

鼻舒通窍合剂制备工艺的优化

李洁环^{1,2}, 王洛临^{2*}, 郭鸣^{1,2}, 徐文杰², 陈雪婷², 李智勇²

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要: 目的 优化鼻舒通窍合剂制备工艺。方法 以固形物总质量、黄芪甲苷及毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为评价指标, 加水量、提取时间、提取次数为影响因素, 正交试验优化水提工艺。以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量和保留率为评价指标, 考察常压和减压对浓缩工艺的影响。再研究增溶剂(聚山梨酯80)、矫味剂(蔗糖)、抑菌剂(苯甲酸钠)用量对成型工艺的影响。结果 最佳水提条件为加水量10倍, 提取时间1 h, 提取次数2次, 综合评分91.67; 常压浓缩下, 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量和保留率高于减压浓缩; 聚山梨酯80、蔗糖、苯甲酸钠用量分别为1.43%、15%、0.3%时, 成型工艺最优。结论 该方法稳定可行, 可用于制备鼻舒通窍合剂。

关键词: 鼻舒通窍合剂; 水提; 浓缩; 成型; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)09-1825-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.09.012

Preparation optimization for Bishutongqiao Mixture

LI Jie-huan^{1,2}, WANG Luo-lin^{2*}, GUO Ming^{1,2}, XU Wen-jie², CHEN Xue-ting², LI Zhi-yong²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Research and Development, Guangdong Provincial Research Institute for Traditional Chinese Medicine Engineering and Technology, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the preparation of Bishutongqiao Mixture. **METHODS** With solid total mass, contents of astragaloside A and calycosin-7-glucoside as evaluation indices, water addition, extraction time and extraction times as influencing factors, the aqueous extraction process was optimized by orthogonal test. With the contents and retention rates of astragaloside A and calycosin-7-glucoside as evaluation indices, the effects of normal pressure and decompression on the concentration process were investigated. And the effects of solubilizer (polysorbate 80), taste-masking agent (sucrose) and bacteriostatic agent (sodium benzoate) amounts on the forming process were studied as well. **RESULTS** The optimal aqueous extraction conditions were determined to be ten times for water addition, 1 h for extraction time, and extracting twice, the comprehensive score was 91.67. The contents and retention rates of astragaloside A and calycosin-7-glucoside at normal pressure concentration were higher than those at decompression concentration. The optimal forming process was obtained at polysorbate 80, sucrose and sodium benzoate amounts of 1.43%, 15% and 0.3%, respectively. **CONCLUSION** This stable and feasible method can be used for the preparation of Bishutongqiao Mixture.

KEY WORDS: Bishutongqiao Mixture; aqueous extraction; concentration; forming; orthogonal test

鼻舒通窍合剂由黄芪、防风、白术、茯苓、广藿香、佩兰、薏苡仁等12味药材组成, 具有健脾利湿, 化浊通窍的功效, 临床上用于治疗慢性鼻

炎、鼻窦炎、过敏性鼻炎等症, 原方汤剂内服有良好的临床疗效, 但提取麻烦、体积大、口感不佳、部分患者不易接受。中药合剂由汤剂改进而来, 既

收稿日期: 2017-04-14

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013B040200040)

作者简介: 李洁环(1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药制剂。Tel: 13416439166, E-mail: 13416439166@163.com

*通信作者: 王洛临(1958—), 男, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药制剂研究。Tel: (020) 83501292, E-mail: luolin_w@

保持了汤剂原有的优点与疗效,又有固定的工艺方法,可成批生产,应用方便,故拟将本方制成合剂。文献调研发现,方中防风^[1]、白术^[2]等药材发挥功效的主要成分为挥发油,而黄芪^[3]、茯苓^[4]等药材主要为水溶性成分。本实验通过水蒸气蒸馏法提取挥发油,药渣与黄芪、茯苓等药材合并进行水提取,通过正交试验,以君药黄芪中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量以及固形物总质量作为评价指标,优选水提工艺,并对其浓缩工艺和成型工艺进行考察,为该制剂的临床使用、成批生产提供依据和参考。

