



## 保和丸剂型改革的提取工艺优化

保和丸为《中国药典》收录的传统中成药，疗效确切。临床上广泛用于食积停滞，脘腹胀满，噎腐吞酸，不欲饮食等症[1][2]。但应用于临床的保和丸为传统全粉末水泛丸和大蜜丸存在服用量大，崩解时限和卫生学指标难以控制等缺陷，难以满足临床与患者的要求。故对该传统丸剂进行剂型改革具有较重要的临床意义。对传统中成药进行剂改的核心问题是保证剂改后的新剂型与原有制剂具有化学等效性和生物等效性。因此，采用适宜的提取工艺有效地提取原处方的主要成分在保证新剂型化学等效性与生物等效性的关键步骤。纵观保和丸全方，山楂、陈皮、连翘等主药均含有黄酮苷类和挥发油类成分[3][4][5]，所以我们采用了全方总黄酮转移率为化学等效性指标，结合小鼠小肠炭末推进与胃排空等胃肠动力学药效学为生物等效性评价指标，尝试性研究保和丸剂型改革的工艺过程[6]。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

紫外分光光度计(中国上海惠普公司)。HA121-32-24型超临界二氧化碳萃取装置(江苏南通华安超临界萃取实业公司)。

#### 1.2 动物

NIH小鼠，19~20 g雌雄各半，普通级，由广州中医药大学实验动物中心提供。

#### 1.3 材料

保和丸(市售，批号990523)，芦丁对照品(中国药品生物制品检定所，批号0080-9705)。

#### 1.4 试剂

乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝等均为AR级。

### 2 方法与结果

#### 2.1 化学等效性研究

2.1.1 总黄酮的含量测定方法 取供试品液10 ml，用50%乙醇稀释并定容为100 ml，过滤。取续滤液1 ml置10 ml比色管中，用50%乙醇使成5 ml后，先加5%亚硝酸钠液0.3ml，摇匀放置6 min，加10%硝酸铝液0.3 ml，摇匀，再放置6 min，加4%氢氧化钠4 ml，用水稀释到刻度，摇匀，放置15 min，按照《中国药典》2000版附录分光光度法[1]，以续滤液1 ml置10 ml比色管中，用50%乙醇加至刻度使成为对照液，在510 nm波长处测量吸收度，代入以芦丁为对照品制备的标准曲线(按《中国药典》2000版一部291页槐花项下)中计算总黄酮含量。

#### 2.1.2 保和丸全方的提取工艺研究[7]

2.1.2.1 保和丸全方50%乙醇提取工艺样品制备 取上述保和丸全方粉末约1 g, 精密称定, 用定性滤纸包裹, 置索氏提取器中, 加入50%乙醇50 ml回流提取至50%乙醇液基本无色, 收集乙醇液, 残渣、滤纸与器皿用适量50%乙醇洗涤, 合并乙醇液, 水浴挥干乙醇, 残渣加50%乙醇至50 ml超声溶解, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.2.2 保和丸全方水提取工艺样品制备 取上述保和丸全方粉末约1 g, 精密称定, 装入包袋茶纸中, 加蒸馏水50 ml, 回流提取3次, 每次1 h, 过滤, 合并水提液, 残渣与器皿加适量蒸馏水洗涤, 减压蒸干, 残渣加50%乙醇超声溶解, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.2.3 保和丸超临界二氧化碳萃取与水提结合工艺样品制备 取处方量连翘, 粉碎成粗粉。置超临界CO<sub>2</sub>萃取仪提取, 萃取压力25~29 MPa, 萃取温度50 °C, 解析压力6.5 MPa, 解析温度53 °C, CO<sub>2</sub>流量120 L/h, 得提取物另器贮存备用[8]。药渣另器贮存供再水提。取处方量陈皮, 粉碎成粗粉。置超临界CO<sub>2</sub>萃取仪提取, 萃取压力20~25 MPa, 萃取温度40 °C, 解析压力7 MPa, 解析温度48 °C, CO<sub>2</sub>流量90 L/h, 得提取物(V)另器贮存备用。药渣另器贮存供再水提。另取上述两味经超临界萃取后的药渣适量, 与其它药材粉末按处方中比例混合, 加水煎煮三次, 水提取合并, 滤过, 浓缩, 浓缩液与超临界提取物合并, 加50%乙醇超声溶解配制成含生药量0.02 g/ml的溶液, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.1.2.4 三种工艺提取液中总黄酮含量比较 取上述三种供试品溶液各10 ml, 按上述方法测定总黄酮含量, 结果见表1。

