

复方芪麻胶囊的提取工艺研究

王洛临^{1*}, 吴小斌², 周蓉³, 张建军¹, 袁柳萍²(1.广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室, 广州 510095; 2.广州中医药大学附属广东省第二中医院, 广州 510405; 3.丽珠集团利民制药厂, 广东韶关 512000)

中图分类号 R284.2; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3128-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.31

摘要 目的:优化复方芪麻胶囊的提取工艺。方法:采用药效实验法,以大鼠血压降低值为指标,筛选样品制备工艺(A工艺为药材全煎;B工艺为天麻细粉与其余煎煮后药材混合);采用单因素和正交试验法,以黄芪甲苷含量、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量和固形物质量为指标,以加水倍数、煎煮时间、煎煮次数为因素优化提取工艺并进行验证试验。结果:药效实验表明B工艺样品降压作用更优;该工艺中其余药材的最优提取工艺为药材每次加12倍量水煎煮1.5 h,共煎煮3次;验证试验显示黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均提取率分别为64.02%、51.97%,平均固形物质量为5.69 g(RSD≤1.92%, n=3)。结论:优化的提取工艺稳定、可行。

关键词 复方芪麻胶囊; 降压作用; 提取工艺; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 正交试验

Study on the Extraction Technology of Compound Qima Capsules

WANG Luolin¹, WU Xiaobin², ZHOU Rong³, ZHANG Jianjun¹, YUAN Liuping²(1. Guangdong Province Engineering and Technology Research Institute of Chinese Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Guangzhou 510095, China; 2. Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Livzon Group Limin Pharmaceutical Factory, Guangdong Shaoguan 512000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound qima capsules. METHODS: With the blood pressure lowering of rats as index, pharmacological efficacy test was used to screen the preparation technology (A was whole herb decoction; B was *Gastrodia elata* fine powder mixed with other decocted medical materials). The extraction technology was optimized by single factor and orthogonal test using the contents of astragaloside and isoflavone grape glycosides and the quality of solid as indexes, with added water, decoction time, decoction times as factors; and the verification test was carried out. RESULTS: Pharmacological efficacy test showed that antihypertensive effect of sample by technology B was superior. The optimal extraction condition of other medical materials of technology B was as follows as 12-fold water per time, decocting for 1.5 h, for 3 times. In verification test, average extraction rates of astragaloside and isoflavone grape glycosides were 64.02% and 51.97%, and average value of the quality of solid was 5.69 g (RSD≤1.92%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable and feasible.

KEYWORDS Compound qima capsules; Antihypertensive effect; Extraction technology; Astragaloside; Isoflavone grape glycosides; Orthogonal test

高血压是最常见的慢性病,也是心脑血管病最主要的危险因素,其脑卒中、心力衰竭及慢性肾脏病等主要并发症不仅致残、致死率高,而且严重消耗医疗和社会资源。中医将高血压病归结为“脉胀”“眩晕”“肝风”“风眩”等病症,以气虚痰浊型为主。复方芪麻胶囊由黄芪、天麻、橘红等药材组成,具有健脾益气、化痰通络、理气散结的功效,临床上用于治疗气虚痰浊型高血压所致的眩晕、头痛、苔白腻、脉滑等症^[1-3]。为保证制成制剂后的临床疗效,笔者先对制剂工艺路线进行优选,再对优选出的提取工艺的条件进行优化。

1 材料

1.1 仪器

1200 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agilent 公司); Alltech 3300 蒸发光散射检测器(德国 Sincere 公司); JJ3000 动物电子秤(美国 G&G 公司); BS224S 电子天平(德国 Sartorius 公司, 万分之一); BP-100A 全自动大鼠无创血压测量系统(成都泰盟软

