

贞子方中的有效组分,在查阅相关文献发现,大多数应用的是灵芝、香菇、根霉菌等,而本研究用的真菌未发现应用于中药材固体发酵的研究,因此,通过本研究不仅有利于本真菌在中药资源发酵中的应用,而且为大品种二次开发及中药有效组分富集提供一种新的思路。

参考文献:

[1] 庄毅.药用真菌新型(双向性)固体发酵工程[J].中国食用菌, 2002, 21(4):3.

- [2] 魏巍.灵芝-黄芪液体发酵条件优化及缓解体力疲劳功能研究[D].成都:四川农业大学硕士学位论文,2007.
- [3] 陈雪婷,陈卉,王洛临,等.星点设计-效应面法优选广金钱草提取工艺[J].中成药,2016,38(5):1171.
- [4] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药典标准,一部[S].北京:中国医药科技出版社,1995.

白芷纳米乳鼻喷雾剂提取工艺的正交试验优选

陈玲珑¹,李跃辉^{2*}

[1. 湖南省中医药研究院附属医院(湖南中医药大学附属中西医结合医院) 湖南长沙 410006;

2. 湖南省中医药研究院 湖南长沙 410006]

摘要:目的 正交试验优选白芷纳米乳鼻喷雾剂的提取工艺。方法 以欧前胡素提取量、香豆素提取量总量和浸膏得率的综合评分为评价指标,在单因素试验基础上,采用正交试验优选白芷醇提工艺的溶剂体积、乙醇浓度、提取时间。结果 优选得到白芷纳米乳鼻喷雾剂最佳醇提工艺为:以85%乙醇为提取溶剂,第1次6倍量1.5h,第2次5倍量1h,共提取2次。结论 在单因素试验基础上,通过正交试验优选的提取工艺经验证稳定、简便易行,预测性好,为白芷纳米乳鼻喷雾剂的工艺研究提供了依据。

关键词:白芷纳米乳鼻喷雾剂; 正交试验; 欧前胡素; 香豆素; 浸膏得率

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.02.030

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2019)02-0351-03

Optimization of extraction technology of Baizhi nanoscale spray for nose by orthogonal design

CHEN Ling-long¹, LI Yue-hui^{2*}

(1. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

Abstract: Objective To optimize extraction process of Baizhi nanoscale spray for nose by orthogonal design. **Methods** On the basis of single factor tests, orthogonal design was employed to investigate effects of the extraction time, the alcohol addition and the alcohol concentration. **Results** The optimization processing parameters was as follows: added 6 times volume of 85% of ethanol and 5 times volume of 85% of ethanol separately, extracted for twice, the first 1.5 hours then 1 hour. **Conclusion** This optimized extraction experience proved to be stable, simple, good predictability by orthogonal design, it provides the basis for technology research of Baizhi nanoscale spray for nose.

Key words: Baizhi nanoscale spray for nose; Orthogonal design; Imperatorin; Coumarin; Yield of extract

白芷的功效为散风除湿、通窍止痛、消肿排脓,常用于鼻塞、鼻渊、牙痛、感冒头痛、疮疡肿痛等的治疗^[1],尤其在鼻炎疾病上应用较多,但外用制剂一般以熏蒸为主,该方法需要专用的仪器和专业人员的协助,携带和操作均不方便^[2]。由于鼻黏膜的特点为穿透性较高而酶相对较少,故对药物的降解作用比胃肠道黏膜低,为了延长白芷在鼻黏膜滞留时间,提高其生物利用度^[3],在保持中医药特色的基础上,采用药物制剂新技术,研制成既保持疗效,又使用方便,操作简单的白芷纳米乳鼻喷雾剂。白芷主要含香豆素类成分,是其抗炎的主要药效成分,呋喃香豆素抗炎

