

安心颗粒醇提工艺的实验研究

方显明¹, 肖柳华¹, 陈 勇¹, 谢金鲜¹, 卢玉扬¹, 刘建中², 温庆伟², 黄尚敏²

(1. 广西中医学院附属瑞康医院, 广西南宁 530011; 2. 培力(南宁)药业有限公司, 广西南宁 530000)

安心颗粒是人参、桂枝、水蛭、瓜蒌、茯苓等中药组成的复方制剂, 具有益气化痰、通阳逐瘀等作用, 临床用于治疗脏气亏虚、痰瘀互结之冠心病心绞痛疗效显著^[1]。为了优化其提取工艺, 提高其药品质量, 更好地发挥其药用功效, 本实验采用正交试验法, 以人参皂苷 R_{g1} 为指标, 考察提取条件的影响, 并以药效学试验进行验证, 确定最佳提取工艺。

1 仪器与试药

CS-9000 双波长薄层扫描仪(日本岛津), 939 薄层制板器(重庆南岸贝尔德仪器技术厂), 定量毛细管(USA Drummond Scientific CO.), AG285 电子分析天平(Mettler Toledo), 硅胶 G(青岛海洋化工厂), 人参皂苷 R_{g1} 对照品(中国药品生物制品检定所), 其他试剂均为分析纯。

计算机+BL-410 智能型生物信号显示与处理系统, 昆明种小鼠(广西中医学院实验动物中心), 0.4% 戊巴比妥钠(广西中医学院药理实验室)。

所用药材购自南宁市药材批发站, 均经广西中医学院中药鉴定教研室何报作教授鉴定, 符合《中国药典》2000 年版规定。

2 方法与结果

2.1 因素和水平的确定: 人参、水蛭用乙醇提取, 其余药物用水提取。对于醇提部分工艺, 根据单因素初筛试验结果, 分别确定乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、提取次数(C)、乙醇倍量(D)为因素, 每个因素各取 3 个水平, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/%	B/h	C/次	D/倍
1	70	1	1	6
2	75	1.5	2	8
3	80	2	3	10

2.2 提取工艺操作: 按处方量称取人参、水蛭, 按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表安排试验, 用乙醇提取, 合并乙醇提取液, 回收乙醇至尽, 置于蒸发皿中水浴浓缩, 合

并水提部分, 定容到 150 mL 量瓶中备用(药效学试验用)。

2.3 人参皂苷 R_{g1} 的测定

2.3.1 对照品溶液的制备: 取人参皂苷 R_{g1} 对照品 5 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备: 取各样品粉末约 10 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加氯仿 100 mL, 水浴回流提取 1 h, 弃去氯仿液。残渣挥干溶剂, 加甲醇 100 mL, 水浴回流提取 2 h, 放冷, 滤过, 残渣再用甲醇洗涤 2 次, 每次 10 mL, 滤过, 合并滤液。滤液蒸干, 残渣加水 30 mL 溶解后, 用水饱和正丁醇萃取 3 次(30、30、30 mL), 合并上层正丁醇萃取液。正丁醇萃取液再用氨试液萃取 3 次(100、100、100 mL), 弃去下层氨溶液, 将上层正丁醇萃取液水浴蒸干, 残渣加甲醇溶解转入 10 mL 量瓶中, 用甲醇洗涤后, 并入 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。同法制备缺人参的阴性对照溶液。

2.3.3 TLC 鉴别: 用定量毛细管吸取供试品溶液、对照品溶液、阴性对照溶液各 3 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板(硅胶 G 适量与 0.7% CMC-Na 按 1:3 混合拌匀, 用自动铺板器铺板, 晾干, 105 $^{\circ}$ C 活化 1 h)上, 以氯仿-甲醇-水(65:35:10)的下层液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰^[2]。结果供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同颜色的斑点。

2.3.4 色谱条件: 双波长反射吸收法线性扫描, 狭缝 5.0 mm $\times$ 1.0 mm, 测定波长 $\lambda_s=525$ nm, 参比波长 $\lambda_R=680$ nm, 线性化参数 $S_x=3$ 。

2.3.5 线性关系考察: 用定量毛细管吸取 1、2、3、4、5 μ L 人参皂苷 R_{g1} 对照品溶液, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 按上述色谱条件展开, 斑点显色清晰后进行扫描测定。以点样量为横坐标, 斑点峰面积积分值为纵坐标, 进行回归处理, 得回归方程: $Y=4\ 337.7$

收稿日期: 2004-12-01

基金项目: 广西卫生厅资助重点项目(重 200011)

作者简介: 方显明(1951—), 男, 湖南祁阳县人, 教授, 医学硕士, 主要从事心血管疾病的中西医结合防治研究。Tel: (0771) 3111337

$X+4\ 443.9$, $r=0.999\ 1$ 。结果表明:人参皂苷 R_{g_1} 在 $0.551\sim 2.755\ \mu\text{g}$ 与峰面积积分值线性关系良好。

