

正交试验优选断血流软胶囊提取工艺

陈华国^{a, b} 靳凤云^c 赵超^{a, b} 周欣^{a, b} 龚小见^{a, b}

^a(贵州师范大学天然药物质量控制研究中心 贵阳市宝山北路 116 号 550001)

^b(贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室 贵阳市 550001)

^c(贵阳中医学院 贵阳市 550002)

摘要 以醉鱼草皂苷 IVb 含量、断血流总皂苷含量和浸膏得率为考察指标, 采用正交试验设计优选断血流软胶囊的提取工艺。最佳提取工艺为药材粒度为中粉, 10 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1.0h, 优选得到的工艺稳定、合理、可行。

关键词 断血流软胶囊; 醉鱼草皂苷 IVb; 断血流总皂苷; 提取工艺

中图分类号: O 657. 7⁺ 2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2010)01-0135-05

1 前言

断血流软胶囊是由断血流药材 *Clinopodium polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan 或 *linopodium chinensis* (Benth.) O. Kuntze 经提取、醇沉、浓缩后得到的浸膏与适当的辅料制成的软胶囊制剂, 具有凉血止血之功效, 用于功能性子宫出血, 月经过多, 产后出血, 子宫肌瘤出血, 尿血, 便血, 吐血, 咯血, 鼻衄, 单纯性紫癜, 原发性血小板减少性紫癜等。药理活性研究和临床应用表明, 断血流药材发挥凉血止血功效的物质基础主要是水溶性成分^[1-4]; 断血流植物中主要含有挥发油、黄酮类、皂苷、甾醇和碱性成分等, 皂苷是其主要药用活性成分之一^[5]。根据药材主要成分的性质及该方面的临床应用, 初步确定对断血流药材进行水提取, 乙醇作为沉淀剂除杂, 回收乙醇并浓缩干燥后得到的浸膏与辅料混合后制成断血流软胶囊剂。本实验对断血流软胶囊的水提工艺进行了研究, 现报道如下。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

2.1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(四元泵, DAD 检测器, 自动进样器, 美国安捷伦公司); XP205 型十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司); DU-70 型可见紫外分光光度计(美国贝克曼公司); 10260D 型超声波清洗机(天津市东康科技有限公司)。

贵州省中小企业局平台建设项目黔中小发[2008]76 号; 贵州省发展与改革委员会黔科合带帽字[2008]5005 号

联系人, 手机: (0) 13984301492; E-mail: chenhuaguo1981@163.com

作者简介: 陈华国(1981—), 男, 贵州省遵义市人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为中药、民族药质量控制以及中药新药研发。

周欣(1962—), 女, 贵阳市人, 博士, 教授, 主要研究方向为中药、民族药质量控制、中药提纹图谱以及中药新药。

收稿日期: 2009-07-01; 接受日期: 2009-07-26

2.1.2 试剂

甲醇为色谱纯; 香草醛、冰醋酸、高氯酸、正丁醇等为分析纯; 醉鱼草皂苷 IVb 对照品(批号: 110839-200607), 购于中国药品生物制品检定所。

2.1.3 材料

断血流于 2007 年 6 月购于贵阳市药材公司, 经贵阳中医学院何顺志研究员鉴定为唇形科植物荫风轮 *Clinopodium polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan 或风轮菜 *Clinopodium chinensis* (Benth.) O. Kuntze 的干燥地上部分。

2.2 实验方法

2.2.1 醉鱼草皂苷 IVb 含量测定^[6]

2.2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (5 μ m, 250mm \times 4.6, 美国迪马公司); 流动相: 甲醇-水 (80:20); 流速: 1 mL \cdot min⁻¹; 温度: 35 $^{\circ}$ C; 检测波长为 250nm; 理论塔板数按醉鱼草皂苷 IVb 峰计不低于 2000。