作用是通过抑制环氧合酶-2(COX-2),从而调节花生四烯酸的代谢途径实现的;且香豆素的代表成分欧前胡素及异欧前胡素均具有显著的镇痛作用,能明显抑制热板法所致的小鼠疼痛,欧前胡素为2015年版《中国药典》(第一部)白芷药材质量控制指标成分^[4],故本文以醇浸膏得率、香豆素提取总量和欧前胡素的含量为综合考察指标,对其工艺进行优选。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪 (SPD-20A 检测器, LC-20A 泵, LC-20B 泵), 依利特色谱柱 (Hypersil ODS2 5 μ m, 4.6mm \times 250mm), DK-98-II 电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司), DZTW 型调温电热套 (北京永光医疗机械厂), YP5102 电子天平 (上海光正医疗有限公司), AL204 分析天平 (梅特勒托利多), 电热鼓风干燥箱 (上海康路仪器有限公司), UV2450 紫外吸收分光光度计 (日本岛津公司), SB2200 超声清洗器 (昆山市仪器有限公司)。

1.2 试剂 白芷药材 (购自湖南省自然堂中药饮片有限公司),

收稿日期: 2018-07-20; 修订日期: 2019-01-10

基金项目: 湖南省中医药管理局重点项目 (201726)

作者简介: 陈玲珑 (1981-), 女 (汉族), 湖南邵阳人, 湖南省中医药研究院附属医院主管药师, 硕士学位, 主要从事制剂及质量控制研究工作。

* 通讯作者简介: 李跃辉 (1978-), 女 (汉族), 湖南益阳人, 湖南省中医药研究院研究员, 硕士学位, 主要从事中药制剂研究及分析工作。

欧前胡素对照品(中检院:110826-200511)水为纯化水,色谱级甲醇(美国天地有限公司)其他试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 提取次数的选择试验 取白芷饮片 粉碎成最粗粉 加 80% 乙醇提取 3 次 第 1 次加 6 倍量提取 1.5 h,第 2 次加 5 倍量 提取 1h 第 3 次加 5 倍量 提取 1h 醇浸膏得率及香豆素提取量结果见表 1。

表 1 白芷醇提次数的选择试验结果

提取次数	第 1、2 次	第 3 次	第 3 次所占比例* /%
醇浸膏得率	13.16%	1.52%	10.35
香豆素提取量	175.5mg	16.7mg	8.69

* 指第 3 次醇提取占总醇浸膏量、香豆素总提取量的比例

试验结果表明,以醇浸膏得率和香豆素提取量为指标,第 3 次醇提所占比例分别为 10.35%、8.69%;说明白芷饮片两次已基本提取完全,故采用醇提两次的工艺。

2.2 正交试验优选提取工艺 取白芷药材 粉碎成最粗粉 称取 30g 采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,乙醇提取液过滤,滤液合并回收乙醇,定容至一定体积 V。

2.2.1 因素水平 以白芷醇浸膏得率、香豆素提取总量及欧前胡素含量为考查指标,采用正交试验对白芷醇提工艺进行优选。见表 2。

表 2 因素水平

水平	A	B	C
	溶剂浓度 /%	加乙醇量 /倍	提取时间 /h
1	85	8 7	2 1.5
2	75	7 6	1.5 1
3	65	6 5	1 1

2.2.2 醇浸膏得率的测定 精密吸取已定容的白芷醇提溶液 20ml,置干燥至恒重的蒸发皿中,蒸干,电热干燥箱 105℃ 干燥 3h 取出,干燥器中冷却 30min 迅速称重,并计算醇浸膏得率,余液备用。结果见表 3。

$$\text{醇浸膏得率}(\%) = \frac{W \times V}{20M} \times 100\%$$

表 3 白芷醇提工艺正交试验及结果

试验号	A	B	C	D	浸膏得率 /%	香豆素 /mg	欧前胡素 /mg
1	1	1	1	1	13.25	139.2	36.2
2	1	2	2	2	12.80	227.3	54.8
3	1	3	3	3	11.64	173.3	41.8
4	2	1	2	3	12.86	147.8	36.2
5	2	2	3	1	11.59	116.1	29.6
6	2	3	1	2	12.98	87.8	35.7
7	3	1	3	2	10.59	132.3	31.9
8	3	2	1	3	12.29	162.1	39.1
9	3	3	2	1	11.76	225.9	51.0
醇浸膏得率	Ij	37.68	36.71	38.52	36.60		
	IIj	37.43	36.68	37.43	36.37		
	IIIj	34.65	36.38	33.82	36.79		
	R	3.03	0.33	4.7	0.42		
香豆素提取量	Ij	539.8	419.3	389.1	481.2		
	IIj	351.7	505.5	601.0	447.4		
	IIIj	520.3	487.0	421.7	483.2		
	R	181.1	86.2	211.9	35.8		
欧前胡素含量	Ij =	132.9	104.3	111.0	116.8		
	IIj	101.5	123.5	142.0	122.5		
	IIIj	122.0	128.5	103.3	117.1		
	R	31.4	24.2	38.7	5.7		

