

多指标综合评价法优选补肾活血颗粒的醇提工艺

王玲¹, 尹华^{1*}, 章建华², 李渊贞¹

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 杭州 310006)

[摘要] 目的: 优选补肾活血颗粒的醇提工艺。方法: 采用 HPLC 测定桂皮醛和苦杏仁苷含量, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~3.5 min, 18% A; 3.5~4.0 min, 18%~55% A; 4.0~9.0 min, 55% A; 9.0~9.5 min, 55%~18% A), 检测波长分别为 290, 210 nm。以桂皮醛、苦杏仁苷转移率为综合评价指标, 通过单因素试验考察提取方法、浸泡时间、乙醇体积分数对醇提工艺的影响, 利用正交试验考察提取溶剂用量、提取次数、提取时间对醇提工艺的影响。结果: 最佳醇提工艺为加 10 倍 60% 乙醇浸泡 1 h, 提取 3 次, 每次 1.5 h; 桂皮醛、苦杏仁苷转移率分别为 85.43%, 86.95%。结论: 优选的提取工艺重复性好, 可为补肾活血颗粒的工业生产提供参考。

[关键词] 补肾活血颗粒; 醇提工艺; 单因素试验; 正交试验; 桂皮醛; 苦杏仁苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0022-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1537.008.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:37

Optimization of Ethanol Extraction Process for Bushen Huoxue Granules by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

WANG Ling¹, YIN Hua^{1*}, ZHANG Jian-hua², LI Yuan-zhen¹

(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China; 2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction process of Bushen Huoxue granules. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of cinnamaldehyde and amygdalin with mobile phase of acetonitrile (A) - water (B) for gradient elution (0-3.5 min, 18% A; 3.5-4.0 min, 18%-55% A; 4.0-9.0 min, 55% A; 9.0-9.5 min, 55%-18% A), detection wavelength at 290 and 210 nm, respectively. Taking transfer rates of cinnamaldehyde and amygdalin as a comprehensive evaluation index, effects of extracting method, soaking time and ethanol concentration on ethanol extraction process were investigated by single factor tests, orthogonal test was employed to optimize extraction process with ethanol consumption, extraction times and extracting time as factors. **Result:** Optimum extraction process was as follows: soaked 1 h with 10 times the amount of 60% ethanol, extracted thrice for 1.5 h each time; transfer rates of cinnamaldehyde and amygdalin were 85.43% and 86.95%, respectively. **Conclusion:** This optimized extraction technology was repeatable and feasible, it could provide a reference for industrial production of Bushen Huoxue granules.

[Key words] Bushen Huoxue granules; ethanol extraction process; single factor test; orthogonal test; cinnamaldehyde; amygdalin

[收稿日期] 20131118(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273772);浙江省中医药科技计划项目(2010ZA026);浙江省中药现代化项目计划(浙经信[2010]421号)

[第一作者] 王玲,在读硕士,从事中药分析研究, Tel:0571-86613604, E-mail:cherish.198813@163.com

[通讯作者] *尹华,教授,博士生导师,从事中药质量标准、新药开发、血清药化及药效物质基础研究, Tel:0571-86613604, E-mail:maryinhua@163.com

补肾活血颗粒是课题组正在研发的治疗骨质疏松症的中药新药,处方源自浙江省中医院骨伤科的传统经验方,由熟地黄、杜仲、附子、肉桂、桃仁、红花等 10 味药组成,具有补肾益精、活血化瘀、散寒止痛之功效。方中杜仲、附子、红花等 8 味药的活性成分呈水溶性,而桃仁和肉桂的活性成分则偏向醇溶性,为尽可能地提取和保护方中活性成分,将杜仲、熟地黄等 8 味药进行水提,桃仁和肉桂 2 味药采用醇提。本实验以肉桂中桂皮醛和桃仁中苦杏仁苷的转移率为综合评价指标,通过单因素试验和正交试验优选补肾活血颗粒的醇提工艺,为该颗粒剂的工业生产提供参考^[1-2]。

1 材料

1525-2998 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司),PHS-3TC(0.01 级)型精密数显酸度计(上海天达仪器有限公司),BD211D 型 1/10 万电子天平(德国塞多利斯公司),Classic UVF MK2 型纯水机(英国 ELGA 公司)。

