

回乳抑增颗粒回流提取工艺的优化

邹吉利, 盛碧, 陈永刚, 李颖*
(武汉市第三医院药学部, 湖北武汉 430061)

摘要: 目的 优化回乳抑增颗粒回流提取工艺。方法 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为影响因素, 迷迭香酸、哈巴俄苷含量及浸膏得率的综合评分为评价指标, 正交试验优化提取工艺。再建立高泌乳素血症大鼠模型, 通过药效学实验对优化工艺进行验证。结果 最佳条件为6倍量40%乙醇提取3次, 每次0.5 h, 迷迭香酸、哈巴俄苷含量40.35、8.03 $\mu\text{g/g}$, 浸膏得率12.03%, 综合评分92.48。结论 该方法简便、稳定、可行, 可用于回流提取回乳抑增颗粒。

关键词: 回乳抑增颗粒; 回流提取; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)06-1219-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.06.004

Optimization of reflux extraction process for Huiru Yizeng Granules

ZOU Ji-li, SHENG Bi, CHEN Yong-gang, LI Yin*
(Department of Pharmacy, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430061, China)

KEY WORDS: Huiru Yizeng Granules; reflux extraction; orthogonal test

高泌乳素血症为女性内分泌系统常见疾病, 由下丘脑-垂体-性腺轴系统病变引起内分泌紊乱、激素失调所致^[1]。近年来研究显示, 泌乳素含量与肝郁有关, 肝气郁结、情志不遂可使气血逆乱、脏腑功能失调, 从而导致泌乳素异常升高^[2-3], 中医主要采用疏肝理气、调摄冲任、逐瘀化痰方法进行治疗^[4]。复方回乳抑增一号是武汉市第三医院用于治疗高泌乳素血症的临床经验方^[5], 由于原方回乳抑增方药量过大, 前期已对其进行优化^[6], 优化后的处方组成为生麦芽、夏枯草、郁金、丹参、玄参、浙贝母、白芥子、牡蛎、淡昆布、山慈菇7味药材, 但作为传统汤剂在临床使用时仍有很多不便之处^[7], 如不宜携带、服用麻烦、难以保存、质量不可控制等, 故需要对该剂型进行改进, 制成颗粒剂。本实验将在单因素试验基础上通过正交试验优化回乳抑增颗粒回流提取工艺, 并结合药效学实验加以验证, 为后期相关研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (UltiMate 3000, 美国 Dionex 公司); PH 计 (pHS-3C, 上海今迈仪器仪表有限公司); 万分之一电子天平 (BS110S, 德国 Sartorius 公司); 超声波清洗器 (KQ-300E, 昆山市超声仪器有限公司); 恒温水浴锅 (HH-2, 江苏省金坛市融化仪器制造有限公司); 旋转蒸发器 (RE-3000, 上海亚荣生化仪器厂); 医用低速离心机 (BY-320C, 北京白洋医用离心机有限公司); 实验室超纯水机 (Master-SUF, 上海和泰仪器有限公司)。

1.2 试药 生麦芽、夏枯草、玄参、山慈菇、浙贝母、昆布、牡蛎购于亳州市豪门中药饮片有限公司, 经武汉市第三医院药学部吴金虎主任药师鉴定为正品, 符合2015年版《中国药典》一部相关项下规定。甲磺酸溴隐亭片 (T3A285A, 匈牙利吉瑞大药厂); 盐酸甲氧氯普胺注射液 (1404531-B31,

收稿日期: 2018-07-03

基金项目: 湖北省自然科学基金项目资助 (2014CFC1044, 2014CFC1045); 武汉市卫生计生委临床医学科研项目资助 (S201802140018)

作者简介: 邹吉利 (1986—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药新制剂、新技术。Tel: (027) 68894990, E-mail: 75301082@qq.com

* 通信作者: 李颖 (1986—), 女, 药师, 研究方向为药物新制剂、新剂型及新技术。Tel: (027) 68894884, E-mail: 81149156@qq.com

国药集团容生制药有限公司)。迷迭香酸 (MUST-13110115, 含有量 98%)、哈巴俄苷 (MUST-13071801, 含有量 98%) 对照品 (成都曼思特生物科技有限公司)。乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