$$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 109.76$$

$$CT = G^2 / 9 = 1338.67$$

$$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 1411.80$$

$$CT = G^2 / 9 = 221464.36$$

$$G = \sum_{i=1}^9 y_i = 356.37$$

$$CT = G^2 / 9 = 14111.16$$

式中: W (g) 为浸膏重; V (ml) 浓缩后定容的总体积; M (g) 药材取样量。

2.2.3 白芷提取物中总香豆素的含量测定 照紫外分光光度法(《中国药典》2015 年版四部 附录) [4]。

白芷提取物为混合物,且总香豆素成分复杂,导致样品溶液的紫外吸收峰型很不规则。通过紫外分光光度法扫描得知欧前胡素对照品溶液和白芷提取物溶液在 300 nm 附近均有较强吸收,且峰型变化平缓,故本研究采用 300 nm 作为测定波长 [5 6]。

2.2.3.1 对照品溶液制备 精密称取欧前胡素对照品,加乙醇溶解制成 36.4μg/ml 的对照品溶液,即得。

2.2.3.2 供试品溶液的制备 精密吸取定容后白芷醇提取液 1ml,置 50 ml 量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3.3 标准曲线的绘制 精密量取上述取欧前胡素对照品溶液各 1 2 3 4 5 ml 于 10 ml 量瓶,分别加乙醇至刻度,摇匀,在 300 nm 处分别测定吸光度。以吸光度为纵坐标,欧前胡素浓度为横坐标,绘制标准曲线, Y = 0.04445X + 0.00965 r = 0.999。

2.2.3.4 测定法 取定容后醇提取液,置 50 ml 量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,用紫外分光光度计在 300 nm 处测定吸光度。通过标准曲线读出供试品溶液中含欧前胡素的质量(μg),计算总香豆素的含量。结果见表 3。

2.2.4 HPLC 测定白芷提取物中欧前胡素的含量

2.2.4.1 色谱条件与系统适应性 选用十八烷基硅胶为填充剂,流动相为甲醇-水(60:40),检测波长 300nm,流速 1ml/min,理论板数不低于 3000。

2.2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取欧前胡素对照品适量,加甲醇制成 10 ug/ml 的溶液,即得。

2.2.4.3 供试品溶液的制备 取白芷提取物适量,精密称定,置 50 ml 量瓶中,加甲醇 45 ml,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz) 1h,取出,放冷,加甲醇至刻度线,摇匀,0.45um 有机膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4.4 测定法 对照品溶液 10 μl,供试品溶液 20 μl,分别注入液相色谱仪测定。计算欧前胡素的含量。结果见表 3。

2.3 方差分析 结果见表 4~6。

表 4 白芷醇浸膏得率方差分析结果

方差来源	离差平均和	自由度	均方	F	P
A	1.8906	2	0.9453	64.44	<0.05
B	0.0221	2	0.0111	0.75	>0.05
C	4.0369	2	2.0184	137.59	<0.01
D	0.0293	2	0.0742		

表 5 白芷醇提香豆素总量方差分析结果

方差来源	离差平均和	自由度	均方	F	P
A	7131.98	2	3565.99	26.44	<0.05
B	1372.89	2	686.44	5.09	>0.05
C	8679.21	2	4339.6	32.17	<0.05
D	269.79	2	134.89		

