

药效学实验结合正交设计优化消疹止痛凝胶提取工艺

郭 静^{1,2}, 玄振玉², 岑 俊³, 谢 燕^{1*}

1. 上海中医药大学公共健康学院, 上海 201203

2. 苏州玉森新药开发有限公司, 江苏 苏州 215125

3. 上海建工医院, 上海 200083

摘要: **目的** 通过药效学实验与正交试验相结合的方式, 确定消疹止痛凝胶的提取工艺路线及工艺参数。**方法** 选用单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型和热板致小鼠疼痛模型进行初步药效学实验, 比较乙醇渗漉、乙醇回流、水煎煮 3 种提取方法所得提取液对疱疹症状的减轻程度和止痛作用的差异, 筛选提取工艺路线; 再通过正交试验, 以延胡索乙素转移率和干膏得率为指标对乙醇渗漉法的提取工艺参数进行优化。**结果** 药效学实验结果显示, 乙醇渗漉法所得的提取物对豚鼠皮肤疱疹病毒有明显减轻作用, 并可缩短痊愈时间; 在给药后 0.5、1、2 h 均能够显著延长小鼠的痛阈值, 表现出明显的止痛作用, 因此, 确定为消疹止痛凝胶的提取工艺路线; 进一步通过正交试验优化得到的提取工艺为以 60%乙醇渗漉提取, 渗漉体积流量为 4 mL/min, 收集渗漉液体积为 8 倍药材量。**结论** 所得的提取工艺合理、可行, 为后期消疹止痛凝胶的制剂工艺研究奠定基础。

关键词: 消疹止痛凝胶; 药效学实验; 正交设计; 延胡索乙素; 渗漉; 止痛

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)14-4210-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.011

Optimization of extraction technology of Xiaozhen Zhitong Gel by combining pharmacodynamic experiment and orthogonal design

GUO Jing^{1,2}, XUAN Zhen-yu², CEN Jun³, XIE Yan¹

1. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Suzhou Youseen New Drug R&D Co., Ltd., Suzhou 215125, China

3. Shanghai Jiangong Hospital, Shanghai 200083, China

Abstract: **Objective** Through the combination of pharmacodynamic test and orthogonal test, the extraction technology route and parameters of Xiaozhen Zhitong Gel (XZG, 消疹止痛凝胶) were optimized. **Methods** The skin infection model of guinea pigs induced by herpes simplex virus and the pain model of mice induced by hot plate were chosen to perform the preliminary pharmacodynamic test. The effects of extracts from three technology routes of ethanol percolation, ethanol reflux, and water decoction on alleviation herpes symptoms and pain were compared to ascertain the extraction technology route. Then the extraction technology parameters of ethanol percolation method were optimized by orthogonal test with the transfer rate of tetrahydropalmatine and dry extract yield as indexes. **Results** The results of pharmacodynamics test showed that the extracts obtained by ethanol percolation method could obviously alleviate guinea pig skin herpesvirus and shorten the healing time. Besides, the pain threshold of mice was also significantly prolonged after administering the extracts for 0.5 h, 1 h, and 2 h, demonstrating the obvious analgesic effect. Therefore, the ethanol percolation method was ascertained as the extraction technology route of XZG. The extraction technology parameters were further optimized by orthogonal test as follows: 60% ethanol was used for percolation extraction, the percolation rate was 4 mL/min, and the volume of percolation solution was collected up to 8 times of the medicinal materials amount. **Conclusion** The obtained extraction technology is reasonable and feasible, which will lay the foundation for the pharmaceutical technology of XZG.

收稿日期: 2021-03-22

基金项目: 上海市科委“生物医药领域”科技支撑项目 (18401930800); 上海市科委优秀学术带头人资助项目 (19XD1423700)

作者简介: 郭 静 (1984—) 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新药的研发。Tel: (0512)62956088 E-mail: guojing_192@163.com

*通信作者: 谢 燕 (1978—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新制剂与新剂型的研究。

Tel: (021)51322440 E-mail: rosexie_2004@163.com

in the future research.

