

抗小儿腹泻中药复方宝泻宁提取工艺的优化研究^{*}

刘 静¹, 周盈利¹, 王婵娟¹, 徐月红¹, 张克坚², 王冬梅^{1,3}

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;

2. 广东华南新药创制中心, 广东 广州 510663;

3. 广东省现代中药工程技术研究开发中心, 广东 广州 510006)

摘要: 为优化并建立抗小儿腹泻中药复方宝泻宁(BXN)的提取工艺, 采用回流提取法, 以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛的转移率为考察指标, 选择不同浓度乙醇为提取溶媒, 选定溶媒含醇量、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行BXN的提取工艺的优化。综合考虑各指标成分转移率及工业应用的方便、经济, 经工艺验证, 选定采用10倍量的 $\varphi=95\%$ 乙醇回流提取2次, 每次提取2h为优选工艺, 该方法可有效提取BXN中的有效成分, 4个指标成分的转移率均在80%以上, 并具有稳定、经济、便捷的优点。

关键词: 中药复方 BXN; 抗腹泻; 提取; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2015)02-0101-05

Optimization of Extraction Process of Chinese Herbal Compound Bao-Xie-Ning for Anti-Diarrhea in Infant

LIU Jing¹, ZHOU Yingli¹, WANG Chanjuan¹, XU Yuehong¹, ZHANG Kejian², WANG Dongmei^{1,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. South China Center for Innovative Pharmaceuticals, Guangzhou 510663, China;

3. Guangdong Technology Research Center for Advanced Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The study is to optimize and establish the extraction process of the Chinese herbal Compound Bao-Xie-Ning used for Anti-diarrhea in Infant. The process was optimized by taking the extraction percentages of evodiamine, rutaecarpine, eugenol, cinnamic aldehyde as the evaluation parameters, considering the concentration of ethanol (extraction solvent), liquid-solid ratio, extraction time, extraction times as the affecting factor, and the extraction process of BXN optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design. The results show that optimum condition is achieved when the concentration of ethanol is 95%, liquid-solid ratio is 10 (V/m), the mixed herbs are extracted twice while 2 hours for each time. The established optimum extraction process is efficient for the extraction of BXN, and is a stable, economical and convenient method.

Key words: Chinese herbal Compound BXN; anti-diarrhea; extraction process; orthogonal experiment

腹泻是多种疾病的常见症状, 是由各种疾病或食物、重金属盐中毒所引起的, 其主要表现为排便次数增多、粪便稀薄、含水量增加, 且常伴有未经消化的食物, 甚至脓血, 严重者可引起脱水和电解

质紊乱^[1-2]。据世界卫生组织2013年的统计报道, 全球每年约有17亿次的腹泻发生, 每年约有76万5岁以下儿童死于腹泻病。腹泻是婴幼儿时期的常见病, 是我国儿童重点防治的四病之一, 对小儿健

* 收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 广东省重大科技计划资助项目(2010A080813002)

作者简介: 刘静(1991年生), 女, 研究方向: 生药学; 通信作者: 王冬梅; E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn

康影响极大, 目前仍是导致婴幼儿死亡的重要原因, 必须引起高度重视^[3-4]。

宝泻宁 (BXN) 是根据中医理论在中国药典所收录的小儿腹泻外敷散 (吴茱萸、丁香、白胡椒、肉桂) 的基础上进行药味化裁, 选择温里散寒、燥湿健脾、止痛止泻的吴茱萸、丁香、肉桂三味中药组成的抗小儿腹泻中药复方。含有中药吴茱萸、丁香或肉桂的中药复方, 通过敷脐疗法在治疗小儿腹泻方面有很好的临床效果^[5-7], 但由于给药方式简单、粗放, 给小儿治疗带来了很大的不便。为了方便小儿用药, 同时对中药经皮给药制剂进行新的探索, 本课题组采用凝胶膏剂 (也称巴布剂) 这一国际上新兴的经皮给药制剂剂型^[8-9], 对 BXN 的凝胶膏剂进行了研制。本文研究旨在对 BXN 提取工艺进行优化筛选, 采用四因素三水平的正交试验, 以提取溶媒含醇量、料液比、提取时间、提取次数为主要考察因素, 以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛的转移率为考察指标, 利用 HPLC 法测定提取物中各指标成分含量并计算转移率, 筛选建立了 BXN 的优选提取工艺。