2.2.1.2 对照品溶液的制备

准确称取经五氧化二磷干燥至恒重的醉鱼草皂苷 IVb 对照品 2.51mg, 用甲醇溶解并转移至 50mL 容量瓶中定容, 制成 0.05mg/mL 的醉鱼草皂苷 IVb 对照品溶液。

2.2.1.3 供试品溶液的制备

准确称取“干膏收率测定”项下干浸膏 0.5g, 加甲醇 30mL, 超声处理 15min, 过滤, 滤渣加甲醇 15mL, 超声 15min, 过滤, 合并滤液, 置于水浴上挥干。残渣加水 30mL 使溶解, 移入分液漏斗中, 加水饱和的正丁醇提取 4 次, 每次 20mL, 合并正丁醇液, 置于水浴上挥干, 残渣加甲醇溶解定容至 5mL, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 过滤, 得供试品溶液。

2.2.1.4 阴性溶液的制备

本品为单味药制剂, 因此采用试剂空白作为阴性对照。取供试品溶液、醉鱼草皂苷 IVb 对照品溶液、阴性对照溶液, 分别进样 20 μ L, 结果阴性对照溶液在醉鱼草皂苷 IVb 相应的保留时间出峰处无干扰。

2.2.1.5 校准曲线的绘制

准确称取经五氧化二磷干燥至恒重的醉鱼草皂苷 IVb 对照品 15.34mg 用甲醇溶解并转移至 50mL 容量瓶中定容, 摇匀, 制成每 1mL 含醉鱼草皂苷 IVb 0.3068mg 的对照品贮备液; 准确吸取该溶液 1、2、4、8、10mL, 置于 10mL 的容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1mL 含醉鱼草皂苷 IVb 30.68、61.36、122.72、245.44、306.80 μ g 的系列对照品溶液, 分别精密吸取上述系列对照品溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 并以对照品的进样浓度 x (μ g/mL) 为横坐标, 峰面积值 y 为纵坐标, 绘制校准曲线, 得回归方程: $y = 728983.26x + 1451.67$, $r^2 = 0.9999$, 结果表明, 醉鱼草皂苷 IVb 在 0.3068—3.0680 μ g/mL 范围内线性关系良好。

2.2.2 干膏收率测定

准确量取各正交试验浓缩定容后的药液 25mL, 分别置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 残渣于 105 $^{\circ}$ C 干燥 3h, 取出, 干燥器中放置 30min, 称重, 计算干膏收率。

2.2.3 断血流总皂苷含量测定^[7]

2.2.3.1 对照品溶液的制备

准确称取醉鱼草皂苷 IVb 对照品 10mg, 用甲醇溶解并转移至 50mL 容量瓶中定容, 摇匀, 备

用。

2.2.3.2 供试品溶液制备

准确称取“干膏收率测定”项下干浸膏 0.5g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加甲醇 60mL, 密塞, 超声 (功率 300W, 频率 20kHz) 提取 30min, 放至室温, 过滤, 将滤液用甲醇定容至 100mL 容量瓶中, 备用。

2.2.3.3 紫外吸收光谱

分别准确吸取供试品溶液 1.0mL 和对照品溶液 1.0mL, 按照校准曲线制备项下操作, 在 200—600 nm 波长范围内扫描, 结果供试品溶液和醉鱼草皂苷 IVb 对照品溶液都在 530nm 波长处存在吸收峰。

2.2.3.4 校准曲线的绘制

准确吸取对照品溶液 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mL 于 6 支具塞试管中, 挥去溶剂, 分别加入 1.0mL 5% 香兰素冰醋酸试液和 4.0mL 高氯酸, 密塞, 摇匀, 于 60℃ 水浴加热 15min, 取出后用冰水浴冷却, 于 530nm 处测定吸光度, 用未加对照品的溶液作空白对照, 以吸光度值 A 为纵坐标, 断血流皂苷浓度 C 为横坐标进行线性回归, 得方程: $A = 0.0258C + 0.0311$ ($r = 0.9994$), 说明吸光度与醉鱼草皂苷 IVb 在 0.04—4mg/mL 范围内有良好的线性关系。