件有限公司); PowerLab 8/30 多导生理记录仪(澳大利亚 AD Instrument 公司)。

1.2 药材、药品与试剂

黄芪(批号:140101)、天麻(批号:140901)、法半夏(批号:141201)、泽泻(批号:141101)均购自广州集和药品有限公司,经广东省第二中医院刘法锦研究员鉴定,均符合现行药典各药材项下的规定,其中黄芪中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量分别为0.045% (g/g)和0.022% (g/g); 黄芪甲苷对照品(批号:110781-200613,纯度:95.8%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:11920-201203,纯度:97.3%)均来源于中国食品药品检定研究院;水合氯醛溶液(成都市科龙化学试剂厂,批号:20120611,规格:500 ml/瓶);依托咪酯(瑞士 Adamasbeta 公司,批号:P00459,纯度:98.2%);厄贝沙坦片(杭州赛诺菲民生制药有限公司,批号:0901174,规格:0.15 g/片);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠70只,♀♂各半,体质量约300 g,鼠龄3个月,购自广东省医学实验动物中心提供,实验动物合格证号:

* 主任中药师,硕士生导师。研究方向:中药制剂。电话:020-83501292。E-mail:luolin_w@163.com

2 方法与结果

2.1 制备工艺的确定

本处方中黄芪和天麻均为君药,根据处方中药味所含已知成分及相关药理作用,以及天麻的习惯用法,采用降压药效模型进行制备工艺的筛选。

2.1.1 样品的制备 (1)样品A的制备(工艺A):全方药材煎煮2次,每次加10倍水,煎煮1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩成稠膏,真空干燥,制成1 g干浸膏,相当于2.775 g生药。(2)样品B的制备(工艺B):方中天麻粉碎成细粉;黄芪等其余药材煎煮2次,每次加10倍水,煎煮1.5 h,滤过,合并滤液,减压浓缩成稠膏,真空干燥;加入天麻细粉,混匀,制成1 g混合物,相当于6.989 g生药。

2.1.2 药效对比实验 取大鼠70只,♀♂各半,随机留取10只大鼠作为正常对照组,其余60只大鼠作为模型组。用10%水合氯醛(0.4 ml/100 g)腹腔注射麻醉模型组大鼠后,将大鼠仰卧固定于手术台上,剪去其腹部体毛,用5%碘伏消毒、75%乙醇脱碘,盖上孔巾。沿腹正中线作手术切口打开腹腔,按无菌操作,小心钝性分离出左肾动脉后,穿入无菌丝线,将直径为0.25 mm的针灸针与肾动脉血管长轴紧贴、平行放置,用无菌丝线扎紧肾动脉和针灸针后抽出针灸针,造成大鼠单侧肾动脉狭窄,而且不触及侧肾脏和动脉^[4]。正常对照组大鼠除不结扎肾动脉外,其余手术操作均同上。术后3 d内腹腔注射青霉素 3×10^4 u/d预防感染。造模4周后模型组大鼠再均分为6组,分别为厄贝沙坦组(阳性对照,0.027 g/kg,经人用临床剂量换算的等效剂量),模型对照组,样品A高、低剂量组[7.432、1.858 g(生药)/kg,分别相当于成人日服生药80、20 g,其中低剂量组与临床用药剂量相近],样品B高、低剂量组[7.432、1.858 g(生药)/kg],每组10只,♀♂各半。正常对照组大鼠给予等体积生理盐水。给药方法:生理盐水溶解药物,每天1次,连续灌服给药8周。测定方法:第8周末,各组大鼠末次给药后1 h,以100 mg/kg依托咪酯水溶液腹腔注射麻醉后,分离右颈总动脉,插入注有125 u/ml肝素钠溶液的聚乙烯导管中,通过压力换能器连接多导生理记录仪及生理信号处理系统,测量大鼠收缩压、舒张压。计量资料以均数±标准差表示;多组间均数的比较采用单因素方差分析,组间均数两两比较;方差齐时采用SNK法,方差不齐时采用Dunnett's T3法。统计检验由SPSS 2.0软件完成。大鼠血压测定结果见表1。