1 材 料

1.1 仪器

AG-285 电子天平 (METTLER TOLEDO Max81 g/210 g, d=0.01 mg/0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多公司); SB25-120 超声清洗机 (功率 350 W, 频率 35 kHz, 宁波新芝生物科技股份有限公司), LC-20A 高效液相色谱仪 (LC-20AB 二元高压泵, IL-20A 自动进样器, SPD-M20A 检测器, CTO-20A 柱温箱, 色谱软件 LCsolution, 日本岛津公司), TRACE DSQ 热电气质谱联用仪 (热电公司)

1.2 药材

吴茱萸为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 (*Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth) 的干燥近成熟果实 (批号: 20120704), 丁香为桃金娘科植物丁香 (*Eugenia caryophyllata* Thunb) 的干燥花蕾 (批号: 20120704), 肉桂为樟科植物肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl) 的干燥树皮 (批号: 20120704), 上述药材均购自广州市药材公司中药饮片厂, 经中山大学生药学与天然药物化学实验室杨得坡教授鉴定。

1.3 药品与试剂

吴茱萸碱对照品 (110802-200606), 吴茱萸次碱对照品 (110801-201006), 吴茱萸内酯 (又名柠檬苦素, 110800-200404), 丁香酚对照品 (110725-201112), 桂皮醛对照品 (110710-

201016), 购自中国药品生物制品检定所。食用酒精 (市售, $\varphi=95\%$), HPLC 用乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA), 超纯水 (Millipore 超纯水系统), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 原料药材中指标成分含量测定

参照中国药典 (2010 版, 一部) 中吴茱萸、丁香、肉桂药材含量测定项, 采用高效液相色谱法测定吴茱萸药材中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯 (柠檬苦素), 以及肉桂药材中桂皮醛的含量; 采用气相色谱法测定丁香中丁香酚含量。所得药材中各指标成分含量如表 1 所示。根据中国药典要求, 吴茱萸药材中吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量不得少于 0.15%, 吴茱萸内酯不少于 0.9%; 丁香药材中丁香酚含量不得少于 11%; 肉桂药材中桂皮醛含量不得少于 1.5%, 故本研究所用吴茱萸、丁香、肉桂药材均符合中国药典的要求。

表 1 吴茱萸、丁香、肉桂药材中各指标成分含量

Table 1 Contents of Marker Compounds in Three Kinds of Crude Medicine

药材	指标成分	w/%			均值
		样品 1	样品 2	样品 3	
吴茱萸	吴茱萸内酯	2.46	2.38		2.42
吴茱萸	吴茱萸碱	0.78	0.73		0.76
吴茱萸	吴茱萸次碱	0.38	0.36		0.37
肉桂	桂皮醛	2.22	2.32		2.27
丁香	丁香酚	16.43	17.31	16.72	16.82

2.2 提取物中指标成分含量测定方法的建立

2.2.1 指标成分的选取 参考中国药典 (2010 版, 一部) 中吴茱萸、丁香、肉桂药材含量测定项指标成分的选择, 初步确定提取工艺考察的指标成分为吴茱萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯、丁香酚、桂皮醛。关于吴茱萸药材抗腹泻活性成分研究, 戴媛媛等^[10]指出, 吴茱萸碱能抑制醋酸诱导的腹腔血管通透性增加, 镇痛消炎, 吴茱萸次碱具有消炎的作用。龚慕辛等^[11]指出, 吴茱萸碱能够抑制雄性大鼠胃排空和胃转运, 机制涉及 CCK 释放和 CCK₁ 受体激活, 吴茱萸次碱可对兔和人肛门括约肌产生松弛作用。杨志欣等报道^[12-13] 吴茱萸内酯具有止泻、镇痛的作用, 但在 HPLC 分析方法的建立中, BXN 复方中共存的丁香、肉桂中的成分对吴茱萸内酯的测定有干扰给其含量测定结果的准确性带来影响, 故在提取工艺考察中不对吴茱萸

内酯转移率进行测定。最后确定提取工艺考察的指标成分为：吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛。

2.2.2 色谱条件优化 色谱柱：Diamonsil - C18 (2) 5 μm, 250 mm × 4.6 mm, Dikma 公司；保护柱：Gemini C18 4 mm × 3.0 mm, Phenomenex 公司；检测波长：290 nm；流速：1 mL/min；柱温：室温。分别用乙腈 - 0.2% 醋酸 (φ) 水系统、乙腈 - 0.4% 醋酸 (φ) 水系统在不同洗脱程序条件下进行实验，以各指标成分的分离情况作为考察指标。筛选得出优选流动相系统为乙腈 - 0.2% 醋酸 (φ) 水，优选洗脱程序条件见表 2，BXN 提取物及 4 个指标成分对照品在该条件下分析所得 HPLC 色谱图见图 1。