2.2.4 正交试验优选水提工艺

2.2.4.1 正交试验设计

为了确定较佳的提取参数, 拟采用正交试验对提取工艺中所涉及的条件进行优选, 根据预试验的结果, 以药材粒度、提取次数、提取时间和加水量作为影响因素, 各选择 3 个水平, 以 $L_9(3^4)$ 表安排试验, 筛选较佳提取工艺条件。因素水平表见表 1。

表 1 煎煮正交试验因素水平表

水平	因素			
	提取次数(次)	提取时间(h)	药材粒度	溶剂用量(倍)
1	1	1	粗粉	10
2	2	1.5	中粉	12
3	3	2	细粉	14

2.2.4.2 评价指标的确定

提取工艺指标由醉鱼草皂苷 IVb 含量、断血流总皂苷含量及浸膏得率组成。权重系数: 浸膏得率/醉鱼草皂苷 IVb 含量/断血流总皂苷含量为 0.2/0.4/0.4。

3 结果与讨论

3.1 正交试验结果与分析

按处方比例称取断血流药材 200g, 按表 1 选择的因素和水平, 加水煎煮提取, 滤过, 滤液供测试醉鱼草皂苷 IVb 含量、断血流总皂苷含量和浸膏得率, 结果见表 2、表 3。

结果表明: 以醉鱼草皂苷 IVb 含量、断血流总皂苷含量及浸膏得率为指标作显著性检验, 影响因素从大到小依次为 $A > C > B > D$, 因素 A 具有显著性影响, 其余各因素不具备显著性影响。各因素的各个水平间对提取效果影响大小依次为: $A_2 > A_3 > A_1$; $B_2 > B_3 > B_1$; $C_3 > C_1 > C_2$; $D_2 > D_3 > D_1$, 结合生产实际, 从降低能耗, 节约成本方面考虑, 拟定选择最佳煎煮工艺应为 $A_2B_1C_2D_1$, 即药材粒度为中粉, 10 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1.0h。

表 2 正交试验及结果表

试验号	列号				评价指标			综合评分
	A	B	C	D	醉鱼草皂苷 IVb 含量(mg)	断血流总皂苷 (mg)	浸膏得率 (%)	
1	1	1	1	1	8.06	709	6.81	0.50
2	1	2	2	2	9.32	838	7.16	0.57
3	1	3	3	3	10.85	987	8.99	0.68
4	2	1	2	3	12.88	1186	8.01	0.76
5	2	2	3	1	17.44	1641	9.11	0.99
6	2	3	1	2	14.90	1592	7.11	0.88
7	3	1	3	2	13.87	1285	9.33	0.84
8	3	2	1	3	14.76	1373	7.20	0.83
9	3	3	2	1	10.14	917	7.43	0.62
I	1.76	2.09	2.21	2.11				
II	2.63	2.39	1.94	2.28				
III	2.27	2.18	2.51	2.26				
SS	0.13	0.016	0.053	0.0058				

注: 综合评分= 浸膏得率评分+ 醉鱼草皂苷 IVb 含量评分+ 断血流总皂苷含量评分; 浸膏得率评分=(浸膏得率/最大浸膏得率) × 0.2; 醉鱼草皂苷 IVb 含量评分= (醉鱼草皂苷 IVb 含量/最大醉鱼草皂苷 IVb 含量) × 0.4; 断血流总皂苷含量评分= (断血流总皂苷含量/最大断血流总皂苷含量) × 0.4。

表 3 方差分析表

差异来源	SS	自由度	变异均方	统计量 F	显著性
A	0.13	2	0.065	22.13	$F_{0.05}(3, 2) = 19.00$
B	0.016	2	0.0080	2.74	$F_{0.01}(3, 2) = 99.00$
C	0.053	2	0.027	9.14	
D	0.0058	2	0.0029	1	
总计	0.20	8			

