

全国中药标准研究 学术研讨会

论文集

二〇〇五年 珠海

實行中西醫結合

發展傳統醫藥學

陽宗寶

二零零五年

三月廿一日

目 录

工艺研究论文

- 1、巴布剂基质骨架材料的选择及评价 刘淑芝 彭丽华等(1)
- 2、正交设计研究穿心莲中内酯类成分提取工艺 张建军(5)
- 3、正交试验法优选双降合剂的提取工艺 戴珍福(9)
- 4、阳离子交换树脂纯化喘平复方总生物碱的工艺研究 霍务贞、朱盛山(13)
- 5、贞糖康胶囊体外溶出度测定的研究 何夏秋、贺建华(19)
- 6、复方丹参缓释片中水溶性成分溶出度研究 袁旭江、李苑新等(25)
- 7、高速逆流色谱制备石杉碱甲单体工艺参数的研究及讨论(Ⅱ)——转速
..... 陈建华、黄少烈等(30)
- 8、舒心胶囊中虎杖提取工艺研究 王洛临、张素中等(36)
- 9、麝冰菖控释双层膜制备工艺研究 唐洪梅、孙亦群等(43)

质量研究论文

- 10、HPLC 法测定不同产地黄芩中黄芩素、汉黄芩素的含量 ... 冯伟红、李曼玲等(50)
- 11、HPLC 法测定地黄不同炮制品中梓醇含量 康琛、李曼玲等(54)
- 12、HPLC 测定皮肤病血毒丸中大黄素与大黄酚含量 陈世虎、陈瑞云(61)
- 13、Studies on Chemical Constituents of *Peucedanum praeruptorum* Dunn
..... Zhang Cun、Xiao Yong - Qing(65)
- 14、大黄蟪虫丸微生物限度检查法的建立 林丽英、陈浩桢(71)
- 15、大蒜油 HPLC 指纹图谱研究 丁家欣、张秋海等(80)
- 16、山茱萸薄层色谱指纹图谱鉴别研究 林朝展、祝晨陈等(86)
- 17、丹参素作为丹参药材和含丹参药材制剂质量控制指标的研究
..... 杨西晓、曾煦欣等(93)
- 18、木贼中山奈素的薄层鉴别及含量测定研究 张宪、赵惠萍等(97)
- 19、半夏采收与加工标准研究 白权、李敏等(103)
- 20、肝康胶囊质量标准的研究 孙冬梅、罗文汇等(108)
- 21、陈香露白露片的鉴别方法研究 李家琳、周俊(114)

- 22、采用生物活性法制定中药材质量标准初探—半夏药材的质量标准研究 秦彩玲、刘婷等(117)
- 23、南充与有关产地半夏总生物碱含量比较 白权、李敏等(130)
- 24、枳实饮片中有效成分含量测定 刘振丽、宋志前等(133)
- 25、炮制对中药大黄 5 种蒽醌成分含量的影响 李先端、黄璐崎(137)
- 26、砂仁的进口药材质量标准研究 朱沛韶、陈浩桢(143)
- 27、通络胶囊质量标准的研究 罗文汇、孙冬梅等(145)
- 28、活血胶囊质量标准的研究 李智勇 孙冬梅等(150)
- 29、高效液相色谱法研究甘肃产白条党参指纹图谱 封士兰、胡芳弟等(154)
- 30、高效液相—蒸发光散射检测法测定中药银柴胡中豆甾-7-烯醇的含量 李曼玲、赵宇新等(161)
- 31、接骨胶囊薄层鉴别研究 彭俊锋、范宋玲等(166)
- 32、葛根和粉葛饮片的质量标准研究 张思巨、王怡薇等(169)

药理研究论文

- 33、川芎内酯 A 对体外培养乳鼠 33 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 梁日欣、高伟等(173)
- 34、中药枳实对功能性消化不良大鼠胃排空的影响 朱金照、张捷等(177)
- 35、安宫牛黄丸中朱砂和雄黄的药理作用特点与安全性评价 叶祖光、王智民等(181)
- 36、尿毒清颗粒对小鼠耐寒机能和体液免疫循环抗体溶血素的影响 侯连兵、杨西晓等(188)
- 37、复方降脂素抗高血脂症的实验研究 曾晓会、崔景朝等(192)
- 38、柿叶乙醇提取物对大鼠高脂血症治疗作用的实验研究 邓瑞春、张文生等(197)
- 39、栀子对大鼠肝毒性的实验研究 杨洪军、付梅红等(203)
- 40、益智汤对家兔脑 $\text{Na} + \text{K} + - \text{ATP}$ 酶活力影响的药效动力学研究 周瑞玲、陈玉兴等(208)
- 41、益智汤抗老年期痴呆的实验研究 陈玉兴、周瑞玲等(214)
- 42、常用苦寒药对小鼠胃肠运动与肝肾功能影响的实验研究 邱赛红、李飞艳等(220)

