

正交设计结合药效学实验优选桂栀助眠胶囊提取工艺研究

杜正彩¹, 齐彪^{2#}, 张明哲¹, 韦燕霞², 李丽洁², 郝二伟³, 侯小涛², 胡小勤^{2*}, 邓家刚^{3*}

1. 广西中医药大学 科学实验中心, 广西 南宁 530001

2. 广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530001

3. 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530001

摘要: 目的 优选桂栀助眠胶囊最佳提取工艺。方法 在单因素实验结果基础上, 采取正交试验法, 以干膏得率和栀子苷转移率为指标, 考察加水量、提取时间、提取次数 3 个因素, 优选桂栀助眠胶囊最佳水提工艺; 以药液浓度、药液含醇量、醇沉时间为考察因素, 优选桂栀助眠胶囊最佳醇沉工艺; 通过改善睡眠药效学实验对醇沉前后提取物进行比较。结果 桂栀助眠胶囊最佳水提工艺为加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 0.5 h; 最佳醇沉工艺为水提滤液浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 1 g, 药液含醇量为 80%, 醇沉时间为 12 h。与阴性对照组比较, 桂栀助眠胶囊水提取物能延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间($P < 0.01$), 且能增加戊巴比妥钠阈下剂量小鼠入睡率($P < 0.05$); 水提醇沉物有延长巴比妥钠小鼠睡眠时间, 增加小鼠入睡率的趋势, 但差异无显著性($P > 0.05$)。结论 醇沉前后提取物药效存在差异, 为不影响药效, 最终选择水提工艺作为制剂的最佳提取工艺。

关键词: 正交设计; 药效学; 桂栀助眠胶囊; 栀子苷; 提取工艺; 戊巴比妥钠

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0618-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.013

Optimization of extraction technology of Guizhi Zhumian Capsule by orthogonal design and pharmacodynamics test

DU Zheng-cai¹, QI biao², ZHANG Ming-zhe¹, WEI Yan-xia², LI Li-jie², HAO Er-wei³, HOU Xiao-tao², HU Xiao-qin², DENG Jia-gang³

1. Science Experimental Center of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Faculty of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

3. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530001, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of Guizhi Zhumian Capsules (GZC). **Methods** Based on the analysis of the single factor experiment results, the orthogonal test method was adopted to study the three factors including the amount of water added, extraction time, and extraction frequency by taking the dry extract yield of the medicinal materials and transfer rate of geniposide as indicators to optimize the water extraction process of GZC. To optimize the alcohol precipitation process of GSC, these factors including the concentration of the medicinal materials, alcohol content, and time of alcohol precipitation were investigated. The extracts before and after alcohol precipitation were compared by improving sleep pharmacodynamics. **Results** The best water extraction technology of GZC was decocted three times with 10 times of water, 0.5 h each time. The optimal alcohol precipitation process was to concentrate the filtrate of water extraction to 1 mL, which was equivalent to 1 g of the original medicinal materials, with 80% alcohol content and 12 h alcohol precipitation time. Compared with the negative control group, the water extract group of GZC could prolong the sleep time of pentobarbital sodium mice and increase the sleep rate of mice under the lower dose of pentobarbital sodium valve ($P < 0.05$). The water extract group and the water extract and alcohol precipitation showed a trend of shortening the sleep

收稿日期: 2018-10-14

基金项目: 广西中药药效研究重点实验室(省级)开放课题(17-259-20-P5); 广西中药药效研究重点实验室项目(17-259-20); 广西农作物废弃物功能成分研究协同创新中心

作者简介: 杜正彩(1972—), 硕士, 副主任药师, 从事中药药效筛选及新产品开发研究。E-mail: duzhengcai8@163.com

*通信作者 邓家刚, 广西终身教授。E-mail: dengjg53@126.com

胡小勤, 博士, 教授。E-mail: hxqok69052@163.com

#并列第一作者 齐彪, 男, 在读硕士。Tel: 18656705035 E-mail: 1534367833@qq.com

latent period of the mice with barbiturate sodium, but there was no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The pharmaceutical efficacy of the extract before and after alcohol precipitation was different. In order not to affect the drug effect, the water extraction process was finally selected as the best extraction process.

