正交试验优化健脾益肾丸的水提工艺Δ

陈剑平*,张尚斌,郑　平,余晓丹,何泰东,索　娟,李中桂,李顺民#(深圳市中医院深圳市医院中药制剂研究重点实验室,广东 深圳　518033)

中图分类号　R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2016)34-4833-03
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.25

摘　要　目的:优化健脾益肾丸的水提工艺。方法:以加水量、提取时间、提取次数为考察因素,以提取液中丹酚酸B含量和干膏量为综合评价指标,采用正交试验设计法优化健脾益肾丸的提取工艺。结果:最优提取工艺为提取2次,第1次加12倍水,第2次加8倍水,每次提取1 h。验证试验中综合评分平均值为95.5(RSD=0.52%,n=3)。结论:优化的水提工艺简便、可行,结果稳定,可用于健脾益肾丸的提取制备。

关键词　健脾益肾丸;丹酚酸B;干膏量;正交试验;水提工艺

Optimization of Water Extraction Technology of Jianpi Yishen Pills by Orthogonal Test

CHEN Jianping, ZHANG Shangbin, ZHENG Ping, YU Xiaodan, HE Taidong, SUO Juan, LI Zhonggui, LI Shunmin (Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of Jianpi yishen pills. METHODS: Using water amount, extraction time and extraction times as factors, the content of salvianolic acid B and dry extract amount as index, orthogonal test was employed to optimize the extraction technology of Jianpi yishen pills. RESULTS: The optimal extraction technology was extracting twice, adding 12-fold water for the first time, 8-fold water for the second time, extracting for 1 h each time. Average comprehensive score of validation test was 95.5 (RSD=0.52%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized technology is simple, suitable and stable, and can be used for the extraction and preparation of Jianpi yishen pills.

KEYWORDS　Jianpi yishen pills; Salvianolic acid B; Dry extract amount; Orthogonal test; Water extraction technology

健脾益肾方是我院原创的治疗慢性肾功能衰竭的有效方剂,具有健脾益肾、活血化浊的功效,临床上主要用于慢性肾功能衰竭、脾肾阳气虚,兼有湿浊、水气和瘀毒等证的治疗。该方在临床上已有5年以上的使用历史,临床效疗显著且安全可靠[1-2]。为方便患者服用,我院拟将其研制成中药浓缩丸剂。为充分提取处方中的活性成分,更好地发挥临床疗效,笔者根据处方中各药材相关的化学和药理作用等资料[3-5],对处方中君药黄芪、臣药酒苁蓉、佐药丹参等5味药材以水为溶剂进行提取;以具有活血化瘀功效且与健脾益肾方的功能主治基本一致的丹参中丹酚酸B含量为测定指标,同时结合干膏量为综合评价指标,采用正交试验对其提取工艺进行优化,为该制剂的制备提供可靠的参考依据。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪,包括柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、LC Solution色谱工作站(日本岛津公司);BP 211D型电子天平(德国Sartorius公司,十万分之一);CQ-250-DST型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);TGL-21M型高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司)。

Δ基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.2015A030310247);深圳市科技计划项目(No.JSGG20141017103353178、JCYJ20150401163247213);载20160024深圳市医院中药制剂研究重点实验室项目(No.ZDSYS20160608151545865)

*助理研究员,博士。研究方向:中药制剂与药理。E-mail:lycjp@126.com

#通信作者:教授,博士。研究方向:中医肾病。E-mail:zyylishunmin@126.com

1.2　药材、药品及试剂

黄芪、肉苁蓉、丹参、大黄、炙甘草(均购自深圳华辉药业有限公司,批号分别为:150621、150620、150626、150104、150615,经深圳市中医院张尚斌主任中药师鉴定为真品);丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110821-201313,纯度:>98%);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　提取液的制备

每份处方含黄芪30 g、酒苁蓉10 g、丹参15 g、大黄10 g、炙甘草6 g,加入一定量的水进行提取,计量体积,备用。

2.2　干膏量的测定[6]

精密取提取液50 g,按2015年版《中国药典》(四部)通则0831干燥失重测定法项下方法测定,计算干膏量(g)。

2.3　丹酚酸B含量的测定方法

2.3.1　色谱条件　色谱柱:Inertsil ODS-SP(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:以0.2%甲酸溶液为流动相A,乙腈为流动相B,梯度洗脱(0→5 min,90% A;5→10 min,90%～80% A;10→30 min,80%～60% A;30→40 min,90% A);流速:1.0 ml/min;二极管阵列检测器,检测波长:286 nm;进样量:10 μl;柱温:室温。

