

表 3 灯盏花素注射液动态比浊法鲎试验定量测定结果

批号	稀释倍数	S平均值 (EU/mL)	PPC平均值 (EU/mL)	回收率 (%)	内毒素实际值 (EU/mL)
000510	12	0.008 7	0.807 4	159.7	0.104 4
001007	12	0.045 2	0.684 3	127.8	0.542 4
001012	12	0.048 9	0.706 1	137.4	0.586 8

2.2.4 消除干扰影响的试验:对检测光源 405 nm 的吸收作用以及不合适 pH 值是导致鲎实验抑制的重要因素,故进行以下 2 项试验。

对检测光源的吸收试验:以上干扰试验结果可见,灯盏花素原液对仪器检测光源有极强的吸收而有干扰作用,为了确证这个问题,将灯盏花素(批号 000510)原液(5 mg/mL)用细菌内毒素检查用水稀释成系列浓度 1.25(1/4 稀释),0.625(1/8 稀释),0.312 5(1/16 稀释),0.156 2(1/32 稀释),0.078 12 mg/mL(1/64 稀释),测定 405 nm 处吸光度(A),将数据进行最小二乘法回归,得直线方程: $C=0.241A+0.0361$, $r=0.97815$

pH 值试验:将原液,1/2,1/4,1/8,1/16,1/32,1/64 浓度系列测定其 pH 值,结果是 8.00,7.79,7.59,7.26,6.87,6.49,6.13

结果可见,405 nm 波长处吸光度值与样品浓度成良好线性关系,随着样品的稀释,吸光度值减少,干扰也减少直到消失。pH 值在 6~8 范围内,样品和鲎试剂在检测混合物 pH 值范围为 6.0~8.0^[3],故 pH 值不是鲎试验干扰因素

3 讨论

3.1 计算公式:回收率%=(PPC 实测值-NPC 实测值)强化内毒素浓度。动态比浊法干扰试验是以样品的添加内毒素平均回收率来判断,若回收率在 50%~200% 范围内,表明样品溶液对鲎试剂反应无干扰影响^[4]。

3.2 灯盏花素原液 NPC 两管插入反应试管后,反应窗无任何显示,说明原液对光吸收极强;PPC 两管反应时间分别为 10/10(s)、10/10(s);(符号“/”前数据是反应物到达预设吸光度的反应时间,符号“/”后数据是反应完成时间)由于灯盏花素原液对仪器检测光源 405 nm 波长有极强吸收而干扰了仪器正常的检测过程,加了强化内毒素的 PPC 管光吸收作用尤其显著,使反应曲线提前结束。反应窗上显示好像是被提前中断反应而出现橙色(比如反应中途拔出反应试管)样品 1/4 回收率在有效范围内,但其 PPC 两管反应时间分别是 600/1 200,580/980 s,即分别在 1 200,980 s 时提前中断反应而呈橙色,说明 1/4 尚未完全消除干扰。故灯盏花素原液对仪器检测光源吸收作用是灯盏花素注射液对动态比浊法鲎试验的主要干扰因素。

3.3 细菌内毒素与鲎试剂的反应是基于一系列丝氨酸蛋白酶的酶促放大作用产生的,其干扰因素包括:不合适的 pH 环境,对照内毒素聚集或吸附,不适宜的阳离子浓度,酶或蛋白质的修饰,非特异性的鲎试剂激活物,对仪器检测光源的吸收作用。大部分的干扰作用可通过适当的样品稀释将干扰消除,故稀释法是排除干扰的最基本方法。

3.4 灯盏花素注射液按 1/12 稀释用动态比浊法鲎试验进行细菌内毒素检查是可行的。对于这类天然药物注射液用动态比浊法鲎试验进行细菌内毒素检查比凝胶法具有更大的优越性。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].2000年版·二部.
- [2] 夏振民.药品细菌内毒素检查的限值[J].药物分析杂志,1995,15(3):54-56.
- [3] 美国药典[S].23版.
- [4] EP Supplement[S].1999.

正交试验法优选胃安冲剂的制备工艺

刘芳¹,王小平²,向爱民¹,伍伟祯¹,王越^{2*}

(1.广东开平中医院,广东开平 529300 2.广东彼迪药业有限公司,广东开平 529300)

摘要:目的 优选胃安冲剂的制备工艺。方法 以厚朴酚、白术多糖、盐酸小檗碱为指标成分,采用正交试验法对胃安冲剂的制备工艺进行优选。结果 优化工艺为:厚朴、枳实采用水提醇沉(20倍量水,0.5 h,提取 3 次,95%乙

* 收稿日期:2001-08-14

基金项目:广东省中医药管理局 2000 年立项科研课题(100070)

