

正交试验法优选熄风通脑胶囊提取工艺

曾聪彦*, 梅全喜, 钟希文, 彭伟文

(广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400)

[摘要] **目的:** 优选熄风通脑胶囊的提取工艺。**方法:** 以芍药苷提取量和浸膏得率为指标, 选取加水量、浸泡时间、提取时间和提取次数为考察因素, 采用正交试验法优选熄风通脑胶囊中赤芍等 10 味饮片的水提取工艺; 以浸膏得率为指标, 选取乙醇体积分数、乙醇用量、浸泡时间、回流时间为考察因素, 采用正交试验法优选熄风通脑胶囊中三七的醇提取工艺。**结果:** 最佳水提工艺为加 10 倍量水浸泡 0.5 h 煎煮 2 次, 每次 1.5 h; 最佳醇提工艺为加 6 倍量 70% 乙醇浸泡 0.5 h, 回流提取 3 次, 提取时间分别为 1.5, 1, 1 h。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 可推广于大生产应用。

[关键词] 熄风通脑胶囊; 正交试验; 提取工艺; 芍药苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0028-04

[doi] 10.11653/syfy2013130028

Optimization of Extraction Process for Xifeng Tongnao Capsules by Orthogonal Test

ZENG Cong-yan*, MEI Quan-xi, ZHONG Xi-wen, PENG Wei-wen

(Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Guangzhou University
of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Xifeng Tongnao capsules. **Method:** With the content of paeoniflorin and yield of extract as indexes, the amount of water, soaking time, extraction time and extraction times were chosen as factors, orthogonal design was used to optimize water extraction process of Radix Paeoniae Rubra and nine other Chinese herbal pieces from Xifeng Tongnao capsules; With yield of extract as index, the amount and concentration of ethanol, soaking time and reflux extraction time were selected as factors, orthogonal design was used to optimize alcohol extraction process of Radix Et Rhizoma Notoginseng from Xifeng Tongnao capsules. **Result:** Optimum water extraction technology was as following: soaked 0.5 h with 10 times the amount of water, extracted 2 times, 1.5 hours per time; Optimum alcohol extraction process was as following: soaked 0.5 h with 6-fold of 70% ethanol, reflux extracted 3 times with extraction time of 1.5, 1, 1 h. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and reliable, it could be extended to large-scale

[收稿日期] 20130130(026)

[基金项目] 广东省中山市科技计划项目(20122A010)

[通讯作者] * 曾聪彦, 教授, 主任中药师, 硕士生导师, 从事医院中药新制剂研究与开发, Tel: 0760-89980213, E-mail: zszcy@126.com

- [8] 唐岚, 刘力, 徐德生. 参附青冻干粉针成型工艺研究 [J]. 中成药, 2005, 27(5): 512.
- [9] 谭涛, 刘景俊. 如何减少冻干粉针制品中的萎缩不良品 [J]. 齐鲁药事, 2005, 24(8): 489.
- [10] 刘嘉, 刘汉清. 冻干技术及其在中药冻干制剂中应用的研究进展 [J]. 中国医药技术经济与管理, 2007, 1(5): 35.
- [11] 萧伟, 范庆林, 凌娅, 等. 活血通络粉针中桃仁与赤芍共煎的正交实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 677.
- [12] 李中娥, 王春颖. HPLC 同时测定妇康片中芍药苷和阿魏酸的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 143.

[责任编辑 全燕]

production application of Xifeng Tongnao capsules.