1 材料

1.1 仪器 Heidolph 旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司);DC-NSG-30 多功能提取浓缩机组(上海达程实验设备有限公司);BL22-500C 超声波清洗机(上海比朗仪器制造有限公司);JJ500 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);TLE204 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);DZF-6210 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Alltech 3300 蒸发光散射检测器(德国 Sincere 公司)

1.2 试药 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品批号分别为 110781-201314、111920-201203,均购自中国食品药品检定研究院;黄芪、防风等药材购自广东众康中药饮片有限公司,经广东省中医药工程技术研究院王洛临主任中药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》一部各药材相关项下要求。甲酸、甲醇等试剂为分析纯;乙腈为色谱纯;水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取 以挥发油提取率为指标,采用单因素试验考察浸泡时间、加水量、提取时间对挥发油提取的影响。称取防风、白术等药材 14 份,每份 480 g,由于预试验发现所得挥发油比重小于 1.0,故按照 2015 年版《中国药典》四部 2204 项下挥发油测定法甲法提取。最终确定,挥发油提取工艺为药材加 8 倍量水蒸馏 6 h,挥发油提取率为 0.379 7%,与单因素结果相近。

2.2 固形物总质量测定 精密移取浓缩液 50 mL,置于已恒重的蒸发皿中,水浴锅上 100 ℃水浴至浓缩液不流动,再于 105 ℃烘箱中干燥至恒重,取出后放冷,精密称定质量,计算固形物总质量,公式为总质量 = $W \times 500 / 50$,其中 W 为 50 mL 浓缩液中固形物质量,500 为溶液定容体积(mL)。

2.3 成分含量测定

2.3.1 色谱条件

2.3.1.1 黄芪甲苷 AichromBond-SB C₁₈ 色谱柱,ELSD 蒸发光散射检测器检测;氮气体积流量 1.5 L/min;漂移管温度 50 ℃;流动相乙腈-水(31:69);柱温 30 ℃;体积流量 1.0 mL/min。

2.3.1.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱;流动相乙腈-0.2% 甲酸(14:86);检测波长 260 nm;柱温 30 ℃;体积流量 1 mL/min。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取对照品适量,甲醇溶解,摇匀,制成 0.503 5 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液和 57.99 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液。

2.3.3 线性关系考察 精密配制 0.050 62、0.101 24、0.202 48、0.303 72、0.404 96、0.506 20 mg/mL 黄芪甲苷对照品溶液,在“2.3.1”项条件下进样 20 μL,以进样量对数值为横坐标(X),峰面积对数值为纵坐标(Y)进行回归,得回归方程为 $Y = 1.629 5X + 4.716 4$ ($r = 0.999 3$),在 1.102 4 ~ 10.124 0 μg 范围内线性关系良好。再精密配制 8.698 62、17.397 24、26.095 86、34.794 48、43.493 10、52.191 72、60.890 34、69.588 96、78.287 58 μg/mL 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液,在“2.3.1”项条件下进样 6 μL,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得回归方程为 $Y = 3.193 3X - 44.053 9$ ($r = 0.999 9$),在 52.191 72 ~ 469.725 48 ng 范围内线性关系良好。

2.3.4 供试品溶液制备

2.3.4.1 黄芪甲苷 精密吸取提取浓缩液 50 mL,按照 2015 年版《中国药典》一部方法制备,其中水饱和正丁醇和 40% 氨水每次各 80 mL,最终定容至 2 mL,即得。

2.3.4.2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 精密吸取提取浓缩液 6 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇超声(300 W、40 kHz) 25 min,放冷后甲醇定容至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.3.5 阴性样品溶液制备 称取除黄芪以外的其他药材,加 12 倍量水提取 2 次,每次 2 h,常压浓缩,定容至 500 mL,按“2.3.4”项下方法制备,即得。

2.4 水提工艺优选 采用正交试验,以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量和固形物总质量的综合评分值为指标,考察加水量(A)、提取时间