表1 各组大鼠血压测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Blood pressure of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	收缩压,mmHg	舒张压,mmHg
正常对照组		104.03±6.58	74.58±4.24
模型对照组		175.03±8.99*	113.38±12.77*
厄贝沙坦组	0.027	128.64±14.58*	76.82±8.86*
样品A高剂量组	7.432	138.94±10.65*	85.91±313.69*
样品A低剂量组	1.858	154.80±6.54*	103.88±12.04
样品B高剂量组	7.432	140.28±19.57*	82.99±9.69*
样品B低剂量组	1.858	154.41±12.41*	92.88±13.31*

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型对照组比较,* $P<0.01$

Note: vs. normal control group,* $P<0.01$; vs. model control group,

* $P<0.01$

由表1可见,与正常对照组比较,模型对照组大鼠收缩压和舒张压显著升高($P<0.01$);与模型对照组比较,各药物组收缩压降低($P<0.01$);从降低舒张压的效果来看,样品B优于样品A,故确定本品的制备工艺路线为工艺B,即方中除天麻粉

碎入药外,其余药材以煎煮后提取物入药。

2.2 考察指标的测定

2.2.1 固形物质量的测定 精密取煎煮后浓缩液50 ml,置于99℃水浴锅上蒸干,在105℃下干燥至恒质量,按照2015年版《中国药典》干燥失重法^[5]测定,计算固形物质量。

2.2.2 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量测定 采用HPLC法测定。

(1)色谱条件。黄芪甲苷:色谱柱为Thermo ODS Hyper-sil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-水(32:68),流速为1.0 ml/min;蒸发光散射检测器检测;柱温为25℃;漂移管温度为45℃;氮气流速为1.5 L/min;进样量为20 μl。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷:色谱柱为XBridge™ C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min A为20%~40%,20~30 min A为40%);流速为1.0 ml/min;二极管阵列检测器,检测波长为260 nm;柱温为25℃;进样量为10 μl。

(2)溶液的制备。对照品溶液的制备:取对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成每1 ml含0.420 0 mg黄芪甲苷的溶液和每1 ml含0.251 8 mg毛蕊异黄酮葡萄糖苷的溶液,即得。

供试品溶液的制备:精密量取煎煮后浓缩液25 ml,照2015年版《中国药典》(一部)黄芪项下^[6],从“用水饱和的正丁醇振摇提取4次”内容起依法操作,制成黄芪甲苷供试品溶液。另精密量取浓缩液1 ml,置于蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至5 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成毛蕊异黄酮葡萄糖苷供试品溶液。

阴性对照溶液的制备:按处方比例称取除黄芪以外的药材112 g,煎煮2次,每次加10倍量水,煎煮1.5 h,滤过,浓缩至约250 ml,按上述供试品溶液的制备方法分别制备黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的阴性对照溶液。

(3)专属性试验。分别吸取2种对照品溶液、2种供试品溶液、2种阴性对照溶液进样测定。试验结果表明,阴性对照溶液在毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷相应位置无色谱峰出现,毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷主峰与邻峰分离度均大于1.5。色谱图见图1、图2。

