

正交试验法优选萸丹胶囊的水提工艺

陈威¹, 侯伟源², 刘坚初², 叶炳皇¹, 贺倩¹, 张军^{1*}, 林吉¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 中山黄圃人民医院, 广东 中山 528429)

[摘要] 目的: 优选萸丹胶囊的水提工艺。方法: 以马钱苷、丹酚酸 B、绿原酸的综合保留率为评价指标, 单因素试验考察提取次数; 选取加水量、浸泡时间及煎煮时间为考察因素, 采用正交试验设计优选萸丹胶囊的水提工艺。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 1 h, 过滤, 滤渣加 6 倍量水煎煮 1 h。结论: 该优选工艺稳定、合理, 可为萸丹胶囊的生产提供实验依据。

[关键词] 萸丹胶囊; 正交设计; 马钱苷; 丹酚酸 B; 绿原酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0028-03

Optimization of Water Extraction Technology of Yudan Capsule by Orthogonal Test

CHEN Wei¹, HOU Wei-yuan², LIU Jian-chu², YE Bing-huang¹, HE Qian¹, ZHANG Jun^{1*}, LIN Ji¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2 Huangpu People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528429, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize water extraction technology of Yudan capsule. **Method:** With comprehensive retention rate of loganin, salvianolic acid B and chlorogenic acid as index, extraction times was optimized by single factor test; the amount of water, soaking time and boiling time were chosen as factors, water extraction technology of Yudan capsule was optimized by orthogonal design. **Result:** Optimal extraction technology was as follows: soaked 0.5 h with 8 times the amount of water, decocted for 1 h, filtered, residues added 6 folds the amount of water and decocted for 1 h. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and reasonable, which provided experimental basis for production of Yudan capsule.

[Key words] Yudan capsule; orthogonal design; loganin; salvianolic acid B; chlorogenic acid

萸丹胶囊为中山黄圃人民医院院内制剂, 由山茱萸、丹参、茵陈、罗布麻叶等组成, 具有补益肝肾、清热活血等功效, 临床用于辅助治疗肝肾阴虚、血热瘀阻症型高血压。本方中主药山茱萸为收敛性强壮药, 具有补肝肾、止汗^[1]、抗休克、强心及抗心率失常的作用^[2-3], 主要含有没食子酸、山茱萸苷、多糖

类等有效成分^[4]。丹参中水溶性成分具有抗氧化、抗血栓、抗心脑血管缺血、增强免疫力等药理活性, 常用于治疗冠心病及缺血性脑血管病^[5]; 其主要为酚酸类, 其中丹酚酸 B 约 70%^[6]。茵陈具有保肝利胆、抗病原微生物、镇痛消炎等活性^[7]。罗布麻叶能平肝安神, 对人体心血管系统、神经系统等均有药理作用^[8]。目前有关萸丹胶囊提取工艺和含量测定的研究未见报道, 本试验以山茱萸中马钱苷、丹参中丹酚酸 B、茵陈与罗布麻叶中绿原酸的综合保留率为指标, 采用 HPLC 建立其含量测定方法, 单因素考察结合正交试验优选萸丹胶囊的水提工艺, 为萸丹胶囊的制剂研究奠定基础。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),

[收稿日期] 20120611(017)

[基金项目] 广东省产学研项目(KCF209112K05); 广东省国际合作项目(2011B050300021)

[第一作者] 陈威, 硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel: 15018419003, E-mail: chenwei2009.good@163.com

[通讯作者] * 张军, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事复方中药新药开发研究, Tel: 020-39358519, E-mail: zhjxsh@yahoo.com.cn

