

复方木尼孜其醇提工艺优化

赵祥¹, 环敷涵¹, 程雪梅¹, 邢建国², 穆丹丹³, 王长虹^{1*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002; 3. 新疆维吾尔药业有限责任公司, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 目的 优化复方木尼孜其醇提工艺。方法 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间为影响因素, 骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、异株五加甲苷、甘草酸、总黄酮含量及浸膏得率为评价指标, 正交试验优化醇提工艺。结果 最佳条件为 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h, 骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、异株五加甲苷、甘草酸、总黄酮含量及浸膏得率分别为 0.32、0.20、0.16、0.10、3.86 mg/mL 及 20.95%, 综合评分为 98.75 分。结论 该工艺稳定可靠, 合理可行, 可为醇提复方木尼孜其工艺提供参考依据。

关键词: 复方木尼孜其; 醇提工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0907-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.036

复方木尼孜其源于维吾尔族古籍《卡日巴丁卡德尔》, 距今已有 1500 年的历史, 由骆驼蓬子等 13 味中药组成, 收录于《中华人民共和国卫生部药品标准(维吾尔药分册)》^[1], 是目前维吾尔药中唯一上市的成熟剂品种。根据维医的体液学说, 复方木尼孜其颗粒作为异常体液的成熟剂, 通过调节发生异常的黑胆质等 4 种体液, 使其成熟并排出体外, 从而调节人体的代谢和激素的合成释放水平, 在肿瘤科^[2]、皮肤科^[3-5]、妇科^[6]等医院科室中有较广泛的应用。

研究表明, 复方木尼孜其颗粒对催产素诱导的小鼠原发性痛经有明显的保护作用, 其机制可能是减少小鼠体内过度的炎症反应以及脂质的过度氧化, 从而发挥镇痛、抗炎作用^[7-8]。同时, 通过 UPLC-Q-TOF-MS 技术在复方木尼孜其颗粒 70% 甲醇提取物中鉴定或推测出 75 个化合物, 大多数为黄酮、生物碱和皂苷类成分, 建立了定性定量方法, 为其应用提供了保证^[9-10]。

目前, 复方木尼孜其颗粒提取工艺以水为溶剂, 但该制剂中大多数成分是中小极性, 在水中溶解度较差。本实验采用正交试验优化复方木尼孜其醇提工艺, 以期为复方木尼孜其颗粒进一步研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 1260 Infinity 蒸发光散射检测器(美国 Agilent 公司); BSA124S-CW 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度仪(北京普析通用仪器

有限责任公司)。

1.2 试剂与药物 去氢骆驼蓬碱、骆驼蓬碱、芦丁、异株五加甲苷对照品均来自上海中药标准化研究中心(纯度均≥98%); 甘草酸对照品(批号 DST210620-060, 纯度≥98%)购于成都德思特生物技术有限公司。骆驼蓬子(批号 Y2001032)、茴芹果(批号 Y1912001)、茴香根皮(批号 Y2005056)、黑种草子(批号 Y2009019)、香青兰子(批号 Y1911023)、蜀葵子(批号 Y2003001)、洋甘菊(批号 Y2005054)、菊苣根(批号 Y2010002)、甘草(批号 Y2005050)、芹菜根(批号 Y2009014)、菊苣子(批号 Y2001017)、香茅(批号 Y2009033)、罗勒子(批号 Y1909015)均由新疆维吾尔药业有限公司提供, 经上海中医药大学王长虹教授鉴定为正品。乙腈、冰醋酸为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 各成分含量测定 采用 HPLC 法。

2.1.1 供试品溶液制备 按处方比例称取各药材适量, 加入 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 放冷后 70% 乙醇补足减失的质量, 离心, 取上清液, 转移至 250 mL 量瓶中, 70% 乙醇定容至刻度, 即得。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、甘草酸、异株五加甲苷对照品适量, 70% 乙醇制成每 1 mL 分别含四者 1.067、1.005、1.046、0.482 mg 的溶液, 即得。