熟地黄、杜仲、红花、肉桂、附子、桃仁等饮片均购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学药学院张如松教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定;苦杏仁苷、桂皮醛对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110820-9910,110710-200714),水为自制纯化水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 评价指标的确定 方中桃仁和肉桂的活性成分偏醇溶性,采用乙醇提取。醇提部分以臣药肉桂中有效成分桂皮醛与佐药桃仁中有效成分苦杏仁苷的转移率为评价指标,采用综合加权评分法优选醇提工艺参数,设定桂皮醛与苦杏仁苷的权重系数分别为 0.6 和 0.4。

2.2 桂皮醛、苦杏仁苷的含量测定^[3-6]

2.2.1 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 3.5 min, 18% A; 3.5 ~ 4.0 min, 18% ~ 55% A; 4.0 ~ 9.0 min, 55% A; 9.0 ~ 9.5 min, 55% ~ 18% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL,桂皮醛、苦杏仁苷检测波长分别为 290, 210 nm。此色谱条件下,桂皮醛、苦杏仁苷与相邻峰的分高度 > 1.5;理论塔板数以桂皮醛峰、苦杏仁苷峰计分别不低于 3 000, 2 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取桂皮醛和苦杏仁苷对照品适量,加甲醇逐级稀释成桂皮醛质量浓度

为 0.440 6, 0.881 3, 1.763, 3.525, 7.050, 8.813, 17.63, 35.25, 70.50 mg·L⁻¹ 和苦杏仁苷质量浓度为 1.443, 2.886, 5.722, 11.54, 17.32, 23.09, 28.86, 57.72, 115.4 mg·L⁻¹ 共 9 个混合对照品溶液。按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 1.180 \times 10^4 X + 3.648 \times 10^3$ ($r = 0.999 9$), $Y = 6.470 \times 10^2 X + 2.757 \times 10^3$ ($r = 0.999 5$),线性范围分别为 8.812 ~ 1 410, 28.86 ~ 2 308 ng。

2.2.3 回收率试验 精密吸取已知含量的提取液 1 mL,加甲醇定容至 10 mL 量瓶中,精密吸取 0.5 mL 置 5 mL 量瓶中,加入 144.3 mg·L⁻¹ 苦杏仁苷对照品溶液 0.25 mL 及 44.06 mg·L⁻¹ 桂皮醛对照品溶液 0.80 mL,混合后加甲醇稀释并定容至 5 mL,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,计算苦杏仁苷、桂皮醛的平均加样回收率($n = 6$)分别为 100.6% (RSD 1.1%), 101.5% (RSD 0.89%),均符合要求。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 提取方法 按处方比例称取饮片(桃仁-肉桂 1:1,下同)3 份,每份 12 g,考察回流、超声、冷浸 3 种方法对有效成分提取效果的影响。回流法为加 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次,每次 1 h;超声法为加 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次,每次 0.5 h;冷浸法为加 10 倍量 60% 乙醇浸泡 24 h。各提取液滤过,合并滤液并减压浓缩至 250 mL,按 **2.2.1** 项下色谱条件测定,计算桂皮醛和苦杏仁苷的转移率,见表 1,结果发现回流法综合评分较高,故确定采用回流法。

表 1 提取方法、浸泡时间及乙醇体积分数对补肾活血颗粒醇提工艺的影响

因素	桂皮醛		苦杏仁苷		综合评分	
	质量浓度 /mg·L ⁻¹	转移率 /%	质量浓度 /mg·L ⁻¹	转移率 /%		
提取方法	回流	808.9	80.47	692.6	89.47	84.07
	超声	37.66	3.953	379.8	49.34	22.11
	冷浸	109.5	11.40	651.8	82.24	39.74
浸泡时间	0.5 h	854.7	79.53	679.7	76.20	78.20
	1.0 h	927.2	85.58	758.9	70.67	79.62
	2.0 h	856.2	83.72	739.5	69.64	78.09
	4.0 h	938.9	82.33	749.4	68.94	76.97
乙醇体积分数	50%	920.0	81.86	718.4	93.96	86.70
	60%	1 026.0	86.05	655.1	90.54	87.85
	70%	1 034.0	87.91	641.9	81.48	85.34
	80%	1 058.0	91.16	556.5	70.66	82.96

2.3.2 浸泡时间 按处方比例称取饮片 4 份,每份 12 g,分别加 10 倍量 60% 乙醇浸泡 0.5, 1, 2, 4 h,回

流提取 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液并减压浓缩至 250 mL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算各成分转移率,结果见表 1,说明浸泡 1 h 后,各提取液中桂皮醛和苦杏仁苷含量及转移率无显著性差异,故确定饮片浸泡 1 h 后进行回流提取。