CP225D型1/万分析天平、AB204-N型1/10万分析天平(Mettler Toledo),马钱苷、丹酚酸B对照品(批号分别为110602,110305,上海融禾医药科技发展有限公司),绿原酸对照品(批号110753-200413,中国药品生物制品检定所),甲醇为色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸进行梯度洗脱(0~28 min, 15%~28% A; 28~48 min, 28% A; 48~65 min, 28%~55% A; 65~70 min, 55%~15% A; 70~75 min, 15% A),马钱苷、丹酚酸B检测波长240 nm,绿原酸检测波长327 nm,流速1.0 mL·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取马钱苷对照品5.46 mg置10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度;丹酚酸B对照品5.01 mg置10 mL量瓶中,加70%甲醇溶解并定容至刻度;绿原酸对照品10.63 mg置50 mL量瓶中,加75%甲醇至刻度,摇匀。即得质量浓度分别为0.546, 0.501, 0.212 6 g·L⁻¹的马钱苷、丹酚酸B、绿原酸对照品溶液。分别精密量取马钱苷、丹酚酸B、绿原酸对照品溶液0.5, 2.0, 1.3 mL,置25 mL量瓶中,加75%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

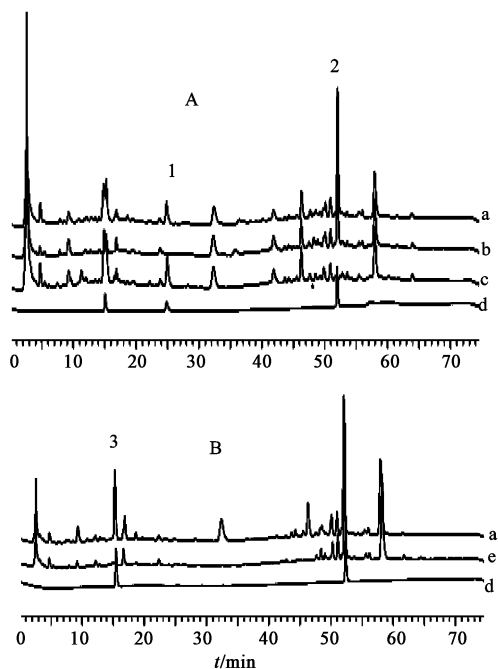
2.1.3 供试品溶液的制备 按处方量称取全方药材,86 g,加10倍量水煎煮3次,每次1.5 h。合并煎液,摇匀,测定体积。精密量取提取液5 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方剂量称取除山茱萸外的全方药材、除丹参外的全方药材、除茵陈和罗布麻叶外的全方药材,分别按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.1.5 专属性考察 取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μL,注入高效液相色谱仪中。结果显示,马钱苷、丹酚酸B、绿原酸3个指标成分分离度良好,且各缺样对照溶液无干扰,表明色谱分析条件可行。见图1。

2.1.6 标准曲线的绘制 分别精密吸取上述混合对照品溶液2, 4, 8, 10, 16, 20 μL注入高效液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得马钱苷回归方程 $Y = 1.50 \times 10^6 X - 53.05$ ($r = 1.0000$),马钱苷在0.021 8~0.218 4 μg呈良好线性关系;丹酚酸B回归方程 $Y = 1.10 \times 10^6 X + 4367$ ($r = 0.9999$),丹酚酸B在0.080 2~0.801 6 μg呈

良好线性关系;绿原酸回归方程 $Y = 3.12 \times 10^6 X - 27.79$ ($r = 1.0000$),绿原酸在0.022 1~0.221 1 μg呈良好线性关系。



A. 240 nm; B. 327 nm

a. 样品; b. 缺山茱萸阴性样品; c. 缺丹参阴性样品;
d. 对照品; e. 缺茵陈和罗布麻叶双阴性样品;
1. 马钱苷; 2. 丹酚酸B; 3. 绿原酸

图1 茵丹胶囊 HPLC

2.2 提取工艺考察

2.2.1 提取次数考察 按处方剂量称取全方药材,加水浸泡30 min,煎煮3次,每次1.5 h,加水量分别为12, 10, 10倍。分别滤过,测定其分次提取的得膏率及指标成分综合保留率。结果第3次的得膏率和综合保留率为第1, 2次的15%以下,故确定提取2次为宜。

2.2.2 正交试验优选 在确定煎煮次数为2次的基础上,根据预试验结果,选取加水量、浸泡时间和煎煮时间为考察因素,其因素水平见表1。按处方比例称取全方药材,共9份,按L₉(3⁴)正交表安排试验,提取液放冷,滤过,测定体积。按供试品溶液制备方法制备供试品,测定并计算综合保留率,正交试验安排及结果见表2,方差分析见表3。