(B)、提取次数(C)对提取工艺的影响,因素水平见表1。根据处方比例称取黄芪、防风、白术、茯苓等药材9份,每份270g,按表2进行提取,过滤,滤液合并后常压浓缩并定容至500mL,结

果见表2和表3。由表3可知,各因素影响程度依次为提取次数>加水量>提取时间,综合考虑,确定最优工艺为A₃B₁C₂,即加10倍量水提取2次,每次1h。

$$\text{综合评分} = \left(\frac{\text{黄芪甲苷含量}}{\text{黄芪甲苷最大含量}} \times 0.3 + \frac{\text{毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量}}{\text{毛蕊异黄酮葡萄糖苷最大含量}} \times 0.3 + \frac{\text{固形物总量}}{\text{固形物最大总量}} \times 0.4 \right) \times 100$$

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

表2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

序号	A 加水量/ 倍	B 提取时间/ h	C 提取次数/ 次	D 空白	固形物/ g	黄芪甲苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	综合评分
1	6	1	1	1	37.15	3.447 7	17.637 2	57.77
2	6	2	2	2	50.62	4.741 8	27.177 7	81.36
3	6	3	3	3	58.75	3.535 6	31.150 6	83.29
4	8	1	2	3	48.93	3.427 8	33.071 9	77.48
5	8	2	3	1	53.26	2.831 4	27.012 3	72.51
6	8	3	1	2	43.63	3.672 3	22.270 0	66.96
7	10	1	3	2	47.98	5.448 1	31.689 3	86.91
8	10	2	1	3	45.44	4.380 8	20.487 1	70.73
9	10	3	2	1	54.83	4.758 8	39.222 7	93.54
K_1	222.43	222.16	195.46	223.82				
K_2	216.96	224.61	252.38	235.23				
K_3	251.17	243.79	242.71	231.51				
R	34.21	21.63	56.92	11.41				
SS	225.18	93.55	618.46	22.57				

$\bar{Y} = 690.55/9 = 76.73$
GT = 52 984.37

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	225.18	2	112.59	9.98	<0.10
B	93.55	2	46.78	4.15	>0.10
C	618.46	2	309.23	27.40	<0.05
误差	22.57	2	11.28	—	—

2.5 验证试验 根据处方比例称取黄芪、防风、白术、茯苓等药材3份,每份270g。防风、白术等提油药材加8倍量水,加热回流提取6h,收集挥发油,药液保留,药渣与黄芪等其他药材按最佳工艺条件进行水提,滤过,滤液与提油药液合并,浓缩并定容至500mL,计算固形物得率、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量及综合评分,结果见表4,可知平均综合评分为91.67,与正交试验结果相差不大,表明该方法比较可靠。

表4 验证试验结果

Tab. 4 Results of validation tests

序号	固形物/ g	得率/ %	黄芪甲苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	综合评分
1	55.47	20.54	4.866 4	35.167 9	91.46
2	55.10	20.41	4.821 2	35.789 9	91.44
3	56.19	20.81	4.734 9	36.328 0	92.12

2.6 浓缩工艺考察 称取全方药材2.7kg,按优选工艺提取。精密量取提取液4份(黄芪甲苷含量为0.4326 $\mu\text{g}/\text{g}$,毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为3.4217 $\mu\text{g}/\text{g}$),每份6kg,2份常压浓缩至相对密度约为1.1,另外2份减压浓缩至同一相对密度(-0.085MPa、55~80 $^{\circ}\text{C}$),精密称定浓缩液质量,平行3份,测定黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量,并计算两者保留率,结果见表5。由表可知,提取液采用常压浓缩时,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量和保留率高于减压浓缩。

表5 浓缩方法考察结果 (n=3)

Tab. 5 Results of concentration method investigation (n=3)

试验号	浓缩液量/ g	相对密度 (30 ℃)	黄芪甲苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	保留率/ %	平均保留率/ %	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	保留率/ %	平均保留率/ %
常压1	350	1.081	6.995 5	94.32	94.51	55.460 6	94.55	94.74
常压2	357	1.092	6.885 7	94.70		54.588 1	94.92	
减压1	358	1.098	6.797 3	93.75	92.51	53.269 9	92.89	92.27
减压2	345	1.095	6.866 0	91.26		54.534 5	91.64	

