

正交设计法优选解毒通络颗粒提取工艺

韩忠耀¹, 周福军², 单淇², 刘时乔¹, 侯文彬^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 正交试验法优选解毒通络颗粒处方药材的提取工艺。方法: 以出膏率、丹酚酸 B 及天麻素为考核指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察解毒通络颗粒处方药材提取工艺条件。结果: 解毒通络颗粒处方药材的最佳提取工艺为 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次提取 1.5 h。结论: 该提取工艺稳定可行, 省时、省工、节能, 适合于工业化大生产, 为解毒通络颗粒的制剂研究奠定基础。

[关键词] 解毒通络颗粒; 正交设计; 提取工艺; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0013-04

Optimization of Extraction Process of Jiedu Tongluo Granule by Orthogonal Design

HAN Zhong-yao¹, ZHOU Fu-jun², SHAN Qi², LIU Shi-qiao¹, HOU Wen-bin^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of prescription drugs from Jiedu Tongluo granule by orthogonal test. **Method:** With extract rate, salvianolic acid B and gastrodin as indexes, extraction technology

[收稿日期] 20111219(015)

[基金项目] 国家十一五重大新药专项(2009ZX09103-310)

[第一作者] 韩忠耀, 硕士, 从事中药新药、质量标准研究, Tel: 022-23006903, E-mail: hzy0396@126.com

[通讯作者] * 侯文彬, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药及天然产物研究, Tel: 022-23006295, E-mail: houwb@tjipr.com

新生皂类等, 并结合不同基质组合进行比较, 以软膏外观、稳定性、流变学等参数为评价指标, 结果证明 HLB 值处在 12 ~ 13 的基质最为稳定, 并确定使用 tween-span 复配体系制备黄连软膏。

采用均匀设计试验可明显减少试验次数, 但数据统计过程较为复杂, 模型依赖水平高^[7-8]。故在试验过程中, 考察因素应选择准确, 并合理设置水平; 保证试验条件与操作平行性; 数学模型设置与结果分析应具有专业意义, 对于所得到得多个回归方程, 应结合专业知识及统计学知识选出最优的方程。

[参考文献]

- [1] 余园媛, 王伯初, 彭亮. 黄连的药理研究进展[J]. 重庆大学学报: 自然科学版, 2006, 26(2): 107.
- [2] 李虹, 李革晖, 张玉蓓, 等. 洁肤爽乳剂基质组成及工

艺的优选[J]. 中成药, 2003, 25(3): 188.

- [3] 初阳, 陈涛, 冯婉玉. 正交试验优选透明质酸钠乳膏的处方工艺[J]. 中国医药导报, 2011, 8(6): 57.
- [4] 车斌, 黄丽萍. 调节软膏剂黏度与稠度的对策[J]. 海峡药学, 2004, 16(1): 31.
- [5] 方开泰. 均匀设计—数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363.
- [6] 李智勇, 孙冬梅, 杜建平. 均匀设计法优选癌痛巴布剂的基质处方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 1.
- [7] 徐维佳, 周海虹, 陈少东. 均匀设计在中药复方研究中的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 236.
- [8] 马路, 刘剑刚, 史大卓. 均匀设计在中医药研究中的应用[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3): 278.

[责任编辑 仝燕]

conditions of Jiedu Tongluo granule was investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test method. **Result:** Optimum extraction technology was: extracted 3 times with 1.5 h each time by 10 times the amount of 70% ethanol. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable, feasible. Meanwhile, it could save time, labor and energy and be suitable for industrial mass production, it could settle foundation for preparation of Jiedu Tongluo granule.