Key words: Xiaozhen Zhitong Gel; pharmacodynamic test; orthogonal design; tetrahydropalmatine; ethanol percolation; relieving pain

带状疱疹是由水痘-带状疱疹病毒感染引起的急性疱疹性皮肤病^[1]，主要侵犯皮肤和局部神经，常伴有剧烈疼痛^[2]。中医认为，该病由外感湿热毒邪火郁、气血瘀滞所引发，故以清热解毒、活血化瘀、通络止痛为治疗原则。诸多研究表明^[3-5]，中医药在减轻疱疹症状及降低后遗神经痛发生率等方面颇具特色和优势。消疹止痛凝胶（Xiaozhen Zhitong Gel, XZG）是来源于上海市中西医结合医院的临床经验方，由地龙、延胡索、连翘、紫花地丁、白芷、甘草 6 个药味配伍而成。方中地龙清热通络为君；延胡索活血化瘀、行气止痛，连翘、紫花地丁清热解毒、凉血消肿为臣；白芷祛风除湿为佐；甘草调和诸药为使。全方配伍共奏解毒利湿、消疹止痛的功效。临床研究表明，该方能加快疱疹皮损区结痂，并有效缓解带状疱疹急性期疼痛^[6]。

该复方制剂有多年临床应用经验，疗效确切，现将其转化为中药新药，提高患者用药可及性。提取工艺研究是保证中药新药安全有效的关键环节^[7]，工艺路线直接影响其药效物质基础。目前，在中药复方新药研究中，常用化学指标成分来确定其提取工艺路线，忽略与临床疗效的充分关联^[8-10]，故化学指标成分作为工艺评价指标有一定局限性。本实验拟采用药效学指标与化学指标相结合的方式，对 XZG 的提取工艺进行筛选、优化。选用单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型和热板致小鼠疼痛模型进行药效学实验，初步筛选出具有抗病毒和止痛作用的提取工艺路线；再通过正交试验，以延胡索乙素转移率和干膏得率为指标，考察该提取工艺的关键参数，从而确定 XZG 的提取工艺，为后期 XZG 的制剂工艺研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪，含四元泵，柱温箱，DAD 检测器，Chemstation B.04.03 工作站，美国 Agilent 公司；CP225D 分析天平，十万分之一级，德国 Sartorius 公司；S210 型 pH 计，梅特勒-托立多仪器（上海）有限公司；DHG 9140A 鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司。

1.2 试剂与材料

延胡索乙素对照品，批号 110726-201718，质量

分数 99.9%，中国食品药品检定研究院；阿昔洛韦乳膏，福建太平洋制药有限公司，批号 180404；扶他林（双氯芬酸二乙胺乳胶剂），北京诺华制药有限公司产品，批号 X4775；乙腈为色谱纯，美国 Tedia 有限公司；单纯疱疹病毒液，购自中国医学科学院医药生物技术研究所。

地龙、延胡索、连翘、紫花地丁、白芷和生甘草均购自亳州永刚饮片厂有限公司，产地分别为浙江、江苏、河南、安徽、安徽和内蒙古，经上海中医药大学中药研究所吴立宏研究员鉴定，地龙为钜蚓科动物通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen 的干燥体，延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎，连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实，紫花地丁为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草，白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根，生甘草为豆科植物光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根及根茎；甘油购自浙江遂昌惠康药业有限公司；卡波姆购自上海运宏化工制剂辅料技术有限公司；经检验均符合《中国药典》2015 年版项下各项规定。

1.3 动物

ICR 小鼠，SPF 级，体质量（19±1）g，合格证号 11400700104571，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证 SCXK（京）2015-0001；豚鼠，普通级，体质量（300±20）g，合格证号 11804800001841，北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供，动物许可证 SCXK（京）2015-0005。所有动物实验遵循小鼠和豚鼠有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 药效学实验筛选提取工艺路线

XZG 原方采用乙醇浸渍提取后应用于临床，药材提取效率差。生产中乙醇渗漉法提取效率高且与原工艺提取原理一致；考虑药材提取时加热可增加分子间运动，提高溶解度和提取效率，故增设乙醇回流提取作对比；另传统中药复方常以水为溶媒煎煮提取，安全经济；因此本实验拟选取乙醇渗漉、乙醇回流和水煎煮 3 种提取工艺路线进行研究。

