

正交设计优选九味益胃合剂提取工艺研究

肖卫红*, 杨全伟, 何伟#, 张耕(武汉市第一医院, 武汉 430022)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2711-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.37

摘要 目的: 优选九味益胃合剂的水回流提取工艺条件。方法: 以君药丹参中水溶性成分丹酚酸B含量、赤芍中芍药苷含量和干膏得率的综合评分为考察指标, 以浸泡时间、提取时间、加水量、提取次数等4个因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验优选九味益胃合剂提取工艺条件, 并进行验证试验。结果: 最优工艺为加8倍药材量水浸泡1h, 提取2次, 每次提取1h。3批样品验证试验综合评分分别为98.793、99.078、99.220(RSD<2%, n=3)。结论: 九味益胃合剂优选工艺稳定可行。

关键词 九味益胃合剂; 提取工艺; 正交试验; 丹酚酸B; 芍药苷; 干膏得率

Study on Optimization of Extraction Technology of Jiuwei Yiwei Mixture by Orthogonal Design

XIAO Wei-hong, YANG Quan-wei, HE Wei, ZHANG Geng(Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize water reflux extraction technology of Jiuwei yiwei mixture. METHODS: With the overall score of the content of salvianoli acid B, a water-soluble component of the principal drug *Salvia miltiorrhiza*, the content of paeoniflorin in *Paeonia Radix Rubra* and dry ointment yield rate as the observed index, and taking soaking time, extraction time, amount of water added, and extraction times as the factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was designed to optimize the extraction technology of Jiuwei yiwei mixture. And the verification test was conducted. RESULTS: The optimal technology was to add water with an amount 8 times as much as that of the drugs to soak them for 1 h and to conduct extraction twice, 1 h for each. The overall scores of 3 batches of samples in the verification test were respectively 98.793, 99.078 and 99.220 (RSD<2%, n=3). CONCLUSIONS: The optimal technology for Jiuwei yiwei mixture is stable and feasible.

KEYWORDS Jiuwei yiwei mixture; Extraction technology; Orthogonal design; Salvianoli acid B; Paeoniflorin; Dry ointment yield rate

九味益胃合剂为武汉市中西医结合医院国家级重点专科脾胃病科的临床处方, 是在四君子汤合左金丸基础上化裁而来, 主要功能为益气和胃、活血止痛, 用于脾胃虚弱、血瘀胃痛、体倦神疲、噎腐吞酸、缠绵反复。临床上使用后可提高溃疡愈合质量, 与三联疗法合用可提高幽门螺杆菌根除率^[1]。该方主要由丹参、太子参、赤芍、姜黄连、大黄等9味中药组成, 故命名为九味益胃合剂。为了优选其提取工艺, 以最节省的成本来达到最优提取效果, 使其更好地发挥临床疗效, 笔者以方中君药丹参中水溶性成分丹酚酸B的含量、赤芍中芍药苷的含量和干膏提取率进行加权评分作为综合考察指标, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 确定九味益胃合剂的最优提取因素水平。试验方法与结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器

LC-10A系列高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司); e2695系列高效液相色谱仪(美国Waters公司); ME215S电子天平(瑞士Sartorius公司, 实际分度值d=0.01 mg)。

1.2 药品、药材与试剂

丹酚酸B对照品(批号: 110715-201016, 纯度: 95.4%)、芍药苷对照品(批号: 110736-201037, 纯度: 95.4%)均购于中国

* 主管中药师。研究方向: 中药新制剂。电话: 027-61871268。
E-mail: xiaoweihong2005@sina.com

通信作者: 主管药师。研究方向: 药物新剂型与新技术。电话: 027-85332289。E-mail: 52572405@qq.com

食品药品检定研究院; 丹参、太子参、赤芍、当归、姜黄连、仙鹤草、红花、茯苓、炙甘草(湖北天济中药饮片有限公司, 批号: 20130402); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸B的含量测定^[2]

2.1.1 色谱条件 色谱柱: ODS Hypersil-C₁₈(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-水-甲酸(7:25:67:1, V/V/V/V), 流速: 1.0 ml/min; 紫外检测器检测波长: 286 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。