[**Key words**] Jiedu Tongluo granule; orthogonal design; extraction technology; HPLC

目前我国脑卒中幸存者约有 600 万,5 年内脑卒中复发率高达 41%^[1]。解毒通络方是中国中医科学院王永炎院士以中风病的“毒损脑络”创新性病机理论假说为指导,结合缺血性中风现代病理生理学和中药生物效应国内外最新研究成果,经多年临床实践,研制出的由栀子、丹参、黄芪、天麻的有效组分配伍而成的中药新配方。主要以改善大脑微环境,诱导神经突触的结构和功能再建为主要药效靶点,是针对中风病康复期的创新药物。

根据有效成分理化性质和药理作用,将解毒通络颗粒处方中的药物分为 2 组提取,丹参、黄芪、天麻为醇提取组(热提取);君药栀子单独提取。试验采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,以出膏率、丹酚酸 B 与天麻素的含量为考核指标,考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间、提取次数 4 个因素对解毒通络颗粒出膏率、丹酚酸 B、天麻素的影响,确定解毒通络颗粒处方药材的最佳提取工艺条件。

1 材料

Agilent1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),BP211D 型电子天平(METTLER),迪马公司 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)。丹参、黄芪、天麻药材均购自河北省安国市义通中药材有限公司(批号均为 20100605),经天津药物研究院现代中药研究部周福军副研究员鉴定均为正品。丹酚酸 B(批号 111562-200908)、天麻素(批号 110807-200205)对照品均购于中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 丹酚酸 B 流动相甲醇-乙腈-水-甲酸(30:10:59:1),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 286 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C。理论塔板数按丹酚酸 B 计算不低于 2 000。

精密吸取提取液适量于 25 mL 棕色量瓶中,加适量 75% 乙醇定容到刻度,摇匀。取适量 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

称取丹酚酸 B 对照品适量,精密称定,加 75%

甲醇制成 0.166 g·L⁻¹ 的溶液,即得对照品溶液。

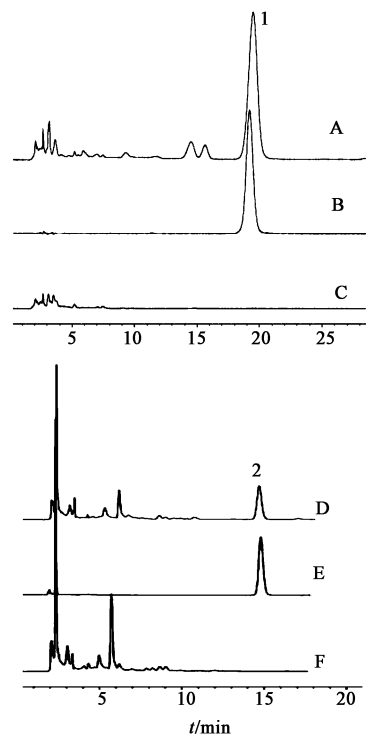
精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L,照 2010 年版《中国药典》附录 VD 高效液相色谱法测定。

2.1.2 天麻素 流动相乙腈-0.1% H_3PO_4 (1:99),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 220 nm,柱温 35 $^{\circ}$ C。理论塔板数按天麻素峰计算不低于 5 000。

精密吸取提取液适量于 10 mL 棕色量瓶中,加适量乙腈-水(3:97)定容到刻度,摇匀。取适量过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得供试品溶液。

取天麻素适量,精密称定,加流动相制成 0.050 4 g·L⁻¹ 的溶液,即得对照品溶液。

精密吸取对照品溶液 5 μ L、供试品溶液 10 μ L,照 2010 年版《中国药典》附录 VD 高效液相色谱法测定,见图 1。



A, D 供试品; B, E. 对照品; C. 阴性(缺丹参)对照;
F. 阴性(缺天麻)对照; 1. 丹酚酸 B; 2. 天麻素

图 1 解毒通络颗粒 HPLC

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取丹酚酸 B 对

照品溶液 ($0.166 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、天麻素对照品溶液 ($0.0504 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μL 分别注入高效液相色谱仪,按上述丹酚酸 B 及天麻素相应的色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品质量为横坐标,得回归方程,丹酚酸 B $Y = 1033.5X - 12.02$ ($r = 0.9999$),线性范围 $0.332 \sim 3.320 \mu\text{g}$;天麻素 $Y = 81.704X + 13.63$ ($r = 0.9994$),线性范围 $0.10 \sim 1.01 \mu\text{g}$ 。