带状疱疹是由水痘-带状疱疹病毒感染引起^[11], 缓解急性期疼痛是 XZG 原方的临床治疗特色之一。针对以上 2 个主要药效作用特点, 本实验选择单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型和热板致小鼠疼痛模型进行初步药效学实验, 比较 3 种提取工艺对疱疹症状的减轻程度和镇痛作用的差异, 以确定 XZG 的提取工艺路线。

2.1.1 样品制备 按处方称取粉碎后过 10 目筛的地龙、延胡索、连翘、紫花地丁、白芷和甘草各 3 份, 按以下工艺进行提取。

(1) 乙醇渗漉提取: 加适量 70%乙醇, 以 2 mL/min 的体积流量渗漉提取, 收集 10 倍药材量的渗漉液, 混匀。

(2) 乙醇回流提取: 加 10 倍量 70%乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液。

(3) 水煎煮提取: 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并提取液。

将上述提取液滤过, 滤液于 70℃减压浓缩至相对密度为 1.07, 备用; 另取卡波姆、甘油加入适量的纯化水中, 搅拌使溶胀; 分别将上述浓缩液加入溶胀的卡波姆中, 搅拌均匀, 以适量三乙醇胺调 pH 值至 6.5, 即得 3 个含药凝胶 (每克凝胶相当于含生药 0.8 g)。取卡波姆、甘油, 不加提取液, 同法制得空白凝胶。

2.1.2 剂量设计 参考《中药药理研究方法学》中“体表面积比”法换算动物临床等效剂量^[12], 均匀涂抹动物皮肤, 以完全覆盖为准, 测得豚鼠凝胶涂抹量为 1.2 g/只 (相当于生药 3.2 g/kg), 小鼠凝胶涂抹量为 0.3 g/只 (相当于生药 12 g/kg); 阿昔洛韦软膏豚鼠按 1.2 g/只 (相当于生药 4 g/kg) 涂抹, 扶他林软膏小鼠按 0.15 g/只 (相当于 7.5 g/kg) 涂抹给药。

2.1.3 统计学方法 使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如符合正态分布, 进行单因素方差分析, 否则进行 K-W 非参数检验; 单因素方差分析时, 如方差齐性, 采用 LSD 检验, 如方差不齐, 采用 Tamhane's T2 检验。

2.1.4 对单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型的影响

(1) 分组和给药: 取豚鼠 48 只, 按刺伤皮肤部位的破损程度分层随机均分为 6 组, 分别为对照组、模型组、阳性 (阿昔洛韦) 组、3 种提取工艺组, 每组 8 只, 雌雄各半。将豚鼠背部区皮肤脱毛 (4 cm × 4 cm) 后, 用梅花针深刺皮肤造成破损, 模型组及各给药组背部破损部位滴涂 100 μL 稀释 10 倍的单

纯疱疹病毒液, 对照组给予等量生理盐水, 连续感染 2 d。第 1 天感染后 4 h 各给药组涂擦相应药物, 对照组和模型组涂擦空白凝胶, 每日 1 次, 连续给药 7 d。

(2) 观察方法: 于感染当天开始观察各组豚鼠背部病变情况, 连续观察 12 d; 按评分标准表记录分数^[13] (表 1), 将皮肤病变过程中所有分数加在一起得到累积计分, 同时记录各组动物的痊愈时间。

(3) 实验结果: 见表 2。与对照组相比, 模型组豚鼠感染区皮肤红肿明显, 并伴少量渗液, 有不同程度的小疱疹出现或局部皮肤呈暗红色, 病变状况明显增加; 且痊愈时间延长 8 d, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组相比, 阳性组、乙醇渗漉组和乙醇回流组感染区病变明显减轻: 病变累积计分由 (20.00 ± 1.39) 分分别减少至 (14.25 ± 1.56) 分 ($P < 0.01$)、(16.25 ± 1.10) 分 ($P < 0.01$)、

表 1 单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型病变评分标准
Table 1 Scoring criteria of skin lesions in guinea pigs infected with herpes simplex virus