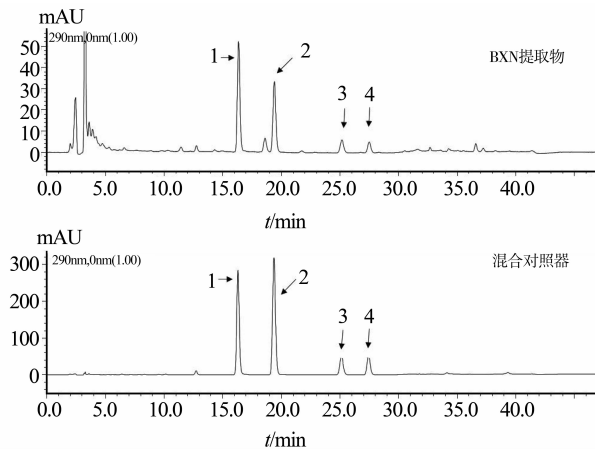


图 1 BXN 提取物和 4 个指标成分对照品混合液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of The BXN Extract and the Mixture of Four Standard References

1: 桂皮醛; 2: 丁香酚; 3: 吴茱萸碱; 4: 吴茱萸次碱

表 2 优选的 HPLC 洗脱条件

Table 2 Optimized Elution Requirement of HPLC

时间/min	φ(乙腈)/%	φ(0.2% 醋酸水)/%
0.01	30	70
10.00	45	55
20.00	50	50
25.00	59	41
26.00	90	10
36.00	90	10

2.2.3 检测波长的确定 分别在 254、280、290、324 nm 波长下测定吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛相对应色谱峰的峰面积，以质量浓度 (μg/mL) 为横坐标，峰面积 (A) 为纵坐标，绘制标准曲线，求回归方程。综合四个指标成分的情况，在 290 nm 下，各指标成分回归方程中 R 平方

值均能达到 0.999 9，说明在相应质量浓度范围内线性关系良好，故采用 290 nm 作为 4 个指标成分定量分析的检测波长。

2.2.4 提取物供试品溶液的制备 精密称取提取物 30 mg，用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶中，过滤，即得。平行操作两份。

2.2.5 对照品溶液的制备 精密称取对照品吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛一定量，甲醇溶解，制成吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛的质量浓度分别为 297 μg/mL、187 μg/mL、4.9 mg/mL、219 μg/mL 的对照品母液。精密吸取上述 4 种对照品母液各 1 mL，置于 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释并定容至刻度，即得 4 种对照品的混合溶液 (吴茱萸碱 59.4 μg/mL，吴茱萸次碱 37.4 μg/mL，丁香酚 980 μg/mL，桂皮醛 43.6 μg/mL)，并将其依次稀释 2、4、10、20、40 倍，作为绘制标准曲线用的系列质量浓度对照品溶液，备用。

2.2.6 标准曲线的绘制 将不同质量浓度混合标准品溶液各进样 10 μL，按 2.2.4 项下色谱条件测定 290 nm 波长下各指标成分相对应色谱峰的峰面积，以峰面积 (A) 对各指标成分质量浓度 (μg/mL) 进行线性回归，得吴茱萸碱的回归方程为 $Y = 17\ 380X - 2\ 498.2$ ， $R^2 = 0.999\ 9$ ，在 1.49 ~ 59.40 μg/mL 范围内呈良好线性关系；吴茱萸次碱回归方程为 $Y = 26\ 837X - 2\ 184.3$ ， $R^2 = 0.999\ 9$ ，在 0.94 ~ 37.40 μg/mL 范围内呈良好线性关系；丁香酚回归方程为 $Y = 5\ 636\ 850.6X - 2\ 256.9$ ， $R^2 = 0.999\ 9$ ，在 24.5 ~ 980 μg/mL 范围内呈良好线性关系；桂皮醛回归方程为 $Y = 99\ 313X - 6\ 903.5$ ， $R^2 = 0.999\ 9$ ，在 1.09 ~ 43.60 μg/mL 范围内呈良好线性关系。