- 43、路路通有效成分筛选实验研究 秦彩玲、孙玉茹等(224)
- 44、睡眠一号口服液改善睡眠的研究 李严巍、陈兰桂等(229)

临床研究论文

- 45、三角草的基础与临床研究 梅全喜、高幼衡等(234)
- 46、运脾散敷脐治疗小儿急性胃炎 36 例 黄秋云、张南(239)

综 述

- 47、“3S”技术在中药资源可持续利用中的应用 郭兰萍、黄璐琦等(241)
- 48、中药纵横应用与中西医结合 刘文坡、刘佳贺(246)
- 49、中药饮片注册管理应重点加强质量管理 肖永庆、张村等(249)
- 50、中药炮制辅料的规范化示范研究中中药炮制辅料醋目前应用情况实地调查
..... 毛淑杰、戴明辉等(252)
- 51、中药配方颗粒质量控制的研究 涂瑶生(258)
- 52、中药配方颗粒标准化问题探讨 高文远、刘新桥等(261)
- 53、中药新剂型的研究和应用 高灵玲(268)
- 54、中药剂型研究发展概况 肖树雄、王晓钰(272)
- 55、从药材抽查结果对《中国药典》的几点看法 朱沛韶(279)
- 56、从热力学角度审视和研究中医药(摘要) 肖小河(281)
- 57、分子蒸馏技术在天然产物分离纯化上的应用进展 陈建华、黄少烈等(284)
- 58、分散片的研究进展 张素中(291)
- 59、浅谈中药质量对临床疗效的影响 彭瑞松(297)
- 60、基于主成分分析的不同治法方药多药效指标综合比较研究
..... 赵亚丽、邬洪波等(300)
- 61、基于熵方法分析中风病方剂中药物之间的关联度 杨洪军、赵亚丽等(304)
- 62、超频震动膜过滤系统在中药分离浓缩中的应用探讨 周宏兵(311)
- 63、新辅料、新技术、新设备在中药配方颗粒制备工艺中的应用
..... 范宋玲、王洛临(315)
- 64、雷公藤根皮及地上部分的研究进展 毕晓黎、周伟雄等(317)
- 65、模糊数学法结合 Ridit 分析十首中药复方分煎与合煎的效应差异
..... 崔景朝、陈玉兴等(322)

巴布剂基质骨架材料的选择及评价

刘淑芝 彭丽华* 郭春燕 冯伟红 李曼玲 康琛 金日显

中国中医研究院中药研究所(北京 100700) *在读研究生

摘要:目的: 选择巴布剂的基质骨架材料, 对两种不同骨架材料制成的巴布剂进行体外释放度的测定, 比较其释放速率和释药规律。方法: 仿照透皮吸收的扩散池法, 采用改良的 Franz 扩散池装置, 用高效液相色谱法测定, 以吴茱萸中所含吴茱萸次碱为指标, 研究体外释放度。结果: 两种骨架材料制备的巴布剂, 吴茱萸次碱释药速率略有差别, 聚丙烯酸树脂与天然高分子物质组成的基质释药速率略高于聚丙烯酸树脂与半合成高分子物质组成的基质。体外释药随时间为一递增过程, 释药模式符合骨架型结构的 Higuchi 方程。结论: 两种骨架材料配方均具有较好的控释性能。

关键词: 基质配方 巴布剂 释放度 吴茱萸次碱 高效液相色谱

经皮给药系统(Transdermal Therapeutic System TTS)具有超越一般给药方法的独特优点。可以不经肝脏“首过作用”和胃肠道的破坏, 维持稳定, 持久的血药浓度。降低毒副作用, 进而提高疗效, 减少给药次数, 方便给药, 是一个极有前途的剂型^[1]。

在中药复方经皮给药系统研究中, 皮肤的屏障作用, 药物的理化性质以及基质骨架材料是影响经皮给药的三大重要因素。也是制约中药复方经皮给药系统开发的关键问题。因此, 研究缓控释药物的基质骨架材料及其释药, 经皮渗透规律, 具有重要意义。

作为经皮给药制剂, 膏体的粘弹性直接影响临床应用。如何增加巴布剂的粘弹性, 以满足临床对贴剂粘性的要求, 一直是从事巴布剂研究者和生产企业致力于解决的问题。但是, 膏体粘弹性的增加, 在一定程度上影响释药速率。本文对优选的基质配方用粘弹性和释放度进行评价。以吴茱萸所含吴茱萸次碱作为测定指标, 对两种不同骨架材料配方进行体外释放度的研究, 用以反应药物在经皮给药基质内的释药特性, 考察不同骨架材料配方、不同粘弹性对药物释放的影响, 为经皮给药系统骨架材料的选择和质量评价提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