作者简介:刘芳(1968-),女,湖南益阳人,副主任中药师,1990 年毕业于湖南中医学院中药系,1990~1995 年任职于广东彼迪药业有限公司,负责多项新产品的开发及检测,现为广东省中医药学会医院中药管理委员会委员,在各级药学专业杂志发表论文 10 余篇,研究方向为中药制剂与中药检验。

醇沉淀杂质);黄连采用 95%乙醇回流提取,白术等其它药材采用水提法(24倍量水,提取 2次,每次 2h,白术粒度为 2~4mm) 结论 该工艺合理,有效成分提取效率高。

关键词:胃安冲剂;制备工艺;正交试验

中图分类号:R284.02;286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2002)06-0507-04

Optimum selection of preparative procedure of WEI'AN GRANULES* by orthogonal test

LIU Fang¹, WANG Xiao-ping², XIANG Ai-min¹, WU Wei-zhen¹, WANG Yue²

(1. Kaiping Hospital of TCM in Guangdong Province, Kaiping Guangdong 529300, China;

2. Guangdong P. D. Pharmaceutical Co., Ltd., Kaiping Guangdong 529300, China)

Abstract Object To optimize the preparation procedure for WEI'AN GRANULES. **Methods** The optimum conditions of WEI'AN GRANULES were selected with the active components: magnolol, polysacchride of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* and berberine hydrochloride as mark by orthogonal test. **Results** The optimum preparative procedure was as follow: *Cortex Magnoliae officinalis* and *Fructus Aurantii Immaturus* were extracted with water and precipitated with alcohol (adding 20-fold water as much as medicine, extracting three times, 0.5 h per time and precipitated with 95% alcohol to remove impurities); *Rhizoma Coptidis* was extracted with 95% alcohol by refluxing; *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* and other herbs were extracted with water (adding 24-fold water as much as medicine, extracting twice, 2 h per time, its granule-size of *Rhizorna Afracylodis Macrocephalae* was 2 mm to 4 mm). **Conclusion** The optimum preparative procedure is reliable and the extracting ratio of active component is high.

Key words WEI'AN GRANULES preparative procedure; orthogonal test

* WEI'AN GRANULES is a Chinese traditional compound medicine with the function of disintegrating masses and strengthening the spleen and stomach.

胃安冲剂是以枳实消痞丸为主,佐以越鞠保和丸化裁而成。根据文献和大量药效实验证明,该方中厚朴、白术、枳实均有促进胃动力之功效,黄连清胃热,因此临床上可消痞除积,健脾和胃疗效显著。为了提高该产品质量,本研究对其提取工艺进行优选。

1 仪器与试药

美国 Waters 高效液相色谱仪,510泵,C-3A 积分仪,490紫外检测仪,U6k 进样器;UV-1206紫外分光光度仪(日本岛津);厚朴酚、盐酸小檗碱对照品(购自中国药品生物制品检定所),葡萄糖标准品(购自江苏省药物研究所),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,药材购自肇庆市药材公司。

2 方法与结果

厚朴所含主要有效成分为厚朴酚,有报道^[1]指出厚朴与枳实合煎可提高厚朴酚的溶出率,故制备工艺设计厚朴与枳实合煎。白术所含主要有效成分为白术多糖,属于水溶性成分,与方中其它 5 味药采用水提法;黄连所含有有效成分盐酸小檗碱易与方中山楂所含枸橼酸反应生成难溶性提取物,故黄连单独提取。

2.1 厚朴与枳实的水提醇沉工艺优化

2.1.1 正交试验设计:取厚朴与枳实两味药材,分别粉碎烘干后过 80 目筛,按处方比例称取,选择水的用量、煎煮时间、醇沉时乙醇的浓度为考察对象,

每个因素拟定 3 个水平(见表 1),选用 $L_9(3^4)$ 正交表,具体实验安排见表 2。

表 1 厚朴与枳实水提醇沉工艺因素水平表

水平	因素		
	A 水用量(倍)	B 煎煮时间(h)	C 醇沉浓度(%)
1	10	1.5	50
2	15	1	75
3	20	0.5	95

表 2 正交设计及效应计算表

试验号	A	B	C	-	厚朴酚含量
					(mg/g)
1	1	1	1	1	0.85
2	1	2	2	2	1.24
3	1	3	3	3	2.12
4	2	3	1	2	1.68
5	2	1	2	3	0.92
6	2	2	3	1	2.05
7	3	2	1	3	1.01
8	3	3	2	1	1.77
9	3	1	3	2	2.30
K ₁	4.21	4.07	3.54	4.67	
K ₂	4.65	4.30	3.93	5.22	
K ₃	5.08	5.57	6.47	4.05	
k ₁	1.40	1.36	1.18	1.56	
k ₂	1.55	1.43	1.31	1.74	
k ₃	1.69	1.86	2.16	1.35	
R	0.87	1.50	2.54	1.17	

