

药效学结合正交试验优选参连颗粒的水提工艺

王敏¹, 杜守颖^{1*}, 田志浩¹, 白洁^{1*}, 李鹏跃¹, 张林¹, 黎丹奇¹, 万洁²
(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的:多指标综合评分法优选参连方的水提工艺,为参连颗粒的生产提供工艺参数。方法:将大鼠随机分为空白组,提取物Ⅰ组(水提),提取物Ⅱ组(水提醇沉),提取物Ⅲ组(党参等水提醇沉,丹参等醇提),提取物Ⅳ组(党参等水提,丹参等醇提),在以大鼠心肌缺血再灌注后室性早搏、室性心动过速和室性颤动的总时间为指标考察不同提取工艺路线的基础上,采用HPLC测定芍药苷、甘草苷和甘草酸的含量,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~18 min,86% B;18~30 min,86%~72% B;30~40 min,72%~65% B;40~50 min,65%~60% B;50~55 min,60%~40% B;55~60 min,40%~86% B;60~65 min,86% B),流速1.0 mL·min⁻¹,芍药苷检测波长230 nm,甘草苷和甘草酸检测波长237 nm。通过正交试验考察溶剂用量、提取时间、提取次数对3种成分含量的影响,利用综合评分法优选提取工艺并进行验证试验。结果:最佳提取工艺为提取3次,分别加10,8,8倍量水提取1.5 h;芍药苷、甘草苷、甘草酸提取量分别为22.88,15.17,13.54 mg·g⁻¹。结论:优选的提取工艺稳定可行,可为参连颗粒的生产提供指导。

[关键词] 参连方;水提工艺;综合评分;芍药苷;甘草苷;甘草酸;心肌缺血再灌注

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2;RS481+.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0027-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170208.1035.010.html>

[网络出版时间] 2017-02-08 10:35

Optimization of Water Extraction Process of Shenlian Granules by Orthogonal Test and Pharmacodynamics

WANG Min¹, DU Shou-ying^{1*}, TIAN Zhi-hao¹, BAI Jie^{1*}, LI Peng-yue¹,
ZHANG Lin¹, LI Dan-qi¹, WAN Jie²

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the water extraction process of Shenlian formula. **Method:** Rats were randomized into control group, extract I group (water extraction), extract II group (water extraction and ethanol precipitation), extract III group (water extraction and ethanol precipitation of some herbs, ethanol extraction of others), extract IV group (water extraction of some herbs, ethanol extraction of others), and the numbers of premature ventricular contraction, the total time of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation were used to evaluate the arrhythmia induced by myocardial ischemia reperfusion arrhythmia. Orthogonal design was used to optimize the process conditions by taking solvent volume, extraction time and times as factors after investigating pharmacodynamics index of different extraction process routes. Paeoniflorin, liquiritin and glycyrrhizic acid, as examining parameters, were evaluated by HPLC with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution. **Result:** Optimal extraction process was as follows: extracted thrice

[收稿日期] 20161209(006)

[基金项目] 北京市科技计划项目(Z141100002214005)

[第一作者] 王敏,在读硕士,从事中药新技术与新药研究,E-mail:minbjzyy@163.com

[通讯作者] *杜守颖,博士,博士生导师,从事中药新技术与新药研究,Tel:010-84738615,E-mail:dushouying@263.net;

*白洁,博士,讲师,从事中药新技术与新药研究,Tel:13811723360,E-mail:baijie22811@263.net

with 10, 8, 8 times the amount of water, decocted for 1.5 h per time. Extracting amounts of paeoniflorin, liquiritin and glycyrrhizic acid were 22.88, 15.17, 13.54 mg · g⁻¹. **Conclusion:** This optimized extraction process is stable and feasible, which can provide reference value for the actual production of Shenlian granules.