2.1.2 溶液制备 (1)丹酚酸B对照品溶液。精密称取丹酚酸B对照品13.94 mg, 置于50 ml量瓶中, 加75%甲醇, 制成每1 ml含0.278 8 mg的溶液即得。(2)供试品溶液。按比例称取九味益胃合剂处方药材, 用10倍量的水浸泡1h, 水回流提取2次, 每次提取1h, 收集所得药液, 浓缩至200 ml, 摇匀; 精密量取2 ml, 置于50 ml量瓶中, 加75%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液即得。(3)丹参阴性溶液。称取不含丹参的其余药材, 按“(2)”项下供试品溶液制备方法制备即得。

2.1.3 方法专属性试验 吸取上述3种溶液各10 μl, 进样检测。结果, 丹酚酸B对照品和供试品溶液均在18 min左右出现丹酚酸B色谱峰; 供试品溶液色谱图中丹酚酸B色谱峰峰形尖锐、对称性好, 与前后其他峰分离度均大于1.5; 按丹酚酸B计, 理论板数大于2 000, 且阴性对照无干扰。色谱见图1。

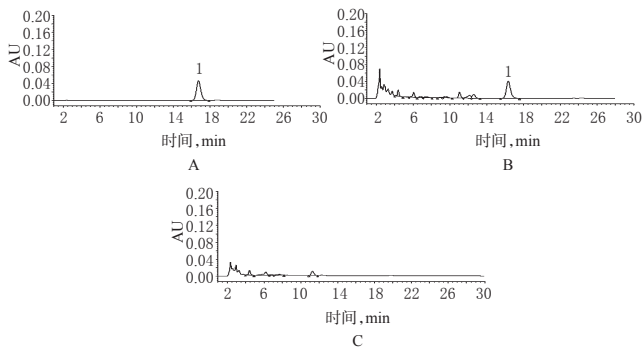


图1 丹酚酸B高效液相色谱图

A.丹酚酸B对照品溶液;B.供试品溶液;C.丹参阴性溶液;1.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms of salvianolic acid B

A. control solution of salvianolic acid B; B. test solution; C. negative solution of *Salvia miltiorrhiza*; 1. salvianolic acid B

2.1.4 线性关系考察 取丹酚酸B对照品溶液,精密取2、3、4、5、10 ml分别至20 ml量瓶中,加75%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。取上述稀释后溶液及母液分别进样10 μ l,测定峰面积(y),以y与对照品质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=11\ 143x-23\ 229(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,丹酚酸B检测质量浓度线性范围为27.88~278.80 μ g/ml。

2.1.5 精密度试验 精密取丹酚酸B对照品溶液10 ml置于20 ml量瓶中,加75%甲醇稀释至刻度,摇匀;连续进样6次,计算峰面积的RSD=1.02%(n=6),表明仪器的精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液分别于制备后0、1、2、4、8、12 h进样测定峰面积,得峰面积的RSD=0.49%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品,按供试品溶液的制备方法平行制备6份,测定丹酚酸B的含量。结果平均含量为1.966 4 mg/ml(RSD=0.83%,n=6),表明本法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的样品6份,制备成供试品溶液后精密量取1 ml,分别置于50 ml量瓶中,各精密加入适量的丹酚酸B对照品,加75%的甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液分别进样、测定并计算回收率。结果平均回收率为97.54%(RSD=1.85%,n=6)。

2.2 芍药苷的含量测定^[2]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:ODS Hypersil-C₁₈(200 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86,V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。

2.2.2 溶液制备 (1)芍药苷对照品溶液。精密称取芍药苷对照品适量,加稀乙醇使溶解,制成每1 ml含0.616 mg的溶液即得。(2)供试品溶液^[9]。按比例称取九味益胃合剂处方药材,用10倍量的水浸泡1 h,水回流提取2次,每次提取1 h,收集所得药液,浓缩至200 ml,摇匀;精密取3 ml,置于25 ml量瓶中,加稀乙醇适量,超声处理(功率:240 W,频率:45 kHz)30 min后取出,放冷,加稀乙醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液即得。(3)赤芍阴性溶液。按处方比例称取缺赤芍药材,按“(2)”项下供试品溶液制备方法制备即得。

