

健脑益智胶囊提取工艺研究*

赵晓平^{1**} 吕杨² 范小璇¹ 侯文¹ 郭东艳^{2***}

(1. 陕西中医学院附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 目的 优化健脑益智胶囊水提工艺条件。方法 采用正交试验设计法,以葛根素、多糖含量及出膏率作为评价指标,考察加水量、煎煮时间、煎煮次数对健脑益智胶囊水提工艺的影响。结果 正交试验优选确定的工艺条件为加10倍量水,煎煮3次,每次2h。结论 健脑益智胶囊的水提工艺条件合理、稳定、可行。

关键词: 健脑益智胶囊; 水提工艺; 正交试验

中图分类号: R 94 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2013)05-0083-03

健脑益智胶囊为陕西中医学院附属医院院内制剂,主要由水蛭、白茅根、石菖蒲、郁金、葛根等药味组成,具有化痰利水、豁痰开窍的功效,临床上主要用于颅脑损伤后脑组织水肿和微循环障碍引起的各种症状。现代药理研究结果表明处方中所含药材白茅根,其水提液对正常家兔有利尿作用^[1-3];此外石菖蒲水溶性成分能有效清除自由基、阻止过氧化物形成,减少NO的神经毒性,对脑细胞具有保护作用^[4-6],故拟对其进行水提,并对其工艺条件进行考察,为进一步生产提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 材料 试验用饮片均购于西安盛兴中药饮片有限责任公司,经鉴定符合《中国药典》(2010年版一部)各饮片项下的规定。葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号为:110752-200511),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.2 仪器 日立L-2000型高效液相色谱仪,L-2400型紫外检测器,L-2130型泵,EZStart工作站;MP5002电子天平(百分之一);BMETTLER TOLEDO电子天平(万分之一),T-25S电子天平(十

万分之一);WJN-50多功能真空(提取、分离蒸馏)浓缩机;D101型电热鼓风干燥箱;ZKF040型真空干燥箱。

2 方法与结果

2.1 浸泡时间及吸水率的考察 根据处方量称取白茅根、葛根、石菖蒲、郁金3份,每份62.1g,加5倍量水进行浸泡,每30min观察一次浸润程度,待药物完全浸透,记录时间,经观察约1h能够使药物完全透。待药物完全浸透后,滤去多余水分,药渣称重,记录药材吸水后的重量,计算吸水率。结果表明,药材的吸水率为200.4%,即在首次加水时应多加2倍量。

2.2 水提工艺考察的试验设计

2.2.1 评价指标的测定 (1) 葛根素含量测定。

①仪器与试剂。日立L-2000型高效液相色谱仪,L-2400型紫外检测器,L-2130型泵,EZStart工作站。乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

②色谱条件与系统适用性。色谱柱Kromasil ODSC₁₈(5 μm A, 6 mm × 250 mm),甲醇-水(30:70)为流动相,流速为1.0 mL/min,检测波长按《中国药典》2010版一部葛根素的测定条件为250 nm,

* 基金项目: 陕西省科技厅资助项目(2011KTCL03-02)

** 作者简介: 赵晓平(1963年-)男,主任医师、教授,研究方向: 脑外伤及脑血管病的中西医结合治疗研究。

*** 通讯作者: 郭东艳(1973年-)女,博士,教授,主要研究方向: 中药新制剂与新剂型的研究。Tel: (029) 38185180, E-mail: winter180@163.com.

柱温: 室温。在此条件下, 样品中葛根素与相邻的杂质峰均达到基线分离。缺葛根阴性对照在葛根素峰处无峰出现, 不干扰本品的测定。

③对照品溶液的制备。取葛根素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.0435 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

④供试品溶液制备。分别精密称取各样品液 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加入 30% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

⑤标准曲线。分别精密吸取葛根素对照品溶液(浓度 0.0435 mg/mL) 3, 6, 9, 12, 15, 18 μL, 按上述色谱条件注入色谱仪, 测定峰面积。以峰面积 A 为纵坐标, 葛根素含量 C (μg) 为横坐标绘制标准曲线(图 1)。计算的回归方程为: $A = 1E + 07C + 327746$ 相关系数 $r_2 = 0.9997$, 表明葛根素在 0.1305 μg ~ 0.783 μg 之间线性关系良好。

⑥样品测定。依据上述色谱条件对各样品分别进行测定。

(2) 出膏率的测定。精密吸取各提取液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 烘箱内干燥 3 ~ 4 h, 至干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定重量。按下式计算出膏率。

$$\text{出膏率}(\%) = [(\text{浸膏重量} \times 4) / \text{药材重量}] \times 100\%$$

(3) 多糖含量测定。蒽酮试剂的配制精密称取蒽酮 0.2 g 于烧杯中, 缓慢加入浓硫酸 100 mL, 即得。标准葡萄糖溶液的制备: 精密称取葡萄糖标

准品 10.6 mg, 加蒸馏水溶剂并定容至 100 mL 量瓶中, 备用。

标准曲线的绘制: 精密吸取葡萄糖备用液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 mL 置具塞试管中, 分别加蒸馏水使成 2 mL。另精密吸取 2 mL 蒸馏水, 作为空白参比。沿各试管壁缓缓加入 4 mL 冷的蒽酮试剂, 盖紧, 摇匀, 置沸水浴中加热 10 min, 冷水浴中冷却 20 min, 在 622 nm 波长处测定吸光度, 以吸光度 A 值为纵坐标, 葡萄糖浓度 C 为横坐标, 绘制标准曲线。结果表明: 当葡萄糖的浓度在 0.0106 ~ 0.0636 mg/mL 范围内, 浓度与吸光度有良好的线性关系, 回归方程为: $A = 10.404C + 0.0009$, $R_2 = 0.9994$ 。

