

多指标正交试验法优选加味败藤颗粒的提取工艺

武洁^{1,2}, 何子剑^{1,2,3}, 邢玉霞^{1,2}, 鞠建明^{1,2*}

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 中国中医科学院江苏分院, 南京 210028;
3. 中国药科大学, 南京 210009)

[摘要] 目的: 优选加味败藤颗粒的水提取工艺。方法: 以盐酸小檗碱、芍药苷质量及含固量的综合评分为指标, 通过 $L_9(3)^4$ 正交试验考察加水量、提取时间和煎煮次数对加味败藤颗粒水提取工艺的影响。采用 HPLC-DAD 测定盐酸小檗碱和芍药苷含量, 流动相 10 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~9 min, 19.5% B; 9~10 min, 19.5%~45% B; 10~20 min, 45% B), 检测波长分别为 347, 231 nm。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h; 含固量 23.69%, 盐酸小檗碱、芍药苷质量依次为 0.092 5, 0.333 7 g。结论: 优选的工艺合理可行, 重复性好, 为加味败藤颗粒的工业化生产提供参考。

[关键词] 加味败藤颗粒; 败酱草; 盐酸小檗碱; 芍药苷; 综合评分法; 含固量; 黄柏

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0023-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160023

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0946.095.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 11:03

Optimization of Extracting Technology for Jiawei Baiteng Granules by Multi-index Orthogonal Test

WU Jie^{1,2}, HE Zi-jian^{1,2,3}, XING Yu-xia^{1,2}, JU Jian-ming^{1,2*}

(1. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;
2. Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China;
3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize water extracting technology of Jiawei Baiteng granules. **Method:** With composite score of contents of berberine hydrochloride, paeoniflorin and solid-containing as index, orthogonal test was adopted to optimize extraction process by taking the amount of water, extraction time and boiling times as factors. Contents of berberine hydrochloride and paeoniflorin were determined by HPLC coupled with DAD detector, mobile phase consisted of 10 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (A) -acetonitrile (B) with gradient elution program of (0-9 min, 19.5% B; 9-10 min, 19.5-45% B; 10-25 min, 45% B), detection wavelengths were set at 347 nm and 231 nm, respectively. **Result:** Optimal extracting technology was as follows: decocted 3 times with 10 times the amount of water for 1 h at each time; under these conditions, contents of berberine hydrochloride, paeoniflorin and solid-containing were 0.092 5 g, 0.333 7 g and 23.69%, respectively. **Conclusion:** This optimize process was reasonable, feasible and reproducible, which could guide industrial production of Jiawei Baiteng granules.

[Key words] Jiawei Baiteng granules; *Thlaspi arvense*; berberine hydrochloride; paeoniflorin; comprehensive evaluation method; solid-containing content; *Phellodendri Chinensis* Cortex

[收稿日期] 20131210(012)

[基金项目] 中国中医科学院江苏分院医院制剂开发专项(Y1211)

[第一作者] 武洁, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准及药代动力学研究, Tel: 025-85608675, E-mail: wujie613@hotmail.com

[通讯作者] * 鞠建明, 博士, 研究员, 从事中药质量标准及制剂工艺研究, Tel: 025-85639640, E-mail: jjm405@sina.com

加味败藤颗粒为江苏省中医药研究院的临床经验方,源自大血藤汤,由败酱草、大血藤、黄柏、赤芍等 11 味药材组成,具有清热解毒、利湿排脓、行气活血、化瘀止痛之功效,临床用于盆腔炎湿热瘀结证,治疗慢性盆腔炎有效率高且复发率低^[1-3],为了使该方造福更多患者,拟将其研发成服用方便、工艺可行、质量可控的颗粒剂。根据《医疗机构制剂注册管理办法》规定,处方根据中医药理论组方,利用传统工艺配制(制剂配制过程未使原组方中治疗疾病的物质基础发生变化),且该处方在本医疗机构具有 > 5 年的使用期,可免做药效、毒理和临床研究^[4]。本实验以盐酸小檗碱、芍药苷质量及含固量为综合评价指标,通过正交试验优选加味败藤颗粒的水提取工艺,为该制剂的临床推广提供参考。

1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司), Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司), CPA225D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司), AT201 型 1/万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), Micromax 型高速离心机(美国 Thermo 公司)。

败酱草等药材均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;盐酸小檗碱、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201212, 110736-201136),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

