器

实验用主要仪器包括Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、WH-2000超声波雾化器(广东粤华医疗器械厂有限公司)、UV-2600型紫外-可见分光光度计[岛津仪器(苏州)有限公司]、TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、UPC-II-10T型实验室超纯水器(四川优普超纯科技有限公司)、XS104型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、HH-S6型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司)、KH-500B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)、挥发油提取器(安徽美星实验设备有限公司)、8 mm打孔器(张家港市双银医疗器械有限公司)等。

1.2 主要药品和试剂

龙脷叶、射干、黄芩、薄荷、白前、柴胡、桔梗、荆芥、青天葵、枇杷叶等10味药材均购自广西仙荣中药科技有限公司(批号分别为20181001、20171101、20180601、20171101、20170201、20180501、20180501、20180601、20170901、20171001),经广西中医药大学药学院滕建北教授鉴定均为真品,且符合2015版《中国药典》(一部)和《广西壮族自治区壮药质量标准(第2卷)》项下相关规定^[11,22]。

次野鸢尾黄素对照品(批号111557-200602,供含量测定用)、芦丁对照品(批号100080-201409,供含量测定用)均购自中国食品药品检定研究院;实验用药品和试剂还包括磷酸可待因片(青海制药厂有限公司,批号20180433,规格30 mg)、醋酸氢化可的松片(上海上药信谊药厂有限公司,批号2019180401,规格20 mg)、苯酚红(成都金山化学试剂有限公司,批号20180706,分析纯)、氨水(国药集团化学试剂有限公司,批号20160322,分析纯)、二甲苯(天津市富宇精细化工有限公司,批号2018022,分析纯)等;其余试剂亦为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

1.3 动物

实验用SPF级昆明种小鼠雌雄兼有,体质量18~22 g,1.5~2月龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(湘)2016-0002。

2 方法与结果

2.1 止得咳颗粒提取方法的初步筛选

2.1.1 止得咳颗粒提取方法的设计与提取物的制备

根据文献[5-10],该方药材的提取方法主要包括水煎煮法和乙醇回流提取法。在此基础上,本研究初步筛选设计了3种提取方法。(1)水提法:按处方量(龙脷叶、射干、黄芩、桔梗、白前、青天葵、枇杷叶、柴胡、荆芥、薄荷质量比为3:3:2:3:3:2:3:3:2:2,下同)取全方各药材适量,加12倍量(mL/g,下同)水,煎煮提取3次,每次1 h,滤过,合并滤液,浓缩成稠膏(得膏率为34.58%)。(2)水提醇沉法:按处方量称取全方各药材适量,按上述水提法提取,合并滤液,浓缩;加乙醇至上述浓缩液中,使乙醇体积分数为70%,静置过夜,滤过,收集滤液并浓缩成稠膏(得膏率为16.75%)。(3)醇提法:按处方量称取全方各药材适量,加12倍量95%乙醇回流提取3次,每次1 h,滤过,合并滤液,浓缩成稠膏(得膏率为

26.06%)。

2.1.2 止得咳颗粒不同提取物的止咳作用比较

采用小鼠氨水引咳实验进行比较^[23-25]。将昆明种小鼠分为模型组、磷酸可待因组(阳性对照,0.011 g/kg)、水提物低剂量组(2.19 g/kg,相当于生药6.34 g/kg)、水提物高剂量组(4.38 g/kg,相当于生药12.68 g/kg)、醇提物低剂量组(1.65 g/kg,相当于生药6.34 g/kg)、醇提物高剂量组(3.30 g/kg,相当于生药12.68 g/kg)、水提醇沉提取物低剂量组(1.06 g/kg,相当于生药6.34 g/kg)、水提醇沉提取物高剂量组(2.12 g/kg,相当于生药12.68 g/kg),每组10只,雌雄各半。磷酸可待因组给药剂量根据临床用量按体表面积换算成小鼠等效剂量;各提取物组给药剂量均参照本课题组前期预实验结果并根据该方临床用量按体表面积换算为小鼠等效剂量,其中高、低剂量分别相当于成人用量的1/5、1/10。上述药物均以水为溶剂配成相应药液。模型组小鼠灌胃等体积水,各药物组小鼠灌胃相应药液,灌胃体积均为0.02 mL/g,每天1次,连续给药7天。末次给药前禁食不禁水12 h,末次给药后1 h,将小鼠放入烧杯中并罩住烧杯口,用超声波雾化器向烧杯中通入浓氨水喷雾,20 s后停止。取出小鼠,观察并记录2 min内其咳嗽次数(小鼠腹部收缩或缩胸,同时张大嘴、头向前倾,有时带有咳嗽声等为小鼠咳嗽1次)和潜伏期(从诱咳至发生第1次咳嗽的时间)。采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析;计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果,与模型组比较,水提物低、高剂量组,水提醇沉提取物高剂量组和磷酸可待因组小鼠的咳嗽潜伏期均显著延长,2 min内咳嗽次数均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表1。可见,与其他方法相比,以水提法所制提取物的止咳效果相对最佳。

