

结合药效学指标正交优选复方止呕颗粒提取工艺

冯果¹, 刘文¹, 张永萍¹, 马雯雯², 冯泳^{1*}

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 中国人民解放军第一医院药剂科, 兰州 730030)

[摘要] 目的: 筛选复方止呕颗粒的最佳提取工艺条件。方法: 采用正交设计法和药效学实验, 以有效成分 6-姜酚和止呕效果作为评价指标, 对复方止呕颗粒最佳提取工艺条件进行优选。结果: 最佳提取工艺条件为加 9 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。最佳提取工艺条件验证结果满意。结论: 用正交设计法结合药效学指标优选复方止呕颗粒提取工艺条件, 具有药物有效成分与功能主治密切结合的特点, 优选出的最佳提取工艺稳定、可行、重复性好。

[关键词] 复方止呕颗粒; 正交设计; 药效学指标; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0032-03

Optimizing Extraction Process of Fufang Zhiou Granules by Orthogonal Test with Pharmacodynamic Index

FENG Guo¹, LIU Wen¹, ZHUANG Yong-ping¹, MA Wen-wen², FENG Yong^{1*}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Department of Pharmacy, First Hospital of People's Liberation Army, Lanzhou 730030, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process conditions of Fufang Zhiou Granules. **Method:** Optimized extraction process conditions of Fufang Zhiou granule by orthogonal design and pharmacodynamics test, 6-gingerol and vomiting results as evaluated indexes. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extracted three times with 9 times the amount of water for 1 h every time. Optimum extraction conditions were verified with satisfactory results. **Conclusion:** Optimized the extraction conditions by orthogonal design and pharmacodynamic test with the characteristics of active ingredients and indications combined closely. The optimized extraction process was stable, reliable, reproducible.

[Key words] Fufang Zhiou granules; orthogonal design; pharmacodynamic index; extraction process

复方止呕颗粒的处方来源于东汉名医张仲景《金匱要略》中的小半夏加茯苓汤, 是千百年来临床治疗呕吐的经典方, 全方由半夏、生姜、茯苓组成, 具有散饮降逆、和胃止呕的功效^[1]。本实验采用正交设计法结合药效学指标优选复方止呕颗粒最佳提取

工艺条件, 为复方止呕颗粒的研制奠定基础。

1 仪器与试剂

AUY 220 型电子天平(日本岛津), LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-20A 型检测器(日本岛津), JA2003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

半夏购于贵州省赫章县半夏 GAP 种植基地, 茯苓购于贵州森泰实业有限公司, 生姜为市售。经贵阳中医学院生药教研室王世清老师鉴定, 半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia temata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎, 茯苓为孔菌科真菌 *Poria cocos* (Schw.) wolf 的干燥菌核, 均符合 2010 年版《中国药典》一部要求。6-姜酚对照品(天津马克生物技术

[收稿日期] 20110321(006)

[基金项目] 贵州省中药现代化专项(黔科合社字[2008]5025号)

[第一作者] 冯果, 讲师, 硕士, 从事中药新制剂研究, Tel: 15608513563, E-mail: 453989352@qq.com

[通讯作者] *冯泳, 教授, 硕士, 从事中药复方配伍研究, Tel: 0851-5652834, E-mail: fy668@sina.com

有限公司提供,批号 20081015,纯度为 98.57%)。甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

家鸽购于贵阳市场,清洁级昆明种小鼠购自贵阳医学院医学实验动物中心(合格证号 0200372)。

2 方法与结果

2.1 6-姜酚的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilenttc-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(65:35), 柱温 30 ℃, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 280 nm。

2.1.2 对照品溶液的配制 取 6-姜酚对照品 11.350 mg 置于 50 mL 的量瓶中, 加入甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得对照品溶液。

2.1.3 样品溶液的配制 称取复方止呕颗粒剂 1 g, 精密称定, 精密加入水 25 mL, 加热回流提取 0.5 h, 放冷, 补足失重, 放冷, 过滤, 取续滤液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得样品溶液。

2.1.4 线性关系的考察 精密吸取 6-姜酚对照品溶液 0.5 mL, 加甲醇定容至 10 mL, 精密吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL 加甲醇定容至 1 mL, 配成分别为 0.0113 5, 0.045 4, 0.090 8, 0.136 2, 0.181 6 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 分别吸取上述溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪测定峰面积, 以对照品进样量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 5\ 406\ 463X - 1\ 188$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明 6-姜酚在 0.113 5 ~ 2.270 0 μg 呈良好的线性关系。

2.1.5 稳定性试验 取复方止呕颗粒剂 1 g, 精密称定, 按 2.1.3 项下方法制备样品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定, 计算峰面积, RSD 1.32%。结果表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2 呕吐模型的建立及止呕药理试验 家鸽 100 只, 随机分成 10 组, 每组 10 只, 均先以 2% 硫酸铜溶液 140 mg·kg⁻¹ 灌胃, 硫酸铜灌胃后立即用供试样品液以 20 g·kg⁻¹ 灌胃^[2], 空白组以凉开水灌胃。以家鸽两翼稍抬, 头部向前, 上下伸脖, 吐食或不吐食, 继而抬头, 恢复平静记为一次呕吐。以家鸽 2 h 内的呕吐次数和呕吐潜伏期为指标, 并记录实验结果。