Key words: orthogonal design; pharmacodynamics; Guizhi Zhumian Capsule; geniposide; extraction technology; pentobarbital sodium

桂槌助眠方是第 6 批全国老中医药专家学术继承指导老师邓家刚教授根据长期从事临床和中药研究的实践, 结合经典名方“交泰丸”的立意, 选用肉桂、栀子 2 味药食两用药材, 用于辅助治疗心肾不交、心火偏亢所致的失眠症。君药栀子具有清心除烦之功效^[1], 其有效成分栀子苷具有改善睡眠的作用^[2], 反佐药肉桂具有补火助阳、引火归元之功效^[1], 挥发油是肉桂镇静安神的化学物质基础^[3-5]。本课题组为了将桂槌助眠方开发成具有改善睡眠功效的中药保健食品, 采取正交设计结合药效学实验优选桂槌助眠胶囊(Guizhi Sleeping Capsules, GSC)最佳提取工艺, 为 GSC 的研发提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; RE-52AA 型真空旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-III A 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; ELMA Elmasonic P120H 型超声波清洗器, 德国 Elma 公司; Mettler Toledo ME204 型万分之一电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; FD56 型恒温鼓风干燥箱, 上海合测实业有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; HDM-500 型恒温电热套, 江苏天由有限公司; JG-30 型高速万能粉碎机, 上海市精益工贸有限公司; TGL-16M 型医用离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; HH-S8 数显型恒温水浴锅, 金坛市医疗仪器厂。

1.2 试药

栀子, 批号 20180117, 南宁市京昌中药饮片有限公司; 肉桂, 批号 20180101, 南宁生源中药饮片有限责任公司; 以上药材经广西中医药大学药学院韦松基教授鉴定栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥树皮, 均符合《中国药典》2015 年版规定; 栀子苷对照品, 批号 11079-201718, 质量分数 97.6%, 中国食品药品检定研究院; 地西洋片, 上海上药信谊药厂有限公司, 批号 14170401W; 0.9%氯化钠注射液, 回音必集团(江西)东亚制药有限公司, 批号 2018022312;

巴比妥钠、戊巴比妥钠, Sigma 公司; 乙腈、甲醇, 色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠 120 只, 体质量 (20 ± 2) g, 雄性, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(湘) 2016-0002。

2 方法和结果

2.1 栀子苷含量的测定^[6]

2.1.1 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 进样量为 10 μL; 以乙腈-水 (12:88) 为流动相; 检测波长为 238 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 理论板数按栀子苷峰计算不低于 1 500。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品 8.20 mg, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取水提或水提醇沉后干膏粉末(过四号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 20 min (功率 200 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 阴性对照样品溶液的制备 按处方比例栀子-肉桂 5:1, 称取肉桂干膏适量, 按“2.1.3”项方法制成阴性样品溶液。

2.1.5 系统适应性试验和专属性试验 分别精密吸取栀子苷对照品溶液、供试品溶液、阴性对照样品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 色谱图见图 1。结果表明栀子苷保留时间为 14.513 min, 栀子苷与供试品其他组分分离度良好 ($R > 1.5$), 阴性对照品无干扰。色谱图见 1。

2.1.6 栀子苷标准曲线的制备 分别精密吸取“2.1.2”项对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 在“2.1.1”项色谱条件下记录栀子苷峰面积。以色谱峰面积为纵坐标 (Y), 对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得线性回归方程为 $Y = 16\,311\,219 X - 47\,220$, $r^2 = 0.999\,9$, 表明栀子苷在 16.40~

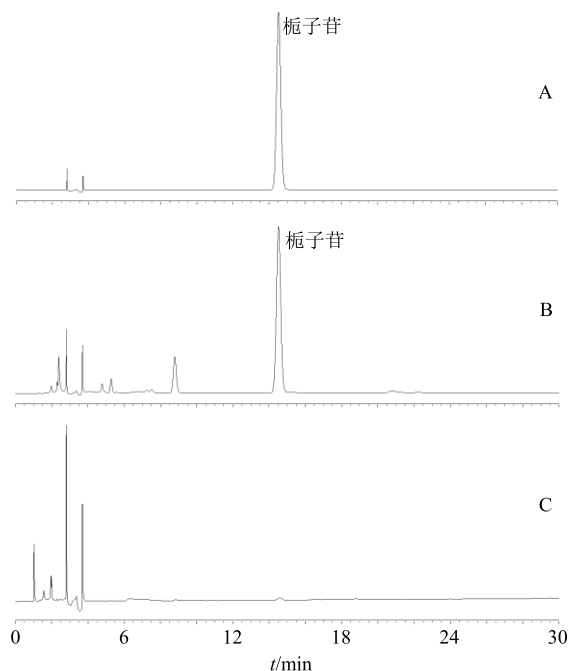


图 1 栀子苷对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of geniposide reference substance (A), sample (B), and negative control (C)

