

病毒消提取条件优选及其颗粒剂的制备*

袁珂 封银曼 杨传英 屈志莲¹ 郭莹¹ (郑州 450003 河南中医学院,¹ 本院中药系毕业实习生)

摘要 目的: 研究病毒消颗粒的提取条件及制备。方法: 采用正交设计法优选最佳提取条件。以醇提和水提的主要有效成分为考察指标, 选择提取时间、提取次数和溶剂用量 3 个因素, 每个因素取 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验。结果: 醇提取的最佳提取条件为 $A_3B_3C_2$, 即用 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 3h; 水提取的最佳提取条件为 $A_3B_3C_2$, 即用 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 3h。结论: 该工艺简单、可行, 收率高。

关键词 病毒消颗粒; 正交试验法

The choice of extracting conditions of Bingduxiao and preparation of granules

Yuan Ke (Yuan K), Feng Yinman (Feng YM), Yang Chuangying (Yang CY) et al, (Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the extracting conditions and preparation process of Bingduxiao granules. **METHOD:** An orthogonal test method was used to choose the best extracting condition. We choose the three factors, three levels of each factor to do the experiment according to the $L_9(3^4)$ orthogonal test. **RESULTS:** The best extracting condition of alcohol extracting is $A_3B_3C_2$, i.e. circling extracting twice by using ten times of EtOH (95%), 3h once; The best extracting condition of water extracting is $A_3B_3C_2$, i.e. extracting three times by using eight times of water, 3h once. **CONCLUSION:** The preparation process is simple, feasible, and yield is high.

KEY WORDS Bingduxiao Granules; Method of orthogonal test

病毒消颗粒由虎杖、枳实、苦参、金银花、女贞子、甘草等 9 味中药组成, 具有清热解毒、理气活血、滋养肝肾等功能, 对病毒性肝炎具有较好的疗效。为确定该制剂的工艺条件, 根据处方中各味药中主要有效成分的性质, 以其中的主要有效成分辛弗林和甘草酸的含量为考察指标, 采用正交设计法研究了病毒消颗粒的提取工艺^[1], 确定了最佳提取条件。

1 仪器、样品和试剂

CS-9301 双波长薄层扫描仪(日本岛津), 三用紫外分析仪(江苏省江阴市申港电光仪器厂), 点样定量毛细管(USA), 真空薄膜浓缩器(自装), 超级恒温水浴锅(上海实验仪器厂); 循环水式多用真空泵(郑州市巩县英峪予华仪器厂); 分样筛(12 目、120 目、160 目); 硅胶 G 及硅胶 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂), 其它试剂均为分析纯。

辛弗林及甘草酸对照品由中国药品生物制品检定所提供。

方中各味药材均购自河南省药材公司, 经鉴定符合药典规定。

2 实验方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取辛弗林对照品 1.95 mg, 用甲醇溶解定容至 2 ml 容量瓶中, 为 0.975 mg/ml。另精密称取甘草酸单铵盐对照品 4.80 mg/ml, 置 2 ml 容量瓶中, 加入 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 为 2.40 mg/ml。

2.2 样品溶液的制备 分别精密称取 9 份两倍处方量的药材粗粉, 按正交试验表(表 1)中所选取的 3 因素 3 水平进行

回流提取, 将提取液减压浓缩至干, 然后用适量甲醇溶解, 转移至容量瓶中用甲醇定容至刻度备用。另取按醇提最佳工艺提取后的药渣 9 份, 按正交试验表(表 4)中所选取的 3 因素 3 水平进行煎煮提取, 将提取液浓缩至适量, 过滤, 滤液加浓硫酸放置, 过滤, 将不溶物水洗至中性, 烘干, 用 50% 乙醇溶解不溶物, 定容至容量瓶中备用。

2.3 薄层层析条件及薄层扫描条件^[4] 辛弗林: 吸附剂: 硅胶 G, 展开剂: 正丁醇-冰醋酸-水(4: 1: 5 上层), 显色剂: 0.5% 茛三酮的乙醇溶液, 辛弗林经显色后呈现紫红色; 甘草酸: 吸附剂: 硅胶 GF₂₅₄, 展开剂: 正丁醇-冰醋酸-水(4: 1: 2), 展开前饱和 30 min, 取出晾干后, 在紫外灯(254 nm)下定位。

采用反射法双波长锯齿扫描法, 狭缝 0.4 × 0.4 mm, 线性参数 $S_x = 3$, 灵敏度中等, 辛弗林的 $\lambda_s = 510$ nm, $\lambda_R = 700$ nm; 甘草酸的 $\lambda_s = 256$ nm, $\lambda_R = 240$ nm。