药材(购自北京市北城药材批发站), 吴茱萸碱、次碱对照品(由中国药品生物制品检定所提供), 基质骨架材料(均为药用或食用规格), 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 透皮扩散试验仪 TK-12B 型(上海锴凯科技贸易有限公司), Z92-BD 多功能搅拌器(天津利华仪器厂)。

1.2 中药巴布剂制备及粘性比较

两种骨架材料: 1 号基质: 聚丙烯酸树脂与天然高分子物质配方。2 号基质: 聚丙烯酸树脂

与半合成高分子物质配方。制法：按巴布剂制备工艺的条件制备，精密称取处方量的中药复方提取物浸膏和处方量的聚丙烯酸树脂等巴布剂基质，以及一定比例的促渗剂，混合均匀，制备成膏体后均匀涂于衬布上，加盖防粘膜，即得巴布剂供试样品。黏着力（药典滚球法）：1号基质：25#球，2号基质：28#球，1号基质粘性小于2号基质^[2]。

1.3 吴茱萸碱、次碱体外分析方法的建立^[3]

1.3.1 储备液的配制 精密称取干燥器内恒重的吴茱萸碱、次碱对照品一定量，用聚乙二醇400:95%乙醇:蒸馏水=1:3:6介质溶解配制浓度为0.104mg/ml和0.459mg/ml的标准品溶液，并进一步稀释配制成一系列标准品溶液。

1.3.2 色谱条件 色谱柱：Kromasil C18柱（4.6mm×250mm, 5μm）、996二极管阵列检测器；流动相：乙腈：水：四氢呋喃：36%乙酸=51:48:1:0.1；流速：1ml/min；柱温25℃；检测波长：吴茱萸碱225nm，吴茱萸次碱341nm。

1.3.3 标准曲线的绘制 将各种浓度的系列标准液，分别进样1μl, 10μl, 50μl, 进行色谱分析，以样品浓度为横坐标，峰面积积分值为纵坐标，进行线性回归，并绘制标准曲线，结果如下：

组分	回归方程	相关系数	线性范围 (ug)
吴茱萸碱	$Y=10040808x+55627.037$	0.999988	0.00104~5.2
吴茱萸次碱	$Y=6454382x+11580.783$	0.999987	0.000459~22.95

1.3.4 精密度试验 用所配制的吴茱萸碱和次碱标准品溶液于一日内重复进样6次，每次进样10μl，记录峰面积，计算日内精密度。同一份溶液，在相同条件下联系3日进样，每日进样3次，每次10μl，记录峰面积，计算日间精密度。均用相对标准偏差RSD表示。吴茱萸碱的日内和日间RSD分别为1.31%和2.40%。吴茱萸次碱的日内和日间RSD分别为2.07%和2.82%。

1.3.5 稳定性试验 取标准品溶液2份，于3日内重复进样，每日进样2次，每次进样10μl，记录峰面积。吴茱萸碱和吴茱萸次碱3日内RSD分别为3.5%和4.59%。

1.3.6 重现性试验 取标准品溶液3份，每份进样4次，每次进样10μl，记录峰面积。吴茱萸碱和吴茱萸次碱的RSD分别为3.18%和2.10%。

1.3.7 回收率试验 配制低、中、高三种水平的标准品溶液，进样测量，每次进样10μl，比较实测浓度与标准浓度，计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱回收率分别为98%和100%。

1.3.8 样品测定：将不同时间点取的接收液过滤后精密量取200μl滤液进样，直接进样测量其中吴茱萸次碱含量；称取制成巴布剂贴片的中药复方浸膏适量，与适量硅藻土混匀后加入少量氨水，静置游离一夜，加入25ml氯仿，超声振荡30min，水浴加热回收氯仿至干，用甲醇溶解并定容至5ml，过滤后，精密量取5μl滤液进样测量吴茱萸次碱含量。

1.4 释放度测定：采用透皮吸收扩散装置，该装置为垂直式改良Franz扩散池，由上下两

只筒状玻璃管对合而成, 夹于玻璃间的贴片将其分为上下两室。上室为扩散室, 下室为接受室, 在接受液的右部连一取样管, 供进样、取样及排除气泡用。扩散池容积为 7ml, 有效扩散面积为 2.834cm^2 , 恒温水浴加热, 温度精密控制在 $37^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$ 。实验时, 接受室加满释放介质 (PEG₁₀₀₀: 95%EtOH: 蒸馏水=1: 3: 6), 将巴布剂贴片的背衬层朝向扩散室并固定在两室之间, 排除气泡。开动磁力搅拌器和恒温水浴, 磁搅拌转速设定为 350rpm, 在设定的时间点 1, 4, 8, 12, 24h 将接收室中的接受液全部取出, 同时补加同样体积的新鲜接收液。将接受液 2.2 项下方法进行含量测定, 计算累积透过量^[11]。