[Key words] Xifeng Tongnao capsules; orthogonal test; extraction technology; paeoniflorin

熄风通脑胶囊是在我院临床使用多年的有效经验方基础上研制成的医院制剂(粤药制字Z20110102),由赤芍、石决明、钩藤、夏枯草、珍珠母、三七、胆南星等11味中药组成,具有熄风通脑、祛痰开窍、活血化痰之功效,主要用于治疗脑梗死急性期所致的肢体偏瘫、口角歪斜、语言謇涩。根据方中药材的性质及医院中药制剂生产的特点,配制工艺采用“原方水提取与乙醇提取相结合-浓缩-过筛制粒-填充胶囊成型”设计,其中三七采用乙醇提取,剩余10味药则采用水提醇沉法。本实验以芍药苷和浸膏得率为指标,采用正交试验法优选熄风通脑胶囊的提取工艺,以确定最佳提取工艺,为扩大生产提供依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),BS-224S 型电子天平(德国赛多利斯),东方-A型直热式电热恒温干燥箱(广州东方电热干燥设备厂)。芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号110736-200424),赤芍、石决明、钩藤、夏枯草等药材(均购于广东广弘药材有限公司,经广州中医药大学附属中山中医院梅全喜教授鉴定,均符合《中国药典》2010年版各药材项下规定),乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品制备 取除三七外其余药材的1/10处方量(20.5 g),加适量水浸泡,提取,浓缩,过滤,滤液浓缩至100 mL,作供试样品备用。

2.2 干浸膏得率的测定 精密吸取上述样品溶液25 mL置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴蒸干后,于105℃烘3 h,移置干燥器中,冷却30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。

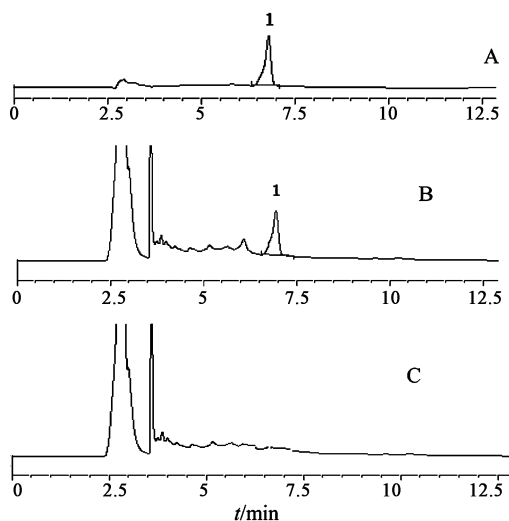
2.3 芍药苷含量测定

2.3.1 供试品溶液的制备 取样品溶液0.5 g,置蒸发皿中水浴蒸干,加甲醇约5 mL,超声处理(150 W,20 kHz)5 min使溶解,用甲醇洗净蒸发皿并定容至10 mL量瓶中,摇匀,滤过,取滤液,即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成50 mg·L⁻¹的溶液,摇匀,即得。

2.3.3 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82),检测波长230 nm,流速1.0 mL·

min⁻¹,进样量20 μL,柱温30℃,见图1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性溶液;1. 芍药苷

图1 熄风通脑胶囊 HPLC

2.3.4 线性关系考察 精密称取芍药苷对照品8.6 mg,加甲醇适量溶解并定容至20 mL。精密吸取上述溶液5 mL,依次用甲醇稀释成质量浓度为0.412 8, 0.206 4, 0.103 2, 0.051 6, 0.025 8, 0.012 9 g·L⁻¹的系列对照品溶液,进样量20 μL,以峰面积积分为纵坐标,芍药苷对照品质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 13\,541 X + 5.292$ ($r = 0.999\,9$),表明芍药苷在0.012 9~0.412 8 g·L⁻¹呈良好线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密量取同一对照品溶液20 μL,重复进样5次,按2.3.3色谱条件测定,结果芍药苷峰面积的RSD 1.02%,表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后0,1,2,4,8,24 h进样20 μL,按2.3.3色谱条件测定,结果芍药苷峰面积的RSD 1.60%,表明供试品溶液放置24 h内较稳定。

2.3.7 加样回收率试验 取已知含量的同一批样品6份,分别准确加入芍药苷对照品溶液0.5 mL,按2.3.1项下方法制备供试品溶液,精密吸取20 μL进样,按2.3.3色谱条件测定,结果平均回收率99.01%,RSD 1.57%。

