

金母颗粒提取工艺的优化

李晓霞^{1,2}, 王志萍^{1,2*}, 蒋雅娴^{1,2}, 苏佳昇^{1,2}, 刘笑^{1,2}, 王孝勋¹, 冯桥³
(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室, 广西南宁 530001; 3. 广西国际壮医医院, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 优化壮药金母颗粒提取工艺。**方法** 对颗粒水提物、乙醇提取物进行抗炎(棉球肉芽肿)、抑菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)实验以筛选提取溶剂,再以抑菌活性为指标确定其浓度。以乙醇体积分数、提取时间、乙醇用量为影响因素,落新妇苷、虎杖苷含量及干膏率的总评“归一值”(OD)为评价指标,星点设计-效应面法优化提取工艺。**结果** 乙醇提取物抗炎、抑菌活性均优于水提物($P<0.01$),其体积分数在 50%~90% 范围内均有抑菌活性,以 60% 作用最强。最佳条件为加热回流提取 2 次,第 1 次加 10 倍量 60% 乙醇,第 2 次加 8 倍量 60% 乙醇,每次 45 min,OD 值为 0.769 1。**结论** 以抗炎、抑菌活性为主要考核指标并结合星点设计-效应面法时,可用于提取金母颗粒,并能为其临床有效性提供保障。

关键词: 金母颗粒; 提取; 抗炎活性; 抑菌活性; 星点设计-效应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2561-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.004

Optimization of extraction process for Jinmu Granules

LI Xiao-xia^{1,2}, WANG Zhi-ping^{1,2*}, JIANG Ya-xian^{1,2}, SU Jia-sheng^{1,2}, LIU Xiao^{1,2},
WANG Xiao-xun¹, FENG Qiao³

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory for Common Technology Development of Chinese Medicine Preparations, Nanning 530001, China; 3. Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530001, China)

KEY WORDS: Jinmu Granules; extraction; anti-inflammatory activity; anti-bacterial activity; central composite design-response surface method

金母方是课题组前期优化壮药经验方——妇雅净方而成,由金刚刺、火炭母、白背叶根等 9 味特色壮药材组成,具有清火毒、除湿毒、灭虫毒、通龙路和水路等功效,临床上主要用于治疗阴道炎、慢性宫颈炎、子宫内膜炎、附件炎。方中火炭母、虎杖、黄柏所含有效成分大多为醇溶性物质^[1],对盆腔炎性疾病后遗症的疗效显著,而且毒性较小,工艺简便,质量可控^[2-4]。该方原剂型为汤剂,现拟将其改为颗粒剂,选用何种溶剂及工艺进行提取是决定该制剂临床疗效的关键。

目前,优化中药复方提取工艺已成为研究热

点,有学者以成分含量或结合干浸膏提取率为评价指标,正交实验、星点设计或结合人工神经网络优化提取工艺^[5-7];还有学者先以正交试验优化提取工艺,再通过药效学实验对其进行验证^[8]。本实验选择抗炎、抑菌活性作为主要考核指标,并结合星点设计-效应面法来优化壮药金母颗粒提取工艺。

1 材料

1.1 仪器 Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);SQP 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];LDZX-75KBS 型立式压

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA18126003); 广西中医药大学校级创新项目(YCSY20190075)

作者简介: 李晓霞(1995—),女,硕士生,从事中药、民族药新制剂与新剂型的研发工作。Tel: 18174855972, E-mail: 1622508619@qq.com

* 通信作者: 王志萍(1965—),女,教授,硕士生导师,从事中药、民族药新制剂与新剂型的研发工作。Tel: 13878818902, E-mail: 318007460@qq.com

力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；DFY-1000 型摇摆式高速万能打粉机（上海精胜科学仪器有限公司）；HWS-26 型电热恒温水浴锅（上海齐欣科学仪器有限公司）；LPH-250-A 型生化培养箱（广东泰宏君科学仪器股份有限公司）；DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱（上海齐欣科学仪器有限公司）；98-1-B 型电子调温电热套。

1.2 试剂与药物 金刚刺（批号 Y18080604）、火炭母（批号 17070202）、土茯苓（18031901）、白背叶根（批号 Y18101502）、虎杖（批号 18051501）、犁头草（批号 Y18080604）等药材均购自广西宝正药业有限公司，经广西中医药大学韦松基教授鉴定为正品，符合 2015 年版《中国药典》一部或《广西壮药质量标准》各药材项下要求。地塞米松（批号 171702，广东南国药业有限公司）；营养琼脂（批号 1080331）、水解酪蛋白胨（MH）肉汤（批号 1069061）（广东环凯微生物科技有限公司）；红四氮唑〔批号 I18007011，阿拉丁试剂（上海）有限公司〕。虎杖苷（111575-01603，纯度 87.3%）、落新妇苷（111798-01504，纯度 93.9%）对照品（中国食品药品检定研究院）。乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯；其余试剂均为分析纯；水为超纯水。

