

# 多指标正交试验优化复方红景天颗粒的提取工艺<sup>Δ</sup>

刘庆焕\*,王宏,张婷,张岩,王文彤,陶遵威\*(天津市医药科学研究所,天津 300020)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1830-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.29

**摘要** 目的:优化复方红景天颗粒的药材提取工艺。方法:以药效学指标(学习记忆能力)对小鼠进行Y型水迷宫实验,筛选复方红景天颗粒药材的水提、水提醇沉及醇提方法;以红景天苷、阿魏酸提取量及出膏率的综合评分为指标,采用正交试验优化醇提工艺中乙醇体积分数、提取时间、溶剂用量和提取次数,并进行验证试验。结果:3种提取方法中以醇提方法所得产物对改善学习记忆能力效果最好;最优醇提工艺为8倍量70%乙醇回流提取3次,每次1.0 h。验证试验中红景天苷、阿魏酸的提取量及出膏率平均值分别为4.884 mg/g、1.669 mg/g、33.52% (RSD均小于2%, $n=3$ )。结论:优化的提取工艺稳定、可靠、简便、易行,可用于复方红景天颗粒的工业化提取。

**关键词** 复方红景天颗粒;提取工艺;药效指标;小鼠;红景天苷;阿魏酸;正交试验

## Optimization of Extraction Technology of Compound *Rhodiolae crenulatae* Granule by Multi-index Orthogonal Test

LIU Qinghuan, WANG Hong, ZHANG Ting, ZHANG Yan, WANG Wentong, TAO Zunwei (Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound *Rhodiolae crenulatae* granule. METHODS: The pharmacodynamic index of learning and memory ability was used to screen the water extraction, water extraction and alcohol precipitation and alcohol extraction methods for Compound *R. crenulatae* granule in mice by Y-type water maze test. Using the comprehensive scores of salidroside, ferulic acid extraction amount and extraction yield as indexes, orthogonal test was used to optimize the ethanol volume fraction, extraction time, solvent amount and extraction times, and verification test was conducted. RESULTS: Products by alcohol extraction can significantly improve learning and memory ability in the 3 methods; the optimal extraction tech-

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:38-39, 1286-1287.
- [2] Shergill M, Patal M, Khan S, *et al.* Development and characterisation of sustained release solid dispersion oral tablets containing the poorly water soluble drug disulfiram[J]. *Int J Pharm*, 2016, 497(1/2):3-11.
- [3] Gao Y, Gao Y, Yin F, *et al.* Preparation and pharmacokinetics study on gastro-floating sustained-release tablets of troxipide[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(9):1443-1451.
- [4] 李茜茜, 邹玲玲, 黄雪丽, 等. 流通池法测定替硝唑阴道泡腾片的溶出度[J]. *中国药房*, 2014, 25(32):3059-3063.
- [5] Dorozynski PP, Kulinowski P, Mendy A, *et al.* Novel application of MRI technique combined with flow-through cell dissolution apparatus as supportive discriminatory test for evaluation of controlled release formulations[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11(2):588-597.
- [6] Medina JR, Padilla AR, Hurtado M, *et al.* In vitro release of ketoprofen suppositories using the USP basket and the flow-through cell dissolution methods[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(3):453-458.
- [7] Medina JR, Salazar DK, Hurtado M, *et al.* Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system[J]. *Saudi Pharm J*, 2014, 22(2):141-147.
- [8] Seidlitz A, Weitschies W. In-vitro dissolution methods for controlled release parenterals and their applicability to drug-eluting stent testing[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(7):969-985.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 硝苯地平缓释片(I) WS1-(X-056)-2004Z[S]. 2005-06-06.
- [10] Ilic M, Kovacevic I, Parojcic J. Deciphering nifedipine in vivo delivery from modified release dosage forms: identification of food effect[J]. *Acta Pharm*, 2015, 65(4):427-441.
- [11] 叶俊鹏, 吴爱琴, 黄培良, 等. 硝苯地平缓释片及控释片的体外释放度试验[J]. *广东药学*, 2003, 13(5):25-26.

Δ 基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(No.14JCYBJC28700)

\* 助理研究员, 硕士研究生。研究方向:中药制剂与质量标准。E-mail:liuqinghuan@126.com

# 通信作者:研究员, 硕士生导师。研究方向:药物化学与新药研发。E-mail:taozunweitj@163.com

(收稿日期:2016-08-08 修回日期:2016-12-08)  
(编辑:邹丽娟)

nology was confirmed to 8-fold 70% ethanol reflux extracting for 3 times, 1.0 h each time. In verification test, average extraction amount of salidroside and ferulic acid were 4.884 mg/g and 1.669 mg/g, and average extraction yield was 33.52% (all RSD<2%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable, reliable, simple and feasible, which can be used for industrial extraction of Compound *R. crenulatae* granule.