3.2 验证试验

按处方比例称取断血流药材 200g, 共 3 份, 按所选条件安排试验, 依拟定的方法测定各项指标, 结果见表 4。验证试验结果表明, 检测指标高于或接近于正交表中最优值, 说明优选的提取条件稳定、可行。

表 4 验证试验结果表

编号	投药量	醉鱼草皂苷 IVb 含量(mg)	断血流总皂苷(mg)	浸膏得率(%)
1	200g	19.61	1899	8.33
2	200g	19.22	1818	8.47
3	200g	19.36	1862	8.41

3.3 提取溶剂的优选

断血流植物中主要含有挥发油、黄酮类、皂苷、甾醇和碱性成分等, 皂苷是其主要药用活性成分之一, 药理活性研究和临床应用表明, 断血流药材发挥凉血止血功效的物质基础主要是水溶性成分, 故以水作为提取溶剂。

3.4 正交试验因素水平的选择

影响煎煮的主要因素有: 药材粉碎粒度, 浸泡时间, 煎煮次数, 加水量及煎煮时间等, 我们对浸

泡时间采用单因素试验进行过考察, 发现对提取效果没有显著性影响; 故本试验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表对其余因素进行考察。

3.5 评价指标的选择

在评价指标的确定方面, 本试验采用多指标综合评分法。多指标综合评价是将提取过程多个侧面的变化予以综合考虑, 并采用适当的数学处理使各变化结果具有加和性, 从而可全面监测提取过程。相对单指标而言多指标综合评价可使优化工艺的代表性更强, 能更全面地反映提取结果。

4 结论

断血流软胶囊的最佳提取工艺为药材粒度为中粉, 10 倍量的水, 煎煮 2 次, 每次 1.0h, 优选得到的工艺稳定、合理、可行。

参考文献

- [1] 竺丽霞, 孙文基. 断血流的化学成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 126—128
- [2] 李国贤. 断血流急性及亚急性毒性的研究[J]. 安徽大学学报(自然科学版), 1991, 15(4): 95—98
- [3] 张建成, 张伟军. 断血流合补肾调经方治疗功能性子宫出血 20 例的疗效观察[J]. 医学创新研究, 2007, 4(18): 126
- [4] 雷小莉, 罗艳. 断血流治疗口腔出血性疾病的临床观察[J]. 现代口腔医学杂志, 2007, 21(6): 587.
- [5] 戴敏, 刘青云, 瞿晓梅等. 断血流总苷对药物流产模型大鼠子宫出血量的影[J]. 中药材, 2002, 25(5): 342—344
- [6] 陈华国, 陈庆, 靳凤云. HPLC 法测定断血流中断血流皂苷的含量[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(3): 62—63
- [7] 竺丽霞. 超声提取-分光光度法测定断血流总皂苷含量[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2007, 37(6): 1016—1018

Optimization of the Extraction Process for DuanXueLiu Soft Capsule by Orthogonal Experiment

CHEN Hua-Guo^{a,b} JIN Feng-Yun^c ZHAO Chao^{a,b} ZHOU Xin^{a,b} GONG Xiao-Jian^{a,b}

a(The Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, P. R. China)

b(Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guiyang 550001, P. R. China)

c(Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, P. R. China)

Abstract The extraction process in duanxueliu soft capsule was optimized by taking the contents of buddlejasaponin IVb, total saponins and the yield of extracts as assessment index. The optimal extraction conditions were extracting twice, every time lasted 1.0h, every time added 10 times water and the comminution granularity was middle powder. The optimized extraction process is stable and reasonable.

Key words DuanXueLiu Soft Capsule; Buddlejasaponin IVb; Total Saponins; Extraction Technology

中国期刊数据库驰名网址

1. 《中国数字期刊群 CHINAINFO (万方数据 WANFANGDATA)》
<http://www.periodicals.net.cn> <http://www.wanfangdata.com.cn>
2. 《中国期刊网(中国知网 CNKI)》<http://www.cnki.net.cn> <http://www.chinajournal.net.cn>
3. 《中国科学引文数据库 CSCD》<http://www.sciencechina.ac.cn>