由表2可知,各因素对综合保留率影响程度依次为B>C>A。由方差分析可知,B因素对试验结果影响最大,C,A因素对综合保留率影响较小。综合考虑指标成分保留率和临床汤剂经验,最终确定提取条件为A₁B₃C₂,即加8倍量水浸泡0.5 h,煎煮1 h,过滤,滤渣加6倍量水煎煮1 h。

表 1 黄丹胶囊水提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A	B	C
	加水量/倍	浸泡时间/min	煎煮时间/h
1	8,6	0	0.5
2	10,8	15	1.0
3	12,10	30	1.5

表 2 黄丹胶囊水提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	保留率/%			
					马钱苷	丹酚酸 B	绿原酸	综合
1	1	1	1	1	88.23	60.74	51.57	66.85
2	1	2	2	2	83.7	79.08	49.47	70.75
3	1	3	3	3	83.73	69.66	61.23	71.54
4	2	1	2	3	84.98	69.85	43.08	65.97
5	2	2	3	1	84.72	68.84	41.24	64.93
6	2	3	1	2	94.42	87.04	57.73	79.73
7	3	1	3	2	93.79	69.09	42.59	68.49
8	3	2	1	3	84.52	74.31	47.12	68.65
9	3	3	2	1	89.65	69.59	57.43	72.22
K_1	69.12	67.10	71.48	68.29				
K_2	69.97	67.81	69.19	72				
K_3	70.06	74.23	68.48	68.86				
R	0.94	7.13	3.00	3.71				

注:综合保留率 = (马钱苷保留率 + 丹酚酸 B 保留率 + 绿原酸保留率) / 3。

表 3 综合保留率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1.5997	2	0.067	>0.05
B	92.557	2	3.867	>0.05
C	14.762	2	0.617	>0.05
D(误差)	23.94	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.3 验证试验 称取处方量的各味药材,按最佳提取工艺重复提取 3 批,测得马钱苷、丹酚酸 B 和绿原酸的综合保留率分别为 68.74%、68.30%、66.69%,说明优选工艺稳定可行。

3 讨论

影响汤剂保留率最主要的因素是提取次数,沈群^[9]认为提取次数加在正交表中是不合理的,故先进行提取次数的单因素考察,确定提取次数后再进行正交试验考察其他因素。

中药复方的功能主治是多成分、多靶点、多途径综合作用的结果,单一的指标成分很难证明工艺的科学合理性,贾英杰等^[10]认为中药复方应重视方中有效成分和有效组分的研究。方中山茱萸和丹参共为君药,罗布麻和茵陈为臣药,且马钱苷、丹酚酸 B 和绿原酸均与黄丹胶囊功能主治一致,故选用山茱萸中马钱苷、丹参中丹酚酸 B 及罗布麻和茵陈中绿原酸为指标成分,以综合保留率优选提取工艺。

[参考文献]

- [1] 王俊霞,武晓红,李昌勤,等. 山茱萸提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):74.
- [2] 李雅梅,李华,李春荣. 山茱萸化学成分及其药理作用研究进展[J]. 武警医学院学报,2010,19(6):500.
- [3] 曹岗,张云,丛晓东,等. 中药山茱萸化学成分和药理学研究进展[J]. 中国药学,2009,18(3):208.
- [4] 诸明娜,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 测定山茱萸不同炮制品中 5-羟甲基糠醛和没食子酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):64.
- [5] 窦昊,李薇. 丹参药理作用的研究[J]. 中国中医药资讯,2011,3(1):197.
- [6] 魏冬青,陈绍民,苗建武,等. 丹参总酚酸大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):42.
- [7] 贾照志. 茵陈蒿的化学成分药理作用及临床应用进展[J]. 牡丹江医学院学报,2010,31(3):87.
- [8] 李庆华. 罗布麻叶药理作用及临床应用研究进展[J]. 中成药,2008,31(5):784.
- [9] 沈群. 中药研究中的正交设计问题[J]. 数理医药学杂志,2011,24(1):19.
- [10] 贾英杰,李小江,张丽丽,等. 中药复方的拆方研究进展[J]. 实用中医杂志,2011,27(8):578.

[责任编辑 全燕]