表1 止得咳颗粒不同方法提取物对氨水致小鼠咳嗽的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of extracts by different extraction technology of Zhideke granules on ammonia-induced cough in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	咳嗽潜伏期,s	2 min内咳嗽次数,次
模型组	22.78 ± 5.67	15.56 ± 2.60
水提物低剂量组	50.56 ± 5.79**	9.00 ± 1.87**
水提物高剂量组	60.11 ± 7.25**	5.44 ± 1.13**
醇提物低剂量组	27.22 ± 3.67	13.33 ± 2.06
醇提物高剂量组	28.78 ± 2.44	12.11 ± 2.62
水提醇沉提取物低剂量组	26.56 ± 2.92	13.11 ± 2.85
水提醇沉提取物高剂量组	36.11 ± 4.65*	10.89 ± 1.09**
醋酸氢化可的松组	70.78 ± 3.80**	3.56 ± 1.51**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.1.3 止得咳颗粒不同提取物的抗炎作用比较

采用二甲苯致小鼠耳肿胀实验进行比较^[23-24]。将

雄性小鼠分为模型组、醋酸氢化可的松组(阳性对照,0.011 4 g/kg)和水提物、醇提物、水提醇沉提取物的低、高剂量组(剂量同“2.1.2”项),每组10只。醋酸氢化可的松组给药剂量根据临床用量按体表面积换算成小鼠等效剂量;各提取物组给药剂量设置依据同“2.1.2”项。上述药物均以水为溶剂配成相应药液。模型组小鼠灌胃等体积水,各药物组小鼠灌胃相应药液,灌胃体积均为0.02 mL/g,每天1次,连续给药7天。末次给药前禁食不禁水12 h,末次给药后1 h,小鼠左耳均匀涂抹二甲苯40 μ L,右耳(不作处理)作为对照,20 min后处死,剪下两耳,在相同位置打孔并称定两耳片的质量,计算肿胀度和肿胀抑制率:肿胀度=肿胀耳(左耳)质量-对照耳(右耳)质量,肿胀抑制率(%)=(模型组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/模型组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。按“2.1.2”项下统计学方法对数据进行统计分析。

结果,与模型组比较,水提物低、高剂量组,醇提物高剂量组,水提醇沉提取物高剂量组和醋酸氢化可的松组小鼠的耳肿胀度均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),水提物、醇提物、水提醇沉提取物的低、高剂量组以及醋酸可的松组的肿胀抑制率分别为42.29%、55.08%、33.49%、51.56%、39.57%、44.36%、63.31%,详见表2。可见,与其他方法相比,以水提法所制提取物的抗炎效果相对最佳。

表2 止得咳颗粒不同方法提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of extracts by different extraction technology of Zhideke granules on xylene-induced ear swelling in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	左耳质量,mg	右耳质量,mg	肿胀度,mg	肿胀抑制率,%
模型组	19.48 ± 3.25	12.53 ± 1.90	6.95 ± 2.12	
水提物低剂量组	13.76 ± 3.29	9.74 ± 1.95	4.01 ± 2.28*	42.29
水提物高剂量组	15.04 ± 1.89	11.92 ± 0.75	3.12 ± 1.94**	55.08
醇提物低剂量组	16.36 ± 4.55	11.73 ± 2.29	4.62 ± 2.89	33.49
醇提物高剂量组	14.79 ± 1.77	11.42 ± 1.34	3.37 ± 1.18*	51.56
水提醇沉提取物低剂量组	16.49 ± 4.67	12.29 ± 0.84	4.20 ± 4.22	39.57
水提醇沉提取物高剂量组	14.05 ± 4.96	10.03 ± 1.67	3.87 ± 4.20*	44.36
醋酸氢化可的松组	14.68 ± 2.77	12.13 ± 0.76	2.55 ± 2.38**	63.31