164.04 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 取“2.1.2”项对照品溶液，重复进样 6 次，每次精密吸取 10 μL ，记录栀子苷的峰面积，并计算 RSD 值。结果表明，其 RSD 为 0.14%，精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样，每次进样 10 μL ，记录栀子苷的峰面积，并计算 RSD 值。结果表明，其 RSD 为 1.34%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 精密称取同一批水提浸膏 6 份，按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液，每份样品精密吸取 10 μL 进样，记录栀子苷的峰面积，计算栀子苷质量分数。结果浸膏中栀子苷平均质量分数为 109.79 mg/g，RSD 为 1.13%，表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取 6 份水提浸膏，每份 0.05 g（已知干膏含量 108.78 mg/g），分别加入栀子苷对照品溶液（1.814 4 mg/mL）3 mL，按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液，每份样品精密吸取 10 μL 进样，记录栀子苷的峰面积，计算加样回收率。结果平均回收率为 100.52%，RSD 为 1.15%。

2.1.11 样品测定 精密称取单因素及正交试验浸膏样品，按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液，进

样测定。每份样品重复测定 2 次，根据线性回归方程，计算样品中栀子苷含量平均值。

2.2 水提工艺优选

2.2.1 水提干膏得率的测定 取适量的肉桂粗粉 20 g，加 8 倍量水浸泡 1 h，蒸馏 5 h，收集挥发油，蒸馏后的水溶液滤过另器收集；然后肉桂药渣与栀子（共 120 g）按照单因素及正交试验安排进行提取，合并滤液与上述蒸馏液，精密量取 20 mL 样品溶液至干燥恒定质量的蒸发皿，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸发水分。常压 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒定质量，置干燥器冷却 1 h，迅速称定质量，计算得膏率。

2.2.2 水提工艺评价指标 通过对栀子功效性成分及药典标志性成分分析，栀子苷转移率越高，提取效果越好，可作为考察提取效果的主要指标，权重系数为 0.6，同时，兼顾桂枝助眠方中其他有效成分，干膏得率作为次要指标，权重系数为 0.4，因此以干膏得率和栀子苷转移率为评价指标，对水提工艺进行综合评分。

干膏得率 = 水提液总体积 $\times$ 干膏质量 / (取样体积 $\times$ 原药材质量)

水提栀子苷转移率 = 干膏栀子苷含量 $\times$ 干膏质量 / (原药材栀子苷含量 $\times$ 原药材质量)

水提综合评分 = 干膏得率 / 最大干膏得率 $\times$ 40 + 栀子苷含量 / 最大栀子苷含量 $\times$ 60

2.2.3 水提工艺单因素考察 参考相关文献报道^[7]，影响水提工艺的主要因素加水量、提取时间、提取次数，以栀子苷转移率和干膏得率为指标，分别对每个因素设置 5 个水平优选出最优的 3 个水平。

(1) 加水量：准确称取药材 5 份，每份 120 g，取适量的肉桂粗粉 20 g，加 8 倍量水浸泡 1 h，蒸馏 5 h，收集挥发油，蒸馏后的水溶液滤过另器收集，室温下 100 g 栀子、肉桂药渣分别加 6、8、10、12、14 倍量水浸泡 0.5 h，加水煎煮 2 次，每次 1 h。以考察加水量对干膏得率、栀子苷转移率的影响。由表 1 可知，加水量对综合评分影响较大，随着加水量的增加，综合评分先升高再降低，加水量 10 倍时综合评分最高。结合经济成本，故选取加水量为 6、8、10 倍量作为正交试验的 3 个水平。

(2) 提取时间：室温下 100 g 栀子、肉桂药渣加 8 倍量水分别浸泡 0.5 h，煎煮 2 次，每次分别煎煮 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h，以考察提取时间对干膏得率、栀子苷含量影响。其余条件同“2.2.3 (1)”项。由表 2 可知，提取时间对挥发油包合物综合评

分影响较大,随着提取时间的增大,1.0 h 时综合评分达最高峰,大于 1.0 h 有下降趋势。故选择 0.5、1.0、1.5 h 3 个水平进入正交试验。

(3) 提取次数:室温下 100 g 栀子、肉桂药渣加 8 倍量水浸泡 0.5 h,分别加水煎煮 1、2、3、4、5 次,每次 1 h,以考察提取次数对干膏得率、栀子苷含量影响。其余条件同“2.2.3 (1)”项。由表 3 可知,提取次数对综合评分影响较大,随着提取次