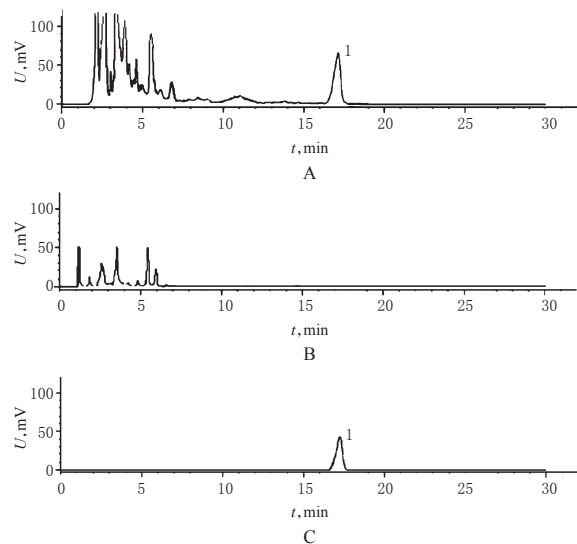


图1 黄芪甲苷的高效液相色谱图

A.供试品溶液;B.阴性对照溶液;C.对照品溶液;1.黄芪甲苷

Fig 1 HPLC chromatograms of astragaloside

A. test sample; B. negative control; C. substance control; 1. stragaloside

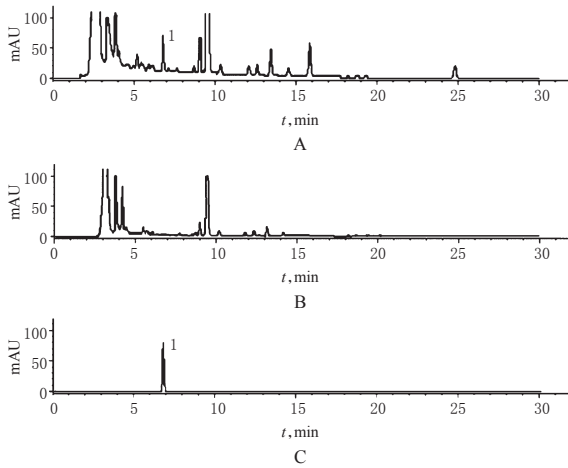


图2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷的高效液相色谱图

A.供试品溶液;B.阴性对照溶液;C.对照品溶液;1.毛蕊异黄酮葡萄糖苷
Fig 2 HPLC chromatogram of isoflavone grape glycosides
 A. test sample; B. negative control; C. substance control; 1. isoflavone grape glycosides

(4)标准曲线的建立。按规定方法操作,得黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的线性回归方程分别为 $\ln y = 1.487 \ln x + 4.5014$ 、 $y = 3318.33x + 31.36$ (r 均为0.9996,其中 y 为峰面积、 x 为质量浓度),二者检测质量浓度线性范围分别为0.8400~8.400、0.7554~2.014 mg/ml。

(5)灵敏度、精密度、稳定性和准确度试验。按相关方法进行试验,结果灵敏度试验中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷定量限分别为0.5841、0.6753 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;精密度试验中二者峰面积的RSD分别为0.61%、0.85% ($n=3$);稳定性试验中二者含量的RSD分别为0.84%、0.91% ($n=3, 12\text{ h}$ 内);重复性试验中二者含量的RSD分别为0.99%、1.37% ($n=3$);准确度试验中二者加样回收率平均值分别为99.74%、98.56% (RSD分别为1.79%、1.85%, $n=3$)。

2.3 水煎煮提取工艺的单因素试验

以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为评价指标,考察不同浸泡时间、加水倍数、煎煮时间以及煎煮次数对2个指标的影响。

2.3.1 浸泡时间 按照处方比例称取药材5份,每份152 g,分别浸泡不同时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h),然后加10倍量水,煎煮2次,每次提取1.5 h。

2.3.2 煎煮时间 按照处方比例称取药材5份,每份152 g,加10倍量水,煎煮2次,煎煮提取不同时间(0.5、1、1.5、2、2.5 h)。

2.3.3 加水倍数 按照处方比例称取药材5份,每份152 g,分别加入不同倍量(6、8、10、12、14倍)的水,煎煮2次,每次1.5 h。

2.3.4 提取次数 按照处方比例称取药材4份,每份152 g,分别加入10倍量水,分别煎煮1、2、3、4次,每次1.5 h。

分别将上述各条件下的提取液过滤,浓缩定容至250 ml,分别测定黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,结果见表2。

由二者含量结果可见,浸泡时间对各指标成分无明显影响,故药材提取前无需浸泡;确定正交试验水平范围为煎煮时间1.5~2.5 h、加水倍数8~12倍、煎煮次数1~3次。