2.4 水提工艺优选 选取浸泡时间、加水量、提取次数、提取时间为考察因素,每个因素选取3个水平,选用L₉(3⁴)正交表安排试验,以芍药苷提取量和浸膏得率为考察指标,因素水平见表1,试验安排

与结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 熄风通脑胶囊水提工艺正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间 /h	B 加水量 /倍	C 提取数 /次	D 提取时间 /h
1	0.5	8	1	1.0
2	1.0	10	2	1.5
3	1.5	12	3	2.0

表 2 熄风通脑胶囊水提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	浸膏 得率 /%	芍药苷 提取量 /mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	16.128	0.323
2	1	2	2	2	27.439	0.542
3	1	3	3	3	28.049	0.589
4	2	1	2	3	26.779	0.502
5	2	2	3	1	27.542	0.560
6	2	3	1	2	17.831	0.364
7	3	1	3	2	29.554	0.615
8	3	2	1	3	20.354	0.381
9	3	3	2	1	23.346	0.462
浸膏得率	K_1	23.872	24.154	18.104	22.339	
	K_2	24.051	25.112	25.855	24.941	
	K_3	24.418	23.075	28.382	25.061	
	R	0.546	2.037	10.278	2.722	
芍药苷	K_1	0.485	0.480	0.356	0.448	
	K_2	0.475	0.494	0.502	0.507	
	K_3	0.486	0.472	0.588	0.491	
	R	0.011	0.022	0.232	0.059	

表 3 芍药苷提取量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	2.03×10^{-4}	2	1.01×10^{-4}	1.00	
B	7.89×10^{-4}	2	3.94×10^{-4}	3.89	>0.05
C	8.25×10^{-2}	2	4.13×10^{-2}	407.25	<0.01
D	5.50×10^{-3}	2	2.75×10^{-3}	27.14	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ (表 4, 7 同)。

由直观分析可知, 各因素对水提取工艺的影响顺序为 $C > D > B > A$ 。以极值最小的 A 因素为误差项进行方差分析, 结果 C 因素具有极显著性差异, D 因素具有显著性差异, B 因素则无显著差异, 结合生产成本考虑, 确定最佳水提工艺为 $A_1B_2C_2D_2$, 即加 10 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 2 次, 每次 1.5 h。

2.5 验证试验 按 1/10 处方量称取除三七外其余药材 2 份, 按优选的工艺条件进行水提取, 浓缩, 过

滤, 定容, 测得干浸膏得率分别为 29.017%, 28.573%; 芍药苷提取量分别为 0.592, 0.608 g·L⁻¹, 说明优选的提取工艺条件稳定、可行。

2.6 醇提工艺优选

2.6.1 因素确定 选择浸泡时间、乙醇用量、乙醇体积分数、回流时间为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 取浸膏得率为考察指标, 因素水平见表 4。

表 4 熄风通脑胶囊醇提工艺试验因素水平

水平	A 浸泡时间 /h	B 乙醇用量 /倍	C 回流时间 /h	D 乙醇体积 分数/%
1	0.5	6	0.5, 0.5, 0.5	60
2	1.0	8	1, 1, 1	70
3	1.5	10	1.5, 1, 1	80

2.6.2 浸膏得率的测定 按 1/10 处方量准确称取三七共 18 份(每次试验平行 2 次), 加乙醇回流提取, 过滤, 滤液浓缩并定容至 250 mL, 备用。精密吸取上述溶液 25 mL 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 移置干燥器中, 冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算浸膏得率, 试验安排及结果见表 5, 方差分析见表 6。

表 5 熄风通脑胶囊醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	浸膏得率 /%
1	1	1	1	1	7.667
2	1	2	2	2	8.951
3	1	3	3	3	10.371
4	2	1	2	3	9.898
5	2	2	3	1	10.247
6	2	3	1	2	9.393
7	3	1	3	2	10.611
8	3	2	1	3	6.605
9	3	3	2	1	9.871
K_1	8.996	9.392	7.888	9.262	
K_2	9.846	8.601	9.573	9.652	
K_3	9.029	9.878	10.410	8.958	
R	0.850	1.277	2.521	0.694	