2.3 正交试验设计优选提取工艺

2.3.1 因素及水平的选择 影响煎煮法的主要因素有加水量、煎煮次数、煎煮时间, 试验选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 每个因素设定 3 个水平, 其因素水

平见表 1。

表 1 复方止呕颗粒提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 煎煮次数/次	C 时间/h
1	6	1	1.0
2	9	2	1.5
3	12	3	2.0

2.3.2 正交试验设计 按处方量称取样品, 共 9 份, 按 L₉(3⁴) 设计提取, 定容, 测定 6-姜酚含量。之后将各提取液浓缩成每毫升含 1 g 生药量的清膏, 冷藏, 作为止呕药理实验供试样品, 进行止呕实验, 记录呕吐次数和呕吐潜伏期试验结果(表 2)。

2.3.3 正交试验设计方案及结果分析 本试验将药效试验中的呕吐次数和呕吐潜伏期与 6-姜酚的质量分数相结合, 确定最佳的提取工艺条件, 由于评价指标较多, 故采用综合加权法进行评价。评价指标中呕吐次数和有效成分 6-姜酚的含量最为重要, 设为主要考察指标, 其加权评分各占 40%, 呕吐潜伏期影响较小, 占加权评分 20%, 综合评分 $Y =$ 各样品中呕吐潜伏期 ÷ 9 个样品中呕吐潜伏期最高值 × 20 + 9 个样品中呕吐次数最低值 ÷ 各样品中呕吐次数 × 40 + 各样品中 6-姜酚含量 ÷ 9 个样品中 6-姜酚含量最高值 × 40, 以综合评分值对实验结果进行直观分析和方差分析, 正交试验设计方案及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 直观分析表明, 以综合评分为标准, 由极差的大小可得, 在所选因素水平范围内, 影响因素 $B > C > A$, 最佳提取工艺条件为 A₂B₃C₃; 由表 3 方差分析表明, 只有煎煮次数(B)有显著性影响, 煎煮时间(C)和加水倍数(A)均无显著影响。为进一步确定最佳提取工艺, 对显著因素增加 B₃ 和 B₄(煎煮 4 次)的比较试验, 潜伏期分别为 42.25, 41.71 min; 呕吐次数分别为 8.88, 8.59 次; 6-姜酚质量分数分别为 2.135 5, 2.143 3 mg·g⁻¹。

结果表明, A₂B₃C₃ 与 A₂B₄C₃(煎煮 4 次) 综合评分(80.766, 79.080)相差无几, 为了节省时间和能源, 综合考虑以上因素, 确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₁, 即加 9 倍量的水, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.3 工艺验证试验 称取 20 倍处方量的药材 3 批, 按优选出的最佳提取工艺条件, 进行提取, 并进行相应的试验, 其试验结果见表 4。

表 2 复方止呕颗粒提取工艺正交试验

No.	A	B	C	D	呕吐潜伏期 /min	呕吐数/次	6-姜酚 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	1	1	1	1	19.00	11.00	1.279 5	41.343
2	1	2	2	2	23.75	5.75	1.954 8	67.185
3	1	3	3	3	17.00	4.00	2.390 9	84.529
4	2	1	2	3	22.13	7.00	1.843 2	59.891
5	2	2	3	1	66.75	5.25	2.313 0	88.628
6	2	3	1	2	32.63	6.75	2.425 1	73.480
7	3	1	3	2	19.13	8.00	1.917 1	57.353
8	3	2	1	3	48.25	8.25	2.114 1	68.722
9	3	3	2	1	24.63	5.13	2.367 1	77.612
K ₁	64.352	52.862	61.182	69.194				
K ₂	74.000	74.845	68.229	66.006				
K ₃	67.896	78.540	76.837	71.047				
R	9.648	25.678	15.655	5.041				

注:表 2 中的直观分析是对综合评分的数据处理。

表 3 方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	142.855	2	3.662	>0.05
B	1 156.253	2	29.637	<0.05
C	368.835	2	9.454	>0.05
D(误差)	39.014	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.000$ 。

表 4 复方止呕颗粒提取工艺验证 ($\bar{x}, n = 10$)

批号	潜伏期 /min	呕吐数 /次	6-姜酚 /mg·g ⁻¹	综合评分
100211	36.25	3.88	1.8355	89.859
100212	35.71	3.95	1.7749	87.908
100213	36.83	4.00	1.8870	89.874

结果表明,优选出的最佳提取工艺条件重复性好,工艺稳定可行。

3 讨论

试验采用正交设计法结合药效学指标优选复方

止呕颗粒提取工艺条件,选择 6-姜酚的含量和药效指标作为提取工艺条件优选的评价指标,充分体现了药物有效成分与功能主治密切结合的特点,且优选出的最佳提取工艺条件稳定,重复性好,方法可行。

正交试验设计的结果分析中采用了方差分析与综合加权法相结合,将各评价指标按其实际影响程度加权,从而确定最优的提取工艺条件,试验结果表明,该种设计方法科学、合理、可行。

[参考文献]

- [1] 冯泳,何前松,时京珍,等.小半夏加茯苓汤研究概况[J].江苏中医,2008,40(2):84.
- [2] 隋艳华,邱德文,李江,等.小半夏加茯苓汤止吐作用的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(3):26.

[责任编辑 全燕]