2 实验结果

由实验数据统计结果可得, 各贴片吴茱萸次碱体外释放量与时间的相关性极显著, 相关系数 $r > 0.99$, ($n=5$) t 检验结果 t_r 均大于 $t_{r(0.01, 3)} = 5.841$ 。并且释药随时间为一递增的过程, 释放过程曲线拟合符合 Higuchi 方程。其中 1 号基质 $Q-t^{1/2}$ 回归方程: $Q=0.042 t^{1/2}-0.015133$ 。平均释放速率: $0.042\text{mg} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{h})^{-1}$, 24h 平均累积释放率 53.65%; 2 号基质 $Q-t^{1/2}$ 回归方程为: $Q=0.038 t^{1/2}-0.008446$ 。平均释放速率: $0.038\text{mg} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{h})^{-1}$, 24h 平均累积释放率: 47.41%^[11]; 两者的体外释放规律一致, 其体外释放率 $Q-t$ 图见下图 1。由图 1 可见, 巴布剂两种骨架材料配方体外释放的累积释放量 Q 对时间作图是一条曲线。可见, 其体外释放并非零级过程。以累积释放量 Q 对 $t^{1/2}$ 作图, 得到图 2。从以上结果可以看出, 两种基质的体外释放机理是相似的, 都属于骨架控释系统, 其释药随时间是一个递增的过程; 两者的体外释药速度和程度 1 号基质比 2 号基质略高; 比较结果见下表 1: -

表 1 两种基质的释放度比较

基质	24h 累积释放百分率 (%)	释放速率 $\text{mg} \cdot (\text{cm}^2 \cdot \text{h})^{-1}$
1 号	53.37	0.042
2 号	47.41	0.038

图1 两种基质Q-t释放曲线图

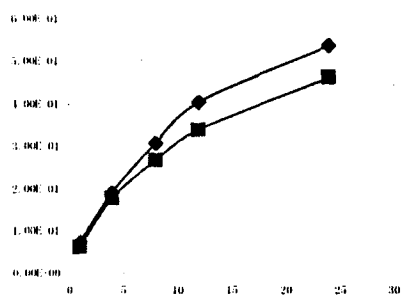
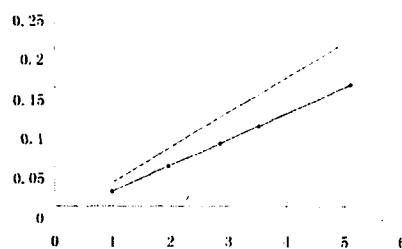


图2 两种基质Q-t^{1/2}图



3 讨论

3.1 经皮给药系统的体外释放度测定, 是外用贴膏基质释放性能的主要参数, 在 TTS 系统中、药物成分首先要从骨架材料中释放出来, 达到皮肤表面, 进而经皮渗透进入体内发挥作用。

因此,在中药复方经皮给药系统中,尽管成分复杂,药效的发挥是综合作用的结果。但与药效相关的有效成分的释放速率直接影响到药物的透皮吸收效果及药理作用。本文借鉴透皮吸收研究方法,选用 Franz 扩散池作为实验仪器,所不同的是将经皮渗透变成药物直接释放,掌握的条件,释放实验方法与透皮实验相当,这样,能更真实反映巴布剂中有效成分的溶出规律。实验证明该方法可行。

3.2 吴茱萸中有效成分是生物碱类,包括吴茱萸碱、次碱、去氢吴茱萸碱等,在测定过程中,次碱成分稳定,易于检出。并与药物具有相同或相似的药理作用,因此释放度的检出成分用吴茱萸次碱作为含量测定指标是合理的。同时,其累积释放百分率也为给药间隔时间设计提供依据。

3.3 本文对两种骨架材料的释放度进行比较。一方面探索吴茱萸次碱在两种骨架材料中的释放特性,同时考察不同粘度基质对药物释放的影响。结果表明:两种骨架材料具有相同的释放规律。整个释放过程符合骨架材料的 Higuchi 方程的扩散模式,只是释放速率略有差别,24 小时累积释放量和释放速率 1 号大于 2 号,分析其原因,可能与粘性有关,粘性大的基质与药物亲和力大,或形成复合物,药物借助范德华力或氢键与基质结合,使药物扩散系数降低,释放速率变慢。1 号基质较之 2 号基质粘性偏低,可能是其原因之一,这也证明了,粘性人对药物释放是有阻滞作用的。

参考文献:

- [1] 王春霞,刘玉玲.透皮给药新进展[J].药学报,2002,37(12):999-1002.
- [2] 刘淑芝,费虹,郭春燕等.均匀设计法优选中药巴布剂基质配方[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(3):9-11.
- [3] 甄攀,王治宝,白雪梅等.吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 HPLC 分析[J].中成药,2004,26(3):227-229.
- [4] 周莉玲,刘强,李锐.青藤碱贴片释放度测定研究[J].中成药,1999,21(6):279-281.
- [5] 张奇,邓英杰,刘令勉.中药透皮吸收制剂青龙贴剂的处方筛选及药物动力学[J].沈阳药科大学学报.1999,16(4):254-257.