1.3 动物 雌性未孕 Wistar 大鼠, 体质量 180~200 g, 由武汉市疾病预防控制中心实验动物中心提供, 合格证号 42000600004378。

2 方法与结果

2.1 迷迭香酸、哈巴俄苷含有量测定

2.1.1 色谱条件 Wondasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 95% B; 10~30 min, 95%~70% B; 30~55 min, 70%~80% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 270 nm; 进样量 20 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取对照品迷迭香酸 13.2 mg、哈巴俄苷 8.86 mg, 置于同一 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 称取药材处方量 (夏枯草、生麦芽、浙贝母、玄参、山慈菇、昆布、牡蛎共 173 g) 的 1/2, 加入 50% 乙醇 692 mL (8 倍体积), 于 70 °C 下加热, 回流提取 1 h, 过滤, 滤液蒸干, 置于 100 mL 量瓶中, 50% 乙醇稀释至刻度, 混匀, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程分别为迷迭香酸 $Y=0.6972X-0.3721$ ($R^2=0.9998$)、哈巴俄苷 $Y=0.86X-0.739$ ($R^2=0.9994$), 分别在 2.59~206.98、1.74~138.92 mg/L 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得迷迭香酸、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 0.36%、1.12%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下于 1、2、4、6、12、24 h 进样测定, 测得迷迭香酸、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 0.22%、0.49%, 表明溶液在

24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 按处方比例称取药材 6 份, 按“2.1.3”项下方法平行制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得迷迭香酸、哈巴俄苷峰面积 RSD 分别为 1.17%、2.27%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取各成分含有量已知的供试品 6 份, 每份 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 分为 2 组, 加入“2.1.2”项下对照品溶液 1、1.2、1.4 mL, 平行 3 份, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 迷迭香酸、哈巴俄苷平均加样回收率分别为 99.67%、100.83%, RSD 分别为 1.09%、0.82%。

2.2 浸膏得率测定 精密移取提取液 50 mL, 置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105 °C 常压干燥至恒重, 取出, 置于干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算浸膏得率。

2.3 单因素试验

2.3.1 温度 称取 4 份处方量药材 (173 g) 的 1/2, 加入 50% 乙醇 692 mL (8 倍体积), 50、60、70、80 °C 水浴回流提取 60 min, 滤液浓缩, 真空干燥箱中干燥成浸膏后, 置于 100 mL 量瓶中, 50% 乙醇稀释至刻度, 取 50 mL 测定浸膏得率, 剩余下测定迷迭香酸、哈巴俄苷含有量, 计算综合评分 [满分 100 分, 根据夏枯草和玄参在处方中的君臣地位, 以及迷迭香酸、哈巴俄苷含有量高低, 设定两者权重系数分别为 50、30; 由于浸膏得率能反映全方质量, 故设定其权重系数为 20。公式为综合评分 = (迷迭香酸含有量/最大值) × 50 + (哈巴俄苷含有量/最大值) × 30 + (浸膏得率/最大值) × 20], 结果见表 1。由表可知, 浸膏得率随着温度升高而增加, 但在 70 °C 后迷迭香酸、哈巴俄苷含有量略有下降, 故选择 70 °C 进行后续实验。

表 1 温度对提取工艺的影响

温度/°C	浸膏得率/ %	迷迭香酸/ (μg·g ⁻¹)	哈巴俄苷/ (μg·g ⁻¹)	综合评分
50	6.32	21.85	3.03	83.00
60	6.44	24.28	2.95	87.22
70	6.38	26.94	3.96	99.63
80	6.50	25.66	3.35	93.04

2.3.2 乙醇体积分数 称取一半处方量药材 6 份, 用水, 20%、40%、60%、80% 乙醇, 乙醇各 692 mL 回流提取 1 h, 过滤后, 滤液于 70 °C 下浓缩回收溶剂, 真空干燥 (-0.1 MPa) 成干浸膏,

置于 100 mL 量瓶中, 50% 乙醇稀释至刻度, 取 50 mL 测定浸膏得率, 剩余测定迷迭香酸、哈巴俄苷含量, 按“2.3.1”项下公式计算综合评分, 结果见表 2。由表可知, 乙醇体积分数为 40% 时迷迭香酸、哈巴俄苷含量最高, 但浸膏得率随其提高而逐步下降, 故选择 40% 进行后续实验。

表 2 乙醇体积分数对提取工艺的影响

Tab. 2 Effect of ethanol concentration on extraction process

乙醇/%	浸膏得率/%	迷迭香酸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	哈巴俄苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	综合评分
0	15.75	26.24	2.98	66.05
20	13.48	29.13	3.44	68.80
40	13.02	39.19	7.11	96.53
60	9.87	28.55	3.82	65.08
80	7.55	23.24	4.08	56.45
100	3.10	23.01	2.80	45.11