2.3.6 精密度试验:扫描同一硅胶 G 薄层板 5 个同样量的人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液,测得峰面积积分值的 RSD 为 4.65%。扫描 5 块不同薄层板相同量的各人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液的斑点,测得峰面积积分值的 RSD 为 2.16%。

2.3.7 稳定性试验:取人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液 $2\ \mu\text{L}$,点于硅胶 G 薄层板上,展开,显色,每隔 20 min 扫描,结果在 2 h 内峰面积积分值基本不变, RSD 为 1.08%。

2.3.8 回收率试验:采用加样回收法。精密称取 5 份已知人参皂苷 R_{g_1} 质量分数的样品粉末适量,分别加入人参皂苷 R_{g_1} 对照品溶液适量,制备供试品溶液,展开,显色,扫描测定,结果平均回收率为 96.9%, RSD 为 2.3% ($n=5$)。

2.3.9 样品测定:精密吸取供试品溶液 $3\ \mu\text{L}$,对照品溶液 $2.4\ \mu\text{L}$ 分别点于同一硅胶 G 薄层板上,按上述条件展开,显色后扫描,外标两点法计算人参皂苷 R_{g_1} 的质量分数。

2.4 正交试验及其结果:结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Table 2 Result of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	人参皂苷 R_{g_1} / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			合计
1	1	1	1	1	1.08	1.06	1.05	3.19
2	1	2	2	2	2.18	2.00	2.02	6.20
3	1	3	3	3	2.37	2.18	2.31	6.86
4	2	1	2	3	1.55	1.60	1.48	4.63
5	2	2	3	1	1.90	1.83	1.89	5.62
6	2	3	1	2	1.18	1.15	1.16	3.49
7	3	1	3	2	1.57	1.51	1.50	4.58
8	3	2	1	3	1.27	1.22	1.20	3.69
9	3	3	2	1	1.37	1.34	1.32	4.03
k_1	16.25	12.40	10.37	12.84				
k_2	13.74	15.51	14.86	14.27				
k_3	12.30	14.38	17.06	15.18				
R	3.95	3.11	6.69	2.34				

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	0.888 0	2	0.444 0	142.23	$P<0.01$
B	0.550 7	2	0.275 4	88.84	$P<0.01$
C	2.583 5	2	1.291 8	416.71	$P<0.01$
D	0.309 2	2	0.154 6	49.87	$P<0.01$
误差 e	0.056 1	18	0.003 1		

$F_{0.01}(2,18)=6.01$

从极差 R 值和方差 F 值分析可见,以人参皂苷

R_{g_1} 的质量分数为评价指标,各因素对提取效果的影响程度依次为 $C>A>B>D$ 。提取次数影响最大,取 C_3 即提取 3 次, A、B、D 因素影响差异也有显著性,选 A_1 、 B_2 、 D_3 。综合分析得最佳组合为 $A_1B_2C_3D_3$,即用 70%乙醇提取、每次提取 1.5 h、提取 3 次、每次 10 倍量的乙醇。

2.5 药效学初步试验:取小鼠 100 只,体重 $18\sim 22\ \text{g}$,雌雄兼用,随机分为 10 组,每组 10 只。1~9 组将各浸膏药由 150 mL 稀释到 200 mL, ig 给药 ($0.2\ \text{mL}/10\ \text{g}$),空白对照组给等体积生理盐水,每天 1 次,连续给药 12 d,末次给药 1 h 后,用 0.4%戊巴比妥钠 ip ($0.2\ \text{mL}/10\ \text{g}$)麻醉,分离气管,肢体连接心电监护仪,用全导联观察心电图,然后结扎气管并同时秒表计时,通过心电图观察小鼠心电活动消失时间,即为心肌缺氧时间。结果见表 4。可见,第 3 组小鼠的抗心肌缺氧时间最长,优于空白对照组,表明正交试验中的 3 号试验组的药效较好。

表 4 小鼠抗心肌缺氧试验 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)Table 4 Antimycocardial hypoxia test of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	缺氧时间/min	组别	缺氧时间/min
1	14.70 ± 3.87	6	16.52 ± 2.53
2	15.42 ± 3.02	7	17.41 ± 4.02
3	$17.60\pm 1.85^{***}$	8	16.65 ± 3.23
4	13.35 ± 2.27	9	14.89 ± 5.34
5	16.38 ± 4.27	空白对照	10.73 ± 1.59

与对照组比较:*** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group

3 讨论

3.1 在正交试验中,采用人参有效成分人参皂苷 R_{g_1} 作为考核指标具有合理性,因为安心颗粒以人参为主药,具有大补元气、安神益心之功效,其主要有效成分为人参皂苷。药效学试验证实,人参皂苷能降低外周血管阻力和冠脉阻力、增加冠脉血流量、减慢心率^[2],具有抗心肌缺氧作用。本实验结果表明,试验 3 号药理活性最好,其人参皂苷的质量分数也最高,提示采用药效学试验来筛选提取工艺的条件是可行的。