正交设计研究穿心莲中内酯类成分提取工艺

张建军 (广东省中医研究所 广州 510095)

[摘要]: 目的 优选穿心莲最佳提取工艺。方法 用正交实验法, 以提取液中脱水穿心莲内酯含量为考察指标, 对影响内酯提取工艺的因素进行了研究。结果 实验设计三因素中乙醇浓度、收集滤液倍数、浸渍时间均有显著影响。结论 穿心莲最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2$, 即用 95% 的乙醇, 浸渍 24 小时, 收集 9 倍量的渗滤液。

[关键词]: 正交实验; 穿心莲; 提取工艺

Studies on process for extraction of *Andrographis paniculata* by
orthogonal experiments

Zhang Jian-jun

Abstract: Object To optimize the conditions for the extraction of *Andrographis paniculata*. Methods Conditions for the extraction were studied by the orthogonal experimental design as guided by the content of 14-deoxy-11-oxoandrographolide present in the extract. Results Significant effect was observed in 3 different experimental conditions. Conclusion The optimum conditions for the extraction of *Andrographis paniculata* is $A_1B_2C_2$, that is, soaking the drug in 95% alcohol for 24 hours and then collecting an amount percolating liquid corresponding to about 6 times of the quantity of *Andrographis paniculata*.

Key words ; orthogonal experiment ; *Andrographis paniculata*; extraction process

穿心莲是爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分, 具有清热解毒、消肿止痛的作用, 广泛用作抗菌药。内酯类成分为其主要活性成分, 主要包括穿心莲内酯(穿心莲乙素, andrographolide)、去氧穿心莲内酯(穿心莲甲素, deoxyandrographolide)、脱水穿心莲内酯(穿心莲丁素, 14-deoxy-11-oxoandrographolide)等^[1]。穿心莲内酯的提取工艺从有关文献报道可知主要有水提法、醇提法、碱水提取法等, 其中以醇提法收率最高^[2], 但有关醇提法优化工艺还未见报道, 本文以解热抗炎作用最强的脱水穿心莲内酯为指标对穿心莲内酯类成分的提取工艺进行了正交实验研究。

1 仪器与药品

CS-930 型双波长薄层扫描仪(日本岛津); 脱水穿心莲内酯对照品(中国药品生物制品检定所); 穿心莲(江西信丰制药厂提供, 由江西中医学院药用植物教研室鉴定符合药典标准);

作者简介: 张建军(1979—), 男, 江西兴国人, 研究方向为中药新制剂。

E-mail: tiening110@yahoo.com.cn Tel: (0791) 6829380

试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 脱水穿心莲内酯含量测定方法

2.1.1 标准曲线的绘制

精密称取(105℃干燥至恒重)脱水穿心莲内酯对照品适量,加甲醇制成每1ml含1mg的溶液,照薄层色谱法试验,分别吸取1、2、3、4、5 μl,点于同一以CMC-Na为黏合剂的硅胶GF254薄层板上,以氯仿-醋酸乙酯-甲醇(20:15:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254 nm)下观察。照薄层色谱法进行扫描,扫描波长 $\lambda_s=263$ nm, $\lambda_r=370$ nm,测定结果以最小二乘法作线性回归,得方程 $Y=-0.2536+7.3332 \times 10^{-5} X$, $r=0.9989$ 。表明脱水穿心莲内酯在1~5 μg范围内具有良好的线性关系。

2.1.2 脱水穿心莲内酯的含量测定

精密称取穿心莲粗粉100g共9份,按正交试验设计(见表2)进行实验,合并渗漉液,渗漉液浓缩至100ml。精密吸取1ml,水浴蒸干,用甲醇溶解并定容至10ml容量瓶中,按“2.1.1”中条件测定,并用外标两点法计算脱水穿心莲内酯含量。

2.1.3 回收率实验

精密吸取一定量的已知脱水穿心莲内酯含量的穿心莲提取液,分别加入一定量的脱水穿心莲内酯对照品溶液,按上述方法测定含量,回收率为96.4%~99.8% ($n=6$), RSD为1.26%。

2.2 提取方法与结果

2.2.1 提取方法

考虑到穿心莲内酯类易溶于乙醇中,参考文献中关于穿心莲内酯类成分的提取方法,考察了穿心莲的四种提取方法:

碱水提取法^[3]:取穿心莲粗粉适量,加水及碳酸钠适量,加水煎煮三次,合并煎液,滤过,滤液用盐酸调节至pH=6,浓缩至一定体积,即得。

渗漉法:取穿心莲粗粉适量,用85%的乙醇浸渍18小时,以每公斤每分钟3~5ml的速度渗漉,收集10倍量的渗漉液,浓缩至一定体积,即得。

回流提取法^[1]:取穿心莲粗粉适量,用85%乙醇热浸提取二次,第一次10倍量,第二次8倍量,每次两小时,合并滤液,浓缩至一定体积,即得。

超声提取法^[4]:取穿心莲粗粉适量,加85%的乙醇适量,浸泡30分钟,超声处理30分钟,滤过,残渣用适量85%乙醇洗涤3次,洗液并入滤液中,浓缩至一定体积,即得。

2.2.2 结果

用以上不同提取方法提取的穿心莲提取液,依法测定其中脱水穿心莲内酯含量,得出超声提取法提取的内酯含量最高,其次为渗漉法、回流提取法、碱水提取法(见表1)。因为超声

提取法不适合于工业化大生产,故选用渗漉法为穿心莲的提取方法,并通过下面正交实验选择最佳提取条件。

表 14 种提取方法以脱水穿心莲内酯为定量指标的结果表

方法	碱水提取法	渗漉法	回流提取法	超声提取法
含量 (mg/g)	1.89	5.17	4.22	5.86

2.3 正交实验方法

在选择了渗漉法作为提取方法基础上,选择了乙醇浓度、收集渗漉液倍数、浸渍时间作为考察因素,每个因素取 3 个水平,选用 (L₉3)⁴ 进行实验。因素水平表见表 2。以提取液中脱水穿心莲内酯的含量为考察指标,结果见表 3。每次实验用 100g 药材,通过对实验结果的统计学处理,得方差分析 (见表 4)。

表 2 因素水平表

	A 乙醇浓度 (%)	B 漉液倍数 (倍)	C 浸渍时间 (h)
1	95	6	12
2	85	9	24
3	75	12	48

表 3 正交实验安排及结果表

因素试验号	A	B	C	D	内酯含量 (mg/100g)
1	1	1	1	1	433
2	1	2	2	2	552
3	1	3	3	3	557
4	2	1	2	3	403
5	2	2	3	1	519
6	2	3	1	2	462
7	3	1	3	2	416
8	3	2	1	3	439
9	3	3	2	1	478
I	514	417	445	477	
II	461	503	478	477	
III	444	499	497	466	
R	70	86	52	11	

表 4 影响渗漉条件因素的方差分析表

来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	7916.23	2	3958.12	37.07	*
B	14084.23	2	7042.12	65.95	*
C	4249.56	2	2124.78	19.90	*
误差	213.56	2	106.78		

* $p < 0.05$ $F_{0.05}(2, 2): 19.00$

2.4 结果分析

从表中可见,各因素对含量均有显著的影响,其影响大小为 $B>A>C$,最佳条件为 $A_1B_2C_3$,根据生产实际情况设计为 $A_1B_2C_2$ 或 $A_1B_3C_2$ 较符合工业生产,并以此三组合方案作重复性试验 ($n=3$),结果见表5,可见三组合方案无显著性差异。

表5 不同组合方案所得脱水穿心莲内酯含量表

条件	脱水穿心莲内酯含量 (mg/100g)			
	1	2	3	$\bar{x}$
$A_1B_2C_3$	538	541	519	532
$A_1B_3C_2$	532	562	553	549
$A_1B_2C_2$	527	529	543	533

3 讨论

根据实验结果,从缩短生产周期,节省乙醇用量,降低成本角度,应以 $A_1B_2C_2$ 为较佳方案。确定最终提取工艺为,取穿心莲粗粉适量,加 95%的乙醇浸渍,浸渍时间为 24 小时、收集 9 倍量的渗漉液。

穿心莲内酯类成分难溶于水,易溶于乙醇。采用碱水提取法虽然能提高内酯类的溶解度,但它在碱性环境下易开环失活,而且内酯类成分对热亦不稳定,所以采用乙醇渗漉法是提取穿心莲内酯类成分较科学合理。

采用高浓度乙醇提取穿心莲内酯类成分,虽然提取率较高,但是药材中的叶绿素和树脂类物质亦被提出,使浸膏易吸潮发粘,增大服用量,给后续制剂成型工艺增加困难,可于渗漉液中加入一定量的水,使含醇量在 50%左右,可以出去叶绿素和树脂,而几乎对内酯类成分无影响。

