

正交试验法优选通便胶囊的提取工艺条件

宋治荣¹, 王兰霞², 李士博² (1.甘肃中医学院, 兰州 730000; 2.甘肃药品检验所, 兰州 730000)

摘要: 目的 优选通便胶囊中木香、黄连、槟榔的提取工艺条件。方法 结合中医理论, 通过药效学试验验证, 比较醇提物、水提物在小鼠肠推进方面的作用, 确定提取工艺, 并以干膏率、盐酸小檗碱的量为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表对影响提取的因素醇浓度、用量、提取次数、时间进行考察。结果 优选工艺条件为药材加 10 倍量 30% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 经药效学实验验证、正交试验筛选得到的提取工艺条件科学合理可行。

关键词: 通便胶囊; 药效试验; 正交试验; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)02-0123-03

Optimization of Extracting Process Conditions of Tongbian Capsule by Orthogonal Test

SONG Zhirong¹, WANG Lanxia², LI Shibo² (1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process conditions from Costas, Coptis and Betel nut of Tongbian capsule. **METHODS** Combined of traditional Chinese medicine theory and passed pharmacodynamic study to compare ethanol extraction with water extraction to determine ethanolic route in the stimulative role of mice intestinal. Content of extraction and berberine hydrochloride are regarded as the assessing index to determine the optimum extracting conditions. Content of ethanol, amount of ethanol, extracting times and extracting time are selected by orthogonal design and the analysis of variance. **RESULTS** The optimum conditions of extraction process are 30% ethanol, which is 10 times of the amount of herb material, refluxed 3 times, 1.5 h for each time. **CONCLUSION** The optimal extracting process conditions are scientific, reasonable and feasible by pharmacodynamic study and orthogonal test.

KEY WORDS: Tongbian capsule; pharmacodynamic study; orthogonal test; berberine hydrochloride; HPLC

通便胶囊是由当归、黄芪、木香、黄连、槟榔、大黄、桃仁等药味组成, 具有益气养血、润肠通便、泄热导滞功效。治疗由燥热内结、气机郁滞、津液不足和脾胃虚寒所致便秘, 临床疗效较好。本试验结合中医理论, 进行药效学试验, 根据处方中各药味作用、有效成分的性质, 通过比较木香、黄连、槟榔 3 味中药的乙醇提取液、水提取液在提高小鼠胃肠推进方面的药效预实验, 确定了以乙醇作为提取溶媒。并对影响乙醇提取的主要因素, 即乙醇浓度、用量、提取次数和时间 4 个因素, 各取 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 以干膏收率、盐酸小檗碱为评价指标, 优选提取工艺条件。

1 仪器与材料

LC-10ATvp 高效液相色谱仪(日本岛津), 十万分之一电子分析天平(AUW120D 型, 日本岛津公司); 高频超声波清洗器(SK3300H 型, 科岛上海超声仪器公司); 数显恒温水浴锅(HH-4 型, 国华电器有限公司)。

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-200208, 供含量测定用); 乙腈(色谱纯); 其余化学试剂均为分析纯; 水为重蒸馏水。

昆明种小鼠体重 18~22 g, ♀ ♂ 各半, 由兰州大学实验动物中心提供。实验动物使用许可证号: SYXK(甘)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 不同溶剂提取物对小鼠炭末推进的药效试验

药效试验药物: 按处方比例称取木香、黄连、槟榔 2 份, 1 份水提, 分别加水 10 倍、8 倍提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液、浓缩, 制成每升相当于 160 g 原生药的药液; 另 1 份醇提, 提取方法同水提, 提取液蒸取乙醇后加蒸馏水制成每升相当于 160 g 原生药的药液。小鼠的剂量按成人(60 kg) 体重日用量($0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的 20 倍设计, 相当于生药量 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

取健康小鼠 30 只, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 禁食 24 h, 生理盐水组、水提药组和醇提药

作者简介: 宋治荣, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0931)3627696

E-mail: songz-r@163.com

组剂量各为 $0.5 \text{ mL} \cdot (20 \text{ g})^{-1}$ 灌胃, 连续 3 d, 第 4 天各组小鼠给药 30 min 后, 用新配置 10% 活性炭混浊液 $0.5 \text{ mL} \cdot (20 \text{ g})^{-1}$ 灌胃, 20 min 后颈椎脱臼处死, 立即剖腹取出胃肠, 将小肠平铺于玻璃板上, 测量炭末在肠管内的移动距离和小肠全长, 计算推进百分率。结果见表 1。