2.2.3 方法专属性试验 精密吸取上述3种溶液各10 μ l进样

检测。结果,芍药苷对照品溶液和供试品溶液均在9 min左右出现芍药苷色谱峰;供试品溶液色谱图中芍药苷色谱峰峰形尖锐、对称性好,与前后其他峰分离度均大于1.5;按芍药苷计,理论板数大于2 000,且赤芍阴性溶液无干扰。色谱见图2。

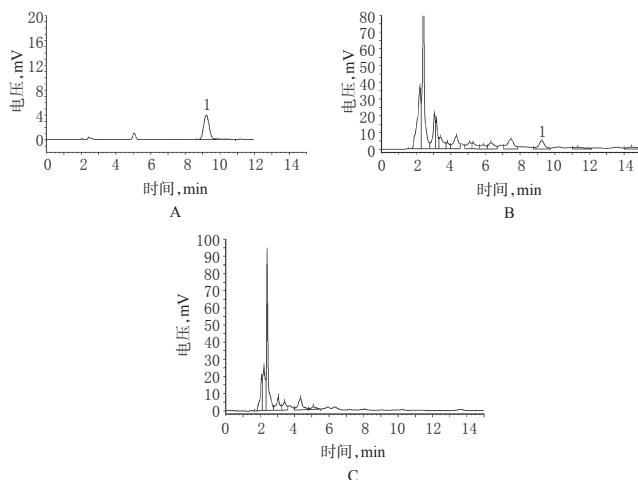


图2 芍药苷高效液相色谱图

A.芍药苷对照品溶液;B.供试品溶液;C.赤芍阴性溶液;1.芍药苷

Fig 2 HPLC chromatograms of paeoniflorin

A. control solution of paeoniflorin; B. test solution; C. negative solution of *Paeonia Radix Rubra*; 1. paeoniflorin

2.2.4 线性关系考察 精密取已制备的各质量浓度的芍药苷对照品溶液(24、36、48、60、180 μ g/ml)分别进样10 μ l,测定峰面积(y),以y与对照品质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=24\ 014x+57\ 187(r=0.999\ 3)$ 。结果表明,芍药苷检测质量浓度线性范围为24.64~172.48 μ g/ml。

2.2.5 精密度试验 精密取对照品溶液10 ml至20 ml量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀。连续进样6次,计算芍药苷峰面积RSD=1.21%(n=6),表明仪器的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液分别于制备后0、1、2、4、8、12 h时进样10 μ l,测定峰面积,计算得芍药苷峰面积的RSD=1.46%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品,按供试品溶液的制备方法平行制备6份,测定芍药苷的含量。结果其平均含量为0.310 mg/ml(RSD=0.95%,n=6),表明本法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的样品6份,制备成供试品溶液。精密量取1 ml,分别置于50 ml量瓶中,各精密加入适量的丹酚酸B对照品,加75%的甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液分别进样、测定并计算回收率。结果平均回收率为100.27%(RSD=1.04%,n=6)。

2.3 正交试验

在参考文献^[4-6]及预试验基础上,针对药材的加水倍量、提取时间、浸泡时间、提取次数等4个影响因素,以丹酚酸B含量、芍药苷含量为主要评价指标,设计L₈(3⁴)正交试验;以干膏得率(干膏总质量/药材总质量×100%)为次要指标,权重系数按丹酚酸B含量、芍药苷含量、干膏得率分别为40、40、20来计算综合评分,即综合评分=(丹酚酸B含量/丹酚酸B含量最大

值) $\times 100 \times 40\%$ +(芍药苷含量/芍药苷含量最大值) $\times 100 \times 40\%$ +(干膏得率/干膏得率最大值) $\times 100 \times 20\%$ 。

称取处方比例的药材共9份,每份121.5 g,按表1因素与水平安排试验,药材加适量水浸泡、煎煮一定时间后合并提取液,过滤浓缩至200 ml,得药液后检测各项指标。因素与水平见表1;正交试验结果见表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(提取时间),h	C(浸泡时间),h	D(提取次数)
1	6	1	0.5	1
2	8	1.5	1	2
3	10	2	1.5	3

