

## 正交试验优化羌黄祛痹颗粒处方药材醇提工艺

徐忠坤<sup>1,2</sup>, 郭传宝<sup>1,2</sup>, 殷洪梅<sup>1,2</sup>, 王钰芳<sup>1,2</sup>, 刘洪波<sup>1,2</sup>, 萧伟<sup>1,2\*</sup>

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 优选羌黄祛痹颗粒处方药材乙醇提取的最佳工艺。方法 采用正交试验法, 以异欧前胡素、芍药苷提取率为指标, 优选最佳醇提工艺。结果 羌黄祛痹颗粒处方药材的最佳醇提工艺为采用 5 倍量 95%乙醇提取 2 次, 每次 60 min。结论 优选的工艺稳定可行, 可作为实际生产工艺。

**关键词:** 羌黄祛痹颗粒; 芍药苷; 异欧前胡素; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1764-03

## Optimization of ethanol extraction technology of Qianghuang Qubi Granule with orthogonal test

XU Zhong-kun<sup>1,2</sup>, GUO Chuan-bao<sup>1,2</sup>, YIN Hong-mei<sup>1,2</sup>, WANG Yu-fang<sup>1,2</sup>, LIU Hong-bo<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

**Key words:** Qianghuang Qubi Granule; peoniflorin; isoimperatorin; orthogonal test; extraction technology

羌黄祛痹颗粒源于明代·薛己《校注妇人良方》(舒筋汤)经典古方, 以中医理论为指导, 应用现代制剂技术研制而成。为治疗风寒湿痹症, 肩臂疼痛的中药六类新药。处方由片姜黄、羌活、当归、赤芍等 7 味药组成。据文献报道<sup>[1-2]</sup>, 处方中羌活的脂溶性成分香豆素具有抗炎作用, 其中异欧前胡素的量较高; 而该方中另一药材赤芍中的芍药苷同样具有抗炎作用, 并具有镇静、镇痛、解热等作用<sup>[3-4]</sup>。为充分提取处方中各药材的有效成分, 本实验以异欧前胡素和芍药苷提取率为指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验法, 对羌黄祛痹颗粒处方药材醇提工艺进行了筛选。

### 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪; VWD 紫外检测器; H.H.S 型电热数字显示恒温水浴锅(金坛市华峰仪器有限公司); RE-3000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂制造); SHZ-IIIID 型循环水真空泵(上海

亚荣生化仪器厂); DEF-6050 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); DN-300 型静态提取罐、JN-300 型静态浓缩罐(国营常熟制药机械厂); XK3130 型电子秤[Mettler Toledo(常州)称重设备系统有限公司]。

异欧前胡素(批号 0827-200105)、芍药苷(批号 0736-200117)对照品购自中国药品生物制品鉴定所; 甲醇、乙腈(色谱纯), 水(超纯水), 其余试剂均为分析纯。

处方中 7 味药材均购自连云港合兴堂中药饮片加工厂, 经江苏康缘药业股份有限公司吴舟主任药师鉴定, 其中片姜黄为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根、羌活为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 的干燥根茎及根、当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、海桐皮为豆科植物刺桐 *Erythrina arborescens* Roxb. 的

收稿日期: 2011-12-27

作者简介: 徐忠坤(1979—), 黑龙江省宁安市人, 工程师, 研究方向为中药制剂工艺的研究。Tel: 13812344975 E-mail: hf1919@sina.com

\*通讯作者 萧伟 E-mail: wzzhz-nj@tom.com

网络出版时间: 2012-08-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120816.1040.003.html>

干燥树皮、白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎。

## 2 方法与结果

### 2.1 异欧前胡素定量测定<sup>[5]</sup>

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (72:28), 检测波长 315 nm, 体积流量 0.6 mL/min, 柱温 30 ℃, 理论板数按异欧前胡素峰计算不低于 2 000。

**2.1.2 线性关系考察** 精密称取异欧前胡素对照品 6.72 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 268.8 μg/mL 的对照品储备液, 分别精密吸取上述储备液 1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别进样 10 μL, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=31\,478\,X-7\,022.4$ ,  $r=0.999\,9$ , 结果表明异欧前胡素在 13.44~134.40 μg/mL 呈良好线性关系。