2.7 成型工艺考察

2.7.1 增溶剂用量 由于挥发油不溶于水，故为了保证本品功效，使其均匀分散于药液中，需加入适量增溶剂。聚山梨酯80是一种常用的表面活性剂，亲水性强，毒性小，安全性高，也是《中国药典》记载的药用辅料，故本实验选择聚山梨酯80作为增溶剂，并对其用量进行考察。取水蒸气蒸馏得到的含油芳香水100 mL（相当于防风、白术、广藿香等6味药材各80 g的提取量），缓慢加入聚山梨酯80，边加边搅拌，直至挥发油溶解分散均匀，测得聚山梨酯80用量为每1 000 mL制剂中14.3 g，即1.43%。

2.7.2 矫味剂用量 本品药液入口酸涩味苦，口感不佳，部分患者难以接受，为了增加患者适应性，满足临床使用，本实验选择蔗糖作为矫味剂。以药液口感为指标，取按优选工艺提取的浓缩液900 mL（相当于1 080 g药材），加入苯甲酸钠3 g，加热至沸腾，保温30 min，放冷，冷藏静置24 h，滤过，含油芳香水加入14.3 g聚山梨酯80后与滤液混匀，均分成5份，加入蔗糖，再加纯化水至200 mL，用口尝之，并观察药液外观，结果见表6。由表可知，当蔗糖用量为30 g（即15%）时，口感得到明显改善。

表6 矫味剂用量考察结果

Tab. 6 Results of taste-masking agent amount investigation

蔗糖/g	10	15	20	25	30
口感	味涩,苦	味涩,苦	味微涩,微苦	味微涩,甜	味佳,甜
外观	棕褐色澄明	棕褐色澄明	棕褐色澄明	棕褐色澄明	棕褐色澄明

2.7.3 抑菌剂用量

2.7.3.1 溶液配制 本品药液pH值在4左右，故可选择苯甲酸钠作为防腐剂。取1 mL相当于1.2 g生药的半成品药液5份，每份1 000 mL，分别加入苯甲酸钠0、0.75、1.5、2.25、3 g，搅拌溶解，备用。

2.7.3.2 实验方法 取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌的新鲜培养物，分别接种至胰酪大豆胨液体培养基中，30~35 ℃下培养18~24 h，取白色念珠菌的新鲜培养物接种至沙氏葡萄糖液体培养基中，20~25 ℃下培养24~48 h。用0.9%无菌氯化钠溶液稀释，制成每1 mL含菌数约为 1×10^8 cfu的菌悬液。再取黑曲霉新鲜培养物接种至沙氏葡萄糖琼脂培养基中，20~25 ℃下培养5~7 d，加入3~5 mL 0.9%无菌氯化钠溶液以洗下黑曲霉孢子，然后吸出孢子悬液至无菌试管内，制成每1 mL含菌数约为 1×10^8 cfu的孢子悬液。取加入不同剂量抑菌剂的样品10份，每份50 mL，装入120 mL量瓶中。

含 1×10^7 cfu大肠埃希菌、 6.1×10^6 cfu金黄色葡萄球菌、 2.4×10^4 cfu铜绿假单胞菌、 2.1×10^6 cfu白色念珠菌的菌悬液和含 1.0×10^6 cfu黑曲霉的孢子悬液，平行2份，按照抑菌效力检查法（2015年版《中国药典》四部通则1121）测定，结果见表7。由表可知，以苯甲酸钠用量为0.3%时抑菌效果最佳。