表 1 加水量对水提效果的影响

Table 1 Influence of water addition on water extraction effects

加水量/倍	得膏率/%	栀子苷转移率/%	综合评分
6	25.42	60.34	88.85
8	28.17	66.49	98.12
10	28.83	66.82	99.33
12	28.50	66.97	99.01
14	28.25	67.57	99.20

表 2 提取时间对水提效果的影响

Table 2 Influence of extraction duration on water extraction effects

提取时间/h	得膏率/%	栀子苷转移率/%	综合评分
0.5	24.83	65.76	91.99
1.0	28.00	69.82	100.00
1.5	26.42	65.25	93.81
2.0	26.16	64.20	92.54
2.5	26.42	64.72	93.36

表 4 水提工艺正交试验结果

Table 4 Orthogonal experiment result of water extraction technologies

试验号	A/倍	B/h	C	D(空白)	得膏率/%	栀子苷转移率/%	综合评分
1	6 (1)	0.5 (1)	1 (1)	(1)	18.67	45.41	66.60
2	6 (1)	1.0 (2)	2 (2)	(2)	24.67	59.57	87.61
3	6 (1)	1.5 (3)	3 (3)	(3)	25.58	53.54	83.38
4	8 (2)	0.5 (1)	2 (2)	(3)	24.17	56.57	84.21
5	8 (2)	1.0 (2)	3 (3)	(1)	28.67	64.03	97.10
6	8 (2)	1.5 (3)	1 (1)	(2)	20.83	46.88	70.87
7	10 (3)	0.5 (1)	3 (3)	(2)	29.42	66.10	100.00
8	10 (3)	1.0 (2)	1 (1)	(3)	22.83	53.05	79.20
9	10 (3)	1.5 (3)	2 (2)	(1)	26.83	61.79	92.57
K ₁	237.59	250.81	216.67	256.27			
K ₂	252.18	263.91	264.39	258.48			
K ₃	271.77	246.82	280.48	246.79			
R	34.18	17.09	63.81	11.69			

表 3 提取次数对水提效果的影响

Table 3 Influence of extraction times on water extraction effects

提取次数	得膏率/%	栀子苷转移率/%	综合评分
1	22.67	55.05	75.01
2	28.83	67.34	93.08
3	29.67	69.29	95.78
4	31.83	68.68	97.86
5	33.17	64.56	95.90

数的增加,综合评分显著增加,当提取次数为 2 次后,综合评分增加缓慢,趋于平稳。考虑企业生产周期、降低生产成本,故正交试验提取次数选取 1、2、3 次。

2.2.4 正交试验优选最佳水提工艺 在单因素考察的基础上,以得膏率、栀子苷转移率为评价指标,选定加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,采用 L₉(3⁴) 表进行正交试验,优选出最佳的提取工艺。见表 4、5。

由正交试验直观分析表明,3 个主要因素对药材水提效果的影响程度依次是 C(提取次数)>A(加水量)>B(提取时间),各因素不同水平程度依次是 A₃>A₂>A₁、B₂>B₁>B₃、C₃>C₂>C₁,再通过方差分析表进一步分析,C(提取次数)对药材水提效果有统计学差异(P<0.05)。而 A(加水量)和 B(提取时间)对药材水提效果没有统计学差异(P>0.05)。综合评分表明最佳水提工艺为

表 5 水提工艺方差分析

Table 5 Variance analysis of water extraction technologies

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	196.101 0	2	7.626 7	
B	53.288 7	2	2.072 5	
C	734.200 3	2	28.554 5	$P < 0.05$
D(误差)	25.712 3	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

$A_3B_1C_3$, 即加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 0.5 h。

2.2.5 验证试验 按照处方比例, 称取药材 120 g (栀子 100 g、肉桂 20 g), 即称取肉桂粗粉 20 g, 加 8 倍量水浸泡 1 h, 蒸馏 5 h, 收集挥发油, 蒸馏后的水溶液滤过另器收集, 栀子及肉桂药渣加 10 倍量水浸泡 0.5 h, 加水煎煮 3 次, 每次 0.5 h, 合并滤液与上述蒸馏液, 浓缩至相对密度为 1.08~1.10 (60 °C), 真空干燥 (0.08~0.10 MPa, 80 °C) 成干浸膏。进行 3 次重复试验, 测得得膏率平均值为 29.67%, RSD 为 1.57%; 栀子苷转移率平均值为 68.14%, RSD 为 3.31%。结果 (表 6) 表明验证试验结果和正交试验综合评分最大值相当, 说明该水提工艺稳定、可靠。