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.1.4 止得咳颗粒提取方法初筛结果

结合“2.1.2”“2.1.3”的药效学实验结果可知,以水为溶剂所制止得咳颗粒提取物的药效相对最佳,故以水提法为该方提取方法。

2.2 止得咳颗粒含挥发油药材提取工艺筛选

根据本课题组前期设计,止得咳颗粒的制备路线大致如下:先将含挥发油药材(薄荷和荆芥)进行提取,所得挥发油以倍他环糊精包合,备用;挥发油提取所得提取液经滤过后备用;将挥发油提取后的药渣与其余8味药材混合,进行水提,滤过,取滤液与上述含挥发油药材

提取液合并,浓缩至浸膏,加入适量蔗糖和环糊精混匀,再以乙醇制粒,干燥;随后加入挥发油 β -环糊精包合物,混匀,即得。因此,参考上述制备路线,本研究先采用单因素试验进行含挥发油药材提取工艺的筛选,再进行水提工艺的优化。

2.2.1 浸泡时间考察

取荆芥、薄荷药材各 111 g,共 5 份,加 6 倍量水(即质量倍数,下同),分别浸泡 10、20、30、40、50 min,滤过,称取药材吸水后的质量,计算吸水率:吸水率=(药材吸水后的质量-药材原质量)/药材原质量 \times 100%。结果,当浸泡时间 \geq 30 min,药材的吸水率无明显变化(约 207%),提示药材吸水基本已达饱和,故确定药材的浸泡时间为 30 min,详见表 3。

表 3 止得咳颗粒含挥发油药材浸泡时间考察结果

Tab 3 Investigation result of immersion time of medicinal material containing volatile oil of Zhideke granules

序号	加水倍数,倍	浸泡时间,min	药材吸水后的质量,g	吸水率,%
1	6	10	555.71	150.32
2	6	20	663.23	198.75
3	6	30	680.99	206.75
4	6	40	681.94	207.18
5	6	50	683.14	207.72

2.2.2 加水量考察

取荆芥、薄荷药材各 111 g,共 3 份,分别加入 4、5、6 倍量水,浸泡 30 min 后,加热至沸腾并保持微沸提取 3 h,计算挥发油得率:挥发油得率=所得挥发油质量/药材原质量 \times 100%。结果,当加水量为 5 倍量时,总挥发油得率达到最高,故选择加水量为 5 倍,详见表 4。

表 4 止得咳颗粒含挥发油药材加水量考察结果

Tab 4 Investigation result of the amount of water added of medicinal material containing volatile oil of Zhideke granules

序号	加水倍数,倍	挥发油得率,%
1	4	0.34
2	5	0.36
3	6	0.32

2.2.3 提取时间考察

取荆芥、薄荷药材各 111 g,共 3 份,加入 5 倍量水,浸泡 30 min 后,加热至沸腾并保持微沸提取 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4 h,分别按“2.2.2”项下公式计算提取不同时间的挥发油得率,每个时间点平行测定 3 次。结果,当提取时间达到 3 h 时,挥发油得率基本达到最高值;再延长提取时间,挥发油得率无明显变化,因此确定提取时间为 3 h,详见表 5。

2.2.4 验证试验

经过上述单因素考察,确定含挥发油药材的最优提取工艺为加 5 倍量水、浸泡 30 min 后提取 3 h。取荆芥、薄荷药材各 111 g,共 3 份,按上述最优提取工艺提取并

表 5 止得咳颗粒含挥发油药材提取时间考察结果

Tab 5 Investigation result of extraction time of medicinal material containing volatile oil of Zhideke granules