皮损不同阶段的临床表现	分数
微红, 轻度水肿	0.5
红斑, 1~2 个小疱疹	1.0
红斑扩大, 大量小疱疹	2.0
大量大疱疹; 或疱疹紧密相连, 合成一片; 或暗红色、溃烂	3.0
未感染或无痂壳	0.0
痂壳脱落 90%	1.0
痂壳脱落 50%	2.0
痂壳未脱落	3.0

表 2 XZG 不同提取物对单纯疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of different extracts from XZG on skin infection model of guinea pigs infected by herpes simplex virus ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	皮肤病变累积计分	痊愈时间/d
对照	1.38 ± 0.35	3.75 ± 0.71
模型	20.00 ± 1.39 ^{##}	11.75 ± 0.46 ^{##}
阳性	14.25 ± 1.56 ^{**}	9.25 ± 0.71 ^{**}
乙醇渗漉	16.25 ± 1.10 ^{**}	9.75 ± 1.02 ^{**}
乙醇回流	18.44 ± 1.52 [*]	10.88 ± 1.15 [*]
水煎煮	20.25 ± 1.73	11.50 ± 0.53

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

(18.44 ± 1.52) 分 ($P < 0.05$); 痊愈时间由 (11.75 ± 0.46) d 分别缩短至 (9.25 ± 0.71) d ($P < 0.01$)、(9.75 ± 1.02) d ($P < 0.01$)、(10.88 ± 1.15) d ($P < 0.05$), 均具有显著性差异; 说明乙醇渗漉组和乙醇回流组对豚鼠皮肤疱疹病毒均有减轻作用, 并可缩短痊愈时间, 且乙醇渗漉组的作用效果更好。

水煎煮组的皮肤病变计分和痊愈时间与模型组相比无差异, 提示水煎煮组对豚鼠皮肤疱疹病毒无减轻作用。

2.1.5 对热板致小鼠疼痛模型的影响

(1) 筛选合格小鼠: 恒温水浴箱预先加热至 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 取 ICR 小鼠雌雄各半, 每次 1 只放在热板上, 记录小鼠出现舔后足所需时间, 即为该鼠的痛阈值, 凡舔后足时间小于 5 s 或大于 30 s 或跳跃者弃之不用。

(2) 分组和给药: 取合格小鼠 50 只雌雄各半, 按基础痛阈值分层随机均分为 5 组, 分别为模型组、阳性 (扶他林) 组、3 种提取工艺组, 每组 10 只。将小鼠背部区皮肤脱毛 ($2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$) 后, 各给药组脱毛区涂抹给药, 模型组涂抹空白凝胶, 每日 1 次, 连续给药 7 d。

(3) 评价方法: 分别于给药后 0.5、1、2 h 测定

小鼠痛阈值, 如 60 s 仍无反应, 将小鼠取出, 以免烫伤, 其痛阈值以 60 s 计算, 连续观察 7 d。

(4) 实验结果: 见表 3。给药前各组小鼠痛阈值均在 17 s 左右, 无显著差异。给药后 0.5 h, 阳性组、乙醇渗漉组、乙醇回流组和水煎煮组痛阈值分别较模型组延长约 17、14、11、8 s, 且均具有显著性差异 ($P < 0.01$); 说明给药后 0.5 h, 阳性组、3 种提取工艺组均可延长小鼠痛阈。给药后 1 h, 阳性组、乙醇渗漉组、乙醇回流组痛阈值较 0.5 h 均有所延长, 分别延长了 4、3、2 s, 而水煎煮组痛阈值则无增加; 与模型组比较, 阳性组和乙醇渗漉组痛阈值分别从 (19.70 ± 9.93) s 延长至 (38.20 ± 14.94) s ($P < 0.01$)、(35.06 ± 18.91) s ($P < 0.05$), 具有显著性差异, 乙醇回流组和水煎煮组痛阈值虽然较模型组有所增加, 但无统计学差异。给药后 2 h, 阳性组、乙醇渗漉组、乙醇回流组和水煎煮组痛阈值较 1 h 没有增加; 但与模型组比较, 乙醇渗漉组和乙醇回流组痛阈值分别从 (19.48 ± 15.18) s 延长至 (33.64 ± 14.38) s、(30.52 ± 7.67) s, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 乙醇渗漉组在给药后 0.5、1、2 h 均能够显著延长小鼠的痛阈值, 表现出明显的止痛作用。