表 1 不同溶剂提取物对小鼠肠推进的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)
Tab 1 Extractions of different solvent on the impact of intestinal propulsion in mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mL} \cdot (20\text{g})^{-1}$	小鼠炭末肠推进/%
生理盐水组	0.5	60.60±14.10
醇提药组	0.5	82.80± 2.50 ¹⁾
水提药组	0.5	67.40±14.40

注: 与生理盐水组比较, ¹⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with the saline group, ¹⁾ $P < 0.01$

结果小鼠胃饲木香、黄连、槟榔的醇提物、水提物, 在小鼠肠推进方面都有增强作用。但胃饲醇提药组与生理盐水组在小鼠肠推进方面相比, 肠推动作用增强明显, 差异十分显著 ($P < 0.01$), 而胃饲水提药组与生理盐水组相比差异不显著。实验表明, 小鼠胃饲醇提物比水提物在增强肠推进方面作用更强。根据上述结果, 确定乙醇为木香、黄连、槟榔的提取溶剂。

2.2 测定方法

2.2.1 盐酸小檗碱含量测定^[1] 色谱条件与系统适用性试验: Phenomenex C_{18} (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 乙腈-0.05% 磷酸二氢钾溶液 (28 : 72) 为流动相; 检测波长为 345 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 3 000。

盐酸小檗碱对照品溶液的制备: 取盐酸小檗

碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.071 2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

供试品溶液的制备: 取样品的干浸膏约 0.1 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 1% 盐酸甲醇溶液 40 mL, 超声提取 (功率 250 W, 频率 53 kHz) 30 min, 放冷, 用 1% 盐酸甲醇溶液定容至 50 mL, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

测定法: 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以外标法计算含量, 即得。

2.2.2 干膏得率的测定 提取液浓缩至 100 mL 精密量取 5 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定重量, 计算干膏得率。

2.3 提取工艺条件正交试验设计

对影响醇提的主要因素, 即乙醇浓度、用量、提取次数和时间 4 个因素, 各取 3 个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交实验, 以干膏收率、盐酸小檗碱为评价指标, 对提取工艺进行优选。因素水平安排见表 2。

表 2 醇提工艺的因素和水平

水平	A 加醇量倍数	B 提取次数	C 提取时间/h	D 醇浓度/%
1	6	1	1	30
2	8	2	1.5	50
3	10	3	2	70

2.4 正交试验结果及方差分析

按处方比例称取木香、黄连、槟榔等药材共 9 份, 按 1~9 号试验条件进行试验, 测定干膏得率及盐酸小檗碱含量, 结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 3 醇提取正交试验结果

Tab 3 Orthogonal test for ethanol extracting process

编号	A	B	C	D	干膏得率%	盐酸小檗碱%	综合评分%
1	1	1	1	1	14.80	3.263 0	42.53
2	1	2	2	2	18.85	8.563 9	75.90
3	1	3	3	3	11.40	12.169 9	80.37
4	2	1	2	3	10.31	4.322 6	39.73
5	2	2	3	1	20.47	7.110 5	71.63
6	2	3	1	2	19.44	6.693 5	67.73
7	3	1	3	2	14.63	5.342 1	52.47
8	3	2	1	3	8.14	11.275 8	70.13
9	3	3	2	1	22.39	9.309 1	85.90
综合评分	K ₁	66.264	44.911	60.131	66.683		
	K ₂	59.695	72.553	67.174	65.367		
	K ₃	69.501	77.997	68.156	63.410		
	R	9.806	33.086	8.025	3.273		

综合评分赋予干膏率、盐酸小檗碱的权重系数分别为 0.4, 0.6。

表 4 醇提工艺方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F 值	P
A	149.781	2	74.890	9.204	<0.1
B	1 888.443	2	944.222	116.042	<0.01
C	114.978	2	57.489	7.065	>0.1
误差	16.274	2	8.137		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$, $F_{0.01}(2, 2)=99.00$, $F_{0.1}(2, 2)=9.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$, $F_{0.01}(2, 2)=99.00$, $F_{0.1}(2, 2)=9.00$

由表 3 极差结果分析: 所考察各因素作用主次为 B>A>C>D, 以 $A_3B_3C_3D_1$ 组合方案为佳; 表 4 方差分析结果表明提取次数(B)对工艺有非常显著性影响, 溶剂量(A)对结果有影响, 提起时间(C)、醇浓度(D)无显著性影响, 可任意取值; 根据经济节俭原理, C_3 调整为 C_2 , 确定最佳工艺为 $A_3B_3C_2D_1$, 即加 10 倍量 30%乙醇提取 3 次, 每次 1.5 h。