表 3 中极差 R 值大小显示:以白芷醇浸膏得率为考查指标时,各因素作用主次为 C > A > B, C 因素 ($P < 0.01$)、A 因素 ($P < 0.05$) 其影响均具有非常显著性意义,以 A_1C_1 为好, B 因素 ($P > 0.05$) 其影响无显著性意义;以白芷总香豆素含量和欧前胡素含量为考查指标时,各因素作用主次为 C > A > B, A、C 两因素均 ($P < 0.05$) 其影响具有显著性意义, B 因素 ($P > 0.05$) 其影响无显著性意义,均以 A_1C_2 组合为好。以醇浸膏得率与香豆素提取量为考查指标, A、C 两因素均有显著性影响,考虑到香豆素含量、欧前胡素含量这一因素较为重要,故 C 选择 C_2 , B 因素的影响均无影响性意义,从大生产中节能考虑,选择 B_3 。综上,选择 $A_1B_3C_2$ 组合为优选工艺。

表 6 白芷醇提欧前胡素含量方差分析结果

方差来源	离差平均和	自由度	均方	F	P
A	169.03	2	84.51	25.04	<0.05
B	108.83	2	54.42	16.12	>0.05
C	280.17	2	140.08	41.5	<0.05
D	6.75	2	3.85		

2.4 验证试验 方案 $A_1B_3C_2$ 是正交表中没有的方案,尚需做实验予以验证。取与正交试验同批白芷药材,按方案 $A_1B_3C_2$ 工艺条件进行实验,测定白芷醇浸膏得率与香豆素提取量,结果醇浸膏得率分别为 13.35%、13.08%、13.29%,香豆素提取量分别为 231.3mg、224.7mg、228.9mg,欧前胡素提取量分别为 53.8mg、55.12mg、54.72mg。因此,确定最佳醇提取工艺为 $A_1B_3C_2$,即白芷药材加 85% 乙醇回流提取两次,第 1 次加 6 倍量提取 1.5h,第 2 次加 5 倍量提取 1h。

3 讨论

白芷中主要成分为香豆素类、挥发油类成分。其中欧前胡素、氧化前胡素、异欧前胡素等香豆素类成分为白芷镇痛的主要活性成分^[7]。《中国药典》(2015 年版)将欧前胡素作为白芷药材质量的控制指标成分,为了全面评价醇提工艺,本文以浸膏得率、香豆素含量和欧前胡素含量为综合评价指标。

白芷提取方法有乙醇回流提取、乙酸乙酯加热回流提取、渗漉提取和超声提取^[8],考虑生产安全及环境友好,选用乙醇为提取溶剂。正交设计注重科学合理的安排试验,为了寻找最佳因素水平组合,可以同时考虑几种因素^[9],所以采用正交设计优选工艺。考察溶剂浓度、溶剂用量、提取时间、提取次数这几个因素不同水平对白芷醇提工艺的影响,以浸膏得率、香豆素含量和欧前胡素为综合评价指标,优选出的最佳工艺为:白芷药材加 85% 乙醇回流提取两次,第 1 次加 6 倍量溶剂提取 1.5 小时,第 2 次加 5 倍量溶剂提取 1 小时。经试验验证表明所选的醇提工艺条件稳定且重现性良好。

参考文献:

- [1] 王云龙,杨立志,姜雪敏,等. HPLC 测定白芷药材中欧前胡素与异欧前胡素的含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8(18): 74.
- [2] 纪少丰,陈铃,林永城. 中药熏蒸的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 22(11): 444.
- [3] Sintov AC, Levy HV, Botner S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies [J]. J Control Release, 2010, 148(2): 168.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典, 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 38.
- [5] 马逾英,钟世红,贾敏如,等. 紫外分光光度法测定川白芷中总香豆素类成分的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(2): 159.
- [6] 张利,马逾英,蒋桂华,等. 白芷新型饮片总香豆素与欧前胡素的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 80.
- [7] 刘晓昱,王佩. 白芷香豆素类成分的提取及大孔树脂纯化的工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 438.
- [8] 于定荣,麻印莲,顾雪竹,等. 不同提取方法对白芷中香豆素成分欧前胡素、异欧前胡素的影响及镇痛作用的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2405.
- [9] 刘寒,金司阳,郭慧,等. 正交设计与 Box - Behnken 设计比较研究优化岩高兰多糖提取工艺[J]. 中医药导报, 2017, 23(21): 71.