表 3 XZG 不同提取物对热板致小鼠疼痛模型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of different extracts from XZG on pain model of mice induced by hot plate ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	痛阈值/s			
	给药前	给药后 0.5 h	给药后 1 h	给药后 2 h
模型	17.02 ± 2.34	17.71 ± 15.04	19.70 ± 9.93	19.48 ± 15.18
阳性	17.16 ± 1.38	$34.30 \pm 10.78^{**}$	$38.20 \pm 14.94^{**}$	32.89 ± 21.56
乙醇渗漉	16.89 ± 2.04	$32.69 \pm 17.85^{**}$	$35.06 \pm 18.91^{*}$	$33.64 \pm 14.38^{*}$
乙醇回流	17.25 ± 2.16	$28.68 \pm 19.82^{**}$	30.49 ± 14.54	$30.52 \pm 7.67^{*}$
水煎煮	17.08 ± 2.23	$26.19 \pm 7.64^{**}$	25.49 ± 22.12	23.73 ± 16.90

与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

综合疱疹病毒致豚鼠皮肤感染模型和热板致小鼠疼痛模型 2 个药效学实验结果, 发现 3 种提取工艺中乙醇渗漉组的抗疱疹病毒和止痛作用效果最好。与原方临床应用时提取方式一致, 另乙醇渗漉提取还可避免方中连翘苷、欧前胡素等化学成分受热破坏而造成损失^[14-15]。因此, 确定采用乙醇渗漉法作为 XZG 的提取工艺。

2.2 正交试验法确定渗漉提取工艺参数

乙醇渗漉提取法主要通过不断加入新鲜溶剂造成浓度差, 形成动态浸出, 使有效成分提取完全,

特别适用于遇热不稳定的成分提取, 但该方法乙醇消耗量较大, 耗时较长^[16-17]。为获得稳定的提取工艺, 并兼顾提取效率, 取得成本最大效益比, 本实验综合提取过程中的各个环节和因素, 采用正交试验法进行优化设计, 确定 XZG 乙醇渗漉法的提取工艺参数。

2.2.1 延胡索乙素含量的测定^[18]

(1) 色谱条件: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-1.2%三乙胺溶液 (45:55) 为流动相; 检测波长为 282 nm。理论板数按延胡索乙素峰计算

不低于 5000。

(2) 对照品溶液的制备: 取延胡索乙素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含延胡索乙素 25 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 即得。

(3) 供试品溶液的制备: 称取处方量的药材, 加适量 70%乙醇, 以 2 mL/min 的体积流量渗漉提取, 收集 8 倍药材量的渗漉液, 混匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(4) 阴性样品溶液的制备: 取缺延胡索的其他药味按照供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液, 即得。

(5) 专属性与系统适用性试验: 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 测定, 色谱图见图 1。结果表明, 供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间出峰, 阴性样品溶液对延胡索乙素的测定无干扰; 以二极管阵列检测器进行纯度分析, 主峰的纯度因子为 998.7。对照品 5 次峰面积的 RSD 为 1.4%, 理论塔板数按延胡索乙素峰计算为 13 556, 分离度 3.1, 符合系统适用性要求。

(6) 线性关系考察: 分别精密量取延胡索乙素对照品溶液 (质量浓度为 251.2 $\mu\text{g/mL}$) 1、2、5、

10、25 mL 分置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述对照品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定。以延胡索乙素对照品质量浓度为横坐标 (x), 峰面积积分值为纵坐标 (y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为 $y=8.673 5 x-18.664$, $r=0.999 9$, 结果表明延胡索乙素在 5.0~125.6 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

(7) 稳定性试验: 取供试品溶液, 在 0、4、8、12、18、24 h 分别进样 1 次, 记录峰面积, 结果延胡索乙素峰面积的 RSD 为 1.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

(8) 重复性试验: 制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μL 并计算质量浓度。结果延胡索乙素的平均质量浓度为 0.032 mg/mL, RSD 为 1.7%, 表明方法重复性良好。