2.2.7 提取物中各指标成分含量测定 将各供试品溶液分别进样 10 μL，经高效液相色谱分析，通过上述各种指标成分的线性回归方程计算提取物中各指标成分的含量，并计算转移率。

$$\text{转移率} / \% = \frac{\text{提取物中指标成分的得量}}{\text{药材中原有指标成分的量}} \times 100\%$$

表 3 正交试验因素水平表¹⁾

Table 3 Table of orthogonal factor level

	A/%	B/倍	C/h	D/次
1	50	8	1	1
2	70	10	2	2
3	95	12	3	3

1) A: 溶剂含醇量; B: 料液比; C: 提取时间; D: 提取次数

表 4 正交实验直观分析表

Table 4 Intuitive analysis table of orthogonal experiment

试验号	考察因素				指标成分转移率/%			
	含醇量	料液比	提取时间	提取次数	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	丁香酚	桂皮醛
实验 1	1	1	1	1	47.33	41.78	38.61	25.09
实验 2	1	2	2	2	91.63	90.33	33.49	18.92
实验 3	1	3	3	3	85.57	82.87	23.94	14.17
实验 4	2	1	2	3	88.63	84.49	52.04	41.07
实验 5	2	2	3	1	80.14	75.19	70.11	64.96
实验 6	2	3	1	2	74.39	69.82	49.55	41.83
实验 7	3	1	3	2	92.11	80.01	89.73	76.66
实验 8	3	2	1	3	98.76	93.10	98.01	86.98
实验 9	3	3	2	1	89.82	93.09	101.14	100.70
吴茱萸碱	均值 1	74.84	76.02	73.49	72.43			
	均值 2	81.05	90.18	90.03	86.04			
	均值 3	93.56	83.26	85.94	90.99			
	极差	18.72	14.15	16.53	18.56			
吴茱萸次碱	均值 1	71.66	68.76	68.23	70.02			
	均值 2	76.50	86.21	89.30	80.05			
	均值 3	88.73	81.93	79.36	86.82			
	极差	17.07	17.45	21.07	16.80			
丁香酚	均值 1	32.01	60.13	62.06	69.95			
	均值 2	57.23	67.20	62.22	57.59			
	均值 3	96.29	58.21	61.26	57.60			
	极差	64.28	8.99	0.96	12.36			
桂皮醛	均值 1	19.39	47.61	51.30	63.58			
	均值 2	49.29	56.95	53.56	45.80			
	均值 3	88.11	52.23	51.93	47.41			
	极差	68.72	9.35	2.26	17.78			

表 5 各指标成分方差分析表

Table 5 Anova table of each maker compounds

	因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
吴茱萸碱	含醇量	545.503	2	1.183	4.46	-
	溶媒用量	300.526	2	0.652	4.46	-
	提取时间	444.971	2	0.965	4.46	-
	提取次数	554.109	2	1.201	4.46	-
	误差	1 845.110	8			
吴茱萸次碱	含醇量	464.579	2	0.904	4.46	-
	溶媒用量	496.066	2	0.965	4.46	-
	提取时间	666.610	2	1.297	4.46	-
	提取次数	428.696	2	0.834	4.46	-
	误差	2 055.950	8			
丁香酚	含醇量	6 293.650	2	3.743	4.46	-
	溶媒用量	134.633	2	0.080	4.46	-
	提取时间	1.590	2	0.001	4.46	-
	提取次数	295.979	2	0.176	4.46	-
	误差	6 725.850	8			
桂皮醛	含醇量	7 123.560	2	3.633	4.46	-
	溶媒用量	131.045	2	0.067	4.46	-
	提取时间	8.187	2	0.004	4.46	-
	提取次数	580.384	2	0.296	4.46	-
	误差	7 843.180	8			

2.3 提取工艺的正交试验优化

根据各药材的性质、所选指标成分的性质及生产的要求，选择不同体积分数的乙醇为提取溶媒，选定溶剂含醇量、料液比 [溶剂体积 (mL) 相对于药材质量 (g) 的倍数, V/m]、提取时间、提取次数为考察因素，以吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、肉桂醛的转移率为考察指标，选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验。均取混合药粉 160 g 进行提取。

表 6 不同指标下的优化提取方法

Table 6 Optimized Extraction Process of Different Evaluation Parameters

指标	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	丁香酚	桂皮醛
因素主次	A>D>C>B	C>B>A>D	A>D>B>C	A>D>B>C
最优方法	A3B2C2D3	A3B2C2D3	A3B2C2D1	A3B2C2D1