2.3.2　对照品溶液的制备　精密称定丹酚酸B对照品适量,加甲醇制成每1 ml含丹酚酸B 0.62 mg的溶液,摇匀,即得。

2.3.3　标准曲线的制备　分别量取对照品溶液2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 μl进样分析,记录峰面积。以进样量(x,μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,得回归方为y=1 374.065 43x−74 684.533 33(r=0.999 8),表明丹酚酸B进样量在1.24～12.4 μg范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.4　供试品溶液的制备　取“2.1”项下的提取液适量，用0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3.5　阴性样品溶液的制备　按健脾益肾丸水提处方的提取制备工艺制得缺丹参的阴性样品，按“2.3.4”项下操作方法制得阴性样品溶液。

2.3.6　专属性试验　取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各10 μl，进样测定。结果，供试品在与对照品相同的保留时间处有相同色谱峰，而阴性样品未见相应色谱峰，表明杂质等对主成分的分析无干扰，色谱见图1。

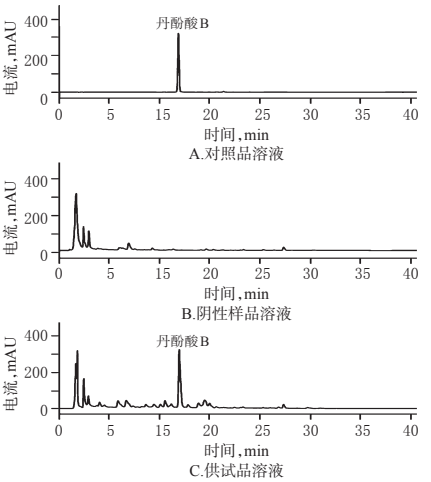

图1　高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms

2.3.7　精密度、重复性、稳定性和准确度试验　按相关方法进行操作，结果精密度、重复性、稳定性试验含量的RSD均小于2.0%（n=6），供试品溶液在24 h内稳定；平均加样回收率为97.90%（RSD=1.8%，n=6）。

2.4　综合指标的确定

采用综合加权评分法[7]，以水溶性干膏量和丹酚酸B质量的9次试验的最大值为100分，将各指标成分的总量分别转换为评分值。考虑到丹参在处方中为佐药，因此干膏量和丹酚酸B质量的加权系数分别设为0.5。综合评分（Y）=（干膏量/干膏量最大值×0.5+丹酚酸B质量/丹酚酸B质量最大值×0.5）×100。

2.5　正交试验优化水提工艺

根据前期预试验结果，分别确定加水量（A，倍）、提取次数（B）、提取时间（C，h）为因素，每个因素各取3个水平，采用 $L_9(3^4)$正交试验法，以丹酚酸B量和干膏量为综合评价指标进行工艺优化。因素与水平见表1；试验设计与结果见表2；方差分析结果见表3。

表1　因素与水平

Tab 1　Factors and levels

水平	因素		
	A（加水量），倍	B（提取次数）	C（提取时间），h
1	8	1	1.0
2	10	2	1.5
3	12	3	2.0

从表2直观分析可得，提取条件以$A_3B_2C_1$条件为优。方差分析结果则表明B因素即提取次数对丹酚酸B质量和干膏量具有显著影响，各因素影响大小为煎煮次数（B）>加水量（A）>提取时间（C）。再从节约溶剂及节省时间考虑，确定最优提取工艺为黄芪等5味药加水煎煮2次，第1次加12倍量水，第2次加8倍量水，每次煎煮1 h。

为验证上述优化工艺的可行性，进行3批放大试验研究。

表2　正交试验设计与结果

Tab 2　Design and results of orthogonal test

编号	A	B	C	D（空白）	干膏量，g	丹酚酸B质量，mg	综合评分Y
1	8	1	1	1	14.8	320.7	69.9
2	8	2	1.5	2	21.6	362.8	88.8
3	8	3	2	3	24.9	307.5	88.5
4	10	1	1.5	3	13.6	218.3	54.7
5	10	2	2	1	21.7	361.5	88.9
6	10	3	1	2	21.0	374.4	89.1
7	12	1	2	2	16.7	257.1	65.7
8	12	2	1	3	23.3	397.6	96.6
9	12	3	1.5	1	25.0	347.6	93.7
K_1	247.20	190.30	255.60	252.50		$\bar{Y}$=735.9/9=81.77	
K_2	232.70	274.30	237.20	243.60			
K_3	256.00	271.30	243.10	239.80			
R	7.77	28.00	6.13	4.23			