2.3 醇沉工艺

2.3.1 醇沉干膏得率的测定 按照优选的最佳水提工艺, 按照正交试验安排进行醇沉, 抽滤, 滤液减压浓缩 (50 °C) 至适量, 精密量取 10 mL 样品溶液至干燥恒定质量的蒸发皿, 真空 (0.08~0.10 MPa, 105 °C) 干燥至恒定质量, 置干燥器冷却 1 h,

表 6 水提工艺验证试验结果

Table 6 Verification test of water extraction technologies

编号	得膏率/%	栀子苷转移率/%
1	29.58	66.14
2	29.25	67.70
3	30.17	70.59

迅速称定质量, 计算得膏率。

2.3.2 醇沉工艺评价指标 考虑到中药水提液杂质较多, 为降低出膏率, 减少患者的服用量, 提高制剂稳定性, 以干膏得率 (权重系数占 0.40)、栀子苷转移率 (权重系数占 0.60) 为评价指标, 对醇沉工艺进行综合评分。

干膏得率 = 醇沉液总体积 × 干膏质量 / (取样体积 × 原药材质量)

醇沉栀子苷转移率 = 干膏栀子苷含量 × 干膏质量 / (原药材栀子苷含量 × 原药材质量)

醇沉工艺综合评分 = 最小干膏得率 / 干膏得率 × 40 + 栀子苷含量 / 最大栀子苷含量 × 60

2.3.3 醇沉精制工艺优选^[8-9]

(1) 正交试验优选最佳工艺: 经前期试验研究, 以得膏率、栀子苷转移率为评价指标, 影响醇沉效果因素主要有药液质量浓度 (A)、药液含醇量 (B)、醇沉时间 (C), 称等量的 9 份药材 (栀子 100 g、肉桂 20 g), 按最佳水提工艺制备药液, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验及方差分析, 优选出最佳醇沉工艺。结果见表 7、8。

表 7 醇沉工艺正交试验结果

Table 7 Orthogonal experiment result of alcohol precipitation

实验号	A/(g·mL ⁻¹)	B/%	C/h	D(误差)	得膏率/%	栀子苷转移率/%	综合评分
1	0.5 (1)	60 (1)	12 (1)	(1)	17.17	54.61	74.37
2	0.5 (1)	70 (2)	24 (2)	(2)	15.92	55.52	76.87
3	0.5 (1)	80 (3)	36 (3)	(3)	16.08	60.91	81.96
4	1.0 (2)	60 (1)	24 (2)	(3)	13.58	44.75	70.09
5	1.0 (2)	70 (2)	36 (3)	(1)	11.58	43.28	73.14
6	1.0 (2)	80 (3)	12 (1)	(2)	13.17	60.01	85.93
7	1.5 (3)	60 (1)	36 (3)	(2)	8.83	30.68	70.22
8	1.5 (3)	70 (2)	12 (1)	(3)	11.08	42.72	73.96
9	1.5 (3)	80 (3)	24 (2)	(1)	10.00	42.54	77.22
K_1	233.20	214.68	234.26	224.73			
K_2	299.16	223.97	224.18	233.02			
K_3	221.40	245.11	225.32	226.01			
R	11.80	30.43	10.08	8.29			

表 8 醇沉工艺方差分析

Table 8 Variance analysis of alcohol precipitation

方差来源	偏差平方和	自由度	F	显著性
A	23.975 5	2	1.805 6	无
B	162.132 1	2	12.210 5	无
C	20.314 4	2	1.529 9	无
D(误差)	13.278 1	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

由正交试验直观分析表明, 3 个主要因素对药材醇沉效果的影响程度依次是 B(药液含醇量) > A(药液质量浓度) > C(醇沉时间), 各因素不同水平程度依次是 $A_1 > A_2 > A_3$, $B_3 > B_2 > B_1$, $C_1 > C_2 > C_3$, 再通过方差分析表进一步分析, A(药液质量浓度)、B(药液含醇量)、C(醇沉时间)对醇沉效果没有显著性影响 ($P > 0.05$)。综合评分表明最佳醇沉工艺为 $A_2B_3C_1$, 即水提滤液浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 1 g, 药液含醇量为 80%, 醇沉时间为 12 h。