收稿日期: 2022-06-17

基金项目: 上海市国内合作项目(20015800100); 新疆维吾尔自治区重点实验室开放基金(2019D04018)

作者简介: 赵祥(1996—), 男, 硕士, 从事中药新制剂与体内过程研究。Tel: 17864190372, E-mail: zxbskk1224@163.com

*通信作者: 王长虹(1964—), 男, 博士, 教授, 从事中药新制剂与体内过程研究。Tel: (021) 51322511, E-mail: wchexm@163.com

2.1.3 色谱条件 参考课题组前期建立的方法^[9], Diamonsil Plus C₁₈-A 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-醋酸铵缓冲盐 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 19% A; 10~20 min, 19%~30% A; 20~35 min, 30% A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; ELSD 蒸发管、漂移管温度 50 °C; 气体流速 1.6; Gain 值 8。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液适量, 70% 乙醇稀释成系列质量浓度 (骆驼蓬碱 33.19、55.31、92.19、153.65、256.08 μg/mL, 去氢骆驼蓬碱 31.26、52.10、86.83、144.72、241.12 μg/mL, 甘草酸 26.08、43.46、60.36、72.43、120.72 μg/mL, 异株五加甲苷 44.98、62.47、74.96、124.93、208.22 μg/mL), 在“2.1.3”项色谱条件下各进样 20 μL 测定。以对照品质量浓度的对数值为横坐标 (X), 峰面积的对数值为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 1, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
骆驼蓬碱	Y=1.756 7X+5.394	0.999 7	33.19~256.08
去氢骆驼蓬碱	Y=1.713 7X+5.227	0.999 8	31.26~241.12
甘草酸	Y=1.750 3X+5.350	0.999 7	26.08~120.72
异株五加甲苷	Y=1.646 6X+5.076	0.999 6	44.98~208.22

2.2 总黄酮含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取芦丁对照品 10 mg, 70% 乙醇超声溶解后定容至 100 mL, 摆匀, 即得 (该成分质量浓度为 0.1 mg/mL)。

2.2.2 检测波长确定 精密吸取供试品、对照品溶液各 1 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液, 振荡后静置 6 min, 然后加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液, 振荡后静置 6 min, 再加入 10 mL 4% 氢氧化钠溶液, 超纯水定容至 50 mL, 静置 15 min, 在 300~800 nm 范围内进行全波长扫描。结果, 2 种溶液均在 344 nm 处有最大吸收波长, 故选择其作为检测波长。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 1、2、3、4、5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 按“2.2.2”项下方法显色后于 344 nm 波长处测定吸光度。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A) 进行回归, 得方程为 A=0.051 79X+0.193 68 (R²=0.999 8), 在 0.010 3~0.051 5 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液 1 份, 在 344 nm 波长处测定吸光度 6 次, 测得其 RSD 为 0.157%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 稳定性试验 取“2.2.1”项下供试品溶液 1 份, 于 0、30、60、90、120 min 在 344 nm 波长处测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.82% (n=5), 表明溶液在 120 min 内稳定性良好。

2.2.4.3 重复性试验 按比例称取各药材 6 份, 按

“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在 344 nm 波长处测定吸光度, 测得其 RSD 为 1.20%, 表明该方法重复性良好。

2.2.4.4 加样回收率试验 按比例称取药材 6 份, 加入芦丁对照品适量, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在 344 nm 波长处测定吸光度, 计算回收率。结果, 芦丁平均加样回收率为 96.70%, RSD 为 1.19%。

2.2.5 测定方法 精密吸取供试品溶液 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 70% 乙醇定容至刻度, 精密吸取 5 mL, 转移至 50 mL 量瓶中, 在 344 nm 波长处测定吸光度, 代入“2.2.3”项下回归方程, 计算含量。