参考文献

- [1]郑占虎,等. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社. 1998. 3491~3494
- [2]张艺,张希,等. 穿心莲提取工艺及含量测定研究进展[J]. 中成药, 1993, 15(6):6~7
- [3]中国药典[S]. 1990 年版. 一部:486
- [4]中国药典[S]. 2000 年版. 一部:221, 542

正交试验法优选双降合剂的提取工艺

戴珍福 顾 玲 (江苏泰兴市人民医院药学科, 江苏 泰兴)

[摘要]: 目的: 研究双降合剂中总黄酮和生物碱的提取工艺, 确立最佳的提取条件。方法: 采用正交试验法考察加水量、煎煮时间、pH 值和醇沉浓度对总黄酮和生物碱提取的影响。结果: 最佳提取工艺为采用 30 倍水在 pH2-3 的条件下煎煮 2 小时, 以 80%乙醇沉淀去渣。结论: 双降合剂最佳提取工艺的确立为制剂生产提供了科学依据。

[关键词]: 正交试验法 黄酮 荷叶 鬼针草 生物碱

双降合剂是本院自制制剂, 该合剂主要由荷叶、鬼针草两味中药组成, 具有降血脂, 调节血压之功效。文献报道, 在荷叶的众多化学成分中具有明显生物活性和生理功能的是黄酮和生物碱两大类物质^[1]。杜力军等^[2]研究表明, 荷叶水提物有明显的调脂作用, 其活性成分主要是荷叶黄酮, 其次是荷叶生物碱。许腊英^[3]研究认为荷叶提取物中的生物碱具有降脂作用。鬼针草的降压有效成分主要为黄酮类化合物^[4], 药理和临床报道其对原发性高血压有明显疗效, 对降低 β -脂蛋白、胆固醇、甘油三酯和改善血液流变学也有良好作用。本次实验以其两者的主要药理活性成分总黄酮和荷叶生物碱为指标, 采用正交试验法对提取工艺进行优选研究。

一、材料与试剂

芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所), 荷叶、鬼针草 (安徽省亳州市永刚饮片厂, 由本院药学科赵成林主任中药师鉴定), 亚硝酸钠 (上海科吕精细化学品公司, 分析纯), 硝酸铝 (上海振欣试剂厂, 分析纯), 氢氧化钠 (宜兴市第二化学仪器厂, 分析纯) 氯仿 (上海森晨化工实业有限公司, 分析纯), 无水乙醇 (上海试剂总厂, 分析纯), 盐酸 (上海东懿化学试剂厂, 分析纯)

751-GD 紫外可见分光光度计 (上海欣益仪器仪表有限公司), 分析天平 (上海分析仪器厂)

二、方法与结果

2.1 双降合剂提取工艺的优选

2.1.1 试验因素与水平

根据预试验结果, 选出 (A) 加水量, (B) 煎煮时间, (C) pH 值, (D) 醇沉浓度 4 个试验因素, 每个因素 3 个水平进行优选。试验因素与水平见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素			
	A/倍	B/h	C	D/%
1	25	1.5	2-3	60
2	30	2.0	3-4	70
3	35	2.5	4-5	80

2.1.2 $L_9(3^4)$ 正交试验^[5]

准确称取荷叶 50g、鬼针草 50g 份分别放入锅内，按 $L_9(3^4)$ 正交试验方案要求，进行煎煮、滤过、浓缩、加乙醇沉淀、回收乙醇后加蒸馏水至 500ml 即得。

2.2 双降合剂总黄酮成分的测定^[6]

2.2.1 标准液的制备

精密称取芦丁对照品 21.4mg，置 100ml 容量瓶中，加 80%乙醇 50ml 使之溶解，再加 50%乙醇至刻度摇匀。精密吸取 25ml 置 50ml 容量瓶中，加 50%乙醇至刻度，即得含无水芦丁 0.107mg/ml 标准品。

2.2.2 标准曲线的绘制

精密量取上述标准液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 分别置 10ml 容量瓶中，各加 50%乙醇至 5ml，精密加入 5%亚硝酸钠溶液 0.3ml，摇匀放置 6 分钟，再加 10%硝酸铝溶液 0.3ml，摇匀放置 6 分钟，加入 1mol/L 氢氧化钠 4ml，再加 50%乙醇至刻度，显色 30 分钟后以第一管为空白，在 500nm 处测定吸光度，以吸光度 A 为纵坐标，浓度 C 为横坐标绘制标准曲线，并以最小二乘法经线性回归，得回归方程： $A=10.473C-0.0088$ ($r=0.9990$)。

2.2.3 样品含量测定

取上述双降合剂浓缩液 5ml 至 100ml 容量瓶中，加 50%乙醇至刻度，摇匀，如发现沉淀，过滤，精密吸取续滤液 25ml 于 50ml 容量瓶中，加 50%乙醇至刻度。精密吸取二次滤液 1ml 于 10ml 容量瓶中，按 2.2.2 项操作，显色 30 分钟后，在 500nm 测定吸光度，依回归方程计算总黄酮含量，得总黄酮提取率（见表 2）。