3.2 人参中有效成分多为水溶性,但利用乙醇回流提取法比水提法效果更好^[3]。水蛭味腥,用醇提可去其腥味,故两药采用醇提。为优化醇提工艺,提高人参皂苷 R_{g_1} 的质量分数,根据正交试验结果综合分析,主要影响因素为提取次数,其次为乙醇体积分数、提取时间,乙醇倍量影响较小,故确定最佳工艺组合为 $A_1B_2C_3D_3$,即用 70%乙醇提取、每次提取

1.5 h, 提取3次, 每次10倍量乙醇。

References:

- [1] Fang X M, Bei W J, Qian H L, et al. Clinical observation on Angina pectoris of coronary heart disease treated with Anxin Oral Solution, 73 cases of contract analysis [J]. Guangxi J Tradit Chin Med (广西中医药), 1995, 18 (6): 1-3.

- [2] Chen L F, Qiu S H, Li Q A. Comparison between the effects of gypenosides and ginsenosides on cardiac function and hemodynamics in dogs [J]. Chin J Pharm Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 1990, 4 (1): 17-20.
- [3] Zhang L, Shan W H, Liang R X. Study on extraction processes in Panax ginseng [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药研究), 2000, 11 (9): 777-779.

添加剂对丹参酚酸 B 水溶液稳定性的影响

曲桂武¹, 岳喜典¹, 李桂生²

(1. 山东省天然药物工程技术研究中心, 山东 烟台 264003; 2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

丹参酚酸 B 是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中主要的水溶性成分, 具有抗心肌缺血、缺氧^[1]、改善血液流变性^[2]等多种药理活性。其化学组成是二分子丹参素与一分子原儿茶鞣缩合而成的四聚咖啡酸类化合物。丹参酚酸 B 的化学性质很不稳定。实验中发现水溶液中的丹参酚酸 B 在低质量浓度(<0.1 mg/mL)下室温过夜损失接近 30%, 其分解产物为丹参素、原儿茶鞣等。大多数丹参制剂均采用丹参酚酸 B 的分解产物丹参素和原儿茶鞣作为主要有效成分或质量检测指标, 但丹参酚酸 B 分解过程尚存在诸多不确定因素, 制剂质量的均一性难以得到保证。因此目前人们越来越倾向于直接以丹参酚酸 B 作为制剂的主要有效成分和质量检测指标。以丹参酚酸 B 为主要成分的制剂工艺研究中首先需要解决的是如何保持其在溶液中稳定性的问题。常用方法有加入抗氧化剂、络合剂等添加剂和调节溶液 pH 等。本实验在影响丹参酚酸 B 水溶液稳定性的添加剂的筛选方面进行了初步探索。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(包括一元泵、柱温箱、手动进样器、VWD 检测器、HP-Chem Station), 恒温水浴锅(上海跃进医药设备厂); 丹参酚酸 B 对照品由山东省天然药物工程技术研究中心现代中药室制备, 经 UV、IR、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 鉴定并确认结构, 质量分数>98%; 质量分数在 85% 以上的丹参酚酸 B 样品由山东省天然药物工程技术研究中心现代中药室制备; 甲醇(色谱纯), L-半胱氨酸盐酸盐(生化试剂, 北京化学试剂公司)、EDTA-2Na (药用, 余杭市利人医药化工有限

公司), 其他试剂均为分析纯, 实验中所用水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Discovery C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL; 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(40:60:2); 检测波长: 286 nm; 体积流量: 0.5 mL/min。理论塔板数以丹参酚酸 B 计不低于 4 000。

2.2 标准曲线的绘制: 精密称取丹参酚酸 B 对照品 25 mg, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并加至刻度, 摇匀, 作为丹参酚酸 B 对照品溶液。精密量取 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。依次吸取丹参酚酸 B 系列对照品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以丹参酚酸 B 的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 计算得回归方程为 $Y = 63\,260 X + 444.25$, $r = 0.999\,6$, 表明丹参酚酸 B 在 0.001~1 mg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.3 不同添加剂的影响: 精密称取相当于 100 mg 丹参酚酸 B 的样品, 置 250 mL 棕色量瓶中, 加水溶解并加至刻度, 摇匀。取 160 mL, 均分成 8 份, 其中 7 份中分别加入不同添加剂 0.02 g, 使其终质量浓度为 0.1%, 溶解摇匀。另一份不加任何添加剂作为空白对照。每份分装成 4 支 5 mL 西林瓶中, 压铝盖密封, 于 80 °C 水浴保温, 分别在 0、24、48、72 h 各取 1 支室温放冷后作为供试品溶液, 精密吸取 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定丹参酚酸 B 峰面积, 代入回归方程计算其质量浓度, 与保温前的数值相比较, 计算溶液中丹参酚酸 B 的变化率。结果见表 1。