

· 论著 ·

复元醒脑颗粒的提取工艺研究

孙莉莉¹, 陈振翼², 秦春霞¹, 胡翔³, 方邦江², 李铁军¹ (1.上海市浦东新区浦南医院药剂科, 上海 200125; 2.上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 3.上海众胜医药科技有限公司, 上海 200125)

[摘要] **目的** 研究复元醒脑颗粒的提取工艺及其工艺优化。**方法** 采用常规提取方法结合药效学实验确定初步提取工艺,使用正交试验法对提取工艺进行优化。**结果** 乙醇回流提取后,水煎煮提取、乙醇沉淀,过滤,浓缩制得浸膏。最佳乙醇回流提取方案为提取2次;乙醇浓度为50%;料液比:第1次8倍,第2次6倍;提取时间:第1次120 min,第2次80 min。最佳水煎煮提取方案为提取2次;提取时间:第1次120 min,第2次80 min;提取温度为100℃;液料比:第1次10倍,第2次8倍。最佳乙醇沉淀工艺为乙醇浓度80%,乙醇用量为2倍,提取时间为16 h。**结论** 采用本优化工艺提取的浸膏制成的复元醒脑颗粒,质量符合《中华人民共和国药典》2015年版(四部)(0104颗粒剂)中的要求。

[关键词] 复元醒脑颗粒;提取;优化;正交试验

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)02-0121-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.006

Study on extraction technology of Fuyuan Xingnao granule

SUN Lili¹, CHEN Zhenyi², QIN Chunxia¹, HU Xiang³, FANG Bangjiang², LI Tiejun¹ (1. Department of Pharmacy, Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, China; 2. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Zhongsheng Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Shanghai 200125, China)

[Abstract] **Objective** To study the extraction technology and optimize the extraction process of Fuyuan Xingnao granule. **Methods** The preliminary extraction process was designed by routine extraction method combined with the results of pharmacological activity experiment. The extraction process was optimized with orthogonal test. **Results** The extract was obtained by ethanol reflux extraction, water decoction extraction or ethanol precipitation followed by filtration and concentration. The optimal process for ethanol reflux extraction was extracting twice with 50% ethanol. The ratio of liquor to dry material was 8:1 for the first time and 6:1 for the second time. The extraction time was 120 minutes for the first time and 80 minutes for the second time. The optimal process for water decoction extraction was extracting twice with 120 minutes and 80 minutes each time. The ratio of liquor to dry material was 10:1 for the first time and 8:1 for the second time. The extraction temperature was 100℃. The best ethanol precipitation process was 16 hour extraction with 80% ethanol. The ratio of ethanol to dry material was 2:1. **Conclusion** The quality of Fuyuan Xingnao granule extract with this optimized extraction process was in line with requirements of *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* 2015, 4 Volumes (0104 granule).

[Key words] Fuyuan Xingnao granule; extraction; optimization; orthogonal test

脑缺血是以脑循环血流量减少为主要病理特征的中枢神经系统疾病,其发病率高、致残率高、病死率高,对人类健康造成严重威胁。中医在治疗中采取扶持元气为主,佐以逐癖化痰、泄热息风、醒脑开

窍之法^[1]。医院经验方复元醒脑汤临床用于治疗急性脑缺血,在降低病死率、减轻脑水肿及改善患者神经功能等方面疗效显著。传统汤剂具有制备简单易行,吸收快,能迅速发挥药效的优点;但汤剂也有缺点,如煎液体积较大、味苦,携带和服用不便;易发霉、发酵、储存时间短;不易大量制备;质量不易控制等。颗粒剂能克服汤剂的缺点,质量可控、稳定、易于储存、可工业化生产,因此,笔者研究并优化了复元醒脑颗粒浸膏的提取工艺,为报批医院制剂提供材料。

[基金项目] 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(2014—2016年)(ZY3-JSFC-2-2007)

[作者简介] 孙莉莉,学士,主管药师,研究方向:临床药学,Email: sunlili3033@sina.cn

[通讯作者] 李铁军,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:临床药理学、心脑血管药理学,Email:18930502906@163.com

1 材料与方法

1.1 中药材

人参(批号:160802,亳州市华云中药饮片有限公司)。水蛭(批号:160301)、制天南星(批号:160601)、大黄(批号:160501)、三七(批号:160401)等均由上海龙威医药有限公司提供,福建孟氏药业有限公司生产。