**KEYWORDS** Compound *Rhodiolae crenulatae* granule; Extraction technology; Efficacy index; Mice; Salidroside; Ferulic acid; Orthogonal test

提取工艺研究是中药复方开发的关键步骤,传统上仅以指标成分含量高低来衡量提取工艺的优劣是不全面的,结合相关药效学指标对工艺进行优化的文献报道逐渐增加<sup>[1-3]</sup>。阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)在中医学中称“呆病”,是一种以记忆和认知功能进行性损害为特征的疾病,目前已成为严重威胁老年人生命健康和生活质量的主要疾病之一<sup>[4]</sup>。复方红景天颗粒为天津市医药科学研究所研的复方六类新药,由红景天、川芎、三七、远志等6味中药组成,具有益气活血、化痰开窍的功效,主要用于治疗气虚血瘀、痰瘀阻络之呆症。现代药理研究表明,方中君药主要成分红景天苷可改善大鼠的学习记忆受损,通过综合抗氧化应激效应起到治疗AD的作用<sup>[5]</sup>;臣药川芎主要成分阿魏酸对 $\beta$ -淀粉样蛋白诱导的AD模型细胞具有保护作用<sup>[6]</sup>。为确定复方红景天颗粒合理的提取工艺,保证制剂质量和疗效,笔者首先通过AD模型小鼠药效试验筛选出提取方法,再以红景天苷、阿魏酸的提取量及出膏率为评价指标,以层次分析法(AHP)<sup>[7]</sup>确定各指标权重系数进行综合评分,采用正交设计优化提取方法的工艺参数,为该新药后续制剂工艺研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司); AB135-S型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); KQ520B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 动物

KM小鼠,♀♂各半,18~22 g,由军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物试验中心提供,合格证号:SCXK-(军)2014-0001。

### 1.3 药材、对照品与试剂

红景天、川芎、三七等药材均购于天津市中药饮片厂有限公司(批号:1409126、1509102、1508101),经天津市医药科学研究所夏光成研究员鉴定符合2015年版《中国药典》(一部)相关规定;氢溴酸东莨菪碱注射液(以下简称东莨菪碱,天津药业集团新郑股份有限公司,批号:1501011,规格:0.3 mg/mL);红景天苷、阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110818-201507、110773-201313,纯度:99.8%、99.6%);甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 药效学指标筛选提取方法

2.1.1 3种提取方法样品的制备 根据处方药味有效成分的理化性质,最终选取水提、水提醇沉、醇提等3种提取方法。按处方比例称取红景天、川芎、三七等药材共3份,每份100 g。(1)水提组:投料后加入8倍量水,加热回流提取3次,每次1 h,合并提取液,浓缩至含生药量为0.3 g/mL。(2)水提醇沉组:投料后加入8倍量水,加热回流提取3次,每次1 h,合并提取液,浓缩至比重为1.1(60℃),放冷;加入等量乙醇,充分搅拌后,密闭冷藏24 h,滤过,滤液回收乙醇,加水稀释至0.3 g/mL。(3)醇提组:投料后加8倍量70%乙醇,加热回流提取3次,每次1 h,合并提取液,浓缩至无醇味后加水稀释至0.3 g/mL,备用。

2.1.2 不同提取方法样品对东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠的影响 参考文献[8-9]方法进行Y型水迷宫实验。取50只小鼠,每只小鼠第1天训练10次,第2天测试小鼠学习记忆能力,记录10次中一次性到达目的地的次数及所需时间。依测试成绩均衡随机分为对照组、模型组、水提组、水提醇沉组、醇提组,各组均ig给药,根据临床等效剂量折算,3个提取方法组给药剂量均为3 g/kg(以生药计),对照组和模型组ig给予等量生理盐水,连续给药10 d。给药第7天起进行行为学测试,每天测试前1 h给药。测试前30 min除对照组ip注射生理盐水外,其余各组均ip东莨菪碱2 mg/kg造模。第7天进行训练,先将小鼠放在起始区,用玻璃棒引导到终点区的出水台阶上,训练10次;第8~10天分组测试(不引导),记录成绩。以小鼠第8、9、10天一次性正确到达目的地的次数及所需时间(逃避潜伏期)的平均值作为学习记忆能力的考察指标。采用SPSS 17.0统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,结果见表1。