1.3 动物 SPF 级雌性昆明种小鼠 32 只，体质量（20±2）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号 SCXK（湘）2016-0002。

1.4 细菌 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌，均由广西中医药大学微生物与免疫实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 虎杖苷、落新妇苷含有量测定

2.1.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-水（B），梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 291 nm；进样量 10 μL。理论塔板数以虎杖苷计，不低于 3 000；以落新妇苷计，不低于 5 000。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 水/%
0~15	18	82
15~20	18~20	82~80
20~22	20~18	80~82
22~45	18	82

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取虎杖苷、落新

2562

妇苷对照品适量，稀乙醇制成每 1 mL 分别含两者 32 μg、0.5 mg 的溶液，即得。

2.1.3 供试品溶液制备 将金母颗粒提取液定容至 2 000 mL 量瓶中，混匀后精密量取 5 mL，4 000 r/min 离心 10 min，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.4 阴性样品溶液制备 按处方工艺取缺虎杖、缺金刚刺、缺土茯苓的阴性样品适量，加 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次，每次 1 h，300 目滤布过滤，浓缩后 60% 乙醇定容于 2 000 mL 量瓶中，精密量取 5 mL，4 000 r/min 离心 10 min，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.1.5 线性范围考察 取对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得方程分别为虎杖苷 $Y = 8 \times 10^6 X + 8\ 163.1$ （ $R^2 = 0.999\ 9$ ）、落新妇苷 $Y = 2 \times 10^6 X + 72\ 995$ （ $R^2 = 0.999\ 2$ ），分别在 0.010 9~0.314 3、0.117 6~3.380 4 μg 范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 精密吸取对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得虎杖苷、落新妇苷峰面积 RSD 分别为 2.88%、1.50%，表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取药材 6 份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、落新妇苷峰面积 RSD 分别为 0.99%、1.47%，表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一份供试品溶液，于 2、4、6、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、落新妇苷峰面积 RSD 分别为 2.19%、2.96%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密量取虎杖苷、落新妇苷含有量已知的供试品溶液 9 份，精密加入对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得虎杖苷、落新妇苷平均加样回收率分别为 99.46%、100.84%，RSD 均小于 5%。

2.2 提取溶剂种类筛选

2.2.1 提取物制备 按处方比例称取药材共 109 g，平行 2 份，加入 10 倍量水、60% 乙醇加热回流提取 2 次，每次 1 h，滤过，合并滤液，精密量取 2 mL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算虎杖苷、落新妇苷含有量。将提取液浓缩至近干，取浸膏适量，灭菌纯水制成 1 000 mg 生药/mL

药液，依次稀释至 500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.81、3.91、1.95 mg 生药/mL，供体外抑菌实验用；另取浸膏适量，纯水制成 708.5 mg 饮片/mL 药液，供棉球致小鼠肉芽肿实验用。

2.2.2 棉球致小鼠肉芽肿实验 参考文献 [9] 报道。32 只小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.04 mL/10 g) 麻醉后，将已高压灭菌的 5 mg 棉球植于腋下。24 h 后，将小鼠随机分为模型组、阳性组（地塞米松）、金母颗粒水提物组、金母颗粒醇提物组，每组 8 只，均以 0.2 mL/10 g 剂量灌胃给予相应药物（模型组给予等量蒸馏水），连续 7 d，于第 8 天处死小鼠，打开原切口，将棉球连同周围结缔组织一起取出，剔除脂肪组织，置于 60 ℃烘箱中干燥 12 h，精密称定质量，将其减去原棉球质量，即为肉芽肿质量，再计算其抑制率，结果见表 2。由此可知，与模型组比较，金母颗粒水提物组、金母颗粒醇提物组肉芽肿质量降低 ($P<0.01$)，以后者更明显 ($P<0.01$)。

表 2 金母颗粒对肉芽肿质量、抑制率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Effects of Jinmu Granules on the weight and inhibitory rate of granuloma ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	肉芽肿质量/mg	肉芽肿抑制率/%
模型组	12.63±2.27	—
阳性组	8.33±1.29 ** ##	34.01±10.23 ##
金母颗粒水提物组	9.81±1.27 **	22.30±10.06
金母颗粒醇提物组	8.38±1.22 ** ##	33.60±9.68 ##