表 1 不同工艺提取液中总黄酮含量测定结果

**Tab.1 Contents of total flavanoids in the solutions of different extraction process**

Extraction process	Contents of total flavanoids(%)	Mean±SD(%)	RSD(%)	Recovery rate(%)
50% alcohol extraction	3.11,3.25,3.07	3.14±0.090	3.01	N/A
Water extraction	2.70,2.81,2.87	2.79±0.090	3.08	87.74
SFE-CO <sub>2</sub> extraction with water extraction	2.81,2.94,2.77	2.84±0.089	3.13	90.45

表中结果显示, 以50%乙醇提取物中总黄酮含量为绝对提取量计算, 水提物的总黄酮的转移率为87.74%, 超临界萃取工艺与水提取工艺相结合的提取物总黄酮转移率为90.45%。结果提示, 超临界和水提结合工艺能较好的提取保和丸方中的总黄酮成分。

2.1.3 联用工艺中水提取参数优化[8] 以总黄酮提取量为指标, 选择L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计表对超临界萃取后水提取工艺参数进行筛选研究。每次实验药材量为800 g, 实验的因素及其水平见表2, 结果见表3。

表 2 因素和水平

**Tab.2 Factors and levels**

Levels	Quantity of water (fold)	Extraction times(time)	Extraction time (h)	Soaking time (h)
1	6	1	0.5	0
2	8	2	1.0	0.5
3	10	3	1.5	2.0

表 3  $L_9(3^4)$  正交试验设计及数据分析表

Lab.3 $L_9(3^4)$ orthogonal design and analysis of the results					
No	A	B	C	D	Extraction rate(%)
1	1	1	1	1	1.69
2	1	2	2	2	1.91
3	1	3	3	3	2.90
4	2	1	2	3	2.37
5	2	2	3	1	2.36
6	2	3	1	2	2.14
7	3	1	3	2	1.38
8	3	2	1	3	1.03
9	3	3	2	1	1.17
K1	6.50	5.44	4.86	5.22	
K2	6.87	5.29	5.45	5.42	
K3	3.57	6.21	6.64	6.30	
K4	0.0110	0.00305	0.00594	0.00360	

由表3中的各因素的R值可知,对于总黄酮的提取量,  $RA > RC > RD > RB$ ,以最小的RB作误差估计,RA、RC分别是RB的1倍以上,由此可知,A、C是影响提取的重要因素,B、D则处于次要地位。再结合各因子K值愈大愈好分析,用 $A_2, B_3, C_3, D_3$ 比 $A_3, B_2, C_1, D_1$ 要好;因此,由直观分析得出的最有利于总黄酮提取物量的提取条件是 $A_2, B_3, C_3, D_3$ 即全方药材加8倍量水,浸泡2 h后,加热煎煮3次,每次1.5 h。

2.1.4 最佳提取工艺验证 按保和丸处方量,取全方药材共800 g,按正交试验得出的最佳提取工艺,即加8倍量水,浸泡2 h后,加热煎煮3次,每次1.5 h,过滤,合并滤液,测定总黄酮含量并计算出百分量,结果与正交实验中总黄酮提取率最高的序列吻合,证明了该工艺的合理性,适宜于保和丸总黄酮的提取。

## 2.2 提取工艺对生物等效性影响的研究[10]

### 2.2.1 受试样品制备

2.2.1.1 水提取物制备 按保和丸处方,取药材800 g,按经正交优选的最佳工艺,制备水提液,浓缩至100%(1 ml相当于1 g生药),供药效试验用。

2.2.1.2 超临界二氧化碳萃取和水提工艺提取物制备 按保和丸处方,取药材800 g,其中连翘、陈皮有采用上述条件先进行超临界萃取,药渣再与该处方中其它药材,加水煎煮,水提液过滤,浓缩至100%(1 ml相当于1 g生药),再加超临界提取物混匀,供药效试验用。

2.2.1.3 保和丸粉末制备 取市售保和丸500 g,粉碎成100目细粉,作为对照品,供试验用。

2.2.1.4 药效学试验样品配制 上述三种受试样品分别用蒸馏水配成9.25%、18.5%,给药体积为0.2 ml/10 g。炭末为0.1 g/ml。

2.2.2 对小鼠小肠推进实验(炭末法)比较[9] 小鼠禁食16 h,不禁水,随机分组,给药组灌胃上述药物,对照组给等体积的蒸馏水,分别灌服炭末混悬液。采用完全随机设计方差分析及Dunnett' t法进行统计学处理,  $F=3.57, P=0.04$ 。具体结果见表4。

**Tab.4 Effect of different extraction process in the stomach-pushing rate in mice**

Group	<i>n</i>	Dosage (g/kg·b.w.)	Intestine moving rate (% , <i>Mean±SD</i> )
Control group of distilled water	11	Equivalent volume of distilled water	63.7±11.8
Low-dose group of the original Baohe Wan	10	5.0	58.6±11.4
High-dose group of the original Baohe Wan	10	10.0	56.8±12.2
Low-dose group of water extraction	9	5.0	52.6±6.5*
High-dose group of the water extraction	9	10.0	0.4±7.9*
Low-dose group of the combined process	10	5.0	50.2±7.8*
High-dose group of the combining process	11	10.0	49.8±9.4*