[Key words] Shenlian formula; water extraction process; comprehensive score; paeoniflorin; liquiritin; glycyrrhizic acid; myocardial ischemia and reperfusion

参连方为北京中医药大学东方医院的临床经验方,由党参、白芍、赤芍、炙甘草、丹参、远志、鬼箭羽、黄连、酸枣仁、川芎、法半夏共 11 味药组成,具有益气活血、清热化痰、安神复脉的功效。方中党参补脾益气为君药,健脾而不燥,养血而不腻;黄连、赤芍等共为臣药,黄连苦寒,入心经,二者配伍共奏清心凉血、化瘀止痛;白芍、鬼箭羽等养血柔肝、活血止痛,炙甘草调和诸药,益气复脉。该方用于治疗冠心病室性期前收缩属气虚血瘀、痰热扰心证,症见心悸心烦、怕热喜凉、气短、舌暗苔腻。参连方临床效果显著,2010—2013 年该科室使用此方治疗心律失常总有效率达 82.2%。药效学实验研究表明该汤剂具有明显拮抗乌头碱、氯化钙和异丙肾所致大鼠心律失常作用^[1-2]。

为提高临床使用的便捷性,本课题组对参连方进行了新药开发。方中党参、白芍、赤芍、鬼箭羽、法半夏、炙甘草 6 味药的有效成分以水溶性为主^[3-5],采用水提工艺,其余药味采取醇提工艺。本实验通过药效学试验和指标成分的含量测定初选了参连方的提取工艺路线,并利用正交试验对方中水提部分——党参、白芍、赤芍、甘草等药味的提取工艺进行优化,选择芍药苷、甘草苷、甘草酸为考察指标,采用多指标综合评分法优选提取工艺,为参连颗粒的研发提供参考^[6]。

1 材料

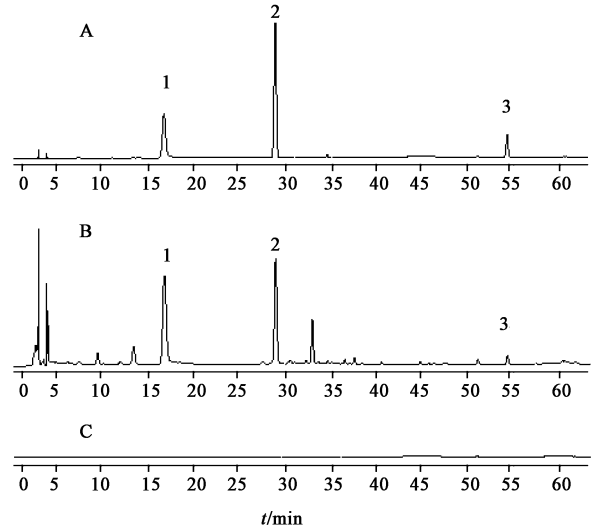
LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),BT 25S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司),DZF-6051 型真空干燥箱(利康达圣科技发展有限公司)。党参、白芍、赤芍等饮片均购自北京本草方源药业有限公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求;芍药苷、甘草苷、甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201438,111610-201106,110731-201418,纯度依次为 96.4%,93.7%,93.1%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇及磷酸为色谱级,其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性 Wistar 种大鼠,200 ~ 220 g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,许可证号

SCXK(京)2011-0004,经北京中医药大学动物保护与使用委员会批准,批准号 0304860。

2 方法与结果

2.1 芍药苷、甘草苷、甘草酸的含量测定
Purospher RP-18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 18 min, 86% B; 18 ~ 30 min, 86% ~ 72% B; 30 ~ 40 min, 72% ~ 65% B; 40 ~ 50 min, 65% ~ 60% B; 50 ~ 55 min, 60% ~ 40% B; 55 ~ 60 min, 40% ~ 86% B; 60 ~ 65 min, 86% B),流速 1.0 mL · min⁻¹,芍药苷检测波长 230 nm,甘草苷和甘草酸检测波长 237 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 芍药苷; 2. 甘草苷; 3. 甘草酸

图 1 参连提取物的 HPLC

Fig. 1 HPLC of Shenlian extract

2.2 大鼠心肌缺血再灌注试验及指标成分的含量测定

2.2.1 提取物的含量测定 取浸膏约 0.1 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密加入甲醇 5 mL,超声处理 20 min,加甲醇定容至刻度,混匀,按 2.1 项下色谱条件测定指标成分的含量。

2.2.2 分组与给药 大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为空白组(生理盐水组),参连提取物 I 组(水提组),参连提取物 II 组(水提醇沉组),参连提