2.3 出膏率测定 精密吸取供试品溶液 25 mL, 置于干燥至恒重的蒸发皿中, 平行 9 份, 水浴蒸干, 在 105 °C 烘箱中干燥 5 h, 迅速转移至干燥器中冷却 1 h, 立即取出, 精密称定质量, 计算出膏率, 平行 2 次, 取平均值。

2.4 正交试验 以乙醇体积分数 (A)、乙醇用量 (B)、提取时间 (C) 为影响因素, 骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱、异株五加甲苷、甘草酸、总黄酮含量及浸膏得率为评价指标, 加权评分分别设定为 15、15、15、15、30、10 分, 再采用 L₉(3⁴) 正交表^[11]优化提取工艺, 因素水平见表 2, 结果见表 3。

表 2 因素水平

水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h
1	50	4	1
2	60	6	2
3	70	8	3

由表 3 可知, 各因素影响程度依次为乙醇用量 (B) > 乙醇体积分数 (A) > 提取时间 (C), 方差分析见表 4。最终确定, 最优工艺为 A₃B₃C₁, 即乙醇体积分数 70%, 乙醇用量 8 倍, 提取时间 1 h。

2.5 提取次数确定 按“2.4”项下优化工艺分别提取 1、2、3 次, 结果见表 5。由此可知, 提取 2、3 次效果基本一致, 而且均优于提取 1 次。最终确定, 提取次数为 2 次。

2.6 验证试验 按“2.4”项下优化工艺平行制备 3 批样品, 进行验证试验, 结果见表 6, 可知该工艺稳定可靠。

3 讨论

黄酮是复方木尼孜其中种类最多的成分, 有抗炎^[12]、抗氧化^[13]等功效, 但单一化合物含量均较低, 故选择总黄酮含量作为评价指标。然后, 以芦丁、槲皮素为对照品, 考察了 AlCl₃^[14]、NaNO₂-Al (NO₃)₃-NaOH^[15]、三乙胺^[16]显色体系, 三乙胺显色法适合测定以芹菜素为母核的黄酮, 而对其他种类黄酮的显色效果较差, 并且其显色受乙醇含水量的影响^[17], 而 NaNO₂-Al (NO₃)₃-NaOH 显色法对大多数种类黄酮都适用, 并且稳定性好, 故选择该方法测定总黄酮含量。

本实验将生物碱、黄酮、皂苷类成分纳入复方木尼孜其醇提工艺优化的评价指标, 采用主观赋权法将三者均赋予 30 分, 而浸膏得率赋予 10 分, 可在一定程度上客观全

表3 试验设计与结果

试验号	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	D (空白)	含量/(mg·mL ⁻¹)					浸膏得率/%	综合评分/分
					骆驼蓬碱	去氢骆驼蓬碱	异株五加甲苷	甘草酸	总黄酮		
1	50	4	1	1	48.0	27.0	14.3	17.5	1.99	14.1	83.5
2	50	6	2	2	45.6	24.8	14.0	17.1	2.17	15.5	84.4
3	50	8	3	3	47.7	25.1	11.8	14.3	2.16	16.3	81.2
4	60	4	2	3	46.9	24.2	11.7	14.2	2.14	15.5	79.7
5	60	6	3	1	50.1	26.4	11.9	14.4	2.25	17.3	84.2
6	60	8	1	2	55.7	29.7	15.2	18.6	2.27	14.7	92.1
7	70	4	3	2	48.4	25.6	11.3	13.7	2.22	15.8	81.1
8	70	6	1	3	55.0	29.5	14.0	17.1	2.25	16.6	90.4
9	70	8	2	1	60.7	33.9	15.9	19.6	2.41	17.6	100.0
K ₁	83.0	81.4	88.7	89.2	—	—	—	—	—	—	—
K ₂	85.3	86.3	88.0	85.9	—	—	—	—	—	—	—
K ₃	90.5	91.1	82.2	83.8	—	—	—	—	—	—	—
R	7.5	9.7	6.5	5.4	—	—	—	—	—	—	—