1.2 试剂

食用酒精(批号:160608),由上海益醇化工有限公司提供,梅河口市阜康酒精有限责任公司生产。

1.3 提取工艺路线

根据处方中各个中药饮片的文献资料对其化学性质、药理作用、提取工艺的报道^[2-6],设计了4条不同提取工艺路线,制备了4种浸膏,分别是1号浸膏(5种药材先水煎煮提取2次,水煎液采用水沉淀后减压浓缩制备);2号浸膏(人参、制天南星和三七采用乙醇回流提取,回流后药渣、水蛭和大黄采用水煎煮提取,合并水煎液和醇提液采用水沉淀后减压浓缩制备);3号浸膏(人参、制天南星和三七采用乙醇回流提取,回流后药渣、水蛭和大黄采用水煎煮提取,合并水煎液和醇提液采用乙醇沉淀后减压浓缩制备)和4号浸膏(5种药材先水煎煮提取2次,水煎液采用乙醇沉淀后减压浓缩制备)。1、2、3、4号浸膏的得率分别为22.09%、22.01%、15.09%和15.00%。

1.4 提取工艺的优化

采用线栓法阻断大鼠中动脉(MCAO)建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,比较了1~4号浸膏(5.5 g生药/kg和11 g生药/kg)对大鼠脑缺血2 h再灌注24 h后脑梗死体积的影响,选取对脑缺血保护作用最强的3号浸膏作为制备颗粒剂的原料。优化复元醒脑颗粒提取工艺分为乙醇回流、水煎煮和乙醇沉淀3个部分进行。

1.4.1 乙醇回流提取工艺的优化

乙醇回流提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验:人参、制天南星、三七等三味中药饮片,以乙醇为溶媒回流提取,以人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的含量为主要指标,以出膏率为次要指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法^[7]对乙醇回流提取工艺进行优化,详见表1。

称取人参20 g,制天南星18 g,三七30 g,共68 g。加入不同浓度和不同倍数的乙醇,加热回流提取不同次数和不同时间,将各种提取液回收乙醇至尽,减压浓缩,干燥。精密称取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.6 g,按照《中华人民共和国药典(2015年

表1 乙醇回流提取工艺正交试验表

水平	A 因素 提取次数	B 因素 提取时间 (t/min)	C 因素 乙醇浓度 (%)	D 因素 料液比
1	1	120	50	4
2	2	80	65	6
3	3	40	80	8

版)》(简称《中国药典》)三七药材项下含量测定方法,测定人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的含量。

乙醇回流提取工艺的验证试验:称取人参20 g,制天南星18 g,三七30 g,共68 g。第1次提取:加入50% 8倍量的乙醇,加热回流提取120 min,过滤;第2次提取:加入50% 6倍量的乙醇,加热回流提取80 min,合并滤液,回收乙醇至尽,减压浓缩、干燥。取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.6 g,按照《中国药典》三七药材项下含量测定方法,测定人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的含量。

1.4.2 水煎煮提取工艺的优化

水煎煮提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验:水蛭、大黄等两味中药饮片,以水为溶媒煎煮提取,以游离蒽醌含量为主要指标,以出膏率为次要指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对水煎煮提取工艺进行优化,见表2。

表2 水煎煮提取工艺正交试验表

水平	A 因素 提取次数	B 因素 提取时间 (t/min)	C 因素 料液比	D 因素 提取温度 (t/°C)
1	1	40	6	80
2	2	80	8	90
3	3	120	10	100

称取水蛭24 g,大黄18 g,共42 g。加入不同倍数的水,采用不同温度、煎煮提取不同次数和不同时间,将各种提取液减压浓缩,干燥。精密称取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.5 g,按照《中国药典》大黄药材项下含量测定方法,测定游离蒽醌的含量。

水煎煮提取工艺的验证试验:称取水蛭24 g,大黄18 g,共42 g。第1次提取:加入10倍量水,加热至100 °C,煎煮提取120 min,过滤;第2次提取:加入8倍量的水,加热至100 °C,煎煮提取80 min,过滤,合并滤液,减压浓缩,干燥。精密称取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.5 g,按照《中国药典》大黄药材项下含量测定方法,测定游离蒽醌含量。

1.4.3 乙醇沉淀工艺的优化

乙醇沉淀工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验:以乙醇为溶媒回流提取人参、制天南星、三七等中药的有效成分后,滤渣加入水蛭、大黄中药饮片,以水为溶媒煎煮提取,过滤,减压浓缩,用不同浓度和不同剂量的乙醇沉淀。以人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} ,三七皂苷 R_1 含量为主要指标,以出膏率为次要指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对乙醇沉淀工艺进行优化,见表3。