2.1.4 精密度试验 分别精密吸取丹酚酸 B、天麻素对照品溶液 10, 5 μL 共 6 份,按 2.1 项下方法进样、测定。RSD 分别为 0.78%, 1.06%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液 6 份,分别按 2.1 项下方法处理,分别进样,记录丹酚酸 B 与天麻素的色谱峰面积,计算指标成分提出量分别为 $52.73, 4.86 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.45%, 1.81%。表明该方法重复性较好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 16, 24 h 时进样,分别记录丹酚酸 B 与天麻素的色谱峰面积,计算丹酚酸 B 与天麻素 RSD 分别为 2.32%, 1.76%, 表明丹酚酸 B 与天麻素溶液 24 h 内稳定。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取温度考察 考虑到丹酚酸 B 稳定性差,在热作用下易发生分解反应^[2-4],故对提取温度进行考察,按处方比例称取丹参、黄芪、天麻各味药材共 3 份,每份总重 44 g,加入 10 倍量 70% 乙醇,分别在 60, 70, 80 $^{\circ}\text{C}$ 温度下加热回流提取 1 次,共 2 h,考察丹酚酸 B 含量变化规律。结果丹酚酸 B 提出量分别为 $42.29, 46.86, 50.79 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。故确定回流提取温度为 80 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 提取溶剂初筛 按处方比例称取丹参、黄芪、天麻各味药材共 10 份,每份总重 44 g,分别用水、10% 乙醇、20% 乙醇、30% 乙醇、40% 乙醇、50% 乙醇、60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、90% 乙醇等溶剂各 10 倍量,提取 1 次(1 h),结果丹酚酸 B 提出量分别为 20.45, 22.30, 29.08, 31.20, 31.42, 33.45, 32.94, 43.05, 38.13, 26.87 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$;天麻素提出量分别为 4.84, 4.52, 4.57, 4.66, 4.67, 4.53, 4.75, 4.82, 4.61, 2.40 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

由结果可知,以丹酚酸 B 为考察指标时,乙醇体积分数为 60% ~ 80% 时效果最好;以天麻素为考察指标时,90% 乙醇提取时天麻素含量最低,其余溶剂提取相差很小。综合考虑,确定提取溶剂为体

积分数为 60% ~ 80% 乙醇。

2.3 正交试验优化 丹参为方中的臣药,其主要有效成分为以丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹参酮 II_B 为代表的脂溶性成分^[5]和以丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛为代表的水溶性成分,本方选用体积分数 60% ~ 70% 乙醇提取时,可兼顾此 2 类有效成分,以奏活血养血,祛瘀滞而通络之效^[6]。黄芪的主要有效成分为皂苷类、黄酮类、多糖类等,具有抗自由基作用、调节免疫系统功能等药理作用^[7]。天麻主要有效成分为以天麻素、天麻醚苷为代表的水溶性成分,对神经细胞损伤具有保护作用,同时,天麻素具有降低血压和外周血管阻力、增加动脉血管中血流惯性以及中央和外周动脉血管顺应性等作用^[8]。

结合单因素试验结果和文献[9-10]报道,确定用体积分数 60% ~ 80% 的乙醇进行提取。考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间、提取次数 4 个因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。选取丹酚酸 B、天麻素及出膏率为评价指标。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 解毒通络颗粒提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 溶剂用量/倍	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	60	6	1	1
2	70	8	1.5	2
3	80	10	2	3

按处方比例称取丹参、黄芪、天麻各味药材共 9 份,每份总重 44 g,按因素水平表进行试验,回流提取,合并提取液,滤过,测定含量,计算每克生药中指标成分的提出量。取适量滤液,蒸干,得干浸膏,计算出膏率。

比较各因素极差大小可知,各因素对出膏率,丹酚酸 B 及天麻素的含量的影响的顺序为 $D > B > A > C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析可知,D 对提取工艺有显著性差异。故确定解毒通络颗粒处方药材的最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2D_3$,即用 10 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 1.5 h。