表3　方差分析结果

Tab 3　Result of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	92.29	2	46.14	3.26	>0.10
B	1 514.00	2	757.00	53.45	<0.05
C	58.85	2	29.42	2.08	>0.10
D（误差）	28.33	2	14.16		

注：$F_{0.01}(2,2)$=99.00，$F_{0.05}(2,2)$=19.00

Note：$F_{0.01}(2,2)$=99.00，$F_{0.05}(2,2)$=19.00

每批称取黄芪300 g、肉苁蓉100 g、丹参150 g、大黄100 g、炙甘草60 g，照最优工艺进行提取。测定水提液中水溶性干膏量和丹酚酸B的质量，计算综合评分。验证试验结果见表4。

表4　验证试验结果

Tab 4　Results of validation test

试验号	干膏量，g	丹酚酸B质量，mg	综合评分
1	230.5	3 913	95.3
2	231.3	3 965	96.1
3	232.4	3 952	95.2
均值	231.4	3 951	95.5
RSD，%	0.41	0.69	0.52

结果表明，3次平行验证试验的综合评分平均值为95.5，RSD=0.52%，提示优化工艺的提取结果稳定。

3　讨论

3.1　提取工艺设计

本研究根据健脾益肾方中各药材药理活性研究等信息，同时考虑医院中药制药业生产的特点，将处方中黄芪等5味药材进行水提浓缩，目的是保持原方的化学组成，以提高含药量、降低服用量。前期已有将该方制成丸剂后相关临床观察研究[8]，初步证实了该剂型的可行性，但尚未进行提取工艺方面的系统研究。因此，本研究采用正交试验法对健脾益肾丸的提取工艺进行研究，以便综合比较提取过程的各种因素的影响程度，明确各因素的主次和相互作用，以获得最优的提取工艺条件[9]。

此外，考虑到对挥发性成分的保留以及简化工艺流程等因素，本品的制备工艺选择黄芪等5味药水提，其余药材粉碎入药。初步预试验结果显示，当水提液浓缩至相对密度为1.20左右时，与药粉混合，利于丸剂的成型，包括湿料的可塑性、挤出条状物及成丸的完整均一性方面均符合要求。本试验进一步提示本组方药材水提工艺的合理性及可行性。

3.2　指标成分的选择

健脾益肾方中丹参具有活血化瘀的功效，与该方的功能主治基本一致，且丹参在处方中所占比例较大，故笔者根据预

通脉颗粒水提及制粒工艺优化Δ

尤文质[1*],陈雪梅[1#],苏娟娟[1],彭连共[1],管昌益[2](1.厦门市中医院药学部,福建 厦门 361009;2.厦门市中医院心血管病科,福建 厦门 361009)

中图分类号 R943 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2016)34-4835-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.26

摘 要 目的:优化通脉颗粒水提及制粒工艺。方法:以浸膏得率和三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re及人参皂苷Rb_1的总皂苷量为评价指标,采用$L_9(3^4)$正交试验法对通脉颗粒制备过程中的水提取工艺条件进行优化与验证;采用单因素分析对制粒工艺中的除杂、浓缩、干燥、制粒工艺进行优化与验证。结果:该颗粒剂水提取最佳工艺条件为8倍水,浸泡0.5 h,煎煮2次,每次煎煮1.0 h;验证试验中,浸膏得率为(28.38±0.461)%(RSD=1.63%,n=3),总皂苷含量为(5.029±0.060) mg/g(RSD=1.20%,n=3)。优化的制粒工艺为浸膏经翅片式过滤除杂,于真空度0.08 MPa、温度60 ℃下浓缩,按药粉-辅料(麦芽糊精)(3∶1,质量比)加入辅料,85~90 ℃干燥;采用干法制粒,稀释剂(麦芽糊精)的加入量为3%。在此条件下制备的样品的总皂苷含量为(5.211±0.207)mg/g(RSD=3.96%,n=3)。结论:该工艺合理可行、稳定可控,适用于通脉颗粒的制备。