表3 乙醇沉淀工艺正交试验表

水平	A 因素 提取次数	B 因素 沉淀时间 (t/h)	C 因素 乙醇浓度 (%)	D 因素 乙醇体积 (倍)
1	1	16	70	1
2	2	20	80	2
3	3	24	90	3

称取人参 220 g、制天南星 198 g、三七 330 g,共 748 g。加入 50% 8 倍量的乙醇,加热回流提取 120 min,过滤;滤渣加入 50% 6 倍量的乙醇,加热回流提取 80 min,过滤,合并滤液,回收乙醇至尽。滤渣加入水蛭 264 g,大黄 198 g,共 462 g,加入 10 倍水,煎煮提取 120 min,过滤;滤渣加入 8 倍水,煎煮提取 80 min,过滤,合并滤液和醇提液,减压浓缩至相对密度为 1.15,分成 11 份,其中 9 份做沉淀工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验,2 份做验证试验。取 9 份浸膏,用不同浓度和不同倍数的乙醇,沉淀不同时间,然后对各份沉淀物进行过滤、回收乙醇至尽,减压浓缩,干燥。分别精密称取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.6 g、0.5 g,按照《中国药典》三七药材项下含量测定方法,测定人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} ,三七皂苷 R_1 的含量。

乙醇沉淀工艺的验证试验:取乙醇沉淀试验时提取的复元醒脑浸膏 2 份,一份用 70% 的乙醇 1 倍量,沉淀 16 h;另一份用 80% 的乙醇 2 倍量,沉淀 16 h,过滤,回收乙醇至尽,减压浓缩、干燥。取干燥浸膏粉末(过四号筛)0.6 g,按照《中国药典》三七药材项下含量测定方法,测定人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1 的含量。

1.5 统计学分析

采用方差分析的方法比较正交试验中各因素的重要性及差异显著性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙醇回流提取工艺的优化

2.1.1 乙醇回流提取工艺的正交试验

方差分析结果显示,各因素的重要性依次为 $C > D > A > B$,即乙醇的浓度影响最大($P < 0.01$),乙醇的用量影响次之($P < 0.05$),提取的次数影响较小,提取的时间影响不显著。优化工艺为:乙醇浓度为 50%;料液比为第 1 次 8 倍,第 2 次 6 倍;提取 2 次;提取时间为第 1 次 120 min,第 2 次 80 min。具体结果见表 4。

2.1.2 乙醇回流提取工艺的验证试验

人参皂苷和三七皂苷的总含量为 3.48% 和 3.17%,出膏率为 23.09%,见表 5。

2.2 水煎煮提取工艺的优化

2.2.1 水煎煮提取工艺的正交试验

方差分析结果显示,各因素的重要性依次为 $A > B > D > C$,即提取的次数($P < 0.05$)影响最大,

表4 乙醇回流提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验结果(%)

试验号	因素				试验结果					综合评分
	A	B	C	D	人参皂苷 R_{g1}	人参皂苷 R_{b1}	三七皂苷 R_1	R_{g1} 、 R_{b1} 、 R_1 总含量	出膏率	
1	1	1	1	1	3.38	2.23	0.75	6.36	15.44	9.08
2	1	2	2	2	1.80	1.60	0.38	3.78	16.47	7.59
3	1	3	3	3	1.38	1.25	0.00	2.63	17.35	7.05
4	2	1	2	3	1.30	1.10	0.09	2.49	21.03	8.05
5	2	2	3	1	0.57	0.80	0.00	1.37	17.65	6.25
6	2	3	1	2	1.86	1.51	0.39	3.76	22.65	9.43
7	3	1	3	2	0.77	0.64	0.00	1.41	19.26	6.77
8	3	2	1	3	1.87	1.54	0.46	3.87	25.15	10.25
9	3	3	2	1	1.05	1.06	0.00	2.11	21.18	7.83
K_1	23.72	23.90	28.76	23.16						
K_2	23.73	24.09	23.47	23.79						
K_3	24.85	24.31	20.07	25.35						
R	1.13	0.41	8.69	2.19						

表5 乙醇回流提取工艺正交试验的验证试验结果(%)