序号	提取时间,h	挥发油得率,%			平均值
		第1次	第2次	第3次	
1	0.5	0.22	0.22	0.22	0.22
2	1	0.22	0.22	0.22	0.22
3	1.5	0.27	0.27	0.27	0.27
4	2	0.27	0.27	0.27	0.27
5	2.5	0.31	0.31	0.31	0.31
6	3	0.36	0.36	0.36	0.36
7	4	0.36	0.36	0.36	0.36

按“2.2.2”项下公式计算挥发油得率。结果显示,在上述工艺条件下,挥发油得率均为 0.36%,与单因素试验结果一致。这表明单因素试验筛选的最优含挥发油药材提取工艺稳定、可行。

2.3 止得咳颗粒水提工艺优化

2.3.1 次野鸢尾黄素的含量测定

采用高效液相色谱法测定止得咳颗粒水提物中次野鸢尾黄素的含量。

(1)色谱条件:以 Phenomenex Gemini C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 为色谱柱,以甲醇-0.2% 磷酸水溶液(55:45, V/V) 为流动相,检测波长为 266 nm,流速为 0.8 mL/min,柱温为 30 $^{\circ}$ C,进样量为 10 μ L。

(2)溶液的制备:精密称取次野鸢尾黄素对照品 2.8 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度为 0.28 mg/mL 的次野鸢尾黄素对照品溶液。取止得咳颗粒水提物约 1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加水 15 mL,称定质量,超声(功率 200 W,频率 40 kHz)提取 30 min,放冷,再次称定质量,用水补足缺失的质量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

(3)方法学考察:按 2015 年版《中国药典》(四部)^[26] 要求进行方法学考察。结果,以待测物质量浓度(X, μ g/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标,求得回归方程为 $Y=65.676 2X-29.554 3$ ($r=0.999 6$),表明次野鸢尾黄素检测质量浓度的线性范围为 2.800~42.00 μ g/mL。精密密度试验的 RSD 为 0.95%($n=6$);稳定性试验(24 h)的 RSD 为 2.49%($n=7$);重复性试验结果显示,次野鸢尾黄素的平均含量为 40.91 μ g/g, RSD 为 1.85%($n=6$);平均加样回收率为 99.42%, RSD 为 1.92%($n=6$)。这表明方法的精密度、重复性、准确度均良好,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(4)样品测定:精密称取水提物样品,按“2.3.1(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1(1)”项下色谱条件进样测定。每份样品重复测定 2 次,按外标法计算样品中次野鸢尾黄素的含量,取平均值。

2.3.2 总黄酮的含量测定

采用紫外-可见分光光度法测定止得咳颗粒水提物

中总黄酮的含量(以芦丁计)。

(1)溶液的制备:精密称取芦丁对照品 48.5 mg,置于 50 mL 量瓶中,加乙醇溶解并定容,制成质量浓度为 0.97 mg/mL 的芦丁对照品溶液。取止得咳颗粒水提物约 0.1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入水 10 mL,称定质量,超声(功率 200 W,频率 40 kHz)提取 30 min,放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

(2)测定波长的确定:取“2.3.2(1)”项下芦丁对照品溶液,分别加 5% 亚硝酸钠溶液 0.4 mL,摇匀,静置 6 min;加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀,静置 6 min;加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4 mL,再加乙醇定容至 25 mL,放置 15 min。以相应试剂(即乙醇)作空白,使用紫外-可见分光光度计在 400~800 nm 波长范围内扫描。结果,芦丁的最大吸收波长为 509 nm,故将其作为测定波长。

(3)方法学考察:按 2015 年版《中国药典》(四部)^[26]要求进行方法学考察。结果,以待测物质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标,求得回归方程为 $Y=1.0991X+0.0027$ ($r=0.9998$),表明芦丁检测质量浓度的线性范围为 0.0194~0.0776 mg/mL。精密度试验的 RSD 为 0.39% ($n=6$);稳定性(24 h)试验的 RSD 为 0.28% ($n=7$);重复性试验结果显示,总黄酮的平均含量为 52.61 mg/g, RSD 为 1.52% ($n=6$);平均加样回收率为 99.54%, RSD 为 1.34% ($n=6$)。这表明方法的精密度、重复性、准确度均良好,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(4)样品测定:精密称取水提物样品,按“2.3.2(1)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.2(2)”项下条件测定吸光度。每份样品重复测定 3 次,按外标法计算样品中总黄酮的含量,取平均值。