(9) 加样回收率试验: 取药材 9 份, 每份 40 g, 分别精密延胡索乙素对照品溶液 (质量浓度为 16.42 $\mu\text{g/mL}$) 80、160、240 mL, 平行 3 份, 按供试品溶液制备方法制得渗漉液, 摇匀, 测定, 计算回收率。结果延胡索乙素的平均回收率为 96.6%, RSD 为 0.7%, 表明方法准确度高。

2.2.2 干膏得率的测定 量取提取液 25 mL, 置干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥至恒定质量, 取出, 置干燥器中, 放冷, 迅速称定质量, 计算干膏得率。

2.2.3 指标综合评分法 方中延胡索具有活血化瘀、行气止痛功效, 延胡索乙素作为主要有效成分, 药理学研究显示其具有明显镇痛作用^[19], 选择以延胡索乙素转移率 (Y_1) 为提取工艺研究的主要跟踪指标, 权重系数设为 0.6; 另外, 干膏得率关系到制剂工艺、剂型的选择及辅料的用量, 以干膏得率 (Y_2) 作为次要指标, 权重系数为 0.4, 采用综合评分 (Y) 法对提取工艺进行考察。

延胡索乙素转移率 = 提取液中延胡索乙素质量 / (延胡索药材中延胡索乙素含量 $\times$ 所用延胡索药材质量)

干膏得率 = 提取液总体积 $\times$ 干膏质量 / (取样体积 $\times$ 药材总质量)

$$Y_i = (X_{1i}/X_{1\max} \times 0.6 + X_{2i}/X_{2\max} \times 0.4) \times 100$$

Y_i 表示第 i 个正交试验的综合评分值, X_{1i} 表示第 i 个正交试验结果的延胡索乙素转移率, $X_{1\max}$ 表示正交试验结果中延胡索乙素转移率的最大值, X_{2i} 表示第 i 个正交试验结果的干膏得率, $X_{2\max}$ 表示正交试验结果中干膏得率的最大值

2.2.4 正交试验方法 参考相关文献报道^[16-17], 影

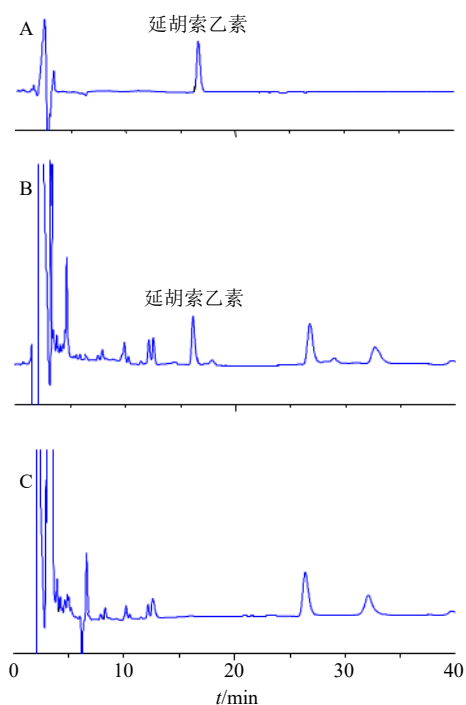


图 1 延胡索乙素对照品 (A)、XZG 供试品 (B)、阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of tetrahydropalmatine reference substance (A), XZG sample (B), and negative sample (C)

响渗漉工艺的主要因素为提取溶剂的浓度与用量、渗漉速度等,本实验在此基础上,结合预实验结果,选取乙醇体积分数(A)、渗漉体积流量(B)、乙醇用量(C,以收集渗漉液的体积计)为考察因素,每个因素选取 3 个水平,因素与水平见表 4。称取处方药材共 9 份,照 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,加入不同体积分数乙醇,控制渗漉体积流量进行提取,收集相应体积的渗漉液,滤过,即得。以提取液中延胡索乙素转移率和干膏得率为评价指标,采用综合评分法进行正交试验分析。

2.2.5 正交试验结果分析 正交试验结果及方差分析见表 4、5。正交试验的直观分析(表 4)显示,乙醇体积分数、渗漉体积流量、乙醇用量 3 个因素的极差 R 值分别为 88.9、4.9、8.3,表明 3 个因素对试验指标影响的主次顺序依次是 A(乙醇体积分数) $>$ C(乙醇用量) $>$ B(渗漉体积流量); K 值表示各因素下 3 个水平分别对试验指标的影响大小, K 值最大则作为该因素的最优水平,根据表 4 中 K_1 、 K_2 、 K_3 大小分析得出,不同水平对试验指标的影响程度依次是 $A_1>A_2>A_3$ 、 $B_2>B_3>B_1$ 、 $C_3>C_2>C_1$,