2.5 验证试验

按处方比例称取药材 3 份, 按上述最佳工艺条件提取并制备相应的样品, 测定各评价指标的量。结果见表 5。表 5 结果表明, 实验条件下筛选的最佳提取工艺较好, 结果稳定可行。

表 5 醇提验证实验结果

序号	干膏得率/%	盐酸小檗碱/%
1	20.15	9.726
2	20.76	9.453
3	20.34	9.693

3 讨论

本试验结合中医理论, 方中当归温通质润, 黄芪补中益气, 二药合用则阴生阳长, 气血两旺为君药。现代研究认为当归、黄芪煎液具有增强免疫、补气生血^[2]等作用, 水提工艺可提取当归、黄芪有效成分。大黄苦寒泄热, 荡涤肠胃积滞, 桃仁活血行瘀, 润肠通便共为佐使药。现已证实大黄中蒽醌类是其泻下有效成分^[3], 蒽醌类热稳定性差, 为使药效不损失, 固与富含脂肪的桃仁相配原粉入药。便秘病位在肠, 肠属腑, 以通为顺。木香、槟榔行气导滞, 以消脘腹胀满, 除里急后重, 黄连苦寒清热燥湿抗炎, 木香、槟榔、黄连三药合用有清热导滞, 通调脏腑之气同为臣药。现代研究认为, 木香配黄连清热化湿, 行气止痛; 木香配槟榔能增强胃肠运动, 行气化积, 泄热通便, 效果好于单独用药^[4]。通过对木香、黄连和槟榔三药提取物在小鼠胃肠方面的药效比较, 发现醇提物、水提物都有促进肠推进作用, 但醇提物

比水提物在促进胃肠推进方面作用更加显著, 可能是醇提物中促进胃肠运动的物质生物碱类如槟榔碱提取较完全, 具有收敛止泻的成分如鞣质类杂质较少的缘故。槟榔中主要活性成分槟榔碱为 M-受体兴奋药, 能促进肠蠕动有利于排便^[5]; 木香醇提取物在消化道利胆方面比水提物作用强^[6]; 黄连清热抗炎主要有效成分是生物碱, 醇提小檗碱含量高于酸水提或水提^[7]。通过药效预试确定醇提路线, 是因为提取工艺技术是研发的手段, 药效才是研发的根本目标。从药效出发, 筛选工艺, 不仅能克服传统中药提取从理化性质出发的不足, 还能认识到药效评价才是确保中药提取工艺是否先进、有效的依据。

正交工艺评价指标确定, 提取主要成分为生物碱, 槟榔碱能溶于任意浓度乙醇, 黄连中有效成分小檗碱为一种季铵生物碱, 其盐类在水中的溶解度都比较小, 醇提以盐酸小檗碱作为生物碱提取完全的标志。小檗碱作为醇提药味中有效成分之一, 不能代表醇提部分的全部药效成分, 因此增加干膏率作为考察指标。因有效成分盐酸小檗碱的量比干膏收率重要, 所以赋予干膏率、盐酸小檗碱分别为 0.4, 0.6 权重系数, 进行综合评分, 以体现复方中药多成分协同作用的整体优势, 有利于提高正交试验筛选工艺结果的准确性。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2005) Vol 1 (中国药典 2005 年版.一部) [S]. 2005: 313-314.
- [2] JIN R M, NING L, CHEN C X, et al. Preparation of blood-deficient model and effects of tangkuei blood-supplementing decoction on hemopoiesis [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2001, 23(4): 268-271.
- [3] LI F, WANG S C, WANG X, et al. Novel exploration of cathartic pharmacology induced by rhubarb [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(4): 481-484.
- [4] HUANG H X, WANG W, QU R Y, et al. Effects of "Saussure Lappa Clarke-Areca Catechu L." supplement on gastrointestinal movement in rats [J]. Shenzhen J Integrated Tradit Chin West Med(深圳中西医结合杂志), 2003, 13(2): 80-82.
- [5] DU Z M, WAN X X, WU A C, et al. Effect of arecoline on movement of small intestine in mice [J]. J Bran Camp First Mil Med Univ(第一军医大学分校学报), 1999, 22(1): 27-28.
- [6] WANG Y B, WANG Q, MAO F L, et al. Pharmacological study on Radix Aucklandiae [J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2001, 32(2): 146-148.
- [7] YING Y, HE Z H, ZHOU S W, et al. Optimizing the extraction of alkaloids from Rhizoma Coptidis by orthogonal design [J]. China Pharm(中国药房), 2007, 18(9): 670-672.

收稿日期: 2009-05-14