2.3.3 止得咳颗粒水提工艺的单因素考察

本研究对药材浸泡时间、提取时间、提取次数等因素进行单因素考察^[25,27]。

(1)药材浸泡时间:按处方比例称取药材,共 8 份,每份 192.4 g(为原组方药材总质量的 1/5,其中荆芥和薄荷为提取挥发油后的药材残渣,下同),加入 10 倍量水分别浸泡 10、20、30、40、50、60、70、80 min,滤过,称取药材吸水后的质量,按“2.2.1”项下方法计算其吸水率,以考察不同浸泡时间的影响。结果表明,当浸泡时间 ≥ 50 min 时,药材的吸水率未见明显变化,说明药材吸水性已达到饱和状态,此时的吸水率为 178.61%,详见表 6。从生产实际出发,为确保药材得以充分浸泡,确定药材的浸泡时间为 50 min。

(2)提取时间:按处方比例称取药材,共 5 份,每份 192.4 g,加入 10 倍量水,浸泡 50 min 后,分别提取 30、60、90、120、150 min,提取次数固定为 1 次。将提取液浓缩,按“2.3.1”“2.3.2”项下方法测定次野鸢尾黄素和总黄

表 6 止得咳颗粒水提工艺药材浸泡时间考察结果

Tab 6 Investigation result of immersion time of Zhide-ke granules in water extraction technology

序号	加水倍量,倍	浸泡时间,min	药材吸水后的质量,g	吸水率,%
1	10	10	375.95	95.40
2	10	20	434.90	126.04
3	10	30	470.05	144.31
4	10	40	505.92	162.95
5	10	50	536.04	178.61
6	10	60	539.85	180.59
7	10	70	543.32	182.39
8	10	80	544.82	183.17

酮的含量,并计算次野鸢尾黄素的转移率(总黄酮无转移率之说,故不作考察):转移率=水提取浸膏中次野鸢尾黄素含量/药材中次野鸢尾黄素含量 $\times 100\%$,以考察不同提取时间的影响。结果,随着提取时间的延长,次野鸢尾黄素和总黄酮的含量也有所增加。当提取时间达到 90 min 时,次野鸢尾黄素和总黄酮的含量分别达到了 12.28 $\mu\text{g/g}$ 、40.25 mg/g,次野鸢尾黄素的转移率为 8.51%;当再增加提取时间后,次野鸢尾黄素的含量和转移率均变化不大,而总黄酮的含量有所下降;此外,当提取时间为 60、90 min 时,该方君药指标性成分次野鸢尾黄素的含量差异不明显,详见表 7。从减少耗能等生产实际出发,选择提取时间为 60 min。

表 7 止得咳颗粒水提工艺提取时间考察结果

Tab 7 Investigation result of extraction time of Zhide-ke granules in water extraction technology

序号	提取时间,min	次野鸢尾黄素		总黄酮含量,mg/g
		含量, $\mu\text{g/g}$	转移率,%	
1	30	8.00	5.55	32.32
2	60	10.67	7.39	30.58
3	90	12.28	8.51	40.25
4	120	12.99	9.00	37.29
5	150	15.26	8.09	24.06

(3)提取次数:按处方比例称取药材,共 4 份,每份 192.4 g,加入 10 倍量水,浸泡 50 min 后,分别提取 1、2、3、4 次,每次均加入 10 倍量水、提取 60 min。合并提取液并浓缩后,按“2.3.1”“2.3.2”“2.3.3(2)”项下方法测定水提物中次野鸢尾黄素、总黄酮的含量和次野鸢尾黄素的转移率,以考察不同提取次数的影响。结果,随着提取次数的不断增加,各指标含量均呈不同程度的上升趋势;当提取次数达到 3 次时,次野鸢尾黄素和总黄酮的含量分别为 49.57 $\mu\text{g/g}$ 、76.09 mg/g,次野鸢尾黄素的转移率为 39.40%;而当提取次数为 4 次时,各指标含量及次野鸢尾黄素转移率的增幅均不大,详见表 8。从减少能耗等生产实际出发,选择提取次数为 3 次。