表 4 渗漉提取工艺正交试验设计与结果

Table 4 Orthogonal experiment design and results of percolation extraction technology

序号	A/%	B/(mL·min ⁻¹)	C/倍	D(误差)	延胡索乙素转移率/%	干膏得率/%	综合评分
1	60(1)	2(1)	4(1)	(1)	81.3	13.8	96.7
2	60(1)	4(2)	8(2)	(2)	82.5	14.7	100.0
3	60(1)	6(3)	12(3)	(3)	81.6	14.6	99.1
4	70(2)	2(1)	8(2)	(3)	77.2	11.5	87.4
5	70(2)	4(2)	12(3)	(3)	79.6	12.1	90.8
6	70(2)	6(3)	4(1)	(2)	76.5	11.4	86.7
7	80(3)	2(1)	12(3)	(2)	54.6	10.8	69.1
8	80(3)	4(2)	4(1)	(3)	53.2	10.5	67.3
9	80(3)	6(3)	8(2)	(1)	55.0	11.2	70.5
K_1	295.8	253.2	250.7	258.0			
K_2	264.9	258.1	257.9	255.8			
K_3	206.9	256.3	259.0	253.8			
R	88.9	4.9	8.3	4.2			

表 5 渗漉提取工艺方差分析结果

Table 5 Variance analysis of percolation extraction technology

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 358.002 2	2	461.556 6	$P<0.01$
B	4.095 6	2	1.392 0	
C	13.548 9	2	4.605 0	
D(误差)	2.942 2	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$; $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

即各因素最优水平分别为 A_1 、 B_2 、 C_3 。

方差分析(表 5)结果显示,因素 A 的 F 值为 461.556 6,大于 $F_{0.01}(2,2)=99.00$,说明 A(乙醇体积分数)对试验指标有显著性影响($P<0.01$),结合直观分析显示的 A_1 水平最优,因此 A 因素选取 A_1 水平,即渗漉提取的乙醇体积分数为 60%。而 B(渗漉体积流量)的 F 值为 1.392 0、C(乙醇用量)

F 值为 4.605 0,均小于 $F_{0.05}(2,2)=19.00$,表明 B 和 C 因素对试验指标无显著性影响($P>0.05$)。

正交试验结果中综合评分显示,提取工艺为 $A_1B_2C_2$ 的评分最高,A 因素为 A_1 水平,与方差分析结果一致;B 和 C 因素为 B_2 、 C_2 ,均取各水平的中间值,从渗漉效率和节约溶剂角度考虑也较为合理。综上,通过正交试验初步选择提取工艺条件为 $A_1B_2C_2$,即 60%乙醇渗漉提取,渗漉体积流量为 4 mL/min,收集渗漉液体积为 8 倍药材量。

2.2.6 提取工艺验证试验 称取 2 倍处方量药材,平行 3 份,加入适量 60%乙醇,以 4 mL/min 的体积流量进行渗漉提取,收集 8 倍药材量的渗漉液,计算延胡索乙素转移率和干膏得率,结果见表 6。结果显示,延胡索乙素平均转移率为 81.2%,RSD 为 0.5%;干膏平均得率为 14.2%,RSD 为 0.7%;平均综合评分值为 97.8;结果表明,3 次试验结果

表 6 渗漉提取工艺方差分析结果

Table 6 Comprehensive score results of percolation extraction technology

试验号	延胡索乙素转移率/%	干膏得率/%	综合评分
1	80.8	14.1	97.4
2	81.1	14.3	98.2
3	81.6	14.2	98.0

和正交试验综合评分最大值相当,且组间均无显著性差异,表明该提取工艺参数 $A_1B_2C_2$ 合理可行,稳定性较好。

3 讨论

进行渗漉提取时,药材粒度大小是重要的影响因素。粒度过大,渗漉时颗粒间隙大,导致溶剂消耗量大,且提取不完全;但颗粒过细会造成渗漉压降过大,渗漉系统能耗过高,造成提取效率较低^[20]。本实验在正交试验前,先以延胡索乙素转移率和干膏得率为指标对药材的粉碎粒度进行了考察。结果显示,药材粉碎后分别过 10、16、24 目筛,延胡索乙素转移率和干膏得率无显著差异,但过 10 目筛的药材渗漉效率高,不易发生堵塞,因此选择将药材粉碎过 10 目筛进行渗漉提取。