取物Ⅲ组(党参、法半夏、炙甘草、白芍、赤芍、鬼箭羽水提醇沉,丹参、黄连、远志、川芎、酸枣仁等醇提),参连提取物Ⅳ组(党参、法半夏、炙甘草、白芍、赤芍、鬼箭羽等水提,丹参、黄连、远志、川芎、酸枣仁等醇提)。大鼠冠状动脉左前降支线栓结扎法建立心肌缺血再灌注损伤模型后,经十二指肠给予供试药物。观察再灌注后 10 min 内室性早搏(premature ventricular contraction, PVC),室性心动过速(ventricular tachycardia, VT)及室性颤动(ventricular fibrillation, VF)之和 VT + VF 总时间,取对数值 lgPVC 及 lg(VT + VF)。

2.2.3 数据处理与分析 药效学结果见表 1,含量测定结果见表 2。提取物 I, II, III, IV 生药量质量分数分别为 3.26, 4.36, 3.67, 3.04 g·g⁻¹, 出膏率依次为 30.69%, 22.92%, 22.36%, 33.20%, 大鼠给药量均为 8.0 g·kg⁻¹(按生药量计)。结果发现空白组再灌注后 1 min 内即发生不同程度的心律失常。与空白组比较,参连方不同工艺组 VT + VF 总时间均明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$), PVC 均有所减少。说明该方对大鼠缺血再灌注损伤诱发的心律失常有明显保护作用,但各工艺组间无统计学差异。因醇提部分饮片有效成分含量测定结果为工艺Ⅲ和Ⅳ较高,但是工艺Ⅳ(水提)较工艺Ⅲ(水提醇沉)的有效成分含量高,转移率也较高,说明水提醇沉后芍药苷、甘草苷、甘草酸有所损失。结合药效学结果,优选工艺Ⅳ,即党参等饮片水提,丹参等饮片醇提。

表 1 参连提取物对 PVC 及 VT + VF 总时程的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of Shenlian extract on number of premature ventricular contraction and total time of ventricular tachycardia + ventricular fibrillation($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	生药量/g·kg ⁻¹	lgPVC	lg(VT + VF)
空白	-	0.85 ± 0.58	1.66 ± 0.19
参连提取物 I	8	0.74 ± 0.48	1.32 ± 0.41 ¹⁾
参连提取物 II	8	0.73 ± 0.57	1.25 ± 0.49 ¹⁾
参连提取物 III	8	0.77 ± 0.51	1.14 ± 0.23 ²⁾
参连提取物 IV	8	0.85 ± 0.42	1.10 ± 0.38 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 工艺优选

2.3.1 吸水量考察 称取处方量党参、白芍、赤芍等水提组饮片共 43 g,加 8 倍量水浸泡 12 h,滤过,量取滤液体积,考察饮片的吸水量($n = 3$),结果发现饮片可吸取自身质量 2 倍的水分。

2.3.2 出膏率的测定 将处方量药液浓缩成清膏,转移至已知质量的蒸发皿中,水浴浓缩成稠膏,于

表 2 不同参连提取物中芍药苷、甘草苷、甘草酸的含量测定

Table 2 Determination of paeoniflorin, liquiritin and glycyrrhizic acid in different Shenlian extract

成分	提取物	浸膏中质量分数/%	生药中质量分数/mg·g ⁻¹	转移率/%
芍药苷	I	0.71	14.67	24.50
	II	1.17	18.16	29.95
	III	1.24	9.97	17.27
	IV	1.26	15.00	25.44
甘草苷	I	0.55	13.78	93.72
	II	0.57	10.49	71.36
	III	0.84	8.07	54.89
	IV	0.68	9.76	66.41
甘草酸	I	0.42	10.34	44.95
	II	0.31	5.68	24.70
	III	0.56	5.34	23.20
	IV	0.44	6.27	27.25

注:生药中质量分数表示各成分在饮片中的质量分数。

60 °C, 0.09 MPa 条件下减压干燥,称重,计算出膏率。结果发现出膏率接近 40%,提示水提组含糖类、黏液质等较难干燥成分较多,需要的干燥时间较长。

2.3.3 提取工艺优选 精密称取处方量水提组饮片 43 g,选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,浓缩液定容至 1 L 量瓶中,混匀,离心处理(5 000 r·min⁻¹, 10 min),经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后进行含量测定。以芍药苷、甘草苷及甘草酸质量分数的综合评分为指标,综合评分为芍药苷、甘草苷及甘草酸质量分数的总和,采用 SAS 8.2 软件分析,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。由直观分析可知,各因素对水提工艺的影响顺序为 C > B > A,最优方案为 A₂B₂C₃。方差分析表明因素 B, C 有显著性影响, A 因素则无显著性影响,最佳工艺条件为 A₁B₃C₃。对于 A₂B₂C₃ 和 A₁B₃C₃, 因素 A 无显著影响,提取数均为 3 次,故主要取决于因素 B。