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	因素				指标			
	A	B	C	D	丹酚酸B含量,mg/ml	芍药苷含量,mg/ml	干膏得率,%	综合评分
1	1	1	1	1	1.264	0.481	23.650	61.054
2	1	2	2	2	2.068	0.701	31.345	91.689
3	1	3	3	3	1.816	0.631	36.771	85.766
4	2	1	2	3	2.044	0.732	39.747	96.942
5	2	2	3	1	1.401	0.434	26.794	62.531
6	2	3	1	2	1.994	0.311	36.033	71.237
7	3	1	3	2	2.152	0.585	33.085	87.741
8	3	2	1	3	1.981	0.393	41.950	78.297
9	3	3	2	1	1.712	0.651	28.863	81.156
K_1	79.503	81.912	70.196	68.247				
K_2	76.903	77.506	89.929	83.556				
K_3	82.398	79.386	78.679	87.002				
R	5.495	4.406	19.733	18.755				

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	45.331	2	22.666	1.545	>0.05
B	29.336	2	14.668	1.000	>0.05
C	587.913	2	293.957	20.041	<0.05
D	597.968	2	298.984	20.383	<0.05
误差	29.34	2	14.67		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

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

通过综合评分直观分析,4个因素对丹酚酸B含量、芍药苷含量、干膏得率的影响程度不同,因素C>D>A>B,最优工艺为A₃B₁C₂D₃。根据方差分析结果可知,因素C、D对综合评分均有显著性影响,但由于提取2次与3次对试验结果影响不大,结合生产实际,从节约成本方面综合考虑后,最终确定最优工艺为A₂B₁C₂D₃,即加8倍量药材水浸泡1 h,提取2次,每次1 h。根据最优工艺进行提取,3批样品验证试验结果表明综合评分的RSD<2%(n=3),表明提取工艺稳定,详见表4。

3 讨论

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of verification test

批号	丹酚酸B含量,mg/ml	芍药苷含量,mg/ml	干膏得率,%	综合评分
1	2.151	0.726	40.144	98.793
2	2.150	0.723	41.125	99.078
3	2.156	0.724	41.075	99.220

采用单一考察指标优选中药提取工艺并不全面,因单一指标并不能完全代表中药制剂整体质量的优劣^[7]。丹参所含水溶性丹酚酸类成分在抗氧化、抗凝血、抗血栓形成、调血脂和细胞保护方面作用显著^[8-9];而赤芍中的芍药苷为其主要有效成分之一,具有活血化瘀、通脉、抗凝、抗炎、抗过敏药效作用^[10],这与该处方的功能主治相一致。故以丹酚酸B与芍药苷的含量作为丹参和赤芍提取效率的考察指标,比较符合中医临床用药的习惯以及质量控制的要求。

本研究所建立的丹酚酸B和芍药苷的高效液相色谱含量测定方法,经过全面的系统适用性试验和方法学考察,具有分离度好、专属性强、稳定性好、结果准确的特点,为正交试验优选丹酚酸B、芍药苷水回流提取工艺条件提供了可靠保障。本试验所确定的九味益胃合剂的优选提取工艺,具有提取率较高、操作简单、便于进行大生产的特点,且其批间质量稳定,故可作为九味益胃合剂的提取工艺方法。

参考文献

- [1] 徐州,周德端,段国勋,等.中药对幽门螺杆菌抑杀作用的实验研究[J].中国医药学报,1993,8(5):25.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:70-71,147-148.
- [3] 郑立运,刘颖,于书仪,等.赤芍中芍药苷提取溶剂的选择[J].黑龙江医药科学,2007,30(4):84.
- [4] 张响,刘路,李钦.丹参中丹酚酸B的提取工艺研究[J].中草药,2007,38(8):1193.
- [5] 聂继红,周玲.复方中丹参提取工艺及含量测定的研究[J].中成药,2007,29(6):889.
- [6] 彭晓霞,路莎莎,张振巍.混合均匀设计效应面法优选赤芍中芍药苷的提取工艺[J].中国药房,2011,22(11):994.
- [7] 朱建新,王宏,何薇.清热除湿颗粒提取工艺研究[J].中成药,2012,34(5):979.
- [8] 刘建梅,朱明磊,郭鄂平.丹酚酸B的研究概况[J].医学理论与实践,2014,27(2):166.
- [9] 王蓉,原永芳.丹酚酸B药理作用的研究概况[J].中医药导报,2011,17(4):130.
- [10] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等.赤芍药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2010,33(3):233.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2015-02-02)

(编辑:刘萍)