注：与模型组比较，** $P<0.01$ ；与金母颗粒水提物组比较，## $P<0.01$ 。

2.2.3 体外抑菌实验 参考文献 [9] 报道。将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌菌液在 4 000 r/min 下离心 15 min，弃去溶液，沉淀加生理盐水制成菌液浓度 1×10^8 CFU/mL 的混悬液。在 96 孔板最外围的一圈中加入 200 μ L 水，往 B2~B11、C2~C11、D2~D11、F2~F11、G2~G11 孔里加入“2.2.1”项下药液、混悬液各 100 μ L，往 E2~E4、E5~E7 孔里加入混悬液各 200 μ L，缓慢摇匀后置于生化培养箱中，在 37 ℃下培养 24 h。配制 1% 红四氮唑溶液（现用现配），过 0.22 μ m 微孔滤膜，各取 5 μ L 加到每孔中，摇匀，置于 37 ℃生化培养箱中培养 4 h，观察各孔显色情况，未显现粉红色的最低浓度即为最小抑菌浓度（MIC）。结果，金母颗粒水提物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的 MIC 均为 62.50 mg/mL，而醇提物对两者的 MIC 均为 31.25 mg/mL，即其抑菌活性更强，与“2.2.2”

项下结果一致。

2.2.4 虎杖苷、落新妇苷含有量测定 取“2.2.1”项下水提液、醇提液各 2 mL，过 0.22 μ m 微孔滤膜，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算虎杖苷、落新妇苷含有量。结果，金母颗粒水提物中两者分别为 0.277 5、1.685 0 mg/g，而醇提物中分别为 1.144 5、5.551 2 mg/g，即在后者中更高，与“2.2.2”和“2.2.3”项下结果一致。

2.3 乙醇体积分数筛选 按处方比例称取药材共 109 g，平行 5 份，分别加入 10 倍量 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇，加热回流提取 2 次，每次 1 h，300 目滤布过滤，合并滤液，真空浓缩回收溶剂至无醇味，转移到蒸发皿中，水浴至近干，提取液用灭菌纯水制成 1 000 mg 生药/mL 药液，依次稀释至 500、250、125、62.5、31.25、15.62、7.81、3.91、1.95 mg 生药/mL，按“2.2.3”项下方法进行实验，结果见表 3。由此可知，乙醇体积分数在 50%~90% 范围内均能不同程度地抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌增殖，以 60% 时最强。

表 3 乙醇体积分数对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 MIC 的影响 (mg/mL)

Tab. 3 Effects of ethanol concentration on the MICs of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (mg/mL)

乙醇/%	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
50	31.25	125.00
60	31.25	31.25
70	125.00	62.50
80	31.25	125.00
90	62.50	125.00

2.4 星点设计-效应面法 对金母颗粒有效成分进行分析后，将虎杖苷、落新妇苷含有量权重系数均设定为 0.4；干膏率为次要指标，故将其权重系数设定为 0.2，采用 Hassan 法对各指标进行数学转换后计算“归一值” (d)，公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ ，其中 $Y_{\max}$ 为指标最大值， $Y_{\min}$ 为指标最小值， Y_i 为指标 i 测定值， i 为指标数，再将其进一步转换为总评“归一值” (OD)，公式为 $OD = d_1^{0.4} \times d_2^{0.4} \times d_3^{0.2}$ ，其中 d_1 为虎杖苷含有量“归一值”， d_2 为落新妇苷含有量“归一值”， d_3 为干膏率“归一值”。

选择乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、乙醇用量 (C) 作为影响因素（提取次数为非连续变量，无法进行回归处理，故按前期单因素试验结果将其固定为 2 次），落新妇苷、虎杖苷含有量及干

膏率作为评价指标，设计 3 因素 5 水平试验。因素水平见表 4。

表 4 因素水平
Tab. 4 Factors and levels

水平	A 乙醇/%	B 提取时间/min	C 乙醇用量/倍
-1. 732	30	15	8
-1	38. 45	27. 68	8. 85
0	50	45	10
1	61. 55	62. 32	11. 15
1. 732	70	75	12