2.4 水煎煮提取工艺的正交试验

根据单因素考察结果确定的水平范围,以黄芪甲苷含量

表2 单因素试验考察结果
Tab 2 Results of single factor test

因素	指标		
	黄芪甲苷含量, $\mu\text{g}/\text{g}$	毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量, $\mu\text{g}/\text{g}$	
浸泡时间, h	0.5	321.54	95.42
	1	323.74	96.37
	1.5	322.91	95.46
	2	321.76	96.74
	2.5	320.45	95.14
煎煮时间, h	0.5	321.54	96.42
	1	322.74	96.24
	1.5	321.91	95.24
	2	321.26	96.74
	2.5	320.45	97.14
加水倍数	6	264.54	82.42
	8	295.74	91.24
	10	321.91	95.24
	12	320.76	96.74
	14	319.45	95.14
煎煮次数	1	281.54	85.42
	2	302.74	95.24
	3	303.91	95.24
	4	302.76	94.74

(X_1)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量(X_2)和固形物质量(X_3)为评价指标,并分别赋予权重系数为0.3、0.3、0.4,计算综合评分值 $[Y, Y_i = (X_{1i}/X_{1\max} \times 0.3 + X_{2i}/X_{2\max} \times 0.3 + X_{3i}/X_{3\max} \times 0.4) \times 100]$;以加水倍数、煎煮时间和煎煮次数为考察因素。按照处方比例称取药材9份,每份152 g,按正交试验安排进行提取,滤过,浓缩并定容至250 ml,依法测定。因素与水平见表3、正交试验结果见表4、方差分析结果见表5。

表3 因素与水平

Tab 3 Levels and factors

水平	因素		
	A(加水倍数)	B(煎煮时间), h	C(煎煮次数)
1	8	1.5	1
2	10	2	2
3	12	2.5	3

表4 正交试验结果

Tab 4 Results of orthogonal test

序号	A	B	C	D(空白)	$X_1, \mu\text{g}/\text{g}$	$X_2, \mu\text{g}/\text{g}$	X_3, g	Y
1	1	1	1	1	231.86	91.55	3.71	71.28
2	1	2	2	2	295.74	100.70	4.19	82.94
3	1	3	3	3	285.87	107.21	4.84	88.27
4	2	1	2	3	322.61	97.90	4.85	89.32
5	2	2	3	1	295.71	114.556	5.76	97.50
6	2	3	1	2	271.18	102.543	4.21	81.30
7	3	1	3	2	283.01	112.381	5.67	95.13
8	3	2	1	3	253.36	107.668	4.77	84.91
9	3	3	2	1	304.06	105.66	5.69	95.44
K_1	242.49	255.73	237.48	264.21				
K_2	268.12	265.35	267.70	259.36				
K_3	275.47	265.01	280.90	262.50				
R	32.98	9.62	43.42	4.85				

结果表明,各因素影响大小为 $C > A > B$,并且C、A因素对试验结果有显著性影响($P < 0.05$)。最终确定最优工艺条件为 $A_3B_3C_3$,即药材每次加12倍量水煎煮3次,每次1.5 h。

2.5 验证试验

表5 方差分析结果

Tab 5 Analysis results of variance

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	199.77	2	99.89	49.51	<0.05
B	19.87	2	9.93	4.92	>0.10
C	330.27	2	165.13	81.84	<0.05
D(误差)	4.04	2	2.02		

注： $F_{0.1}(2,2)=9.00$, $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note： $F_{0.1}(2,2)=9.00$, $F_{0.05}(2,2)=19.00$

按照处方比例称取药材3份,每份152g,根据优化的提取工艺条件进行3次平行试验,计算黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的提取率[(提取液体积×提取液中有效成分含量)/(处方中黄芪药材质量×黄芪药材中有效成分含量)×100%],结果见表6。

表6 验证试验结果

Tab 6 Results of verification test

试验号	$X_1, \mu\text{g/g}$	X_1 提取率,%	$X_2, \mu\text{g/g}$	X_2 提取率,%	X_3, g	Y
1	292.27	64.95	114.32	51.97	5.65	96.35
2	290.21	64.49	114.38	51.99	5.71	96.62
3	281.77	62.62	114.28	51.95	5.69	95.66
平均值	288.09	64.02	114.33	51.97	5.69	96.54
RSD,%		1.92		0.38	0.57	