3 讨论

鼻舒通窍合剂中防风、白术、广藿香等均含有挥发油，分别具有抗炎镇痛^[5]、调节免疫功能^[6]、抗病原微生物^[7]等活性，宜采用水蒸气蒸馏法提取挥发油；黄芪、茯苓等其余药材中与功效主治及现代药理作用相关的化学成分主要存在于水提液中，宜采用水提法。其中，君药黄芪在方中起益气固表，托邪外出的作用，其主要成分黄芪甲苷具有增强免疫力、抗炎、抗菌等多种活性^[8]，而且黄芪总黄酮中毛蕊异黄酮及其糖苷也具有提高免疫功能、抗氧化、抗菌等作用^[9-10]。经文献[11-13]及多次试验显示，黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含有量测定方法成熟，可满足提取工艺考察的需

取供试品适量，在不同剂量抑菌剂样品中加入

表7 抑菌试验结果
Tab.7 Results of bacteriostatic tests

菌株	抑菌剂/%	减少的lg值		结论
		14 d(应≥3)	28 d(NI)	
大肠埃希菌	0	0.2	-0.3	不符合规定
	0.075	1.9	1.4	不符合规定
	0.15	5.3	-1	符合规定
	0.225	6.1	-0.3	符合规定
	0.3	7	0	符合规定
金黄色葡萄球菌	0	0.1	0	不符合规定
	0.075	5.1	-0.3	符合规定
	0.15	6.8	0.7	不符合规定
	0.225	2.1	0.7	不符合规定
	0.3	5.8	-0.4	符合规定
铜绿假单胞菌	0	-2.8	-0.3	不符合规定
	0.075	-3.3	-1.4	不符合规定
	0.15	3	-1.4	符合规定
	0.225	4.4	0	符合规定
	0.3	4.4	0	符合规定
白色念珠菌	0	1.5	2.2	不符合规定
	0.075	2.4	-1	不符合规定
	0.15	4.3	-2	符合规定
	0.225	5	-0.3	符合规定
	0.3	6.3	0	符合规定
黑曲霉	0	0.3	1	不符合规定
	0.075	1.8	-0.7	不符合规定
	0.15	5.3	-0.7	符合规定
	0.225	6	0	符合规定
	0.3	6	0	符合规定

注:NI表示未增加,是指对前一个测定时间,试验菌增加的数量不超过0.5lg

求,而固形物总质量能侧面反映其他药材的提取效率,故本实验以三者作为评价指标。

羟苯乙酯是常用的防腐剂,化学性质稳定,具有广谱杀菌作用,其pH值在3~6的酸性溶液中性质稳定,pH值大于8时则作用减弱^[14];苯甲酸钠也是性质优良的防腐剂,pH值对其抑菌效果的影响很大,pH值较低时抑菌力强,防腐最佳pH值为2.5~4,而大于5时几乎无活性^[14-15]。由于

该方药液pH值在4左右,故选择苯甲酸钠作为防腐剂。

参考文献:

[1] 窦红霞,高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 15-17.

[2] 陈晓萍,张长林. 白术不同化学成分的药理作用研究概况[J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 124-126.

[3] 丰成相. 黄芪中主要化学成分的药理学研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(3): 31-32.

[4] 游昕,熊大国,郭志斌,等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2): 106-109.

[5] 李轶雯,韩忠明,李岳桦,等. 防风的中药学研究[J]. 特产研究, 2011, 33(2): 68-70.

[6] 董凤彩. 白术不同化学成分的药理作用[J]. 中医临床研究, 2015, 7(14): 28-29.

[7] 刘红森,李艳玲,杨继章. 广藿香油的药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4506-4508.

[8] 段立军,孙博航. 黄芪甲苷的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 410-415.

[9] 张蕾,高文远,满淑丽,等. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.

[10] 孙政华,邵晶,郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.

[11] 胡琨. HPLC测定芪肾口服液液中黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(2): 195-196.

[12] 赵春燕. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定芪黄胶囊中黄芪甲苷含量研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(21): 21-22.

[13] 罗堃,王元清,谢瑜,等. HPLC法测定益气软皮丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(20): 22-24.

[14] 庄俊鹏,黄献川. 医院液体制剂中防腐剂的应用[J]. 哈尔滨医药, 2013, 33(5): 366-367.

[15] 王思文,巩江. 防腐剂苯甲酸钠的药理及毒理学研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16724-16846.