2.3.4 正交试验优化止得咳颗粒的水提工艺

在单因素考察的基础上,以次野鸢尾黄素和总黄酮的含量为评价指标(因次野鸢尾黄素转移率的变化趋势与其含量基本一致,故未将转移率作为评价指标),选定

表8 止得咳颗粒水提工艺提取次数考察结果

Tab 8 Investigation result of extraction times of Zhideke granules in water extraction technology

序号	提取次数,次	次野鸢尾黄素		总黄酮,mg/g
		含量, μg/g	转移率, %	
1	1	9.77	7.76	42.78
2	2	40.01	31.80	55.84
3	3	49.57	39.40	76.09
4	4	51.28	40.77	82.78

加水倍量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,进行L₉(3⁴)正交试验。各试验均在药材浸泡50 min后进行。止得咳颗粒水提工艺正交试验的因素与水平见表9,其试验设计与结果见表10,其方差分析结果见表11。

表9 止得咳颗粒水提工艺正交试验的因素与水平

Tab 9 Factors and levels of orthogonal test for water extraction technology of Zhideke granules

水平	A(加水倍量),倍	B(提取时间),min	C(提取次数),次
1	8	30	1
2	10	60	2
3	12	90	3

表10 止得咳颗粒水提工艺正交试验设计与结果

Tab 10 Orthogonal experiment design and results of water extraction technology of Zhideke granules

试验号	A,倍	B,min	C,次	D(空白)	次野鸢尾黄素含量, μg/g	总黄酮含量, mg/g
1	1	1	1	1	13.21	32.23
2	1	2	2	2	28.90	59.08
3	1	3	3	3	37.34	76.40
4	2	1	2	3	38.34	67.16
5	2	2	3	1	53.44	85.40
6	2	3	1	2	8.52	40.56
7	3	1	3	2	68.65	83.55
8	3	2	1	3	30.21	44.75
9	3	3	2	1	53.06	76.72
次野鸢尾黄素	均值1	79.45	120.20	51.94	119.71	
	均值2	100.30	112.55	120.30	106.07	
	均值3	151.92	98.92	159.43	105.89	
	极差	72.47	21.28	107.49	13.82	
总黄酮	均值1	167.71	182.94	117.54	194.35	
	均值2	193.12	189.23	202.96	183.19	
	均值3	205.02	193.68	245.35	188.31	
	极差	37.31	10.74	127.81	11.16	

由表10、表11可知,表中极差值的大小提示各因素对次野鸢尾黄素和总黄酮含量的影响大小依次均为:提取次数>加水倍量>提取时间,其中提取次数对上述成分含量的影响均有统计学意义($P<0.05$),而加水倍量和提取时间的影响则无统计学意义($P>0.05$);直观分析表明,以次野鸢尾黄素含量为评价指标的最优条件为A₃B₁C₃,以总黄酮含量为评价指标的最优条件为A₃B₃C₃。由于提取时间的影响较弱,综合考虑资源节约等生产实际,最终确定最优水提工艺为A₃B₂C₃,即用12倍量的水,浸泡50 min后提取3次,每次提取1 h。

表11 止得咳颗粒水提工艺正交试验的方差分析结果

Tab 11 Results of variance analysis of orthogonal test for water extraction technology of Zhideke granules

指标成分	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
次野鸢尾黄素	A	927.9	2	464.0	22.1	>0.05
	B	77.5	2	38.8	1.8	>0.05
	C	1973.1	2	986.6	47.0	<0.05
	D(误差)	41.9	2	21.0		>0.05
总黄酮	A	242.1	2	121.1	11.6	>0.05
	B	19.4	2	9.7	0.9	>0.05
	C	2825.4	2	1412.7	135.8	<0.05
	D(误差)	20.8	2	10.4		>0.05