表6结果表明,黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均提取率分别为64.02%、51.97%,固形物平均值为5.69g,其平均综合评分值为96.54,与正交试验最大值97.50接近,提示优化的工艺稳定、可行。

3 讨论

黄芪为方中君药之一,所含黄芪甲苷具有扩张血管、降低血压、保护血脑屏障等作用^[6-7],毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有舒张血管、保护局部缺血器官、减轻血管紧张素引起的内皮细胞损伤等作用^[8]。试验结果表明,在最优提取工艺条件下,黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的平均提取率均较高,提示该工艺条件稳定、可行,为本制剂的下一步研究奠定了良好的基础。

天麻为方中君药之一,所含化学成分有天麻素、天麻苷

元、倍半萜类等。文献报道天麻药材有明显的镇静、降压、降低血管阻力等作用^[9-10],但是其作用物质基础尚不清楚。经初步药效学研究证实,就降压作用而言,天麻粉碎入药优于与其他药材共煎入药,但这是否与天麻药材中降压成分的脂溶性或热不稳定性有关,还有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] 黄琳,王清海,丁大珍,等.复方芪麻胶囊对高血压病早期肾损害的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):192.
- [2] 袁利梅,刘磊,朱培罡,等.益气化浊法治疗气虚痰浊型单纯收缩期高血压临床研究[J].河南中医,2012,32(11):1459.
- [3] 黄琳,王清海,李典鸿,等.复方芪麻胶囊对高血压患者动态血压的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(5):57.
- [4] 杨蕾,李红宇,宓德卿,等.天钩方治疗肾性高血压大鼠的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(8):1858.
- [5] 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,2015:302、附录VIB.
- [6] 邱勇波,刘锦,武飞.黄芪化学成分及药理作用研究进展[J].中国疗养医学,2011,20(5):435.
- [7] 梁丽娟,谢俊大,赵奎君.黄芪中化学成分的比较研究进展[J].中国药房,2009,20(36):2877.
- [8] 李晶晶,崔国祯,王亮,等.毛蕊异黄酮对H9c2细胞缺氧损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2014,30(5):32.
- [9] 陈维红,罗栋.天麻素、天麻多糖药理作用研究进展[J].中国药物评价,2013,30(3):132.
- [10] 杨超,吕紫媛,伍瑞云.天麻的化学成分与药理机制研究进展[J].中国现代医生,2012,50(17):27.

(收稿日期:2015-11-03 修回日期:2016-03-02)

(编辑:刘萍)

国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽赴法国、俄罗斯参加中法、中俄人文交流机制活动

本刊讯 2016年6月29日—7月6日,国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽赴法国、俄罗斯分别出席中法高级别人文交流机制第三次会议和中俄人文合作委员会第十七次会议卫生领域等相关系列活动。

7月1日,中国国家卫生和计划生育委员会与法国社会事务与卫生部共同举办中法健康老龄化研讨会。开幕式由国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽和法国社会事务与卫生部副部长凡岗主持。本次研讨会就健康老龄化政策、老年照护等议题开展交流,分享经验,商讨下一步合作。访法期间,国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽与法国社会事务与卫生部副部长贝诺瓦·瓦雷签署了《中华人民共和国国家卫生和计

划生育委员会与法兰西共和国社会事务与卫生部卫生应急合作执行计划(2016—2020)》。中国疾病预防控制中心与法国国家公共卫生所签署了《合作谅解备忘录》。

访俄期间,在中俄人文合作委员会框架下,中俄人文合作委员会卫生合作分委会第十七次会议于7月3日在莫斯科举行。分委会中方主席国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽与俄方主席、俄联邦卫生部第一副部长卡格拉曼扬共同主持会议。双方就传染病联防联控、灾害医学领域合作、中俄医科大学联盟建设、传统医学领域合作、医药卫生产品监管和医疗机构间合作等议题展开讨论并达成共识。