(2) 验证试验: 按照处方比例, 称取药材 120 g(栀子 100 g、肉桂 20 g), 即称取肉桂粗粉 20 g, 加 8 倍量水浸泡 1 h, 蒸馏 5 h, 收集挥发油, 蒸馏后的水溶液滤过另器收集, 按照上述优选的最佳水提工艺制备水提液, 滤过, 合并滤液与上述蒸馏液, 浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 1 g, 加入乙醇至含醇量为 80%, 静止 12 h, 抽滤, 滤液减压浓缩 (-0.08 MPa, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) 至相对密度为 $1.20 \sim 1.25$ ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$), 真空干燥 ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 成干浸膏。进行 3 次重复试验, 测得得膏率平均值为 13.22%, RSD 为 2.20%; 栀子苷转移率为 60.14%, RSD 为 1.66%。说明此醇沉工艺稳定、可靠。见表 9。

2.4 药效学实验筛选最佳提取工艺

2.4.1 实验药物制备

(1) 栀子-肉桂水提物制备: 以上 2 味药, 称取肉桂 50 g、栀子 250 g, 按照最优水提工艺制备栀子-肉桂水提物(棕色至红棕色粉末, 1 g 药粉相当于原生药 3.37 g), 粉碎成细粉, 过 80 目, 备用;

表 9 醇沉工艺验证试验结果

Table 9 Verification test of alcohol precipitation

编号	得膏率/%	栀子苷转移率/%
1	13.50	60.51
2	12.92	59.01
3	13.25	60.90

使用前将肉桂挥发油混入药粉, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

(2) 栀子-肉桂水提醇沉提取物制备: 以上 2 味药, 称取肉桂 50 g, 栀子 250 g, 按照最优水提醇沉工艺制备栀子-肉桂水提醇沉提取物(棕色至红棕色粉末, 1 g 药粉相当于原生药 7.56 g), 其余条件同“2.4.1 (1)”项。

2.4.2 改善睡眠功能评价方法^[10]

(1) 直接睡眠实验与延长戊巴比妥钠睡眠时间实验: 选取昆明种小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 设阴性对照组(生理盐水)、西药阳性对照组(地西洋 1.51 mg/kg)、栀子-肉桂水提物组 0.59 g/kg (生药量为 2.00 g/kg)、栀子-肉桂水提醇沉物组 0.26 g/kg (生药量为 2.00 g/kg), 每组 10 只, 各组小鼠每天 $\text{ig } 10\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$, 连续 30 d。第 29 天给小鼠 $\text{ig } 60\text{ min}$ 后, 以动物的翻正反射消失超过 $30 \sim 60\text{ s}$ 判为进入睡眠, 翻正反射恢复即为动物觉醒, 观察各组小鼠给予受试物入睡动物数; 第 30 天, $\text{ig } 15\text{ min}$ 后, 给各组小鼠 ip 戊巴比妥钠 42 mg/kg , 注射量为 10 mL/kg , 以翻正反射消失 1 min 为指标, 观察受试样品能否延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间。

(2) 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验: 受试样品给予时间设计同“2.4.2 (1)”项, 小鼠末次 $\text{ig } 15\text{ min}$ 后, 给各组小鼠 ip 戊巴比妥钠最大阈下剂量 32 mg/kg , 注射量 10 mL/kg , 记录 30 min 内各组入睡动物数(翻正反射消失达 1 min 以上者)。

(3) 巴比妥钠睡眠潜伏期实验: 剂量分组及受试样品给予时间设计同“2.4.2 (1)”项, 小鼠末次 $\text{ig } 15\text{ min}$ 后, 给各组小鼠 ip 巴比妥钠, 剂量 280 mg/kg , 注射量 10 mL/kg , 以翻正反射消失 1 min 为指标, 观察受试样品对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响。

(4) 统计方法: 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 直接睡眠小鼠入睡率和戊巴比妥钠阈下剂量入睡率为计数资料, 采用 χ^2 检验; 其余指标为计量资料, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 方差齐性组间进行 LSD 检验, 方差不齐者采用 Tamhane's T2 检验。

2.4.3 结果

(1) 对小鼠体质量的影响: 结果(表 10)表明, 在延长戊巴比妥钠睡眠时间实验、戊巴比妥钠阈下剂量实验、巴比妥钠睡眠潜伏期实验中, 与阴性对照组相比给药组小鼠体质量无明显差异 ($P > 0.05$), 表明不同提取工艺对小鼠的体质量无明显影响。