根据方差分析知 A、B、C、D 4 个因素均无显著性差异。由表 6 知，除 D 因素外，4 个指标成分在其他 3 个因素上的最优水平一致，均为采用 10 倍量的 $\varphi=95\%$ 乙醇为提取溶媒，每次提取 2 h。对于 D 因素，吴茱萸碱和吴茱萸次碱采用 3 水平（即提取 3 次）最佳，而丁香酚和桂皮醛采用 1 水平（即提取 1 次）最佳。为了进一步确定提取次数对指标成分转移率的影响，在进行工艺验证的同时，我们分别考察了提取次数对提取率的影响。

2.4 提取次数验证实验

采用所拟定工艺，按处方称取药材 160 g，加入 10 倍体积的 $\varphi=95\%$ 乙醇，每次提取 2 h，分别提取 1、2 和 3 次。平行提取 2 次，得浸膏 6 份。

表 7 工艺验证试验结果

Table 7 Results of Process Validation Test

提取次数	指标成分的转移率/%		
	1	2	3
桂皮醛	87.24	89.37	96.06
丁香酚	97.25	100.51	105.47
吴茱萸碱	69.35	84.57	92.48
吴茱萸次碱	62.42	81.82	90.49

如表 7 所示，提取 3 次所得提取物中各指标成分的转移率均为最高，提取 2 次所得提取物中桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的转移率分别为提取 3 次所得提取物中相应成分转移率的 93.04%、95.30%、91.45%、90.42%。虽然提取 3 次指标成分的转移率较高，但是提取 2 次各指标成分的转移率已可达到 3 次提取相应指标成分转移率

的 90% 以上，综合考虑生产成本与生产周期，我们选定优化的提取次数为 2 次。

3 结 论

本研究为优选抗小儿腹泻中药复方 BXN 的提取工艺，以吴茱萸、丁香、肉桂药材中活性相关指标成分吴茱萸碱、吴茱萸次碱、丁香酚、桂皮醛的转移率为考察指标，以溶剂含醇量、料液比、提取时间、提取次数为主要考察因素，利用 $L_9(3^4)$ 正交表进行提取工艺的优化实验。综合考虑提取物中各指标成分的转移率及工业生产的便利、经济，最终优化得出抗小儿腹泻中药复方 BXN 的提取工艺为：采用 10 倍量 (V/m) 的 $\varphi=95\%$ 乙醇回流提取 2 次，每次提取 2 h。经工艺验证，在该优选提取工艺下各指标成分的转移率均达到 80% 以上，具有稳定、经济、快捷的优点。

参考文献：

- [1] 杨藻宸. 医用药理学[M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，1994：1297.
- [2] 王桂芳. 小儿腹泻的中西医结合护理体会[J]. 时珍国医国药，2008，19(10)：2554.
- [3] 李庆超. 小儿食饵性腹泻的原因与治疗[J]. 中国民康医学，2011，23(6)：759.
- [4] 马振林. 周口地区婴幼儿腹泻的病原学检测分析[J]. 中国医药指南，2009(16)：121-122.
- [5] 徐蕴杰，徐文红，马玉红，等. 香芋止泻散敷脐治疗小儿泄泻 82 例临床观察[J]. 河北中医，2012，34(2)：209.
- [6] 马玉侠，张晓宁，赵岩，等. 脐疗治疗小儿泄泻常用药对分析[J]. 山东中医杂志，2013，32(1)：32-33.
- [7] 王冬梅，李静，徐月红，等. 宝泻灵提取物的体外透皮吸收研究[J]. 中草药，2007，38(10)：1487-1390.
- [8] 王群，曹晓慧. 中药巴布剂的临床研究进展[J]. 时珍国医国药，2009，20(09)：2373-2374.
- [9] 沈静，郭立玮，潘林梅. 中药巴布剂的研究进展[J]. 时珍国医国药，2005，16(01)：52-54.
- [10] 戴媛媛，刘保林，窦昌贵. 吴茱萸及其有效成分的药理研究进展[J]. 中药材，2003(04)：295-298.
- [11] 龚慕辛，王智民，张启伟，等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理，2009，20(03)：183-187.
- [12] 杨志欣，孟永海，王秋红，等. 吴茱萸化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分止泻、止呕作用的研究[J]. 中医药学报，2011，39(5)：13-16.
- [13] 杨志欣，孟永海，王秋红，等. 吴茱萸化学拆分组分的性味药理学评价——化学拆分组分的制备及其镇痛作用的研究[J]. 中医药学报，2011，39(4)：11-13.