2.3.4 验证试验 选择 3 个工艺组合 A₁B₃C₃, A₁B₂C₃ 和 A₂B₂C₃, 对于提取数为 3 次的工艺,采用合并前 2 次提取液并定容至 1 L 量瓶中,第 3 次单独定容至 500 mL,分别进行含量测定($n = 3$),见表 5, 6。结果显示每组试验 3 批样品的指标成分含量测定结果无明显差异,独立样本 t 检验结果表明 A₁B₃C₃ 与 A₁B₂C₃ 无统计学差异,故选择提取时间较短的 A₁B₂C₃; A₁B₂C₃ 与 A₂B₂C₃ 比较有统计学差异,选择综合评分较高的 A₂B₂C₃; 比较 A₂B₂C₃ 与

表 3 参连方水提工艺优选的正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis for water extraction process of Shenlian formula

No.	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次	D(空白)	芍药苷/mg·g ⁻¹	甘草苷/mg·g ⁻¹	甘草酸/mg·g ⁻¹	综合评分	出膏率/%
1	8	1.0	1	1	17.56	6.22	5.76	29.54	24.25
2	8	1.5	2	2	20.35	10.63	5.85	36.83	32.67
3	8	2.0	3	3	20.86	14.59	8.44	43.89	38.30
4	10	1.0	2	3	21.31	7.50	4.89	33.70	32.44
5	10	1.5	3	1	21.35	15.55	7.46	44.36	37.43
6	10	2.0	1	2	16.34	8.80	4.49	29.63	26.72
7	12	1.0	3	2	20.71	11.49	6.70	38.90	36.91
8	12	1.5	1	3	15.57	7.00	3.25	25.82	26.86
9	12	2.0	2	1	25.75	12.09	6.11	43.95	37.83

表 4 综合评分的方差分析

Table 4 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	2.25	1.25	0.15	>0.05
B	81.92	40.96	5.42	<0.05
C	624.45	312.22	41.33	<0.01
D(误差)	83.1	7.55		

注: $F_{0.05}(2,11) = 3.98, F_{0.01}(2,11) = 7.20$ 。

表 5 水提工艺的验证试验

Table 5 Verification test of water extraction process

组别	芍药苷/mg·g ⁻¹	甘草苷/mg·g ⁻¹	甘草酸/mg·g ⁻¹	综合评分
A ₁ B ₃ C ₃	19.30	13.45	13.02	45.77
A ₁ B ₂ C ₃	21.06	12.56	11.70	45.32
A ₂ B ₂ C ₃	22.88	15.17	13.54	51.59
A ₁ B ₃ C ₂	17.89	11.40	10.36	39.65
A ₁ B ₂ C ₂	19.41	10.30	9.32	39.03
A ₂ B ₂ C ₂	21.65	13.05	11.15	45.85

表 6 验证试验的数据分析

Table 6 Variance analysis of verification test

组别	MS	SS	均值的标准误差	均值差值的 95% 置信区间		F	P
				上限	下限		
A ₁ B ₃ C ₃ -A ₁ B ₂ C ₃	-4.25	2.07	1.69	1.24	5.16	0.27	0.802 4
A ₁ B ₃ C ₃ -A ₂ B ₂ C ₃	-9.75	1.73	1.41	1.04	1.73	-4.13	0.014 5
A ₁ B ₂ C ₃ -A ₂ B ₂ C ₃	-6.28	2.24	1.83	1.34	6.43	-3.44	0.026 3
A ₁ B ₃ C ₃ -A ₁ B ₃ C ₂	6.11	1.30	1.06	0.78	3.74	5.75	0.004 5
A ₁ B ₂ C ₃ -A ₁ B ₂ C ₂	5.17	2.35	1.92	1.41	6.74	3.28	0.030 6
A ₂ B ₂ C ₃ -A ₂ B ₂ C ₂	6.28	1.69	1.38	1.41	4.85	4.43	0.011 4