2.4 标准曲线的绘制 用定量毛细管吸取辛弗林对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 μ l 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以展开剂展开, 取出, 晾干, 喷以显色剂, 放置 30 min 后进行扫描测定。以辛弗林点样量(μ g)为横坐标, 以斑点峰面积为纵坐标作图, 得一不通过原点的直线, 求得回归方程 $Y = 1930.2X - 43.232$, $r = 0.999$ ($n = 5$), 结果表明辛弗林在 0.975~4.875 μ g 范围内, 与其峰面积值呈良好的线性关系。

* 河南省科技攻关资助项目第 981180821 号

用定量毛细管吸取甘草酸对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 μl 于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以展开剂展开, 取出晾干, 在紫外灯 (254 nm) 下定位, 放置 30 min 后进行扫描。以甘草酸点样量 (μg) 为横坐标, 以斑点峰面积值为纵坐标绘制标准曲线, 求得回归方程 $Y = 59.1X + 69.8$, $r = 0.9997$ ($n = 4$)。结果表明甘草酸在 4.8~19.2 μg 范围内, 线性关系良好, 故用外标两点法定量。

2.5 提取条件优选 根据方中药材的理化性质及生产工艺实际, 需将各味药全部打成粗粉, 且因其中的主要活性成分既含有脂溶性成分, 又含有水溶性成分, 故先用醇提, 再用水提, 以确保有效成分提取完全^[2]。

2.5.1 醇提取工艺的研究 我们选取醇提取物中有效成分辛弗林的含量为考察指标, 以 95% 乙醇为溶剂, 选用 L₉(3⁴) 正交方案^[3], 考察了溶剂用量、提取时间和提取次数 3 个因素, 每个因素 3 个水平设计试验方案, 见表 1。

表 1 醇提取试验因素水平表

因素水平	A 溶剂用量(倍)	B 提取时间(小时)	C 回流次数(次)
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

按因素水平表所列的各因素水平进行提取, 将所制得的样品溶液点于同一硅胶 G 薄层板上, 随行点对照品溶液 2 μl 和 4 μl , 进行展开、显色、扫描, 用外标两点法计算出各样品中辛弗林的含量, 然后按 L₉(3⁴) 进行正交试验。实验数据及方差分析结果见表 2、3。

表 2 正交设计方案与结果

试验号	A	B	C	辛弗林含量(mg/100g)
1	1	2	3	29.451
2	1	2	2	44.821
3	1	3	3	48.823
4	2	1	2	42.634
5	2	2	3	44.472
6	2	3	1	34.897
7	3	1	3	46.946
8	3	2	1	34.638
9	3	3	2	53.311
K ₁	123.095	119.031	98.986	127.234
K ₂	122.003	123.931	140.766	126.664
K ₃	134.895	137.031	140.241	126.095
K ₁	41.032	39.677	32.995	42.411
K ₂	40.668	41.310	46.992	42.221
K ₃	44.965	45.677	46.747	42.032
R	4.297	6.000	13.927	0.379

$$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 379.993$$

$$CT = \frac{G^2}{9} = 16043.853$$

显著性影响, 各因素影响程度依次为 C > B > A, 根据表 3 直观分析结果, 最佳组合应为 A₃B₃C₂, 即最佳醇提取工艺为用 10 倍量 95% 乙醇提取 2 次, 每次 3 h。

2.5.2 水提取工艺的研究 将最佳醇提取工艺的醇提后药渣以水为溶剂, 进行煎煮提取, 以提取物中的有效成分甘草酸的含量为考察指标, 选用 L₉(3⁴) 正交方案进行实验, 影响提取的主要因素及确定的水平见表 4。

表 3 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	34.0710	2	17.0355	157.2992	*
B	57.7359	2	28.868	266.5554	**
C	383.0914	2	191.5457	1768.6584	**
误差 SSe	0.2166	2	0.1083		

表 4 水提取试验因素水平表

因素水平	A 提取时间(小时)	B 煎煮次数(次)	C 溶剂用量(倍)
1	1	1	6
2	2	2	8
3	3	3	10

按因素水平表所列的各因素水平进行提取, 将所制得的样品溶液点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 随行点对照品溶液 2 μl 和 4 μl , 进行展开、扫描, 用外标两点法计算出各样品中甘草酸的含量, 然后按 L₉(3⁴) 正交表设计试验方案, 实验结果见表 5。对正交试验结果进行方差分析, 结果见表 6。