2.3.5 验证试验

按处方比例称取药材,共3份,每份962 g;先按“2.2”项下方法提取荆芥和薄荷挥发油后,再将药材残渣与其余8味药材混合,按上述最优水提工艺进行提取,最后按“2.3.1”“2.3.2”项下方法检测提取物中次野鸢尾黄素和总黄酮的含量。结果,3次验证试验所得提取物中次野鸢尾黄素的含量分别为77.84、77.41、74.16 μg/g,平均含量为76.47 μg/g(RSD=2.15%, $n=3$);总黄酮的含量分别为93.07、92.23、92.06 mg/g,平均含量为92.45 mg/g(RSD=0.48%, $n=3$)。这提示该优化水提工艺稳定、可行。

3 讨论

3.1 止得咳颗粒药效学模型的建立

诱发咳嗽常用的化学刺激法包括气雾吸入和直接注入两种方法,其中气雾吸入法主要是将没有麻醉的实验动物(如大鼠、小鼠)置于恒定容积的密闭容器内,放入一定量的刺激性气体,诱发其咳嗽;直接注入法则是给麻醉动物(如兔)插入气管套管,把规定剂量的刺激性气体直接充入气管套管中,诱发其咳嗽^[27]。但有研究指出,后一种方法若操作不当或麻醉过深则有可能会抑制咳嗽反射,影响实验结果^[27]。通过比较两种方法,本研究选择使用气雾吸入氨水法来诱发咳嗽,此法操作简便且实验结果易观察。

本研究通过化学试剂二甲苯涂抹小鼠耳朵致肿胀来建立急性炎症模型,二甲苯致炎机制与临床常见急性炎症类似,且有操作简单、流程少、无需专用设备、效果好、价格便宜等优点,被广泛应用于抗炎效果评价和抗炎靶点化合物的筛选^[28]。有研究指出,二甲苯可引起组胺激肽和纤维蛋白等炎症介质的溶出释放,导致局部血管扩张、毛细管通透性增加、炎症细胞浸润,诱发耳部急性渗出性炎症水肿,从而建立急性炎症模型^[29]。

3.2 止得咳颗粒工艺优化中评价指标的选择

通过处方分析,方中龙脷叶和射干作为君药,故选择其中的有效成分作为指标性成分。在预试验中,笔者发现龙脷叶的指标性成分山柰酚-3-O-龙胆二糖苷缺乏特异性的色谱条件(即阴性对照有干扰),故暂未选择该

成分作为止咳颗粒剂的指标性成分;而射干的另一指标性成分次野鸢尾黄素在上述相同条件下不受阴性对照的干扰,因此选择将其作为止咳颗粒剂的指标性成分,并建立了测定其含量的高效液相色谱法^[11]。此外,笔者通过查阅相关文献发现,该方中黄芩、射干和青天葵等多味药材均含有黄酮类成分^[12-20],且黄酮类化合物在抗炎、镇咳、抗菌、抗病毒等方面均具有一定的药理活性^[21],因此本研究选择总黄酮含量作为另一考察指标,并建立了以芦丁为对照、经亚硝酸钠-亚硝酸铝-氢氧化钠显色的紫外-可见分光光度法。

3.3 止咳颗粒提取工艺的筛选和优化

为避免以化学成分为指标所导致的评价片面性和局限性,本研究首先采用药效学实验初步筛选了该制剂的提取方法,结果发现以水为溶剂所得提取物的药效优于乙醇提取和水提醇沉所得提取物,故选择水提法。止咳方中荆芥和薄荷的主要成分是挥发油,故参考其颗粒制备路线,本研究优化了荆芥、薄荷挥发油提取的水蒸气蒸馏法:以挥发油得率为指标,考察浸泡时间、加水量、提取时间等3个因素,优选出挥发油最优提取工艺,即加5倍量水,浸泡30 min后提取3 h。最后,本研究以次野鸢尾黄素和总黄酮含量为指标,在单因素考察的基础上,通过正交试验优化水提工艺,最终确定其最优水提工艺为加12倍量的水,浸泡50 min后提取3次,每次1 h;3次验证试验所得提取物中次野鸢尾黄素、总黄酮的平均含量为76.47 μg/g、92.45 mg/g(RSD<2.2%,n=3)。

综上所述,本研究所优化的止咳颗粒水提取工艺稳定、可行,可为该制剂的后续研发提供参考。

参考文献

[1] 辛静,李丽丽,凌爱思.止咳冲剂治疗支气管哮喘急性发作期的临床观察[J].广西中医药大学学报,2013,16(1):35-36.