注: $F_{0.05}(4,4) = 2.776$ 。

味,用于治疗冠心病属室性期前收缩导致的心律失常。因中药复方组成复杂,药效作用物质基础不明确,实验中以大鼠心肌缺血再灌注试验对工艺路线进行初步考察,使优选的工艺更加科学、合理。结合

A₂B₂C₂,二者有统计学差异,故选择煎煮 3 次。综合考虑,最终确定水提工艺组合为 A₂B₂C₃,第 1 次加入 10 倍量水提取 1.5 h,第 2 次和第 3 次加入 8 倍量水提取 1.5 h(由于药材会吸水,所以后 2 次均只加了 8 倍量水)。

3 讨论

参连方以党参、丹参、黄连、赤芍、白芍为主要药

工业生产的可行性和成本考虑,设计了正交试验对提取工艺的参数进行优化,确定了参连颗粒的最佳提取工艺。

由于临床应用形式为汤剂,故实验设计工艺 I

(全方水提);为减小出膏率,使有效成分得到富集,设计工艺Ⅱ(全方水提醇沉);党参、白芍、赤芍、甘草等饮片的主要药效成分在水中溶解度较大,丹参等饮片的药效成分在乙醇中溶解度较大^[7-10],设计了工艺Ⅳ(党参等水提,丹参等醇提);为减小水提部分出膏率,将水提部分进行醇沉,设计了工艺Ⅲ(党参等水提醇沉,丹参等醇提)。

方中党参为君药,但其有效成分党参炔苷含量较低,不易测定,故选择臣药白芍和赤芍中有效成分芍药苷作为含量测定的指标成分;处方中甘草用量较大,且甘草功效为补脾和胃、益气复脉,主要治疗心动悸、脉结代,现代研究表明甘草中甘草酸、甘草苷为其抗心律失常的有效物质基础^[11-12],故选择甘草苷和甘草酸作为指标成分。水提组的出膏率较大,接近 40%,提示水提液含糖类等较难干燥成分较多,为避免长时间干燥对指标成分含量测定的影响,实验中将提取液浓缩至相对密度 1.20(50℃)后,定容至 1 L 并进行测定含量。

多指标综合评分法是评价中药复方的重要方法,指标成分的权重加和对实验结果具有较大影响,应尽量减少人为赋予权重对测定结果的影响,本实验因各成分含量数值在同一数量级,故采取直接相加进行评分。虽然正交试验筛选结果均为提取 3 次,结合实际生产提取的便捷性,在不影响药效成分含量的前提下,应尽可能地减少提取次数,故验证试验对提取 3 次和 2 次进行了比较。结果表明提取 2 次和 3 次指标成分含量差异较大,最终选择提取 3 次^[13]。

[参考文献]

[1] 郭文达. 益气复脉方治疗室性期前收缩的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.

[2] 李昊娟. 益气复脉合剂治疗室性期前收缩作用机制的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013.

[3] 冯佩佩,李忠祥,原忠. 党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(4):307-311.

[4] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒,2012,9(2):100-103.

[5] 刘建群,王卓,徐金娣,等. 甘草干预雷公藤内酯酮的代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(19):70-75.

[6] 周晶,李玲,王冰,等. 正交试验优选平唐复方的醇提工艺和水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(22):26-30.

[7] 张雅君,梁忠岩,张丽霞. 党参粗多糖的组成及其免疫活性研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(7):199-208.

[8] 袁秀泽,邹盛勤,王晓刚,等. 白芍总苷在佐剂性关节炎大鼠与正常大鼠体内的药动学差异[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(20):86-89.

[9] 饶梦琳,唐蜜,何锦悦,等. 芍药苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑血流量及 PGI-2/TXA-2 平衡的影响[J]. 药学学报,2014,49(1):55-60.

[10] 彭九嫚,柴尧,潘旻,等. 丹参中酚酸类成分在不同工艺条件下转化关系[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):67-70.

[11] 郭慧,姚成增,王龙,等. 近 10 年心律失常用药规律分析[J]. 山东中医药大学学报,2016,40(4):304-307.

[12] 张明发,沈雅琴. 甘草酸类和甘草黄酮类化合物对心脏保护作用的研究进展[J]. 现代药物与临床,2012,27(4):429-434.

[13] 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.

[责任编辑 刘德文]