\* $P<0.01$ , vs control group

表4 结果显示, 超临界萃取与水提工艺相结合制得的提取物不论是高剂量组还是低剂量的炭末推进率均优于原保和丸, 且有显著性差异。此实验结果亦提示提取物没有降低药效。从此项药效学指标分析, 超临界二氧化碳萃取和水提取工艺相结合可用于保和丸的剂型改革。

2.2.3 对小鼠胃排空作用的影响(米糊法)比较[9] 小鼠禁食16 h, 不禁水, 随机分组, 给药组灌胃上述药物, 对照组给等体积的蒸馏水, 给药30 min灌胃营养米糊, 20 min处死动物, 摘胃于电子天平称重, 以胃营养米糊残留率为指标采用完全随机设计方差分析及Dunnett' t法进行统计学处理,  $F=5.47$ ,  $P=0.001$ 。具体结果见表5。

**Tab.5 Effect of different extraction process in the stomach-emptying rate in mice**

Group	Animal (Pcs.)	Dosage(g/kg·b.w.)	Residual rate of rice powder(%, <i>Mean±SD</i> )
Control group of distilled water	9	Equivalent volume of distilled water	62.6±14.6
Low-dose group of the original Baohe Wan	9	1.85	51.1±12.8
High-dose group of the original Baohe Wan	10	3.70	61.9±16.2
Low-dose group of water extraction	10	1.85	52.3±18.8
High-dose group of the water extraction	10	3.70	58.9±8.8
Low-dose group of the combined process	10	1.85	41.5±12.7*
High-dose group of the combining process	10	3.70	40.3±13.9*

\* $P<0.01$  vs control group

表5结果显示，超临界二氧化碳萃取和水提取相结合工艺以及单纯的水提取工艺的胃排空率均优于原保和丸，并且具有显著性差异，提示这两种工艺均没有降低药效。超临界二氧化碳萃取工艺和水提取工艺为最佳剂改工艺。

### 3 讨论

从临床需求出发，我们选择了疗效确切的传统中成药保和丸进行剂型改革研究。首先着重研究了保和丸剂改的提取工艺路线，探讨了对该丸进行改革的可能性与可行性。在研究中围绕“剂改不降低疗效”这一核心问题开展研究。紧密结合“药理导向评价”模式，与原剂型相比较，对水提取路线进行了多指标药理评价，从而为精制工艺、成型工艺以及质量标准的研究打下了基础。同时，也尝试研究了大孔树脂吸附法精制水提取物的可行性，从主要成分分析，采用此法精制水提物是可行的[11]。

3.1 保和丸由山楂、陈皮、连翘等8种中药组成。这3种中药材均含黄酮苷类成分和挥发性成分。采用适宜的方法持取该方中的黄酮苷类和挥发性成分在保证该剂型改革的药效不改变的重要前提。根据此性质，我们选择了超临界二氧化碳萃取工艺提取和富集了该方中的挥发性成分，然后再采用水提取工艺提取了方中的黄酮类水溶性成分。为评价这两种工艺的合理性，我们建立了总黄酮的含量测定方法和两种动物模型即炭末推进试验和米糊排空试验评价了提取工艺的合理性。从药效学试验结果分析，超临界二氧化碳萃取和水提取工艺相结合，药效最佳，进一步从总黄酮苷类成分的转移率分析，水提取工艺总黄酮的转移率为90%，因此，本研究表明超临界二氧化碳萃取法和水提法相结合确定为保和丸剂型改革的提取工艺是合理的可行的。为了优化水提取的最佳工艺参数，我们进而采用了正交试验法优选了水提取的最佳工艺。关于超临界二氧化碳萃取工艺的参数

优选将另文报道。

3.2 保和丸的主要功效为消食导滞，其主要药理效应作用于消化道。因此，我们选用了小鼠小肠炭末推进和促进胃排空等胃肠动力学指标评价不同提取工艺的生物等效性。这两种动物模型简单易行，能较好地体现该方的功能主治。

(责任编辑：吴锦雅)