表 6 熄风通脑胶囊醇提工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	2.784	2	1.392	1.92	>0.05
B	4.987	2	2.493	3.43	>0.05
C	19.792	2	9.896	13.63	>0.05
D(误差)	1.452	2	0.726	1	

由直观分析可知,各因素对醇提工艺的影响顺序为 $C > B > A > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果 A, B, C 因素各水平间均无显著性差异,故确定最佳醇提工艺 $A_1 B_1 C_3 D_2$,即加 6 倍量 70% 乙醇浸泡 0.5 h,回流提取 3 次,分别为 1.5, 1, 1 h。

2.6.3 验证试验 按 1/10 处方量称取三七药材 2 份,按优选的工艺条件进行乙醇回流提取,过滤,浓缩,定容,测得浸膏得率分别为 12.63%, 12.51%, 说明优选的醇提工艺条件基本稳定。

3 讨论

熄风通脑胶囊是在汤剂基础上改制而成,根据处方中药效成分理化性质的不同,有针对性地将提取工艺分为醇提和水提,以使药材中有效成分提取完全,更好地发挥药效。

在水提工艺优选中,由于药材众多,曾尝试选取钩藤中钩藤碱作为考察指标,经多次调整流动相,发现样品中钩藤碱主峰与其他成分峰分离效果差;采用赤芍中芍药苷作为考察指标时,曾尝试采用《中国药典》2010 年版一部中赤芍含量测定项下^[1]的色谱条件,以甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(40:60)为流动相,结果样品中芍药苷峰与杂质峰不能有效分离,将流动相改为乙腈-0.1% 磷酸溶液^[2-5],并不断调整比例,结果发现本实验选择的比例最好,芍药苷峰与杂质峰分离良好。现代药理研究表明,芍药苷对脑缺血后脑水肿、血脑屏障、大脑局部血流量均具有保护作用,可明显减轻脑水肿程度,降低脑梗塞范围,改善神经行为学症状、血脑屏障通透性,增加大脑局部血流量^[6-7]。这些与熄风通脑胶囊具有熄风通脑、祛痰开窍、活血化瘀作用,可用于脑梗塞的功能主治相同,故选择芍药苷为考察指标^[8]。

三七主要含皂苷、黄酮类、部分多糖等成分^[9],无论是从功效还是从主要成分性质分析,均适宜采

用乙醇提取。因三七活性成分众多,单选某一成分作为考察指标均不全面,故选择浸膏得率作为评价指标^[10-11]。

[参考文献]

- [1] 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,2010:147.
- [2] 王进. HPLC 法测定参苓益炎净合剂中芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(9):24.
- [3] 周卿,兑丹华,代广会,等. RP-HPLC 法同时测定清胰汤颗粒中栀子苷、芍药苷的含量[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(3):268.
- [4] 欧国灯,赖珊,霍永昌. HPLC 法测定吐泻肚痛胶囊中芍药苷的含量[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(3):225.
- [5] 张雷,王明星,张玉东. 高效液相色谱法测定胃健灵胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(4):22.
- [6] 葛志伟,贺庆,水文波,等. HPLC 测定双丹颗粒中丹酚酸 B 和芍药苷的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1062.
- [7] 胡南,许惠玉,陈志伟,等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2007,28(9):1093.
- [8] 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.
- [9] 陈浩,夏伦祝. 正交试验优选通脑精胶囊的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(5):30.
- [10] 鲍建才,刘刚,丛登立,等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药,2006,28(2):246.
- [11] 覃伟,罗艳蓉,赵春景,等. 复感康颗粒提取工艺研究[J]. 中国药业,2006,15(4):23.
- [12] 张素芳,程怡,麦艳珍,等. 正交试验法优选大连翘胶囊提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):41.

[责任编辑 全燕]