表4 方差分析

来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	87.7	2	1.0	4.5	>0.05
B	140.2	2	1.6	4.5	>0.05
C	77.1	2	0.9	4.5	>0.05
D(误差)	45.6	2	0.5	4.5	>0.05

表5 提取次数考察结果

提取次数/次	含量/(mg·mL ⁻¹)					浸膏得率/%	综合评分/分
	骆驼蓬碱	去氢骆驼蓬碱	异株五加甲苷	甘草酸	总黄酮		
1	0.24	0.14	0.06	0.08	2.41	17.56	70.65
2	0.32	0.17	0.12	0.09	3.85	20.78	98.70
3	0.32	0.17	0.11	0.09	3.91	22.47	98.45

表6 验证试验结果(n=3)

试验号	含量/(mg·mL ⁻¹)					浸膏得率/%	综合评分/分
	骆驼蓬碱	去氢骆驼蓬碱	异株五加甲苷	甘草酸	总黄酮		
1	0.32	0.19	0.16	0.10	3.86	20.75	98.61
2	0.32	0.20	0.15	0.09	3.84	21.04	97.64
3	0.33	0.20	0.16	0.10	3.89	21.05	100.00
平均值	0.32	0.20	0.16	0.10	3.86	20.95	98.75
RSD/%	1.19	2.29	3.15	2.08	0.67	0.81	1.20

面地反映该方整体疗效，从而保证工艺的有效性。由于方中种子、根茎类药材吸水量较大，直接加入提取溶剂时会导致其浸提不充分，故正交试验前考察了处方吸水量，最终确定第1次提取需多加5倍量提取溶剂以补足药材吸水量。在筛选提取溶剂时，本实验考察了水及10%、30%、50%、70%、90%乙醇，发现50%、70%乙醇提取效果更优，故选择50%、60%、70%乙醇进行工艺优化。

参考文献：

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准(维吾尔药分册) [S]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生出版社，1998.
- [2] 凌丰，沈纳峰，叶岩. 复方木尼孜其颗粒联合维A酸乳膏治疗黄褐斑的临床疗效及其机制分析[J]. 中国生化药物杂志，2015, 35(9): 118-120.

- [3] 努尔拉江·帕合尔丁，穆克代斯·伊力亚斯，帕丽达·阿皮孜阿吉. 78例恶性肿瘤放化疗中联合维药复方木尼孜其颗粒的临床观察[J]. 中国民族医药杂志，2017, 23(1): 22-24.
- [4] 杨金武，郭洪春，彭文仪. 红蓝光动力联合复方木尼孜其颗粒及阿达帕林凝胶治疗重度痤疮疗效评价[J]. 中国麻风皮肤病杂志，2014, 30(1): 40-41.
- [5] 曾三武，金京姬，魏文国，等. 复方木尼孜其颗粒联合窄谱UVB治疗白癜风疗效观察[J]. 中国美容医学，2012, 21(14): 325-326.
- [6] 郑漪霖，余黎. 复方木尼孜其颗粒对盆腔炎性疾病后遗症的作用[J]. 中国妇幼保健，2010, 25(36): 5473-5476.
- [7] Wei Y, Ma T Y, Wang H X, et al. Extracts of compound Muniziqi granule suppressed uterus contraction and ameliorated oxytocin-induced primary dysmenorrheal[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 239: 111-118.