按处方比例称取药材共 109 g，按表 4 参数加热回流提取 2 次，300 目纱网过滤，收集滤液，测定提取液中虎杖苷、落新妇苷含有量及干膏率，计

表 5 试验设计与结果

Tab. 5 Design and results of tests

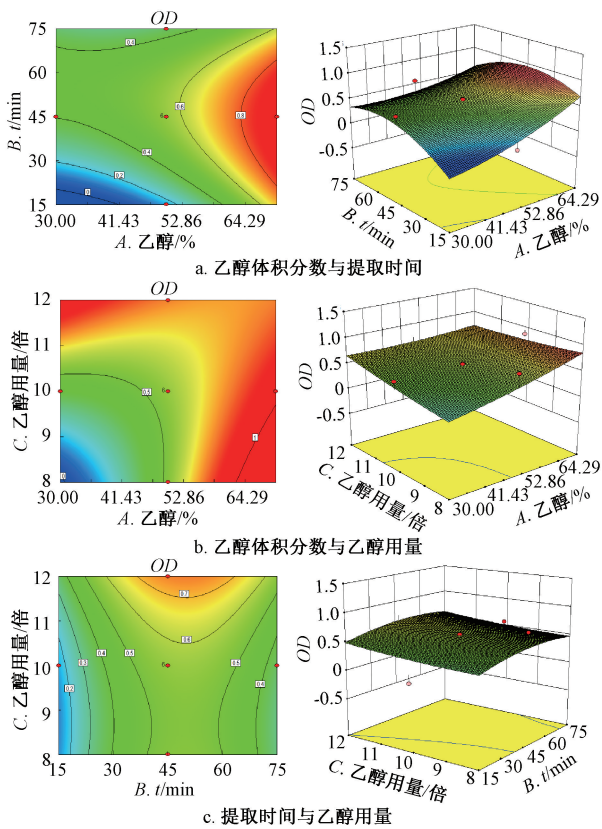
试验号	A 乙醇/%	B 提取时间/min	C 乙醇用量/倍	虎杖苷/(mg·g ⁻¹)	落新妇苷/(mg·g ⁻¹)	干膏率/%	Y OD 值
1	38. 45	27. 68	8. 85	1. 063 4	3. 664 3	11. 29	0
2	61. 55	27. 68	8. 85	0. 995 9	5. 025 5	14. 38	0. 738 6
3	38. 45	62. 32	8. 85	0. 875 8	3. 196 6	15. 44	0
4	61. 55	62. 32	8. 85	0. 920 5	4. 520 7	14. 74	0. 631 2
5	38. 45	27. 68	11. 15	0. 958 6	3. 902 2	16. 12	0. 538 6
6	61. 55	27. 68	11. 15	1. 098 9	5. 072 1	15. 27	0. 832 5
7	38. 45	62. 32	11. 15	1. 160 2	3. 865 3	17. 56	0. 623 1
8	61. 55	62. 32	11. 15	0. 691 8	5. 253 3	15. 91	0. 649 5
9	30	45	10	0. 773 0	4. 098 9	18. 35	0. 554 1
10	70	45	10	1. 058 9	5. 996 7	13. 76	0. 868 9
11	50	15	10	0. 352 0	5. 242 4	14. 06	0
12	50	75	10	0. 749 2	4. 551 3	15. 48	0. 573 8
13	50	45	8	1. 071 1	5. 037 8	14. 49	0. 779 2
14	50	45	12	0. 828 3	4. 317 6	15. 23	0. 565 0
15	50	45	10	0. 802 1	4. 341 7	15. 43	0. 562 6
16	50	45	10	0. 796 5	4. 276 2	15. 69	0. 553 6
17	50	45	10	0. 798 6	4. 314 5	15. 13	0. 547 2
18	50	45	10	0. 827 7	4. 350 2	15. 38	0. 575 6
19	50	45	10	0. 838 2	4. 292 9	15. 18	0. 563 3
20	50	45	10	0. 813 2	4. 304 7	15. 14	0. 552 6

表 6 方差分析

Tab. 6 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0. 84	9	0. 093	2. 61	0. 075 3
A	0. 36	1	0. 36	10. 00	0. 010 1
B	0. 044	1	0. 044	1. 24	0. 291 1
C	0. 058	1	0. 058	1. 63	0. 230 4
AB	0. 018	1	0. 018	0. 49	0. 499 0
AC	0. 014	1	0. 014	3. 86	0. 077 9
BC	0. 000 009 9	1	0. 000 009 9	0. 000 277 4	0. 987 0
A ²	0. 026	1	0. 026	0. 72	0. 417 3
B ²	0. 16	1	0. 16	4. 52	0. 059 3
C ²	0. 012	1	0. 012	0. 33	0. 581 1
残差	0. 36	10	0. 36	—	—
失拟项	0. 36	5	0. 071	8. 58	<0. 000 1
纯误差	0. 000 516	5	0. 000 103 2	—	—
总差	1. 2	19	—	—	—