2.4 验证试验 称取 15 倍处方药材量共 660 g,按上述确定的最佳提取工艺,制备 3 批样品。结果出膏率分别为 36.36%, 35.75%, 35.95%;丹酚酸 B 提出量分别为 $52.84, 51.06, 54.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;天麻素提出量分别为 $4.68, 5.03, 4.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论与结论

进行正交试验前,为确定各味药材对丹酚酸 B

表 2 解毒通络颗粒提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	出膏率 /%	丹酚酸 B /mg·g ⁻¹	天麻素 /mg·g ⁻¹	综合评分 /分
1	1	1	1	1	18.41	31.37	3.00	53.76
2	1	2	2	2	30.61	52.11	5.05	89.83
3	1	3	3	3	37.59	59.81	5.18	99.61
4	2	1	2	3	38.34	52.14	4.81	92.02
5	2	2	3	1	29.05	39.50	3.12	65.65
6	2	3	1	2	32.52	53.50	4.53	87.77
7	3	1	3	2	28.25	43.34	4.06	75.08
8	3	2	1	3	31.25	48.98	4.69	85.27
9	3	3	2	1	20.77	39.07	3.13	61.13
K ₁	81.07	73.62	75.60	60.18				
K ₂	81.81	80.25	80.99	84.23				
K ₃	73.83	82.84	80.11	92.30				
R	7.99	9.22	5.39	32.12				

注:综合评分=(出膏率/正交表中最大出膏率)×20+(丹酚酸 B 提出量/正交表中丹酚酸 B 最大提出量)×40+(天麻素提出量/正交表中天麻素最大提出量)×40。

表 3 解毒通络颗粒提取工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	116.76	2	58.38	2.32	
B	135.60	2	67.80	2.70	
C(误差)	50.23	2	25.12	1.00	
D	1 675.12	2	837.56	33.35	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

含量的影响,分别按处方比例称取丹参、丹参+天麻、丹参+黄芪、丹参+黄芪+天麻各 1 份,分别加入 10 倍量 70% 乙醇回流提取 1 次(2 h),结果丹酚酸 B 提出量分别为 43.95,44.67,43.39,44.12 mg·g⁻¹,表明丹参单提,丹参与方中各味药材合提含量基本无影响。分别按处方比例称取天麻、丹参+天麻、天麻+黄芪、丹参+黄芪+天麻各 1 份,相同方法考察天麻素提出量,结果分别为 4.79,4.83,4.89,4.86 mg·g⁻¹。表明天麻单提,天麻与方中各味药材合提含量基本无影响。

[参考文献]

[1] Ming L, Bo W, Wen Z W, et al. Stroke in China: epidemiology, prevention, and management strategies

[J]. Lancet Neurol, 2007(6):456.

[2] 朱静,陈慧清,白鹏,等.丹酚酸 B 水溶液分解反应的
动力学研究[J].中成药,2009,31(4):541.
[3] 张文芯,玄律,倪健.丹酚酸 B 在水溶液中的稳定性
研究[J].北京中医药大学学报,2009,32(12):856.
[4] 张春光,崔翰明,张秋燕,等.丹参提取物中的丹酚酸
B 在不同 pH 条件下的稳定性研究[J].中国实验方
剂学杂志,2009,15(1):3.
[5] 张金茹.丹参药理作用及临床应用[J].中国医学杂
志,2006,4(8):443.
[6] 徐丽君,黄光英.丹参的化学成分及其药理作用研究
概况[J].中西医结合研究,2009,1(1):45.
[7] 陈国辉,黄文凤.黄芪化学成分、药理活性与临床应
用概述[J].海峡药学,2008,20(3):13.
[8] 岑信钊.天麻的化学成分与药理作用研究进展[J].
中药材,2005,28(10):958.
[9] 李绍林,张建军.丹参提取工艺研究[J].中国实验方
剂学杂志,2011,17(12):45.
[10] 李西林,米健芳,马晓悦,等.HPLC 法对不同产地天
麻药材的质量分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,
16(8):96.

[责任编辑 仝燕]