试验号	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	三七皂苷 R ₁	R _{g1} 、R _{b1} 、R ₁ 总含量	出膏率	综合评分
1	1.62	1.59	0.27	3.48	23.09	9.36
2	1.48	1.45	0.24	3.17	23.09	9.15

其次是提取的时间,提取的温度影响较小,水的用量影响不显著。优化的水煎煮提取工艺,提取2次;提取时间为第1次120 min,第2次80 min;提取温度100℃;料液比为第1次10倍,第2次8倍。具体结果见表6。

2.2.2 水煎煮提取工艺的验证试验

验证试验结果是游离蒽醌的含量为0.44%,出膏率为25.71%和25.48%,综合评分分别为8.02和7.95。

2.3 乙醇沉淀工艺的优化

2.3.1 乙醇沉淀工艺的正交试验

方差分析结果显示,各因素的重要性依次为B>A>C,即乙醇的浓度影响最大(P<0.05),其次是沉淀的时间,乙醇的用量影响较小。在验证试验中,选择乙醇的浓度为70%~80%,沉淀的时间为16 h,乙醇的用量为1~2倍,见表7。

表6 水煎煮提取工艺 L₉(3⁴) 正交试验结果(%)

试验号	因素				试验结果		综合评分
	A	B	C	D	游离蒽醌	出膏率	
1	1	1	1	1	0.24	14.29	4.46
2	1	2	2	2	0.31	17.62	5.51
3	1	3	3	3	0.35	18.81	5.89
4	2	1	2	3	0.49	22.14	6.93
5	2	2	3	1	0.34	23.81	7.38
6	2	3	1	2	0.24	22.62	6.96
7	3	1	3	2	0.40	25.00	7.78
8	3	2	1	3	0.28	28.10	8.63
9	3	3	2	1	0.35	23.57	7.32
K ₁	15.86	19.17	20.05	19.16			
K ₂	21.27	21.52	19.76	20.25			
K ₃	23.73	20.17	21.05	21.45			
R	7.87	2.35	1.29	2.29			

表7 乙醇沉淀工艺 L₉(3⁴) 正交试验结果(%)

试验号	因素				试验结果					综合评分
	A	B	C	D	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	三七皂苷 R ₁	R _{g1} 、R _{b1} 、R ₁ 总含量	出膏率	
1	1	1	1		0.10	0.26	0.06	0.42	20.45	6.43
2	1	2	2		0.14	0.34	0.07	0.55	17.27	5.57
3	1	3	3		0.11	0.31	0.07	0.49	15.18	4.90
4	2	1	2		0.12	1.45	0.06	1.63	18.00	6.54
5	2	2	3		0.15	0.58	0.03	0.76	17.45	5.77
6	2	3	1		0.15	0.78	0.04	0.97	17.09	5.81
7	3	1	3		0.13	0.35	0.01	0.49	18.00	5.74
8	3	2	1		0.18	0.39	0.02	0.59	15.81	5.16
9	3	3	2		0.15	0.35	0.04	0.54	16.45	5.31
K ₁	16.90	18.71	17.40							
K ₂	18.12	16.50	17.42							
K ₃	16.21	16.02	16.41							
R	1.91	2.69	1.01							

2.3.2 乙醇沉淀工艺的验证试验

由人参皂苷总量及出膏率综合考虑,乙醇沉淀

工艺确定使用乙醇的浓度为80%,乙醇用量为2倍,时间为16 h(表8)。

表8 乙醇沉淀工艺正交试验的验证试验结果(%)

试验号	人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 R _{b1}	三七皂苷 R ₁	R _{g1} 、R _{b1} 、R ₁ 总含量	出膏率	综合评分
1	0.04	0.10	0.20	0.34	20.63	6.43
2	0.05	0.23	0.50	0.78	19.27	6.33

3 讨论

中医药在治疗中风及其后遗症时具有一定优势。中医认为脑梗死属于“中风”范畴,其发病机制与痰、火、风、虚、疲密切相关。元代医家沈金鳌认为:元气虚为中风之根也。《丹溪心法》也有“中风大率主血虚有痰”的论述,并主张“治痰为先”。浦南医院中医科主任徐中菊师从龙华医院急诊科主任方邦江教授,在长期的临床工作中发现,脑梗死的发病主要以元气虚损为根本,痰癖互结、痰热生风为病机核心。据此,采取扶持元气为主,佐以逐癖化痰、泄热息风、醒脑开窍之法,以方教授自拟复元醒脑汤(人参、水蛭、制天南星、大黄、三七)治疗急性脑梗死,取得良好的临床疗效。