(2) 对小鼠直接睡眠的影响: 结果(表 11)表明, 各组动物在 1 h 内均未出现睡眠现象, 表明 GSC

不同提取物无明显直接催眠作用, 可通过其他 3 项实验确定进行筛选最佳提取工艺。

表 10 GSC 不同提取物对小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 10 Effects of GSC different extracts on mice body mass ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	延长戊巴比妥钠睡眠时间实验			戊巴比妥钠阈下剂量实验			巴比妥钠睡眠潜伏期实验		
		初期体质量/g	中期体质量/g	末期体质量/g	初期体质量/g	中期体质量/g	末期体质量/g	初期体质量/g	中期体质量/g	末期体质量/g
阴性对照	0	21.91±0.86	32.57±4.48	37.26±2.55	21.86±0.79	32.58±2.26	36.27±2.36	21.77±0.93	32.37±4.25	35.96±3.18
水提取物	0.59	21.52±0.68	33.07±3.27	35.11±2.28	21.56±0.62	32.79±2.08	34.02±2.56	21.46±0.76	32.87±3.49	34.30±2.05
水提醇沉 提取物	0.26	21.94±1.20	31.33±1.70	35.94±1.67	21.78±1.19	31.33±1.54	34.52±1.50	21.68±1.18	31.43±1.51	35.04±1.94
地西洋片	0.001 5	21.78±0.81	30.59±2.32	35.34±1.85	21.82±0.73	31.06±2.06	34.15±2.42	21.82±0.77	31.19±2.30	34.44±2.07

表 11 GSC 不同提取物对小鼠直接睡眠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 11 Effects of GSC different extracts on mice direct sleep ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数	入睡动物数	入睡率/%
阴性对照	0	10	0	0
水提取物	0.59	10	0	0
水提醇沉提取物	0.26	10	0	0
地西洋片	0.001 5	10	0	0

(3) 延长戊巴比妥钠睡眠实验: 结果(表 12)表明, 与阴性对照组相比, GSC 水提取物组、地西洋组能延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间 ($P < 0.01$); 水提醇沉提取物组对小鼠的睡眠时间有延长趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); 经两两比较, 水提取物组延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间效果优于水提醇沉提取物组, 差异显著 ($P < 0.01$)。

(4) 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验: 结果(表 13)表明, 与阴性对照组相比, GSC 水提取物组、地西洋组能增加戊巴比妥钠阈下剂量小鼠入睡率

表 13 GSC 不同提取物对戊巴比妥钠阈下剂量入睡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 13 Effects of GSC different extracts on sleep rate of sodium pentobarbital subthreshold dose ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数	入睡动物数	入睡率/%
阴性对照	0	10	1	10
水提取物	0.59	10	7	70*
水提醇沉提取物	0.26	10	3	30
地西洋片	0.001 5	10	10	100**

($P < 0.05$ 、 0.01); 经两两比较, 水提取物组提高戊巴比妥钠阈下剂量小鼠入睡率, 效果优于水提醇沉提取物组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。

(5) 巴比妥钠睡眠潜伏期实验: 结果(表 14)表明, 与阴性对照组相比, 地西洋组能明显缩短巴比妥钠小鼠睡眠潜伏期 ($P < 0.01$); 其余各组结果差异无显著性 ($P > 0.05$); 经两两比较, 水提醇沉提取物组与水提取物组缩短巴比妥钠小鼠睡眠潜伏期差异不大, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中药复方制剂的临床疗效是由方中各味药物协同发挥作用的结果, 因此一般以有效成分及干膏得

表 12 GSC 不同提取物对戊巴比妥钠睡眠时间的的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 12 Effects of GSC different extracts on pentobarbital sodium sleep time ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	睡眠时间/min
阴性对照	0	28.20±16.86
水提取物	0.59	53.50±10.17**
水提醇沉提取物	0.26	30.10±17.18 ^{##}
地西洋片	0.001 5	146.40±19.87**

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与水提物组比较:

^{##} $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group; ^{##} $P < 0.01$ vs water extract, same as below

表 14 GSC 不同提取物对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 14 Effects of GSC different extracts on barbital sodium sleeping incubation period ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	睡眠潜伏期/min
阴性对照	0	33.90±7.69
水提取物	0.59	31.80±7.79
水提醇沉提取物	0.26	28.10±4.77
地西洋片	0.001 5	22.80±3.71**

率加权综合评分,反映整体提取效果^[11],在水提工艺实验中,栀子苷转移率越高,提取效果越好,可作为考察提取效果的主要指标,权重系数占 0.6,同时,兼顾干膏得率,作为次要指标,权重系数分别为 0.4。在醇沉工艺中,为方便制剂,试验中尽可能保留有效成分,尽可能除去无效成分^[12],因此希望干膏得率越低越好,栀子苷转移率越高越好,但有效成分的转移率应占主导地位,所以本实验得膏率评分为最小干膏得率/干膏得率,权重系数分别为 0.4,栀子苷转移率权重系数占 0.6。