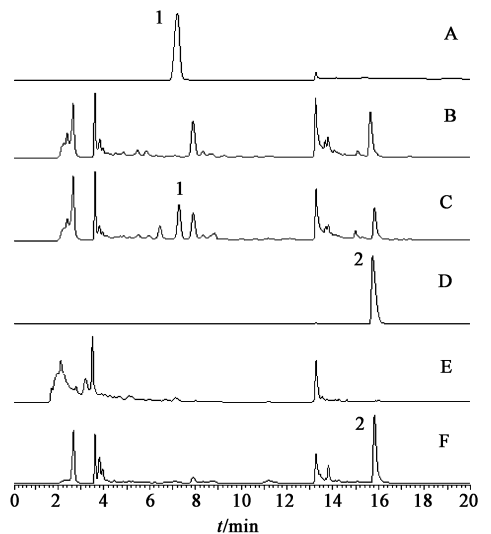
2.1 含固量的测定 精密移取提取液 30 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 °C 常压干燥 3 h,取出,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量^[5],即得。

2.2 盐酸小檗碱及芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 10 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~9 min, 19.5% B; 9~10 min, 19.5%~45% B; 10~20 min, 45% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 347(盐酸小檗碱),231 nm(芍药苷),进样量 10 μL,见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、芍药苷对照品 2.079, 10.460 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取提取液 10 mL,水浴蒸干,残渣用甲醇 10 mL 溶解并定容,15 000 r·



A, D. 对照品; B(缺赤芍), E(缺黄柏). 阴性样品;
C, F. 供试品; 1. 芍药苷; 2. 盐酸小檗碱;
A, B, C. 检测波长 231 nm; D, E, F. 检测波长 347 nm

图 1 加味败藤颗粒 HPLC

min⁻¹离心 5 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2.4 标准曲线的制备 分别精密吸取盐酸小檗碱和芍药苷对照品溶液适量, 用甲醇稀释成盐酸小檗碱质量浓度分别为 5.2, 10.4, 20.8, 41.6, 83.2, 104.0 mg·L⁻¹, 芍药苷质量浓度分别为 26.2, 52.3, 104.6, 209.2, 313.8, 418.4, 523.0 mg·L⁻¹的混合溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积对对照品质量浓度进行线性回归, 得盐酸小檗碱、芍药苷回归方程分别为 $Y = 590.32X + 306.13$ ($r = 0.9995$), $Y = 232.27X + 1081.6$ ($r = 0.9999$), 线性范围依次为 5.2~104.0, 26.2~523.0 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 取盐酸小檗碱、芍药苷质量浓度分别为 20.8, 104.6 mg·L⁻¹的混合对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 1.83%, 0.43%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 按处方比例称取药材各 6 份, 平行制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果盐酸小檗碱和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.65%, 1.58%, 表明该方法重复性较好。

2.2.7 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 3, 6, 9, 12 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算盐酸小檗碱和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.94%, 0.84%, 表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取已知盐酸小檗碱

(108.36 mg·L⁻¹)和芍药苷(32.71 mg·L⁻¹)含量的提取液 5 mL,共 9 份,等分为 3 组,分别加入混合对照品溶液(盐酸小檗碱和芍药苷的质量浓度分别为 523,155.9 mg·L⁻¹) 0.8,1.0,1.2 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算盐酸小檗碱低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 101.92%,101.83%,101.02%,RSD 分别为 1.67%,2.39%,2.63%,芍药苷低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 99.04%,101.68%,100.78%,RSD 分别为 2.70%,1.32%,3.55%。

2.3 正交试验 优选在预试验基础上,选取煎煮次数、煎煮时间、加水量为考察因素,每个因素设定 3

个水平,以盐酸小檗碱、芍药苷质量和含固量的综合评分为指标,因素水平见表 1。按处方比例称取药材共 9 份,每份 118 g,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,平行 2 份,提取液滤过,合并滤液,准确测量体积,按 2.2.1 项下色谱条件测定,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 加味败藤颗粒水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 煎煮时间/h	C 煎煮数/次
1	8	0.5	1
2	10	1.0	2
3	12	1.5	3

表 2 加味败藤颗粒水提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	含固量(X)/%	盐酸小檗碱(Y)/g	芍药苷(Z)/g	综合评分
1	1	1	1	1	14.17	0.035 8	0.225 4	53.34
2	1	2	2	2	20.78	0.068 8	0.319 5	83.71
3	1	3	3	3	23.76	0.091 7	0.305 5	94.10
4	2	1	2	3	20.54	0.058 5	0.313 9	78.58
5	2	2	3	1	23.41	0.093 1	0.324 9	96.65
6	2	3	1	2	17.23	0.050 1	0.254 7	65.31
7	3	1	3	2	23.13	0.096 1	0.337 6	99.20
8	3	2	1	3	17.83	0.044 9	0.263 4	64.69
9	3	3	2	1	23.21	0.076 4	0.339 8	91.34
K ₁	77.05	77.04	61.11	80.44				
K ₂	80.18	81.69	84.54	82.74				
K ₃	85.08	83.58	96.65	79.12				
R	8.03	6.54	35.54	3.62				