根据文献对方中各中药饮片的化学性质、药理作用、提取工艺的报道^[2-6],课题组设计了4条不同的提取工艺路线。王耀文等^[2]采用人参提取工艺与药效双重指标相结合的方法,证明人参中3种皂苷成分在治疗心肌缺氧的有效成分,课题组用这3种皂苷成分作为人参提取工艺的指标。研究表明^[3],水蛭中有效成分水蛭素(hirudin)是一种非常稳定的抗凝血蛋白质,单纯的温度升高(100℃水浴)和pH值的改变(1~13)不影响其活力。单纯的水煎或单纯的醇提效果不如水提醇沉的抗凝效果好,故采用水提醇沉的方法对水蛭进行提取。根据文献^[4]报道,制天南星醇提液中的活性成分主要来自生物碱,课题组把生物碱作为制天南星提取工艺的指标。目前研究大黄的化学成分及活性成分主要是蒽醌类^[5],在不同来源的药材及不同饮片中含量有所不同(3%~5%),分为游离型和结合型,其中以结合状态为主。大黄中结合蒽醌易溶解于水,故选择水作为溶媒进行提取,且水作为溶媒成本低,利于工业化生产。三七皂苷由人参皂苷 R_{g1}、R_{b1}、R_e和三七皂苷 R₁ 等成分组成,是三七的主要活性部位^[6]。

课题组对4种不同提取工艺路线进行预试验,研究了各浸膏对大鼠脑缺血2h再灌注24h后脑梗死体积的影响,发现3号复元醒脑浸膏对脑缺血保护作用最强,因此,以3号复元醒脑浸膏作为制备颗粒剂的原料。3号样品的提取工艺为乙醇回流提取后水煎煮提取、乙醇沉淀,过滤,浓缩制得浸膏。因此,笔者又对3号复元醒脑浸膏的提取工艺进行优化^[7]。利用正交试验设计,进行乙醇回流提取工艺的优化,水煎煮提取工艺的优化和乙醇沉淀工艺的优化。最终,将配制方法分为三部分。一是乙醇回流提取:取中药饮片人参、制天南星、三七,加入8倍量50%乙醇,加热回流2h,过滤,滤液备用;滤渣加入6倍量50%乙醇,加热回流80min,过滤,滤渣放置备用,滤液与第1次滤液合并后,减压浓缩,回收乙醇至无醇味,浓缩液放置备用。二是水煎煮提取:取水蛭、大黄,醇提后(人参、制天南星、三七)滤渣,加入10倍量水,煎煮2h,过滤,滤液备用;滤渣加入8倍量水,煎煮80min,过滤,弃去滤渣,滤液与第1次滤液和回收乙醇后的醇提取液合并,浓缩至相对密度为1.10~1.15(50~60℃)。三是乙醇沉淀:将上述浓缩液加入2倍量80%乙醇,沉淀16h,过滤,弃去滤渣,滤液减压浓缩至相对密度1.10~1.20(50~60℃),得浸膏。复元醒脑颗粒提取工艺的优化为进一步的制剂研究打下了坚实基础。

【参考文献】

- [1] 耿 贇,方邦江,马智慧,等.复元醒脑汤治疗急性缺血性中风的临床研究[J].中国中医急症,2014,23(11):1970-1972.
- [2] 王耀文,孟宪生,包永睿,等.人参提取工艺的优化及其有效成分与药效学相关性分析[J].中成药,2012,34(11):2240-2242.
- [3] 于栋华,张 颖,徐红英,等.水蛭水煎醇沉工艺的正交设计研究[J].中医药信息,2011,28(6):75-76.
- [4] 王 帅,包永睿,杨欣欣,等.中药东北天南星生物碱类成分提取纯化工艺研究[J].时珍国医国药,2015,26(10):2343-2345.
- [5] 吕 洁,李晓燕,李向军,等.大黄中结合蒽醌的提取工艺研究[J].河北中医药学报,2009,24(4):34-35.
- [6] 瞿林海,郑 明,楼宜嘉.三七总皂苷提取工艺研究[J].中药材,2006,29(6):593-595.
- [7] 刘安龙.中药单煎与共煎体会[J].河北中医,2006,28(7):531.

[收稿日期] 2017-02-19 [修回日期] 2017-05-19

[本文编辑] 李睿旻