本实验曾参考相关文献报道^[13-16],以不同比例的乙腈-水(15:85、12:88、10:90)为流动相、甲醇-水(20:80)测定干浸膏中栀子苷的含量,结果以乙腈-水(12:88)为流动相等度洗脱,分离效果及峰形最佳,保留时间适中,经过多次重复试验,其分离效果和保留时间稳定,最终确定以乙腈-水(12:88)为流动相。

肉桂挥发油是肉桂传统功效“补火助阳,引火归元”的主要药效物质基础^[17],因此,其挥发油可作为肉桂质量标志物的首要选择,前期课题组以挥发油提取率为指标,考察浸泡时间、加水量、提取时间 3 个因素,优选出挥发油最佳提取工艺,故本实验制剂工艺设计先通过水蒸气蒸馏法收集肉桂挥发油,再进一步进行 GSC 水提醇沉工艺优选,以保证药效学筛选制剂工艺的合理性。

以往制剂工艺研究中,往往局限于选取一个指标或者多个指标为考察指标,优选出最佳提取工艺^[18-19],为避免以化学成分为指标造成评价的片面性和局限性,本实验采取指标成分和药效学结合优选出 GSC 的提取工艺,结果表明,GSC 水提物在药效强度上更优于水提醇沉提取物,分析原因如下:其一,中药水提物更能够体现中医药特色,能够最大限度地保留水煎剂的有效成分。其二,水提醇沉提取物虽然能够富集有效成分,除去杂质,减少服用量,但也可能除去引起协同作用的有效成分,使其药效降低。

本研究表明,ig 给予小鼠不同受试物 30 d,GSC 水提取组和水提醇沉物组小鼠在 60 min 内,均未有直接睡眠现象;与阴性对照组比较,水提取物组能延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间,且能增加戊巴比妥钠阈下剂量小鼠入睡率($P<0.05$);水提取物组、水提醇沉组均有缩短巴比妥钠小鼠睡眠潜伏期的趋

势,但无显著性差异($P>0.05$)。故醇沉前后提取物药效存在差异,为不影响药效,最终选择水提工艺作为制剂的最佳提取工艺。

参考文献

- [1] 钟赣生. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [2] 李智欣, 肖韦华, 何计国, 等. 栀子中改善睡眠成分的研究 [J]. 农产品加工(学刊), 2006, 73(8): 79-82.
- [3] 王雅琪, 杨园珍, 伍振峰, 等. 中药挥发油传统功效与现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 455-461.
- [4] 吴明侠, 王淑美, 梁生旺, 等. 交泰丸的配伍化学成分研究 [J]. 中成药, 2005, 27(9): 1119-1121.
- [5] 盛亚男. 交泰丸镇静催眠的有效成分研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 王虹玉, 喇孝瑾, 白素芬, 等. 正交试验法优选栀子豉汤的水提工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 36-38.
- [8] 郝博, 杜守颖, 洪燕龙, 等. 中药栀子提取工艺的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(8): 715-717.
- [9] 毕宏生, 郭俊国, 解孝锋. 正交试验优选栀子的水提醇沉工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 19-23.
- [10] 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003.
- [11] 谢松, 卞晓岚, 陈敬贤, 等. 葛芪颗粒水提醇沉工艺的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(8): 1723-1726.
- [12] 李天辰, 沈侃, 韩伟. 益气散聚方的水提醇沉工艺研究 [J]. 中成药, 2012, 34(11): 2257-2261.
- [13] 雷鹏, 刘韶, 李新中, 等. 对《中国药典》2005 年版一部栀子药材中栀子苷含量测定方法的探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 225-227.
- [14] 贺康洪, 侯佳宁, 张紫东, 等. HPLC 法测定肝血管瘤活血胶囊中栀子苷的含量 [J]. 解放军药理学学报, 2014, 30(6): 530-534.
- [15] 田香, 玉华, 白玉霞. HPLC 法测定蒙药如达七味散中栀子苷的含量 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2016, 31(2): 152-155.
- [16] 冯华, 聂明华, 邹孔强, 等. 高效液相色谱法测定连朴饮不同煎液中栀子苷的含量 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2012, 12(9): 809-811.
- [17] 侯小涛, 郝二伟, 秦健峰, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [18] 李卿, 梁旭明, 杜洪飞, 等. 正交试验法优化痛风消颗粒水提醇沉工艺 [J]. 中国药房, 2016, 27(4): 518-521.
- [19] 陈恒文, 张翠英, 任伟光, 等. 多指标综合评分法优化宣痹安痛方的水提醇沉工艺 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 70-74.