#### 参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典[J]. 化学工业出版社, 2000(一部). 532, 附录33.
- [2] 余德钊. 保和丸新用[J]. 新中医, 1997, 29(4): 53-4.  
Yu DZ. New application of Baohe pills[J]. New Trad Chin Med, 1997, 29(4): 53-4.
- [3] 罗玉梅, 王贺振. 山楂的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(1): 53-4.  
Luo YM, Wang HH. Chemical elements and development of pharmacology dynamic research about hawthorn[J]. Shizhen Guo Yi Guo Yao, 2004, 15(1): 53-4.
- [4] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-60.  
Zhang HY. Chemical elements and research development of pharmacodynamic liveness about forsythia[J]. Chin Med Mater, 2000, 23(10): 657-60.
- [5] 黄泰康. 常用中药成分于药理手册[M]. 中国医药科技出版社, 1994, 368, 1137, 1021.
- [6] 陈珍贵. 保和丸(浓缩丸)质量标准研究[J]. 湖南中医药导报, 2003, 9(1): 80.  
Chen ZG. Research on quality standard about condensed baohe pills[J]. Hunan Trad Chin Med J, 2003, 9(1): 80.
- [7] 周德庆, 曾 骆. 黄芩总黄酮的提取工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(1): 78-9.  
Zhou DQ, Zeng L. Research on the Extraction Process of Total Flavanoids from Scutellaria[J]. West Chin Med J, 2003, 18(1): 78-9.
- [8] 王 鹏, 吴惠勤. 超临界CO<sub>2</sub>萃取连翘挥发物的正交试验和GC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2002, 21(4): 34-7.  
Wang P, Wu HQ. Reciprocal crossing test and Gc-Ms analysis on the supercritical carbon dioxide fluid extraction of benzin from forsythia[J]. Analysis Test J, 2002, 21(4): 34-7.
- [9] 陈 奇. 中药药理实验[S]. 贵州人民出版社, 1988, 73.
- [10] 江汉才. 越鞠保和丸对小鼠胃、肠排空运动的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1996, 3(5): 22-3.  
Jiang HC. Test Study on the Baohe pills stomach and bowel-emptying movement in mice [J]. Sci Technol Trad Chin Med Chin, 1996, 3(5): 22-3.
- [11] 刘中秋, 赖小平. 大孔树脂吸附法富集保和丸中橙皮苷的工艺研究[J]. 中成药, 2001, 23(8): 550-2.  
Liu ZQ, Lai XP. Processing study on the gathering of auran-tiamarin inside baohe pills through macroporous ion exchanger purification method[J]. Prepared Chin Med, 2001, 23(8): 550-2.

#### 参考文献：

- [1] 中华人民共和国药典[J]. 化学工业出版社, 2000(一部). 532, 附录33.
- [2] 余德钊. 保和丸新用[J]. 新中医, 1997, 29(4): 53-4.  
Yu DZ. New application of Baohe pills[J]. New Trad Chin Med, 1997, 29(4): 53-4.
- [3] 罗玉梅, 王贺振. 山楂的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(1): 53-4.  
Luo YM, Wang HH. Chemical elements and development of pharmacology dynamic research about hawthorn[J]. Shizhen Guo Yi Guo Yao, 2004, 15(1): 53-4.

- [4] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-60.
- Zhang HY. Chemical elements and research development of pharmacodynamic liveness about forsythia[J]. Chin Med Mater, 2000, 23(10): 657-60.
- [5] 黄泰康. 常用中药成分于药理手册[M]. 中国医药科技出版社, 1994, 368, 1137, 1021.
- [6] 陈珍贵. 保和丸(浓缩丸)质量标准研究[J]. 湖南中医药导报, 2003, 9(1): 80.
- Chen ZG. Research on quality standard about condensed baohe pills[J]. Hunan Trad Chin Med J, 2003, 9(1): 80.
- [7] 周德庆, 曾 骆. 黄芩总黄酮的提取工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(1): 78-9.
- Zhou DQ, Zeng L. Research on the Extraction Process of Total Flavanoids from Scutellaria[J]. West Chin Med J, 2003, 18(1): 78-9.
- [8] 王 鹏, 吴惠勤. 超临界CO<sub>2</sub>萃取连翘挥发物的正交试验和GC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2002, 21(4): 34-7.
- Wang P, Wu HQ. Reciprocal crossing test and Gc-Ms analysis on the supercritical carbon dioxide fluid extraction of benzin from forsythia[J]. Analysis Test J, 2002, 21(4): 34-7.
- [9] 陈 奇. 中药药理实验[S]. 贵州人民出版社, 1988, 73.
- [10] 江汉才. 越鞠保和丸对小鼠胃、肠排空运动的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1996, 3(5): 22-3.
- Jiang HC. Test Study on the Baohe pills stomach and bowel-emptying movement in mice [J]. Sci Technol Trad Chin Med Chin, 1996, 3(5): 22-3.
- [11] 刘中秋, 赖小平. 大孔树脂吸附法富集保和丸中橙皮苷的工艺研究[J]. 中成药, 2001, 23(8): 550-2.
- Liu ZQ, Lai XP. Processing study on the gathering of auran-tiamarin inside baohe pills through macroporous ion exchanger purification method[J]. Prepared Chin Med, 2001, 23(8): 550-2.