表1 各组小鼠水迷宫实验结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 1 Results of water maze test of mice in each group of mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	小鼠逃避潜伏期,s			小鼠正确到达目的地的次数		
	8 d	9 d	10 d	8 d	9 d	10 d
对照组	6.20±0.87	5.85±1.14	5.56±1.81	7.33±0.82	7.25±0.99	7.50±0.83
模型组	7.55±1.23 <sup>#</sup>	7.94±1.43 <sup>#</sup>	7.90±1.61 <sup>#</sup>	5.58±0.75 <sup>#</sup>	5.00±1.05 <sup>#</sup>	5.12±1.07 <sup>#</sup>
水提组	6.38±1.11 <sup>*</sup>	6.42±1.29 <sup>*</sup>	6.08±1.85 <sup>*</sup>	6.67±1.49	6.50±1.48 <sup>*</sup>	6.50±1.48 <sup>*</sup>
水提醇沉组	7.53±1.05	8.04±1.12	7.77±2.02	6.25±1.55	6.17±1.59	6.03±1.45
醇提组	6.14±1.57 <sup>*</sup>	5.90±1.68 <sup>*</sup>	5.58±1.47 <sup>**</sup>	6.77±1.25 <sup>*</sup>	6.58±1.42 <sup>*</sup>	6.75±1.31 <sup>**</sup>

注:与对照组比较,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>#</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>\*</sup>P<0.05,<sup>\*\*</sup>P<0.01

Note: vs. control group, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>#</sup>P<0.01; vs. model group, <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01

由表1可以看出,第8~10天,与对照组比较,模型

组小鼠逃避潜伏期显著延长( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),正确到达目的地的次数显著减少( $P<0.01$ ),提示该造模方法成功。与模型组比较,水提组与醇提组均能显著缩短小鼠逃避潜伏期( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );水提组除第8天外,其余各检测时间点小鼠正确到达目的地的次数显著增加( $P<0.05$ );醇提组第8~10天时小鼠正确到达目的地的次数均显著增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );水提醇沉组的逃避潜伏期与正确到达目的地的次数与模型组比较差异无统计学意义。综合考虑,醇提组改善模型小鼠学习记忆能力效果更好,故正交试验中对该提取方法的条件进行优化。

## 2.2 提取方法指标的考察

2.2.1 红景天苷、阿魏酸的含量测定 (1)色谱条件。参考文献[10]条件。色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为甲醇-水(15:85),检测波长为223 nm(红景天苷);流动相B为甲醇-1%醋酸水溶液(30:70),检测波长为321 nm(阿魏酸);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。(2)对照品溶液的制备。精密称取红景天苷和阿魏酸对照品适量,加70%甲醇制成二者质量浓度分别为202.6、32.08 μg/mL的对照品贮备液。分别精密量取5 mL贮备液置于10 mL量瓶中,加70%甲醇制成二者质量浓度分别为101.3、16.04 μg/mL的对照品溶液。(3)供试品溶液的制备。分别精密吸取正交试验所得1~9号提取液各5 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,用70%甲醇将残渣转移至10 mL量瓶中并定容至刻度,过0.45 μm微孔滤膜,即得,记为供试品溶液S<sub>1</sub>~S<sub>9</sub>。(4)阴性样品溶液的制备。按处方比例分别称取除红景天、川芎的药材共2份,按供试品溶液制备方法分别制成不含红景天阴性样品溶液、不含川芎阴性样品溶液。(5)专属性考察。分别吸取上述“(2)~(4)”项下溶液,进样测定,结果供试品色谱在与对照品色谱在相同的保留时间处出峰,阴性样品无干扰。各峰之间分离度均大于1.5。(6)线性关系及定量限考察。按相关方法进行操作,以质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制红景天苷和阿魏酸标准曲线,计算二者的回归方程分别为 $y=13\ 307.6x+26\ 690$ ( $r=0.999\ 7$ )、 $y=53\ 861.5x-6\ 724$ ( $r=1.000\ 0$ ),检测质量浓度线性范围分别为20.26~202.6、3.208~32.08 μg/mL,定量限分别为0.68、0.21 μg/mL。(7)精密度、稳定性、重复性、准确度考察。按相关方法进行考察。结果精密度试验中红景天苷与阿魏酸峰面积的RSD分别为0.65%、0.34%( $n=6$ );24 h内稳定性试验中二者含量的RSD分别为0.54%、0.42%( $n=6$ );重复性试验中二者含量的RSD分别为1.71%、0.86%( $n=6$ );准确度试验中二者的平均加样回收率分别为97.98%、98.02%(RSD分别为1.43%、1.01%, $n=6$ )。