[2] 黄敏,黄国东,韦瑀龙,等.止咳颗粒质量标准的研究[J].中国医药导报,2018,15(30):106-110.

[3] 周昱杉,梁洁,黄光强,等.基于化学模式识别方法分析止咳颗粒的抗炎谱效关系[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(22):156-163.

[4] 杨红梅,陈斯宁,潘玲,等.止咳颗粒治疗风热犯肺型咳嗽变异性哮喘合并支原体感染的临床研究[J].时珍国医国药,2020,31(5):1150-1151.

[5] 王继华,曹阳,蔡时可.南药龙脷叶的研究进展[J].园艺与种苗,2018,38(1):59-62.

[6] 王红梅,张晓明,焦正花,等.正交试验法优化射干扶正口服液提取工艺[J].西部中医药,2012,25(2):23-24.

[7] 汪天青,张颖,姜鸿,等.中药射干提取物改善豚鼠呼吸道合胞病毒感染后气道炎症的作用研究[J].中华中医药学刊,2019,37(9):2128-2132、2313.

[8] 王船英.桔梗最优提取工艺研究[J].九江学院学报(自然

科学版),2018(3):92-94、97.

[9] 李婷婷.柳叶白前化学成分及其抗氧化活性研究[D].延吉:延边大学,2015.

[10] 牛成伟,蓝建东,王童珍,等.正交实验法优化黄芩中总黄酮的提取工艺[J].中国民族民间医药,2019,28(21):39-41.

[11] 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,2015:97、109-110、204-205、232-233、277、280-281、285、301-302、377-378.

[12] 齐建红.超声细胞粉碎法提取射干总黄酮的工艺研究[J].陕西农业科学,2019,65(8):1-3.

[13] 谢雄雄,张迟,曾金祥,等.中药桔梗的化学成分和药理活性研究进展[J].中医药通报,2018,17(5):13、66-72.

[14] 刘洋,王四旺,唐志书.白前的现代研究与开发应用前景[J].西北药学杂志,2015,30(6):768-770.

[15] 朱芳,陈晓靓,邓红军,等.黄芩的研究进展[J].广东化工,2020,47(12):135-136.

[16] 蔡乐.青天葵药材生化成分及药理活性研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(8):244-246.

[17] 肖旭坤,王翰华,阮洪生.枇杷叶化学成分和药理活性研究进展[J].中医药导报,2019,25(21):60-66.

[18] 王梦迪,靳光乾.柴胡中药资源研究进展[J].山东林业科技,2019,49(3):107-110、114.

[19] 徐军,武毛毛,邓芬,等.薄荷中黄酮的研究进展[J].内江科技,2012(1):24、40.

[20] 黄晓巍,刘玥欣,刘轶蕾,等.荆芥化学成分及药理作用研究进展[J].吉林中医药,2017,37(8):817-819.

[21] 汪海峰,刘沁源.黄酮类化合物药理活性及其治疗效果研究新进展[J].西南国防医药,2020,30(6):593-595.

[22] 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2卷[S].南宁:广西科学技术出版社,2011:162-163.

[23] 匡森,杨巧丽,王林林,等.蒿蓝感冒颗粒抗炎、镇痛、镇咳及解热作用研究[J].中药药理与临床,2013,29(6):144-147.

[24] 刘海锋,黄山,玄光善,等.复方桔梗合剂止咳及抗炎活性的实验研究[J].中医药导报,2017,23(4):59-62.

[25] 陆赛卫,玄振玉.风叶止咳口服液止咳、平喘、化痰的实验研究[J].中国现代中药,2015,17(5):448-452.

[26] 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,2015:374-377.

[27] 张丹参.诱发咳嗽动物模型方法及评价[J].神经药理学报,2011,1(2):35-42.

[28] 谷捷,李鑫,余黄合,等.二甲苯致小鼠耳肿胀急性炎症模型的建立[J].湖南中医药大学学报,2016,36(5):32-35.

[29] 杨巧芳,孟庆刚.炎症动物模型探要[J].中华中医药学刊,2008,26(3):516-517.

(收稿日期:2020-09-04 修回日期:2021-01-19)

(编辑:张元媛)