- 2018, 223: 33-40.
- [8] Cheng J J, Ma T Y, Liu W, et al. In *in vivo* evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of compound Muniziqi granule in experimental animal models [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 20.
- [8] 韦 悅, 程娟娟, 程雪梅, 等. 维吾尔药复方木尼孜其颗粒剂的质量控制方法研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1799-1809.
- [9] 环敦涵, 李曼琳, 邢建国, 等. 基于色谱-质谱联用技术的复方木尼孜其颗粒化学成分分析与鉴定[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1366-1375.
- [10] 林启焰, 谢 凡, 程雪梅, 等. 正交试验优化滋肾养阴颗粒剂提取工艺[J]. 中成药, 2017, 39(1): 213-215.
- [11] 廖成松, 韩阳阳. 瘤果黑种草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(6): 1564-1570.
- [12] 方诗琦, 冷 康, 段金廒, 等. 甘草药渣中黄酮类成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2443-2448.
- [13] 宗春燕, 苏学军. 三氯化铝比色法测定稻壳中总黄酮含量的方法研究[J]. 化学工程师, 2017, 31(10): 66-69.
- [14] 李国峰, 陈海芳, 郎一帆, 等. 诃子总黄酮提取工艺的优化及其体外生物活性研究[J]. 中成药, 2021, 43(11): 2945-2951.
- [15] 司云珊, 翟宏业, 王 玉, 等. 正交试验法优选散痛风凝胶膏贴剂中总黄酮类成分提取工艺[J]. 中国处方药, 2020, 18(12): 29-30.
- [16] 袁旭江, 张 平, 吴燕红, 等. 毛鸡骨草中总黄酮含量测定方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 80-84.
- [17] 邢伯颖, 陈新梅, 秦 乐, 等. 两种显色法测定昆仑雪菊总黄酮含量的比较研究[J]. 化工时刊, 2016, 30(12): 23-25.

白屈菜甘草汁炙工艺的优化

王仁广, 胡力铭, 刘俊泽, 李小欢, 徐丽娅, 王淑敏^{*}
(长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117)

摘要: 目的 优化白屈菜甘草汁炙工艺。方法 在单因素试验基础上, 以炒制温度、炒制时间、甘草与白屈菜比例、甘草汁与白屈菜比例为影响因素, 小檗碱、白屈菜红碱、盐酸黄连碱、白屈菜碱、血根碱总含量为评价指标, Box-Behnken响应面法优化炮制工艺。结果 最佳条件为炒制温度 122 ℃, 炒制时间 9.50 min, 甘草与白屈菜比例 5.2:100, 甘草汁与白屈菜比例 48:100, 5 种生物碱总含量为 11.61 mg/g。结论 该方法合理可行, 操作简便, 可用于规范白屈菜甘草汁炙品的生产工艺及质量控制。

关键词: 白屈菜; 甘草汁炙工艺; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R283

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)03-0910-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.037

白屈菜为罂粟科植物白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草, 具有解痉镇痛、止咳平喘之功效^[1], 常用于治疗慢性支气管炎、哮喘、痉挛等疾病, 其主要成分为生物碱类, 有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抑制平滑肌等活性^[2-7], 但该药材具有一定的肝毒性和肺毒性^[8-9], 故需加以炮制以达到增效减毒的目的。目前, 临幊上白屈菜仅经过简单净制后直接使用, 并无特殊炮制方法; 丁原全等^[10]采用醋烟法炮制白屈菜, 以期增强其生物碱的水溶性及止痛作用。

甘草汁作为炮制辅料, 常用来消减中药毒性^[11-12], 其本身具有祛痰止咳、清热解毒的功效^[13-14], 炮制白屈菜时

可缓和药性、降低毒性, 并增强止咳平喘作用。本实验优化白屈菜甘草汁炙工艺, 以期为其规范化及炮制品质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-2030 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); AB204A/S 型 (万分之一)、ABB5-S 型 (十万分之一) 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 试剂与药物 白屈菜碱 (批号 DST190911-079)、盐酸黄连碱 (批号 DST190913-003)、小檗碱 (批号 DST180603-009)、白屈菜红碱 (批号 34316-15-9)、血根碱

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (192485YY010358427)

作者简介: 王仁广 (1993—), 男, 博士生, 从事中药炮制关键技术及科学内涵研究。Tel: 15843053098, E-mail: 727736000@qq.com

*通信作者: 王淑敏 (1965—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制关键技术及科学内涵研究。Tel: 13943028030, Email: 446097156@qq.com

网络出版日期: 2022-08-01

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220729.1814.002.html>