2.2.2 出膏率测定 参考文献[11]方法测定。精密吸取

提取液20.0 mL,置于已恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于105 ℃干燥至恒质量,置于干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算出膏率(出膏率=干膏质量×25/药材质量×100%)。

2.2.3 提取量的计算 根据公式(提取量=提取液中指标成分含量×提取液体积/投料药材质量)计算出每1 g红景天/川芎中红景天苷/阿魏酸的提取量。

2.2.4 综合评分指标的确定 根据复方“君臣佐使”配伍规律,参照文献[7]采用层次分析法对红景天苷、阿魏酸提取量和出膏率3项指标建立综合权重,计算归一化权重系数分别为0.581 5、0.309 0、0.109 5,随机一致性比率(CR)为0.003 1<0.1,表明3项指标优先比较矩阵满足一致性要求,其相应求得的权重有效。最终得到的综合评分公式为:综合评分=(红景天苷提取量/红景天药材中红景天苷含量)×100×0.581 5+(阿魏酸提取量/川芎药材中阿魏酸含量)×100×0.309 0+(出膏率/最大出膏率)×100×0.109 5。在此公式中,采用《中国药典》方法测得2种药材中有效成分的含量分别为5.45、1.98 mg/g。

## 2.3 正交试验设计优化醇提法工艺

2.3.1 因素与水平的确定 在预试验的基础上,以综合评分为指标,对醇提法中的乙醇体积分数(A,%)、提取时间(B,h)、溶剂倍数(C)、提取次数(D)进行考察,因素与水平见表2。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(体积分数),%	B(提取时间),h	C(溶剂倍数)	D(提取次数)
1	60	1.0	6	1
2	70	1.5	8	2
3	80	2.0	10	3

2.3.2 正交试验设计与结果 按处方比例称取红景天、川芎等药材共9份,每份100 g,按照正交试验设计进行试验,合并提取液,滤过,滤液浓缩,定容至500 mL,记为1~9号,每项试验重复2次。由于正交表中4个因素均填满,故进行重复试验并以第二类离差作为误差估计值进行方差分析。正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

由表3直观分析可知,各因素对提取效果影响大小为D>C>B>A;表4结果表明,因素C、D对试验结果具有极显著影响,因素A、B对试验结果无显著影响。综合考虑实际生产情况及各水平间的差距,最终确定最优提取工艺为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即8倍量70%的乙醇提取3次,每次1.0 h。

2.3.3 验证试验 按处方比例称取药材3份,每份100 g,加8倍量70%乙醇提取3次,每次1.0 h,测定提取液中红景天苷、阿魏酸的提取量及出膏率。结果红景天苷和阿魏酸的平均提取量分别为4.884、1.669 mg/g,平均出膏率为33.52%,RSD分别为0.49%、1.93%、1.69%(均

小于2%, $n=3$ ),提示优化的工艺稳定、可行。

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and result of orthogonal test

编号	A	B	C	D	红景天苷提取量,mg/g		阿魏酸提取量,mg/g		出膏率,%		综合评分	
					1	2	1	2	1	2	1	2
					1	1	1	1	1	2.302	2.790	0.832
2	1	2	2	2	4.208	4.675	1.303	1.415	27.95	31.91	74.23	82.70
3	1	3	3	3	4.788	4.409	1.798	1.640	28.01	24.94	88.18	81.03
4	2	1	2	3	4.995	4.851	1.688	1.620	33.97	32.54	90.59	88.13
5	2	2	3	1	3.788	3.309	1.172	1.079	24.51	21.77	66.61	59.47
6	2	3	1	2	4.120	3.728	1.355	1.247	27.24	24.18	73.89	67.38
7	3	1	3	2	4.347	4.830	1.408	1.530	23.28	25.74	75.87	84.07
8	3	2	1	3	3.642	3.278	1.471	1.354	27.33	24.45	70.63	64.33
9	3	3	2	1	3.605	4.001	1.263	1.382	21.74	24.07	65.18	72.36
$K_1$	421.27	433.79	371.36	358.75								
$K_2$	446.06	417.97	473.19	458.14								
$K_3$	432.44	448.01	455.22	482.88								
$R$	8.27	10.01	33.94	41.38								