2.1.2 色谱条件^[2]: ODS 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:乙腈-水-冰醋酸(15:10:1),流速:

1. 0 mL/min,柱温: 室温,检测波长: 294 nm
 2.1.3 标准曲线的绘制: 精密称取厚朴酚对照品 1 mg,置 5 mL容量瓶中,以甲醇溶解并定容,得对照品储备液,准确吸取该储备液 1.5 mL,置 10 mL量瓶中,以甲醇定容至刻度,0.45 μm 滤膜过滤,在上述色谱条件下分别进样 2.5, 5, 10, 15, 17.5 μL,以峰面积积分值 (Y)对进样量 (X)进行线性处理,回归方程为: $Y = 612.73 + 815.25X$, $r = 0.9989$ 表明厚朴酚在 0.075~ 0.525 μL/mL 范围内线性关系良好。

2.1.4 样品的制备: 按 $L_9(3^4)$ 正交设计表对样品进行提取,过滤,水浴浓缩干燥,精密称取相当于 1 g 厚朴药材的粉末,用甲醇浸提,得正交试验各组样品,以 0.45 μm 滤膜过滤,备用。上述样品均一式两份,平行操作。

表 3 方差分析表

方差来源	离均差平方和 (SS)	自由度 (ν)	方差 (MS)	F	P
A	0.126	2	0.063	0.552	
B	1.688	2	0.844	7.388	< 0.05
C	0.435	2	0.218	1.905	
误差 (e)	0.228	2	0.114		
总变异	2.477				

注: 因 SS_A 小于 $SS_{误差}$, 应合并为 $SS = 0.354$, 自由度也应合并为 $\nu = 4$, 则 $MS_e = SS_e / \nu = 0.354 / 4 = 0.08864$, 合并后的 $F_B = MS_B / MS_e = 9.519$ 查表得 $F_{0.05}(2, 4) = 6.94$, 故 $F_B > F_{0.05}(2, 4)$, $P < 0.05$

2.1.5 结果: 根据表 3 得出的结果可判断: 对厚朴

表 6 正交试验安排及含量测定结果

实验号	A	B	C	D	白术多糖 (mg/g)				合计
					Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	
1	1	1	1	1	0.5963	0.5372	0.5612	0.5698	2.2645
2	1	2	2	2	0.9127	0.9005	0.9336	0.9115	3.6583
3	1	3	3	3	0.6522	0.6437	0.6682	0.6531	2.6172
4	2	1	2	3	0.5248	0.5371	0.5162	0.5267	2.1048
5	2	2	3	1	0.7452	0.7536	0.7375	0.7411	2.9774
6	2	3	1	2	0.9642	0.9598	0.9687	0.9703	3.8630
7	3	1	3	2	0.9187	0.9205	0.9255	0.9234	3.6878
8	3	2	1	3	0.8715	0.8556	0.8698	0.8594	3.4663
9	3	3	2	1	0.8587	0.8532	0.8611	0.8625	3.4355
K ₁	8.54	8.0571	9.5938	8.6774					
K ₂	8.9452	10.102	9.1986	11.2091					
K ₃	10.5896	9.9157	9.2826	8.1883					
\bar{K}_1	0.7117	0.6714	0.7995	0.7231					
K ₂	0.7454	0.8418	0.7666	0.9341					
K ₃	0.8825	0.8263	0.7736	0.6824					
R	2.0496	2.0449	0.3952	3.0208					

2.3.2 实验方法: 白术多糖的含量测定采用紫外分光光度法 将葡萄糖标准品配制成 0.1 mg/mL 的标准溶液, 各取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL,

酚的提取 B 因素有显著性差异 ($P < 0.05$), A C 无显著性差异, 但 C 因素的影响大于 A 因素, 同时, A B C 各因素中 $K_3 > K_2 > K_1$, 因而优选厚朴与枳实两味药材水提醇沉工艺为 $A_3 B_3 C_3$ 。

2.2 黄连的醇提工艺优选: 取等量黄连药材 4 份, 分别用 15 倍水, 70%, 80%, 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液, 回收乙醇, 浓缩, 干燥, 结果见表 4

表 4 黄连提取工艺优化结果

提取溶媒	固体含量 (%)	盐酸小檗碱 (mg/g)
水	21.25	4.57
50% 乙醇	14.27	4.05
75% 乙醇	12.65	4.82
95% 乙醇	8.83	6.75

2.3 白术等药的水提工艺优选

2.3.1 正交试验设计: 除厚朴, 枳实, 黄连外, 方中其它 6 味中药均采用水提法。取白术等 6 味中药, 分别粉碎烘干后过 80 目筛, 按处方比例称取, 选择水的用量, 煎煮时间, 煎煮次数, 白术的粒度大小为考察对象, 每个因素拟定 3 个水平 (表 5), 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 具体实验安排见表 6, 7