由此确定，最优提取工艺为加热回流提取 2 次，第 1 次加 10 倍量 60% 乙醇，第 2 次加 8 倍



注：左边小图均为等高线图，右边小图均为三维曲面图。

图1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

量60%乙醇，每次45 min。再按照上述优化工艺进行3批验证试验，测得OD值分别为0.764 1、0.780 3、0.763 0，平均0.769 1，RSD为1.26%，表明工艺稳定可行，重复性良好。

3 讨论

壮药金母方原剂型为汤剂，但因其服用、保存不便，故将其制成颗粒剂。该方主要用于治疗慢性盆腔炎，其病因为前期细菌感染、反复发作而形成炎症^[10]，方中主药金刚刺、土茯苓主要成分为落新妇苷，虎杖主要成分为虎杖苷，两者均具有抗炎抑菌的作用，可反映全方有效性^[11-15]，故本实验以抗炎、抑菌活性为主要考核指标来筛选提取溶剂。在工业生产过程中，乙醇体积分数会对安全性、生产成本产生影响，故本实验又通过操作简便的体外抑菌实验来筛选其体积分数。

中药复方制剂临床疗效是方中各药材发挥协同作用的结果，故方中单一成分不能全面反映其整体性和有效性。目前，常选择有效成分含量、干膏得率的加权综合评分作为评价指标^[16-18]，故本实验采用虎杖苷、落新妇苷含量及干膏率来综合评

价金母颗粒提取工艺的优化效果。

另外，以抗炎、抑菌活性为主要考核指标时，金母颗粒最优提取溶剂为60%乙醇；以虎杖苷、落新妇苷含量为主要考核指标时，乙醇最优体积分数为70%，两者不一致。最终确定，以抗炎、抑菌活性为主，从而突出基于该方药效的核心地位。

参考文献：

[1] 申文慧. 妇雅净颗粒药学研究初探[D]. 南宁：广西中医药大学，2008.

[2] 熊冰. 壮药妇雅净颗粒新制剂的制备及对大鼠盆腔炎症疾病后遗症的作用机制研究[D]. 南宁：广西中医药大学，2016.

[3] 黎芳，王志萍，夏星，等. 壮药妇雅净提取物经胃肠道给药抗炎作用的实验研究[J]. 中国民族民间医药，2013，22(1)：26-27.

[4] 王志萍，梁裕芬，梁丹，等. 妇雅净浸膏体外抑菌杀虫作用的实验研究[J]. 广西中医药，2007，30(3)：54-55.

[5] 沈丹丹，顾志荣，马天翔，等. 扶正救肺方提取工艺的优化[J]. 中成药，2019，41(5)：1180-1184.

[6] 王佛长，黄诗莹，陈剑平，等. 痛风泰颗粒水提工艺的优化[J]. 中成药，2019，41(8)：1773-1777.

[7] 黄涵，王宇卿. 瓜蒌薤白半夏胶囊提取工艺的优化[J]. 中成药，2019，41(2)：420-423.

[8] 邹吉利，盛碧，陈永刚，等. 回乳抑增颗粒回流提取工艺的优化[J]. 中成药，2019，41(6)：1219-1222.

[9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京：人民卫生出版社，2011：12.

[10] 谢幸，苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京：人民卫生出版社，2013：264.

[11] 黄显章，邹鹏程，高秋芳，等. 金刚藤有效部位群治疗慢性盆腔炎的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16(17)：114-117.

[12] 帅丽乔姝. 菝葜提取物的抑菌抗氧化作用以及纯化绿原酸和落新妇苷的工艺研究[D]. 南昌：江西农业大学，2015.

[13] 肖文渊，王思芦，郝应芬，等. 虎杖乙醇提取物的抗炎及免疫活性初探[J]. 中兽医医药杂志，2018，37(6)：34-37.

[14] 王万骞，黄晨，陈本龙. 七种鞣质类中药提取物的抗菌作用[J]. 食品安全质量检测学报，2015，6(2)：457-465.

[15] 朱廷儒，王素贤，裴月湖，等. 中药虎杖抗菌活性成分的研究[J]. 中草药，1985，16(3)：21.

[16] 杨铭，张莉，葛迎利，等. 以多种数学模型探求降脂颗粒组方配伍优化的研究[J]. 中国中药杂志，2011，36(24)：3439-3443.

[17] 刘东平，张文朋，李端. 多指标试验结果的数据处理[J]. 包头医学院学报，2015，31(10)：127-128.

[18] 朱广平，戴雨晨，刘顺，等. 多指标综合评分法优选抗感染胶囊提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志，2019，26(3)：77-81.