表 5 正交设计方案与结果

试验号	A	B	C	甘草酸含量(mg/100g)
1	1	2	3	5.131
2	1	2	2	8.732
3	1	3	3	12.114
4	2	1	2	5.922
5	2	2	3	8.067
6	2	3	1	9.029
7	3	1	3	7.548
8	3	2	1	6.226
9	3	3	2	13.163
K ₁	25.977	18.601	20.386	26.361
K ₂	23.018	23.025	27.817	25.309
K ₃	26.937	34.306	27.729	24.262
\bar{K}_1	8.659	6.200	6.795	8.787
\bar{K}_2	7.673	7.675	9.272	8.436
\bar{K}_3	8.979	11.435	9.243	8.087
R	1.306	5.235	2.477	0.700

$$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 75.932$$

$$CT = \frac{G^2}{9} = 640.630$$

方差分析结果表明, 因素 A、B、C 对辛弗林的含量均有

表 6 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	2.7816	2	1.3908	3.7891	
B	43.7198	2	21.8599	59.5556	*
C	12.1273	2	6.0637	16.5200	
误差 S _{Se}	0.7341	2	0.3671		

由以上方差分析结果表明,因素 B 对甘草酸的含量有显著性影响,由表 6 直观分析,最佳组合应为 A₃B₃C₂,即最佳水提取工艺为用 8 倍量水煎煮 3 次,每次 3 h。

3 最佳提取工艺及颗粒的制备

3.1 最佳提取工艺 称取 2 倍处方量粉碎成粗粉的 9 味药材共 480 g,加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 3 h,抽滤,合并滤液在 60℃ 条件下真空薄膜浓缩至一定浓度,得稠膏 I;抽滤后所得药渣加 8 倍量水煎煮 3 次,每次 3 h,用滤布过滤,合并滤液,浓缩至一定浓度,得稠膏 II。将稠膏 I 和 II 合并,置蒸发皿中在水浴上低温 60℃ 挥散,浓缩至相对密度为 1.30-1.35(60℃)的膏膏,以备制粒用。

3.2 颗粒的制备 将蔗糖置碾槽中碾碎成粉状,过 120 目筛,得糖粉。称取 615 g 糖粉,205 g 糊精,用 120 目筛使之混合制成均匀的混合物,趁热将所制的清膏与糖粉、糊精的混合物搅拌均匀制成软材(清膏、糖粉、糊精的比例为 1.2:3:1),制成的软材以手捏成团,轻压则散为止。手握成团后用力挤压过 12 目制粒筛,制成颗粒,将湿颗粒置瓷盘内放于烘箱中于 40℃ 干燥 30 min,再升温至 60℃ 干燥 30 min,取出再过 12 目制粒筛整粒即可得到成品。制得的颗粒总重 956 g,得干膏

重为 136 g,出膏率为 28.3%。

4 讨论

4.1 本文通过正交试验法优选病毒消颗粒的提取工艺。提取工艺研究中设计了 3 因素 3 水平的正交试验方案,筛选出了最佳提取条件。实验结果表明,无论是醇提还是水提均为提取次数对提取效果影响最大,其次为提取时间。

4.2 在对醇提物进行浓缩时,考虑到醇提物中的一部分活性成分受热结构易受破坏,因此浓缩时采用在低温下进行真空薄膜浓缩,以最大限度地保护有效成分。

4.3 制粒前糖粉与糊精必须过 120 目筛并混合均匀,否则制得的颗粒易出现白色花斑而影响美观;制得的清膏相对密度应在 1.30~1.35 范围内,否则过稠制得的软材易松散,不易制粒,过稀则制得的颗粒含糖粉过多会影响药效。颗粒的干燥温度应控制在 40~60℃,干燥温度应逐渐由低升高,否则颗粒的表面干燥后易结成一层硬膜而影响内部水分的蒸发,放置时间长后易受潮而结成硬块。

参考文献

- 张纯,高杰,林厚文,等.正交设计法探讨牡丹皮中丹皮酚的提取工艺.中成药,1996,18(5):5.
- 张斌,王丽娜,潘晖.通脉益脑片提取工艺研究.中国实验方剂学,1996,2(6):9.
- 袁珂,胡润淮,翟剑波.正交试验法优选冬凌草的提取工艺.中国现代应用药学,1998,15(5):14.
- 袁珂,翟剑波,胡润淮,等.薄层扫描法测定复方冬凌草片中甘草酸的含量.中国实验方剂学,1998,4(1):1.

收稿日期:1999-10-28