

正交设计优选复方当红注射液提取工艺

吕 鹏*

(天津市天津医院,天津 300211)

当红注射液是由当归和红花为主料制得的注射液,具有舒筋活血,通络止痛的作用,临床上主要用于治疗腰腿疼痛、腰间盘突出症等。本实验以当归中主要有效成分阿魏酸为质控指标,采用正交设计法考察加热回流时间、煎煮时间、醇沉浓度、加水量对提取工艺的影响,以优选最佳提取方案

1 仪器及药品

高效液相色谱仪: Waters 515泵,486紫外检测器,2021色谱工作站(美国);UV-760CRT型双光紫紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,0773-9506),所用试剂均为分析纯 当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 和红花 *Carthamus tinctorius* L. 药材均购于天津市中药饮片厂。

2 方法与结果^[1]

2.1 检测波长的选定: 配制阿魏酸甲醇溶液(10 μg/mL),在 200~ 400 nm 波长扫描,λ_{max}= 321 nm,作为检测波长

2.2 色谱条件: 色谱柱: Nova-Pak^R C₁₈ 柱(3.9 mm× 150 mm,4 μm),流动相: 甲醇-1% 冰醋酸(25: 75),流速: 1 mL/min,灵敏度: 0.1 AUFS,进样量: 20 μL,柱温: 室温。

2.3 线性关系考察: 精密称取阿魏酸对照品适量,以甲醇溶解定容至 25 mL容量瓶中,分别精密量取 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL置 10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下测定,以浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,进行回归计算,方程为 $C = 4.924 + 2.86 \times 10^{-5} A$, $r = 0.9997$ 表明阿魏酸在 10.12~ 60.72 μg/mL呈良好线性

2.4 提取工艺及优选: 按 5: 1取当归、红花粗粉(过 1号筛)适量,加蒸馏水,回流提取挥发油,过滤,药渣再经煎煮后,过滤,合并提取液,浓缩,并用乙醇沉淀除去杂质,回收乙醇 所得溶液用 0.1% 活性炭脱色处理,用 10% 碳酸钠调 pH 7~ 7.5,加入适量吐温-80,溶于适量注射用水,加入氯化钠使之溶解,用 G3垂熔漏斗过滤,灌封,即得

精密吸取样品液 20 mL,置分液漏斗中,用乙酸乙酯萃取两次,合并乙酸乙酯萃取液,用少量水洗涤后,于水浴上蒸干,用甲醇溶解定容至 25 mL容量瓶中。取样品供试液,在 HPLC仪中进样 20 μL,依上述条件测定

以样品中阿魏酸的含量为考察指标。选用回流时间、二次煎煮时间、醇沉浓度、加水量 4个因素,每个因素选择 4个水平,采用 L₁₆(4⁴) 正交表进行试验,结果见表 1, 2, 3

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A煎煮时间/h	B回流时间/h	C加水量	D醇沉浓度
1	0.5	0.5	2	12
2	1	0.5	1.5	10
3	1	1	1	8
4	2	1	0	6

表 2 L₁₆(4⁴) 正交试验结果

Table 2 Results of L₁₆(4⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	D	E(误差)	阿魏酸含量 / (μg·mL ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	48.52
2	1	2	2	2	2	51.99
3	1	3	3	3	3	58.10
4	1	4	4	4	4	58.92
5	2	1	2	3	4	29.72
6	2	2	1	4	3	28.33
7	2	3	4	1	2	31.97
8	2	4	3	2	1	31.67
9	3	1	3	4	2	49.86
10	3	2	4	3	1	34.96
11	3	3	1	2	4	33.36
12	3	4	2	1	3	34.27
13	4	1	4	2	3	47.19
14	4	2	3	1	4	43.33
15	4	3	2	4	1	41.94
16	4	4	1	3	2	45.32
K ₁	217.53	175.29	155.53	158.09	157.09	
K ₂	121.69	158.61	157.92	164.21	179.14	
K ₃	152.45	165.39	182.96	168.11	169.89	
K ₄	177.78	170.18	173.04	179.05	165.33	
R	95.84	15.68	27.43	20.96	22.05	