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	51.399	2	25.700	1.101	
B	75.282	2	37.641	1.613	
C	984.830	2	492.415	21.099	<0.005
D	1438.927	2	719.464	30.828	<0.005
E(误差)	210.042	9	23.338		

注: $F_{0.05}(2, 9) = 4.26, F_{0.01}(2, 9) = 8.02, F_{0.005}(2, 9) = 10.11$

Note: $F_{0.05}(2, 9) = 4.26, F_{0.01}(2, 9) = 8.02, F_{0.005}(2, 9) = 10.11$

### 3 讨论

#### 3.1 含量测定方法

在处理供试品溶液时,若在测定指标成分含量时直接用提取液进样,由于溶剂效应导致峰变宽、分离效果差。故宜将提取液蒸干后用70%甲醇溶解,既能保证浸膏可全部溶解,又能避免溶剂效应。在测定红景天苷与阿魏酸的含量时,笔者曾考虑同时测定二者含量。但由于阿魏酸为酸性成分,需在流动相中加酸以避免峰拖尾,而当使用含酸流动相时,红景天苷与方中极性大的成分的色谱峰难以达到基线分离;此外,二者的含量差异较大,故参照2015年版《中国药典》分别对二者进行测定,经方法学验证表明该法简便、易行、重复性好。

#### 3.2 考察指标的确定

红景天和川芎作为本方的君药和臣药,其有效成分红景天苷和阿魏酸对AD模型具有保护作用<sup>[5-6]</sup>。以红景天为主的复方制剂的提取大多仅以红景天中的成分为指标,同时考虑其他药味成分的较少<sup>[12]</sup>。在前期试验中,笔者对复方红景天颗粒3种提取方法中的指标成分的提取率进行了考察,其结果与本文小鼠水迷宫实验的结果一致,即醇提组优于水提组并优于水提醇沉组,表

明所选取的指标成分是本方药效物质基础的重要组成部分。

在正交试验设计中采用层次分析法对红景天苷、阿魏酸的提取量以及出膏率3个指标赋权重并进行综合评分来优化醇提工艺参数,体现了复方配伍特点。

综上,本文对提取工艺的优化研究兼顾了药效与指标成分的提取效率,较单纯以成分为指标进行评价更为合理。最终优化的提取工艺中红景天苷和阿魏酸的提取量均较高,表明优化的提取工艺稳定、可行。建立的提取工艺可为该制剂的进一步开发奠定良好的基础,同时也为以红景天、川芎为基本组方的制剂的提取工艺研究提供了参考。

### 参考文献

- [1] 杨培民,曹广尚.药效学结合正交实验优选重楼克感滴丸的提取工艺[J].中华中医药学刊,2016,34(1):11-13.
- [2] 李微,罗先钦,周文杰,等.正交设计结合药效学试验优选小儿肺咳口服液的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(2):28-32.
- [3] 何蕾,马慧萍,李兰茹,等.小鼠抗缺氧活性实验结合正交试验优选藏紫苑中总黄酮的提取工艺[J].中国药房,2016,27(13):1832-1835.
- [4] 顾亦婷,顾海.阿兹海默症中医辨证治疗[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(8):139-141.
- [5] 张佳,宋立刚,孔卫娜,等.红景天苷对 $\text{A}\beta_{1-40}$ 所致阿尔茨海默病模型大鼠认知功能改善作用及机制探讨[J].中国中药杂志,2012,37(14):2122-2126.
- [6] 杨长生,杨植媛,吴红彦,等.阿魏酸对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导PC12细胞的保护机制研究[J].辽宁中医杂志,2015,42(1):33-35.
- [7] 任爱农,卢爱玲,田耀洲,等.层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):372-374.
- [8] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:科学技术出版社,1991:172-175.
- [9] 皮慧芳,阮汉利,张鹏,等.黄花石蒜对老年痴呆小鼠的药效学研究[J].中华中医药学刊,2007,25(10):2049-2050.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:41,155.
- [11] 刘桂花,何承辉,帕依曼·亥米提,等.多指标综合评分法优选复方双金感冒颗粒的提取工艺[J].中国药房,2016,27(4):510-513.
- [12] 张瑞堂,石晓峰,张红梅.复方红景天口含片提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):42-45.

(收稿日期:2016-08-14 修回日期:2016-10-24)

(编辑:刘 萍)