样品测定: 采用紫外分光光度计在 622nm 波长处测定吸光度值, 代入标准曲线计算含量。

2.2.2 正交试验优选最佳水提工艺 在预实验的基础上, 筛选加水量, 提取时间, 提取次数 3 个因素, 每个因素选择 3 个水平(见表 1), 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 以浸膏得率、多糖含量及葛根素含量的加和为综合指标筛选最佳提取工艺参数。因素水平表见表 1, 正交实验结果及方差分析见表 2、表 3。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	加水量(倍) A	煎煮时间(min) B	煎煮次数 C
1	8	60	1
2	10	90	2
3	12	120	3

表 2 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D	浸膏得率(%)	多糖含量(mg/mL)	葛根素含量(ug/mL)	综合评分
1	1	1	1	1	15.78	34.61	92.04	0.5185
2	1	2	2	2	22.55	52.30	158.94	0.8119
3	1	3	3	3	25.89	63.35	206.78	1.0000
4	2	1	2	3	21.86	47.68	159.93	0.7793
5	2	2	3	1	25.54	56.62	201.07	0.9438
6	2	3	1	2	20.13	47.30	125.60	0.6971
7	3	1	3	2	24.77	53.84	164.27	0.8491
8	3	2	1	3	18.06	41.15	125.23	0.6416
9	3	3	2	1	24.67	52.59	183.40	0.8774
K_1	2.3304	2.1469	1.8572	2.3397				
K_2	2.4202	2.3973	2.4686	2.3581				
K_3	2.3681	2.5745	2.7929	2.4209				
R	0.0299	0.1425	0.3119	0.0271				

CT = 5.6307

表3 正交试验方差分析表

误差来源	离均差平方和	自由度	F比	显著性
A	0.0013	2	1.08	
B	0.0307	2	25.58	*
C	0.1505	2	125.42	**
D(误差)	0.0012	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

试验方法: 称取石菖蒲 10.8 g, 白茅根 27 g, 郁金 10.8 g, 葛根 13.5 g, 共计 62.1 g, 平行 9 份, 按照正交试验因素水平表安排用 $L_9(3^4)$ 正交表进行提取, 滤过, 滤液浓缩并定容至 100 mL 量瓶中, 按 2.1 项下的方法分别计算葛根素含量、出膏率、多糖含量, 进行综合评分。

综合评分 (OD) = $0.2W1/W_{max1} + 0.4W2/W_{max2} + 0.4W3/W_{max3}$

方差分析结果表明: 以综合评分为考察指标, 由表 2 中极差 R 值大小显示, 各因素的作用主次

为 C(提取次数) > B(提取时间) > A(溶剂用量)。表 3 方差分析结果表明: B、C 因素各水平之间差异具有显著性 ($P < 0.05$), A 因素各水平之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。综上所述最终提取工艺确定为: A2B3C3, 即 10 倍水提取 3 次, 每次 2.0 h。

2.3 验证实验 为了考察正交试验的结果是否具有重现性, 进行验证实验。按处方比例称取石菖蒲、白茅根、郁金、葛根, 共 3 份, 每份 62.1 g, 按照优选的工艺条件进行提取, 测定出膏率、多糖及葛根素的含量, 结果见表 4。

表4 验证实验结果

次数	1	2	3	平均值	RSD(%)
多糖含量 (mg/mL)	63.25	63.54	63.06	63.28	0.38
葛根素含量 (ug/mL)	210.06	211.15	209.36	210.19	0.43
出膏率 (%)	26.27	26.41	26.40	26.36	0.30

验证试验结果表明: 该工艺条件合理可行, 具重现性。

3 讨论

健脑益智胶囊为陕西中医学院附属医院院内制剂, 传统应用方式为汤剂, 在提取工艺的考察中, 根据处方药味中所含成分的理化性质及现代药理研究结果, 结合临床用药方式, 最终选择水提。并对影响水提的主要因素浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数进行了考察。确定了最佳水提工艺条件为加 10 倍水提取 3 次, 每次 2.0 h。

评价指标的选择是进行水提工艺优选的关键环节。考虑到中药复方多成分、多靶点的特点, 实验中选择了葛根素含量、出膏率及多糖含量作为评价指标, 并根据其对功能主治的贡献大小, 进行加权评分, 以综合评分作为评价指标, 相对于单一成分而言, 更能体现中药复方的特点。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977, 721 - 723.
- [2] 于庆海, 杨丽君, 孙启时, 等. 白茅根药理研究 [J]. 中药材, 1995, 18(2): 88 - 90.
- [3] 焦坤, 陈佩东, 等. 白茅根研究概况 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(1): 91 - 93.
- [4] 唐洪梅, 招荣, 邓玉群, 等. 石菖蒲挥发油和水溶性成分对癫痫小鼠脑组织 SOD、LPO、NO 的影响 [J]. 中国药师, 2005, 8(12): 983.
- [5] 景玉宏, 冯慎远, 汤晓琴, 等. 石菖蒲对学习记忆的影响及突触机制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(6): 38.
- [6] 胡锦涛, 顾键, 王志旺, 等. 石菖蒲及其有效成分对学习记忆的实验研究 [J]. 中药材, 1999, 22(11): 584.

(收稿日期: 2013 - 06 - 08 编辑: 文颖娟)