注:综合评分 = $X_i/X_{\max} \times 20 + Y_i/Y_{\max} \times 40 + Z_i/Z_{\max} \times 40$ 。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	98.17	49.08	4.87	>0.05
B	68.00	34.00	3.38	>0.05
C	1958.42	979.21	97.23	<0.05
D(误差)	20.14	10.07	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$, f 均为 2。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B$,最佳组合为 $A_3B_3C_3$ 。方差分析表明 C 因素对水提取工艺具有显著性影响,因素 A,B 则均无统计学意义,从节约能源、提高生产效率的角度考虑,确定最佳水提取工艺为 $A_2B_2C_3$,即加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h。

2.4 验证试验 按处方比例称取同一批药材共 3 份,每份 118 g,按优选的提取工艺进行验证试验,结

果含固量分别为 23.61%,23.74%,23.72%,盐酸小檗碱质量依次为 0.091 9,0.095 0,0.090 7 g,芍药苷质量分别为 0.331 9,0.330 7,0.338 5 g,计算综合评分分别为 97.19,98.44,97.54,说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

本文采用 HPLC-DAD 同时测定加味败藤颗粒中盐酸小檗碱和芍药苷含量,由于二者极性差异较大,故采用梯度洗脱。盐酸小檗碱为含氮化合物,在 C₁₈柱上极易拖尾,通常于流动相中加入十二烷基磺酸钠等离子对试剂^[6],但离子对试剂对 C₁₈柱吸附强,不易冲洗干净,易造成柱压升高而损伤色谱柱。经预试验摸索发现在流动相中加入磷酸二氢钾可提高流动相的离子强度,抑制碱性化合物与硅醇基间的相互作用,得到峰形对称的色谱峰。

Box-Behnken 响应面法优选金樱子抗糖尿病活性部位提取工艺

柴思佳, 齐海艳, 邓翀*
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 优选金樱子抗糖尿病活性部位的提取工艺。方法: 以体外抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性的综合评分为因变量, 乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为自变量, 采用 Design Expert 8.05 软件分析试验数据, 建立多元二次回归方程, 采用 Box-Behnken 响应面法优选金樱子抗糖尿病活性部位的提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 11 倍量 85% 乙醇提取 2 次, 每次 120 min; α -淀粉酶活性平均抑制率 95.39%, RSD 4.59%, DPPH 自由基平均清除率 91.47%, RSD 4.12%, 综合评分 0.967 2, 与预测值 0.977 8 吻合程度良好。结论: 通过生物活性评价优选的提取工艺更科学合理, 符合临床应用。

[关键词] 金樱子; Box-Behnken 试验设计; 响应面法; 综合评分; α -淀粉酶; DPPH 自由基清除率

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0026-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160026

Optimization of Extraction Process for Anti-diabetic Active Parts from *Rosae Laevigatae Fructus* by Box-Behnken Response Surface Methodology

CHAI Si-jia, QI Hai-yan, DENG Chong*
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of anti-diabetic active parts from *Rosae Laevigatae Fructus*. **Method:** With composite score of *in vitro* anti- α -amylase and anti-oxidation activities as dependent variable, ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and times as independent variables, test data were analyzed by Design Expert 8.05 software, then multivariate quadratic regression equation was established,

[收稿日期] 20131215(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374028, 30902002, 81273750); 陕西省中医药管理局项目(13-ZY014); 陕西省重点科技创新团队计划项目(2013KCT-26)

[第一作者] 柴思佳, 在读硕士, 从事防治老年病的中草药开发研究, Tel: 029-38185165, E-mail: csj4181@126.com

[通讯作者] * 邓翀, 博士, 副教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 029-38185165, E-mail: fmmudz217@126.com

盐酸小檗碱和芍药苷是加味败藤颗粒的有效成分, 在减压浓缩过程中相对稳定; 含固量虽不能反映有效成分的含量, 但可作为工艺筛选的参考指标。综合考虑各指标反映提取效果的程度, 将盐酸小檗碱与芍药苷的权重系数均设为 0.4, 含固量的权重系数设定 0.2, 将三者进行加权综合评分较单一评价指标更具全面性和合理性。

[参考文献]

- [1] 许亦韬, 项迎春. 红藤合剂口服联合红藤汤灌肠治疗慢性盆腔炎 86 例疗效观察[J]. 海峡药学, 2013, 25(3): 155.
- [2] 徐文峥, 江伟华. 红藤汤中药配方颗粒治疗慢性盆腔

炎的临床观察[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1386.

- [3] 傅红梅. 中药红藤败酱汤灌肠治疗盆腔炎性包块 38 例分析[J]. 江苏医药, 2010, 36(7): 848.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 医疗机构制剂注册管理办法(试行)[Z]. 北京: 中华人民共和国国务院公报, 2006.
- [5] 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; 附录 10.
- [6] 吴雪丹, 丁宝月, 傅应华. HPLC 法测定复方苦参洗剂中盐酸小檗碱和黄芩苷[J]. 中成药, 2012, 34(5): 868.

[责任编辑 刘德文]