表 5 白术等 (合煎) 提取因素水平表

水平	因素			
	A 水用量 (倍)	B 煎煮次数 (次)	C 煎煮时间 (h)	D 药材粒度 (mm)
1	12	1	2	0-2
2	18	2	3	2-4
3	24	3	4	4-8

依次加水使最终体积为 1.0 mL, 另取 1 mL 的水作为空白, 每一试管加入 1.0 mL 5% 酚试剂混匀, 迅速加入 5 mL 浓硫酸并振摇 5 min, 置水浴中加热 15

min,然后置冷水浴中冷却 30 min^[3],随行空白,在 490 nm 波长处测定吸光度,得回归方程为: $C=143.85A-1.13, r=0.9995$

2.3.3 样品的制备:按表 5,6的设计,精取相当于 5 g 白术的水提液,在平行条件下浓缩至 20 mL,分别加 5% ZnSO₄ 约 2 mL 与饱和 Ba(OH)₂ 溶液约 8 mL,以沉淀蛋白等杂质,振摇静置,上清液加几滴 Ba(OH)₂ 溶液,直至沉淀产生,滤入 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度^[4]。

2.3.4 结果:各正交实验组的白术多糖含量见表 6 其方差分析结果见表 7

表 7 方差分析表

方差来源	离均差平方 (SS)	自由度 (ν)	方差 (MS)	F 值	P
A	0.1943	2	0.0971	785.04	< 0.01
B	0.2118	2	0.1059	855.84	< 0.01
C	0.0068	2	0.0034	27.655	< 0.01
D	0.4401	2	0.2201	1778.1	< 0.01
误差	0.0033	27	0.0001		
总变异	0.8564				

$F_{0.05}(2, 29) = 3.33, F_{0.01}(2, 29) = 5.42$

结果表明:白术等 6 味药物的水提工艺优选

A3B3C1D3

3 讨论

胃安冲剂的制备工艺中水提醇沉部分选择厚朴酚作为定量检测指标,是因为厚朴为方中君药,具有行气除满之功,适用于里实气滞之证,可以治疗胃动力低下等症,其有效成分之一厚朴酚已有测定其含量的大量报道,实验条件成熟,故选择其作为衡量制剂有效成分的控制指标之一。

水提部分选择白术多糖作为定量检测指标,是因为白术为方中臣药,具有健脾运脾之功效,而其水溶性成分白术多糖具有重要生理活性,测定方法简便可靠

黄连有清胃热,健脾胃的作用,故选择盐酸小檗碱作为控制制剂有效成分的另一指标

通过成选胃安冲剂的制备工艺,提高了该制剂有效成分的得率,保证了其内在质量

参考文献:

[1] 寇俊萍,宣圆圆,严永清.影响厚朴三物汤厚朴含量因素的初步研究[J].中成药,2001,23(6):410-403.
 [2] 常增荣,周富荣.高效液相色谱法测定保济丸中厚朴酚和厚朴酚含量[J].中国中药杂志,1995,20(10):605.
 [3] 储秋萍.壳聚糖用于黄芪口服液澄清的工艺探讨[J].中成药,1998,20(12):2-3.
 [4] 陈柳蓉,邵青,陆蕴.白术及炮制品的多糖含量测定[J].中成药,1997,28(4):214-215.

HPLC法测定姜黄、郁金、广西莪术中姜黄素的含量

戚爱棣*

(天津中医学院 中药系,天津 300193)

摘要:目的 测定不同产地姜黄、郁金、广西莪术中姜黄素的含量。方法 采用超声提取法,色谱柱 Supelcosil™ LC₁₈柱(5μm, 4.6mm×250mm),流动相为甲醇-异丙醇-0.5%醋酸溶液(19:25:56),流速 0.6 mL/min,测定波长 420 nm,柱温 35℃。结果 姜黄素在 14~56μg 范围内线性关系良好($r=0.9995$),平均回收率 99.82%,RSD 为 1.57%。结论 本法准确、快速,为控制中药原料药姜黄、郁金、莪术的内在质量提供了依据。

关键词:姜黄;郁金;广西莪术;姜黄素;HPLC

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2002)06-0510-03

Analysis of curcumin in *Curcuma longa*, *C. wenyujin*, *C. kwangsiensis* by HPLC

QI Ai-di

(Department of Chinese Materia Medica, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China)

Key words *Curcuma longa* L.; *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; *C. kwangsiensis* S. G. lee et C.

F. Liang; curcumin; HPLC

姜黄、郁金、广西莪术属姜科植物,其根、茎中的主要活性物质为姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧

基姜黄素^[1]。现代药理研究表明姜黄素具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、降血脂、降压、保肝、护肝等多种功能的

* 收稿日期:2001-10-20

基金项目:天津市科委重大科技攻关基金项目