2.3.3 乙醇体积分数 按处方比例称取饮片 4 份,每份 12 g,分别加 10 倍量 50%,60%,70%,80% 的乙醇溶液浸泡 1 h,回流提取 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液并减压浓缩至 250 mL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算各成分转移率,结果见表 1,说明 60% 乙醇提取效果较好。

2.4 正交试验 按处方比例称取饮片 9 份,每份 12 g,各加一定量 60% 乙醇浸泡 1 h,选择乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素,以桂皮醛和苦杏仁苷转移率的综合评分为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 补肾活血颗粒醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量/倍	B 提取数/次	C 提取时间/h
1	8	1	0.5
2	10	2	1.0
3	12	3	1.5

表 3 补肾活血颗粒醇提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D (空白)	转移率/%		综合评分
					桂皮醛	苦杏仁苷	
1	1	1	1	1	60.00	52.63	57.05
2	1	2	2	2	71.63	83.55	76.40
3	1	3	3	3	81.16	99.01	88.30
4	2	1	2	3	68.84	54.61	63.14
5	2	2	3	1	85.12	92.76	88.17
6	2	3	1	2	82.33	83.55	82.82
7	3	1	3	2	63.95	75.66	68.63
8	3	2	1	3	71.63	53.29	64.30
9	3	3	2	1	74.42	97.37	83.60
K_1	73.92	62.94	68.06	76.27			
K_2	78.04	76.29	74.38	75.95			
K_3	72.18	84.91	81.70	71.91			
R	5.87	21.97	13.64	4.36			

表 4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	54.48	2	27.24	1.54	>0.05
B	735.00	2	367.50	20.76	<0.05
C	279.70	2	139.90	7.90	>0.05
D(误差)	35.41	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对醇提工艺的影响顺序为 $B > C > A$ 。方差分析表明因素 A, C 对醇提工

艺无显著性影响,因素 B 则影响显著,确定最佳提取工艺为 $A_2B_3C_3$ 。方差分析显示提取次数有显著性影响,而乙醇用量和提取时间无统计学显著差异。因此,确定最佳醇提工艺为 $A_2B_3C_3$,即加 10 倍量 60% 乙醇浸泡 1 h,提取 3 次,每次 1.5 h。

2.5 验证试验 按处方比例称取桃仁-肉桂饮片 12 g,共 3 份,按最佳工艺条件进行提取,滤过,合并滤液并减压浓缩至 250 mL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果见表 5,表明该提取工艺稳定可行。

表 5 补肾活血颗粒醇提工艺验证试验

No.	桂皮醛		苦杏仁苷		综合评分
	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	转移率 /%	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	转移率 /%	
1	840.1	83.26	684.0	87.50	84.96
2	876.6	85.58	651.8	85.20	85.43
3	879.6	87.44	656.1	88.16	87.72

3 讨论

补肾活血颗粒治疗骨质疏松的效果确切,该制剂药味较多,因为桃仁和肉桂的主要有效成分为醇溶性成分,为配合工业化生产的需要,故采用乙醇提取。本文采用单因素试验筛选提取方法、浸泡时间及乙醇体积分数等,确定各因素的最佳水平,以苦杏仁苷和桂皮醛的转移率为评价指标,通过多指标综合评分法优选提取工艺。该方法既可保证指标的全面性,又可根据各指标的影响程度进行权重分配,对关键影响因素给予了相应的侧重,使分析结果更为科学和客观。

[参考文献]

- [1] 许兵,方剑利,刘慧,等. 补肾活血方对去势大鼠骨质疏松的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011,4(3):177.
- [2] 丁柱,朱兆洪,彭太平. 补肾活血胶囊对骨质疏松症患者骨密度的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008,16(6):41.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:116,154,232.
- [4] 贾晓斌,刘齐,韦英杰,等. RP-HPLC 同时测定代温灸膏中肉桂酸、桂皮醛、辣椒碱、二氢辣椒碱及 6-姜酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2011,31(8):1467.
- [5] 尚严,李进,刘伟,等. HPLC 测定苦杏仁不同炮制方法中苦杏仁苷的含量[J]. 中医学报, 2011,26(7):831.
- [6] 叶晶晶. HPLC 法测定不同产地桃仁中苦杏仁苷的含量[J]. 中华中医药学刊, 2011,29(1):206.

[责任编辑 刘德文]