2.4 正交试验 在单因素试验基础上, 选择乙醇

体积分数 (A)、乙醇用量 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 作为影响因素, 迷迭香酸、哈巴俄苷含量及浸膏得率的综合评分作为评价指标, 因素水平见表 3。再按处方比例称取药材约 87 g, 共 9 组, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验优化, 每组平行 2 次, 提取液过滤, 合并滤液, 减压回收溶剂至干燥, 50% 甲醇定容至 100 mL, 在“2.1.1”项色谱条件下测定迷迭香酸、哈巴俄苷含量, 按“2.2”项下方法测定浸膏得率, 结果见表 4, 方差分析见表 5。

表 3 因素水平

Tab. 3 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	50	6	0.5	1
2	40	8	1.0	2
3	30	10	1.5	3

表 4 试验设计及结果

Tab. 4 Design and results of tests

试验号	A	B	C	D	迷迭香酸/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	哈巴俄苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	浸膏得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	32.60	2.34	6.96	55.94
2	1	2	2	2	13.64	4.36	15.56	49.78
3	1	3	3	3	26.01	5.84	18.25	73.32
4	2	1	2	3	41.16	7.86	13.85	94.75
5	2	2	3	1	20.81	6.71	7.94	59.35
6	2	3	1	2	21.50	7.23	9.99	64.35
7	3	1	3	2	28.55	3.82	17.87	68.29
8	3	2	1	3	22.54	5.55	18.78	68.56
9	3	3	2	1	13.53	1.97	12.77	37.55
K_1	179.040 0	218.980 0	188.850 0	152.840 0	—	—	—	—
K_2	218.450 0	177.690 0	182.080 0	182.420 0	—	—	—	—
K_3	174.400 0	175.220 0	200.960 0	236.630 0	—	—	—	—
R	44.050 0	43.760 0	18.880 0	83.790 0	—	—	—	—

表 5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 值	P 值
A	390.564 5	2.00	6.403 4	>0.05
B	402.878 1	2.00	6.605 3	>0.05
C	60.993 3	2.00	1.000 0	>0.05
D	1 203.829 4	2.00	19.737 1	<0.05
误差	30.496 6	—	—	—

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$

由此可知, 各因素影响程度依次为 $D > A > B > C$; 因素 D 有显著影响 ($P < 0.05$), 其他 3 个因素无显著影响 ($P > 0.05$); 最优工艺为 $A_2B_1C_3D_3$, 由于因素 C 中各水平无显著差异 ($P > 0.05$), 故将其修正为 $A_2B_1C_1D_3$, 即 6 倍量 40% 乙醇提取 3 次, 每次 0.5 h。

2.5 药效学实验

2.5.1 模型建立 文献 [8] 报道, 高泌乳素血症模型的建立方法为注射盐酸甲氧氯普胺注射液, 以皮下、肌肉注射为主, 给药 10 d, 每天 1 次, 或者给药 5 d, 每天 2 次。本实验采用皮下注射给药以减少肌肉损伤, 并为了节省时间采取给药 5 d, 每天 2 次 (早晚各 1 次) 的方案, 除正常组外每组大鼠给药量均为 75 mg/kg。

2.5.2 分组与给药 在前期研究基础上, 按处方比例称取药材 173 g, 加 8 倍量水提取 2 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 80 mL, 作为水提组; 取等量药材, 加 6 倍量 40% 乙醇回流提取 3 次, 每次 0.5 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 80 mL, 作为醇提 1 组; 取等量药材, 加 6 倍量 40% 乙醇回

流提取3次，每次1.5 h，滤过，合并滤液，浓缩至80 mL，作为醇提2组。将大鼠随机分为正常组、模型组、水提组、醇提1组、醇提2组、溴隐亭组，每组8只，除正常组外各组大鼠均按“2.6.1”项下方法建模，然后灌胃给予相应药物，每只2 mL（正常组、模型组大鼠灌胃给予等体积生理盐水）。给药30 d后，大鼠眼角静脉取血，测定PRL、P、E₂水平。

2.5.3 统计学分析 通过SPSS 16.0软件进行处理，数据以($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用*t*检验。*P*<0.05表示有显著性差异。

2.5.4 结果分析 表6显示，模型组泌乳素水平较正常组有显著变化(*P*<0.01)，表明造模成功，而且在给予生理盐水30 d后未恢复；醇提1组、醇提2组泌乳素水平较模型组有显著变化(*P*<0.05, *P*<0.01)，组间差异无统计学意义(*P*>0.05)，并均略优于水提组。

表6 各组PRL、P、E₂水平的比较($\bar{x} \pm s$, *n*=8)

Tab. 6 Comparison of PRL, P and E₂ levels among various groups ($\bar{x} \pm s$, *n*=8)