**2.1.3 异欧前胡素对照品溶液的制备** 精密称取异欧前胡素对照品适量, 加甲醇制成 20.2 μg/mL 对照品溶液。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 分别按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表对样品进行提取, 并将提取液回收乙醇, 浸膏加辅料适量, 制成干燥提取物, 分别称取相当于生药 1.7 g 的干膏粉, 置 50 mL 三角烧瓶中, 加入正己烷 15 mL, 超声 20 min, 滤过, 滤液减压浓缩至干, 加入 5 mL 甲醇使溶解, 用微孔滤膜滤过, 得滤液, 作为供试品溶液。

分别吸取上述两种溶液各 5 μL 注入液相色谱仪进行测定, 计算异欧前胡素的量。

### 2.2 芍药苷定量测定<sup>[6-7]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈为流动相 A, 以水 (含 0.08%磷酸、0.08%三乙胺) 为流动相 B, 进行梯度洗脱: 0~17 min, 15%~85% A; 18~25 min, 85%~15% A; 26~32 min, 15%~85% A; 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 理论板数按芍药苷峰计算不低于 4 000。

**2.2.2 线性关系考察** 精密称取芍药苷对照品 15.26 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 305.2 μg/mL 对照品储备液, 分别精密吸取上述储备液 1.0、2.0、4.0、6.0、

8.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别进样 10 μL, 以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=12\,340\,X-4\,343.6$ ,  $r=1.000\,0$ , 结果表明芍药苷在 30.52~244.16 μg/mL 呈良好的线性关系。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 40 μg/mL 对照品溶液。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 分别按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表对样品进行提取, 并将提取液回收乙醇, 浸膏加辅料适量, 制成干燥提取物, 研细, 取约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声 (250 W, 40 kHz) 提取 30 min, 放冷, 称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 即得。

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪进行测定, 计算芍药苷的量。

### 2.3 醇提工艺的优化研究<sup>[8-10]</sup>

取 335.6 g 药材 (处方药材量的 1/5) 进行提取试验, 依据预试验结果, 选用异欧前胡素和芍药苷的提取率为考察指标, 对乙醇体积分数 (A)、提取时间 (B)、乙醇用量 (C)、提取次数 (D) 进行考察, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验, 结果采用综合评分法进行分析 (权重系数均为 0.5), 结果见表 1, 方差分析见表 2。

提取率=提取液中指标成分的量/药材中指标成分的量

综合评分=芍药苷提取率×0.5+异欧前胡素提取率×0.5

从直观分析可知, 各因素影响大小顺序为 A>D>B>C, 方差分析可知, 相对于乙醇用量, 乙醇体积分数对提取工艺影响最显著 ( $P<0.05$ ), 其次是提取次数 ( $P<0.05$ ), 提取时间和对提取工艺无显著影响。因素效应曲线显示提取 3 次比提取 2 次提取率略有升高, 提取 60 min 比提取 30 min 提取率有所升高。结合生产实际综合考虑, 羌黄祛痹颗粒的最佳提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, 即采用 5 倍量 95%乙醇提取 2 次, 每次 60 min。

### 2.4 提取工艺验证试验

按最佳醇提工艺进行 3 批验证试验, 结果芍药苷提取率分别为 70.28%、70.81%、70.62%, 异欧前胡素提取率分别为 71.36%、71.58%、71.29%。可知, 各项指标接近, 重复性良好, 证实正交试验结果分析准确。

## 3 讨论

根据羌黄祛痹颗粒复方中含有脂溶性、水溶性

表 1  $L_9(3^4)$  正交试验设计及结果Table 1 Design and results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