2.3 双降合剂生物碱成分的测定^[7]

2.3.1 生物碱成分的分离

取双降合剂浓缩液 100ml，过滤，以 30ml 氯仿分两次萃取，除去脂质及树脂，水层加 0.5%氢氧化钠调 pH 值至 7 左右，过滤，除去鞣质，继续加 0.5%氢氧化钠调 pH 值至 9-11，用氯仿 100ml 分三次萃取，合并氯仿层，回收氯仿，浓缩物定容至 10ml。

2.3.2 吸光度测定

分别吸取不同条件下的上述提取液 4ml，于分液漏斗中，加入 1ml 溴甲酚绿，振摇，静置，分取氯仿层 4ml，加无水乙醇 1ml，在 418nm 处测定其吸光度^[8]，结果见表 2。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及测定结果

试验号	因 素				总黄酮提取率/%	荷叶生物碱吸光度
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	3.34	0.294
2	1	2	2	2	1.86	0.176
3	1	3	3	3	2.17	0.214
4	2	1	2	3	2.64	0.283
5	2	2	3	1	2.15	0.135
6	2	3	1	2	2.43	0.312
7	3	1	3	2	2.30	0.114
8	3	2	1	3	4.01	0.512
9	3	3	2	1	2.68	0.181
总黄酮 提取率	K_1	7.23	8.28	8.82	7.17	
	K_2	7.38	8.01	8.16	6.96	
	K_3	9.00	7.29	6.6	9.45	
	R	1.77	0.99	2.22	2.61	
荷叶生 物碱吸 光度	K_1	0.684	0.690	1.119	0.612	
	K_2	0.729	0.822	0.639	0.603	
	K_3	0.807	0.708	0.462	1.008	
	R	0.123	0.132	0.657	0.405	

表 3 方差分析表

项目	方差来源	自由度	离差平方和	均方	F 值	显著性
总黄 酮提 取率	A	2	0.6422	0.3211	3.678	>0.05
	B	2	0.1746	0.0873		
	C	2	0.8664	0.4332	4.96	>0.05
	D	2	1.2714	0.6338	7.26	>0.05
生物 碱吸 光度	A	2	0.0025	0.00125	1.36	
	B	2	0.0034	0.0017		>0.05
	C	2	0.0770	0.0385	30.80	<0.05
	D	2	0.0364	0.0182	14.56	>0.05

2.4 验证试验 按最佳提取工艺制备了 3 批样品进行验证, 总黄酮平均提取率为 3.98%, RSD 为 0.32%。荷叶生物碱平均吸光度为 0.519, RSD 为 0.51%。

三、讨论

从表 2、表 3 可以看出对总黄酮提取率的影响: 醇沉浓度>pH 值>加水量>煎煮时间, 搭配为 $A_3B_1C_1D_3$; 对生物碱吸光度的影响: pH 值>醇沉浓度>煎煮时间>加水量, 搭配为 $A_3B_2C_1D_3$; 因煎煮时间对总黄酮提取率影响最小, 且对生物碱提取影响大于黄酮类化合物, 综合考虑后, 优选出工艺 $A_3B_2C_1D_3$ 即以 30 倍的水在 pH 值 2-3 的条件下煎煮两小时, 以 80% 的乙醇沉淀去渣为双降合剂的最佳提取工艺。验证试验进一步证明该工艺稳定可行。

双降合剂总黄酮的测定采用与芦丁对照品制得的标准曲线对照的方法,可信度高,荷叶生物碱目前国内未有标准品,但仍可通过比较其吸光度来确定其较佳的提取条件。

在正交试验中,考察多个指标成分,出现结果不一致时,应综合考虑,优选出最佳因素。同时还应结合大生产实际,在经济、有效的前提下确定出最佳工艺。

参考文献

- [1] 范继善. 实用食品添加剂. 天津:天津科学技术出版社, 1993 (10): 322-333
- [2] 杜力军, 孙虹等. 荷叶大豆及其合剂调脂活性部位的研究. 中草药, 2000, 31 (7): 526-528
- [3] 许腊英. 荷叶降血脂的开发研究. 湖北中医杂志, 1996 (4): 42-43
- [4] 张孟庚. 治疗高血压良药—鬼针草, 中国医药报.
- [5] 韩可勤, 杨静化. 医药应用数理统计. 南京:中国药科大学, 121-124
- [6] 赵健, 王春根等. 江苏不同产地鬼针草类中药总黄酮含量的比较. 江苏中医, 1996, 17 (11): 34-35
- [7] 陈海光, 余以刚等. 荷叶功能成分的提取研究. 食品与机械, 2001 (5): 16-17