组别	PRL/(ng·L ⁻¹)	P/(μg·L ⁻¹)	E ₂ /(pmol·L ⁻¹)
正常组	28.93±0.87 ^{ΔΔ}	331.21±16.85 ^{ΔΔ}	116.95±8.25 ^{ΔΔ}
模型组	242.31±25.59 ^{**}	37.35±1.88 ^{**}	35.82±0.77 ^{**}
溴隐亭组	27.17±14.77 ^{ΔΔ}	375.09±30.17 ^{ΔΔ}	98.71±19.56 ^{ΔΔ}
水提组	46.62±1.58 ^{ΔΔ}	281.64±12.34 ^{ΔΔ}	91.63±2.77 ^{ΔΔ}
醇提1组	17.04±13.86 ^{ΔΔ}	300.64±11.16 ^{ΔΔ}	95.86±18.32 ^{ΔΔ}
醇提2组	17.58±11.66 ^{ΔΔ}	298.61±27.93 ^{ΔΔ}	97.65±10.81 ^Δ

注：与正常组比较，** *P*<0.01；与模型组比较：^Δ *P*<0.05，^{ΔΔ} *P*<0.01

2.6 验证试验 按处方比例称取同一批药材3份，每份87 g，按“2.2”项下方法制备浸膏（批号141021-1、141021-2、141021-3），按“2.4”项下优化工艺进行3批验证试验，结果见表7，可知该工艺稳定可行。

表7 验证试验结果(*n*=3)

Tab. 7 Results of verification tests (*n*=3)

批号	迷迭香酸/ (μg·g ⁻¹)	哈巴俄苷/ (μg·g ⁻¹)	浸膏得率/ %	综合评分
141021-1	40.35	8.12	11.85	92.63
141021-2	39.88	8.03	12.01	91.88
141021-3	40.81	7.95	12.23	92.94
平均值	40.35	8.03	12.03	92.48
RSD/%	1.15	1.08	1.59	0.56

3 讨论

前期预实验在水提法、水提醇沉法、醇提法中

选择醇提法，虽然乙醇提取的成本高于水提，但后者过滤十分困难，并且前者可回收再利用。另外，水提醇沉后在治疗乳腺增生方面上几乎没有发挥作用。

由于回乳抑增颗粒中的君药夏枯草为草本植物，而生麦芽中含有大量麦芽糖^[9-10]，考虑到中药“宜粗不宜细”的原则，故并未进行粉碎过筛，而是直接用原药材进行提取。本实验以夏枯草中迷迭香酸^[11]、玄参中哈巴俄苷^[12]含有量为评价指标，这是因为在药效成分不明的情况下应选择含有量最高者进行考察，同时控制浸膏得率以使浸膏量适当，为下一步制剂工艺研究奠定基础。

在优化回乳抑增颗粒回流提取工艺后，本试验选择2个最优工艺进行药效学试验，发现两者泌乳素水平无明显差异，并且仅提取时间有区别。由于该因素影响程度最小，故确定优化工艺为6倍量40%乙醇提取3次，每次0.5 h。

参考文献：

[1] 王彦国, 金萍. 高泌乳素血症药物治疗的研究进展[J]. 中国老年保健医学, 2013, 11(2): 65-67.

[2] 曾安贵, 王乔. 中药内服和外敷联合治疗乳腺增生临床效果评价[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(10): 12.

[3] 李聪. 肝郁证模型大鼠高泌乳素及神经-内分泌-免疫机制和相关方药的作用[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.

[4] 范雪峰. 中药配合理疗治疗乳腺增生82例[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(9): 622-623.

[5] 邓常清. 中药复方有效组分研究的思路与实践[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(12): 1107-1113.

[6] 王佳宁, 阮祥燕. 高泌乳素血症的病因及诊疗进展[J]. 医学综述, 2012, 18(21): 3629-3632.

[7] 王雄. 回乳抑增一号治疗高泌乳素血症与乳腺增生药效学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.

[8] 杜旭隆, 席武. 中医治疗乳腺增生[J]. 四川中医, 2008, 26(8): 87-88.

[9] 方向梅, 吕红叶. 麦芽的研究进展[J]. 中国伤残医学, 2010, 18(5): 167-169.

[10] 吴璐, 吴维刚, 谭丽霞, 等. 麦芽炒制过程中炒制温度和时间对糖类成分的影响[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1334-1339.

[11] 林丽美, 许招懂, 姚江雄, 等. 夏枯草中异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量测定[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(15): 1204-1207.

[12] 陈鹏, 李硕, 邱佳, 等. 玄参药材质量控制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(18): 220-225.