| 试验号   | A / %  | B / min | C / 倍  | D / 次  | 芍药苷提取率 / % | 异欧前胡素提取率 / % | 综合评分   |
|-------|--------|---------|--------|--------|------------|--------------|--------|
| 1     | 75 (1) | 30 (1)  | 5 (1)  | 1 (1)  | 59.46      | 52.15        | 55.805 |
| 2     | 75 (1) | 60 (2)  | 6 (2)  | 2 (2)  | 64.25      | 57.58        | 60.915 |
| 3     | 75 (1) | 90 (3)  | 8 (3)  | 3 (3)  | 66.37      | 59.25        | 62.810 |
| 4     | 85 (2) | 30 (1)  | 6 (2)  | 3 (3)  | 66.25      | 65.56        | 65.905 |
| 5     | 85 (2) | 60 (2)  | 8 (3)  | 1 (1)  | 64.28      | 60.18        | 62.230 |
| 6     | 85 (2) | 90 (3)  | 5 (1)  | 2 (2)  | 68.65      | 63.45        | 66.050 |
| 7     | 95 (3) | 30 (1)  | 8 (3)  | 2 (2)  | 69.52      | 72.12        | 70.820 |
| 8     | 95 (3) | 60 (2)  | 5 (1)  | 3 (3)  | 72.21      | 73.25        | 72.730 |
| 9     | 95 (3) | 90 (3)  | 6 (2)  | 1 (1)  | 63.15      | 68.36        | 65.755 |
| $K_1$ | 59.843 | 64.177  | 64.862 | 61.263 |            |              |        |
| $K_2$ | 64.728 | 65.292  | 64.192 | 65.928 |            |              |        |
| $K_3$ | 69.768 | 64.872  | 65.287 | 67.148 |            |              |        |
| R     | 9.925  | 1.115   | 1.095  | 5.885  |            |              |        |

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

| 因 素    | 偏差平方和   | 自由度 | F 值    | 显著性        |
|--------|---------|-----|--------|------------|
| A      | 147.770 | 2   | 80.793 | $P < 0.05$ |
| B      | 1.903   | 2   | 1.040  |            |
| D      | 57.884  | 2   | 31.648 | $P < 0.05$ |
| C (误差) | 1.829   | 2   |        |            |

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.0 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.0$$

和挥发油成分的特点, 预试验设计 3 种提取工艺, 分别采用了提取挥发油、水提醇沉法, 稀醇热提法以及醇提水提醇沉法。本课题组对 3 种工艺所得提取物进行镇痛、抗炎药理实验筛选, 结果表明醇提水提醇沉提取物对二甲苯致小鼠耳肿具有抑制趋势, 与空白对照组比较具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 对热板法小鼠痛阈有升高作用, 与给药前相比具有统计学差异, 与空白对照组相比也具有统计学差异 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )<sup>[11-12]</sup>。醇提水提醇沉法制得提取物具有作用强、毒性低的特点, 优于其他提取方法。为将处方药材中的活性成分充分提取出来, 本实验对其醇提工艺进行了优选。本研究选择异欧前胡素和芍药苷提取率作为醇提工艺考察指标, 得到最佳醇提工艺为采用 5 倍量 95%乙醇提取 2 次, 每次 60 min, 试验表明, 最佳工艺稳定, 可行。

## 参考文献

- [1] 黄兆胜. 中药学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [2] 张 娜, 孟宪生, 曹爱民, 等. 羌活化学成分及质量评价方法综述 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 2085-2086.
- [3] 杨媛媛, 周 刚, 马晓康, 等. 赤芍的研究进展 [J]. 医药导报, 2008, 27(1): 67-68.
- [4] 刘帅英, 徐文峥, 李水福. 赤芍中芍药苷的大孔吸附树脂纯化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1480-1482.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 张琼英. 高效液相色谱法测定健儿乐颗粒中芍药苷含量 [J]. 中国药业, 2009, 19(17): 23.
- [7] 何石兰, 洪松彬. 高效液相色谱法测定赤芍中芍药苷的含量 [J]. 医药信息, 2010, 23(7): 2342-2343.
- [8] 董方言. 现代实用中药新剂型新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] 梁颖敏, 蒋东旭, 黄有带, 等. 正交试验法优选金芍胶囊的醇提工艺 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(6): 617-619.
- [10] 胡 芳, 陆兔林, 徐佳佳, 等. 正交优选枣味软胶囊醇提工艺研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(3): 140-142.
- [11] 李仪奎. 中药药理实验方法 [M]. 上海: 上海科技出版社, 2006.
- [12] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.