由以上结果可见,加热回流提取 2 h,再煎煮两

* 收稿日期: 2002-11-09

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

方差来源	自由度	离均差平方和	方差	F 值	P 值
A	3	1 234.25	411.42	26.12	$P < 0.05$
B	3	40.33	13.44	0.853 4	
C	3	127.92	42.64	2.707 3	
D	3	68.35	21.12	11.341	$P < 0.05$
E (误差)	4	62.99	15.75		

$$F_{0.05}(3, 4) = 9.12 \quad F_{0.01}(3, 4) = 28.7$$

次,每次 0.5 h,醇沉两次,每次使醇沉浓度达到 50%,再加入 8 倍量的水,即 A₁B₁C₁D₁ 为最佳提取条件。通过正交试验结果直观分析,由 R 值可看出,影响因素由大到小依次为 A>C>D>B。由方差分析结果看出,煎煮时间和醇沉浓度对试验指标影响

差异具有显著意义,回流时间和加水量影响较小

2.5 验证试验:按优选的最佳工艺条件,制备 3 批样品,测定复方当红注射液中阿魏酸含量,结果为 58.78 μg/mL。

3 讨论

通过优化试验,筛选出最佳提取工艺,既节省了煎煮时间又节约了乙醇的用量,降低了成本,适合医院内制备及使用。

References

- [1] Gu M, Zhang L, Zhang Z X. Determination of ferulic acid in Xiaoyao Powder and *Radix Angelicae Sinensis* by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(5): 342.

HPLC法测定甘草中甘草素、异甘草素、甘草苷的含量

何三民¹,石森林^{2*}

(1. 金华市中心医院,浙江 金华 321000; 2. 浙江中医学院,浙江 杭州 310053)

《中华人民共和国药典》2000年版一部收载有甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat.、光果甘草 *G. glabra* L. 3个种。为了保证临床疗效,本实验对甘草中甘草素、异甘草素、甘草苷的含量进行了比较。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪, Lambda2 紫外可见分光光度计 (PE), Mettler AE 163 电子分析天平。乙腈、二水醋酸、甲醇均为分析纯,水为重蒸水。

甘草购自浙江中医学院实验药厂,胀果甘草和光果甘草均购自浙江省金华市医药站药材公司。甘草素、异甘草素、甘草苷(自制,均经光谱学鉴定,采用面积归一化法测得其纯度分别为 98.05%, 98.13%, 98.12%)。

2 方法与结果

2.1 供试液制备:取甘草粉末(60目)约 100 mg,精密测定,置微型索氏提取器中加甲醇 10 mL 回流 2 h,回流液于 70℃ 水浴回收甲醇,浓缩至约 2 mL,放冷后转移至 5 mL 容量瓶中,甲醇稀释并定容至刻度,混匀后滤过,弃去初滤液,即得。

2.2 对照品溶液制备:分别精密称得甘草苷、甘草素、异甘草素对照品 2.00, 0.80, 0.25 mg,置 2 mL

容量瓶中,加甲醇溶解,并稀释至刻度,摇匀后即得。

2.3 色谱条件:色谱柱: Zorbox ODS (150 mm×4.6 mm) (Dupont); 柱温: 25℃; 流速: 1 mL/min; 流动相: 乙腈-5% 醋酸梯度洗脱,安排见表 1。

表 1 色谱条件

Table 1 Chromatographic conditions

时间 /min	流动相		检测波长 /nm
	乙腈	5% 醋酸	
0.0~12.0	20	80	310
12.0~15.0	50	50	365
15.0~25.0	80	20	365

2.4 标准曲线制备:用微量注射器分别吸取 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 μL 的混合对照品溶液,进样测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标作图,得回归方程、相关系数和线性范围。甘草苷: $Y = 83.45X + 2.23$, $r = 0.9993$, 0~10 μg; 甘草素: $Y = 87.31X - 0.25$, $r = 0.9991$, 0~4.0 μg; 异甘草素: $Y = 685.13X - 0.21$, $r = 0.9995$, 0~1.25 μg。

2.5 精密度试验:精密吸取 3 种对照品的混合液,每次 10 μL,连续进样 6 次,测定峰面积,计算得甘草素、异甘草素、甘草苷 RSD 分别为 1.38%, 1.37%, 1.91% ($n = 6$)。

2.6 稳定性试验:分别在样品制备后 1, 2, 4, 8, 16h

* 收稿日期: 2003-02-18

基金项目: 国家科技部创新博士基金 (96-901-06-75)

作者简介: 何三民 (1963-), 浙江义乌人, 浙江省金华市中心医院药剂科中药师, 主要从事中药医院制剂研制。Tel (0579) 2338512-739