关键词 通脉颗粒;水提工艺;制粒工艺;正交试验;喷雾干燥

Optimization of Water Extraction and Granulating Techology of Tongmai Granule

YOU Wenzhi[1], CHEN Xuemei[1], SU Juanjuan[1], PENG Liangong[1], GUAN Changyi[2] (1.Dept. of Pharmacy, Xiamen Hospital of TCM, Fujian Xiamen 361009, China; 2.Dept. of Cardiovascular Diseases, Xiamen Hospital of TCM, Fujian Xiamen 361009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize water extraction and granulating technology of Tongmai granule. METHODS: Using the contents of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Re and ginsenoside Rb_1 and yield of extracts as the index, $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to optimize and validate water extraction technology in preparation process of Tongmai granule. Decontamination, concentration and drying, diluent of granulating technology were investigated. RESULTS: The optimal water extraction technology was as follows as 8-fold water, soaking for 0.5 h, decocting 1.0 h each time, for 2 times. In validation test, the yield of extract was (28.38 ± 0.461)% (RSD=1.63%, n=3), and the content of total saponins was (5.029 ± 0.060) mg/g (RSD=1.20%, n=3). The optimized granulating technology was that extract was filtrated and decontaminated, and then concentrated under vacuum degree of 0.08 MPa and vacuum temperature of 60 ℃; the ratio of extraction powder-accessories (maltodextrin) was 3∶1, drying temperature was set at 85-90 ℃; the amount of diluent was 3%. Under this condition, the content of total saponins was (5.211 ± 0.207) mg/g (RSD=3.96%, n=3). CONCLUSIONS: This technology is stable and feasible, and it is suitable for the preparation of Tongmai granule.

KEYWORDS Tongmai granule; Water extraction technology; Granulating technology; Orthogonal test; Spray drying

试验的结果,选择丹参中有效成分丹酚酸B含量作为指标。本文的丹参含量测定方法是在参照《中国药典》相关方法的基础上改进而建立的。该条件下丹酚酸B色谱峰与其他成分不存在相互干扰,分离良好,保留时间适中。同时,在预试验中也对处方君药黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷和肉苁蓉中的松果菊苷进行了分析[10],结果发现水提液中这2种成分与其他化学成分相互干扰大,因此虽在本文中暂时未将这二者纳入指标成分,但将在之后的研究中完善。

综上,本试验优化的健脾益肾丸提取工艺操作简便、结果稳定,可为其后续研究提供重要的参考。

参考文献

[1] 易无庸,杨曙东,李顺民,等.健脾益肾方治疗维持性血透患者营养不良的临床研究[J].新中医,2004,36(11):16.
[2] 李顺民,杨曙东.健脾益肾方治疗脾肾气虚型慢性肾功能衰竭46例疗效观察[J].新中医,2005,37(10):36.
[3] 黄桢.黄芪多糖的药理研究进展[J].中国临床药学杂志,2002,11(5):315.
[4] 刘雄,李成明,高建德,等.肉苁蓉的研究进展[J].中国中医药科技,2013,20(5):575.
[5] 孙仁弟,徐向阳,宋燕青.丹酚酸B的药理研究进展[J].药物流行病学杂志,2012,20(9):458.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103.
[7] 牟婵,周若鹏,赖滢滢.正交试验法优选复方淫羊藿咀嚼片的提取工艺[J].中国药房,2015,26(28):3 986.
[8] 易铁钢,易无庸,周昕.健脾益肾丸对维持性血透患者微炎症状态的影响[J].中国中医药科技,2011,18(5):377.
[9] 刘静.正交设计法在药物制备工艺研究中的应用[J].齐鲁药事,2011,30(11):668.
[10] 赵燕,李秋芬,张忠亮,等.参芪麝蓉丸质量评价[J].中草药,2014,45(7):942.

(收稿日期:2016-02-17 修回日期:2016-03-28)
(编辑:刘 萍)

Δ基金项目:福建省卫生厅中医科研项目(No.wzze201305)
*副主任药师。研究方向:中药制剂。电话:0592-5582130。E-mail:awen303@163.com
#通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0592-5579606。E-mail:merylchen@126.com