XZG 处方中不含贵重药和毒性药味,通常尽可能选择君药、臣药中的药效成分作为跟踪指标。方中地龙为君药,其主要成分为蛋白质、氨基酸和脂类^[21],特征性专属成分不明确,目前对含地龙中药制剂的质量控制研究较少,因此,未将地龙中的成分作为工艺跟踪指标。连翘和延胡索为方中臣药,前期研究中发现,连翘中主要药效成分连翘苷的阴性干扰较大,供试品制备方法复杂,不适宜作为指标成分跟踪工艺过程;而延胡索中的延胡索乙素为其特征性成分并具有明显的镇痛作用,能够体现工艺特点,因此本实验选用延胡索乙素作为正交试验的指标成分,优化提取工艺。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏志平,胡晓军. 皮肤性病学 第 7 版 高专临床 [M]. 北京:人民卫生出版社,2014: 65.
- [2] 陈洪铎. 临床诊疗指南 皮肤病与性病分册 [M]. 北京:人民卫生出版社,2006: 2-4.
- [3] 皇甫佳欣,沈德新. 带状疱疹后遗神经痛的中西医结合治疗进展 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(12): 65-68.

- [4] 赵丹. 中医治疗带状疱疹后遗神经痛的临床分析 [J]. 基层医学论坛, 2020, 24(13): 1886-1887.
- [5] 马秀芝,李忻红. 仲景方在带状疱疹后遗神经痛中的应用 [J]. 中国民间疗法, 2020, 28(7): 104-106.
- [6] 田瑛瑜,付索菊,赵海燕. 消疹止痛汤加减治疗带状疱疹 46 例 [J]. 河南中医, 2006(4): 46.
- [7] 周刚. 中药复方新药研发中工艺研究需关注的问题 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(16): 1865-1867.
- [8] 陈剑平,陈秋谷,胡兆流,等. 基于药效筛选和正交试验优化健脾益肾丸的制备工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5817-5822.
- [9] 芦彦兆. 基于化学与药效学结合的藏药湿生扁蕾的提取方法及工艺的研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [10] 庞燕梅,周福军,胡跃强,等. 基于药效筛选和正交试验优化温肺降浊方的提取工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2420-2425.
- [11] 周淼,李祥,杨旭东. 带状疱疹后遗神经痛的药物治疗及预防研究进展 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2020, 19(5): 489-493.
- [12] 付昆,付文君,魏江平,等. 正天丸的镇痛作用及机制研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 401-404.
- [13] 赵辨. 湿疹面积及严重程度指数评分法 [J]. 中华皮肤科杂志, 2004(1): 7-8.
- [14] 白吉庆,王小平,曹林林,等. 产地加工方法对青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3258-3261.
- [15] 姜佳,刘虹,刘芳,等. 白芷提取液加热过程中欧前胡素稳定性研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(3): 239-241.
- [16] 蒋俭秀. 金银舒心胶囊的制剂工艺研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2016.
- [17] 徐波,金方,陈坚波. 基于药效筛选和正交试验优化五子衍宗加减方的提取工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1354-1359.
- [18] 张丹,王昌利,卜雕雕,等. 高效液相色谱法同时测定延胡索中 5 种生物碱含量的方法学研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(12): 1759-1762.
- [19] 尚坤,李敬文,常美月,等. 延胡索药理作用研究 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(1): 108-110.
- [20] 李娟,汤添钧,汤为民,等. 药粉颗粒床层特性对渗漉压降的影响 [J]. 苏州科技大学学报: 自然科学版, 2017, 34(2): 38-42.
- [21] 刘巧,毕启瑞,谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 252-261.

[责任编辑 郑礼胜]