

正交试验设计优化复方刺山柑胶囊水提取工艺

袁涛 杨伟俊 薛文采 程波

【摘要】 目的 优化复方刺山柑胶囊的最佳水提取工艺。**方法** 以甘草酸铵提取率、没食子酸提取率、浸膏得率为综合评价指标,以提取次数 A(1、2、3 次)、提取时间 B(1.0、1.5、2.0 小时)和提取溶剂用量 C(8、10、12 倍药材量)为考察因素,采用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验设计法优化复方刺山柑胶囊中甘草、金钱草、诃子和黄芪的最佳水提取工艺。**结果** 方差分析结果显示,A 因素对考察指标的综合影响具有显著性($P < 0.05$),B 和 C 因素的影响均不显著($P > 0.05$)。优选的最佳水提取工艺条件为 A3B1C1,即加入 8 倍药材重量的水,提取 3 次,每次提取 1 小时。**结论** 优选的工艺合理可行。

【关键词】 复方刺山柑胶囊; 水提取工艺; 正交试验; 甘草酸铵; 没食子酸

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.06.005

Optimization on aqueous extraction technology of compound Caper fruit capsule by orthogonal experimental design YUAN Tao, YANG Wei-jun, XUE Wen-cai, et al. Department of Pharmacy, Xinjiang Karamay Center Hospital, Karamay 834000, China

Corresponding author: YANG Wei-jun, E-mail: wifred3106@163.com

【Abstract】 Objective To optimize the aqueous extraction technology of compound Caper fruit capsule. **Method** The extraction technology of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Lysimachiae Herba, Chebulae Fructus, Astragali Radix were optimized by single factor design and orthogonal experiment design, taking the extraction rates of ammonium glycyrrhetate, gallic acid, and total solids as indicators, with the extraction times (A: 1, 2, 3 times, separately), the extraction time (B: 1.0, 1.5, 2.0 h, separately) and the amount of solvent (C: 8, 10, 12 times weight, separately) as three factors that required optimization.

Result Variance analysis showed that factor A had a significant effect on the combined indicators ($P < 0.05$), while factor B and C had no significance ($P > 0.05$). The best extraction condition was A3B1C1, that is 10 times the amount of water extracting 3 times, with each time 2 hours. **Conclusion** The optimum technology is reasonable and effective.

【Key words】 Compound Caper fruit capsule; Aqueous extraction technology; Orthogonal experimental design; Ammonium glycyrrhetate; Gallic acid

复方刺山柑胶囊是新疆药物研究所自主研发

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支撑计划项目(200933123)

作者单位:834001 新疆克拉玛依市中心医院药学部(袁涛);新疆维吾尔自治区药物研究所维吾尔药研究检测室/新疆维吾尔药重点实验室(杨伟俊、薛文采、程波)

作者简介:袁涛(1977-),学士,主管药师。研究方向:制药工程。E-mail:yuantaol00@qq.com

通信作者:杨伟俊(1973-),博士,副研究员,硕士生导师。研究方向:新疆药用植物资源及创新药物研究。E-mail:wifred3106@163.com

的复方药物,由刺山柑、川西獐牙菜、波棱瓜子、大黄、苦蕒菜、木香、兔耳草、唐古特乌头、角茴香、甘草、金钱草、诃子、黄芪等多味药材组成,具有清热解毒,疏肝利胆、利湿退黄之功能,用于急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎属肝胆湿热证者。根据处方各药味理化性质结合本方功效,课题组前期以蒽醌类等有效成分为指标,对处方中刺山柑等药味进行了乙醇提取工艺研究^[1]。本文继以甘草酸铵含量、没食子酸含量、浸膏得率为综合评价指标,采用单因素

试验设计和 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对方中甘草、黄芪、金钱草、诃子的水提取工艺进行优化,为该制剂的制备工艺提供支持。

1 材料与仪器

1.1 试验材料

甘草酸铵、没食子酸对照品(均由中国药品生物制品检定所提供,批号依次为 110731-200614、110818-200404);诃子等药材购自安徽亳州中药材公司,经检验符合相应的药材质量标准。甲醇为美国 Fisher 公司产色谱纯,醋酸铵、冰醋酸等试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津制造所),包括 LC-10ATVP 二元高压泵,SPD-10AVP 紫外检测器,CTO-10ASVP 柱温箱,SCL-10AVP 系统控制器;LibrorAEG-200 电子天平(日本岛津制造所);Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司);LS-3120 超声波发生器(美国科学系统公司)。

2 方法与结果

2.1 甘草酸铵含量测定方法^[2]

2.1.1 色谱条件 Diamonsil 柱(250 × 4.6 mm, 5 μm);甲醇-0.2 mol·L⁻¹醋酸铵-冰醋酸(67:33:1)为流动相;柱温:30 ℃;检测波长为 250 nm;流速 1 ml·min⁻¹。理论板数按甘草酸峰计算应不低于 2500。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草酸铵对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 含 0.176 mg 的溶液(折合甘草酸为 0.1724 mg),摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取水煎液,滤过(0.45 μm 微孔滤膜),取续滤液 1 ml,置 5 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 没食子酸含量测定方法^[3]

2.2.1 色谱条件 Diamonsil 柱(250 × 4.6 mm, 5 μm);甲醇-0.05% 磷酸(5:95)为流动相;柱温:30 ℃;检测波长为 273 nm。流速 1 ml·min⁻¹;理论板数按没食子酸峰计算应不低于 2500。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的没食子酸对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 含 10.4 μg 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取水煎液,滤过(0.45 μm 微孔滤膜),取续滤液 1 ml,置 5 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 浸膏得率测定

精密吸取提取液 50 ml,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃干燥至恒重,取出,迅速置干燥器中冷却,称重,按下式计算。浸膏得率 = 干浸膏重量/药材重量 × 100%。

2.4 评分计算方法

各因素评分计算方法:甘草酸铵评分 = (甘草酸铵含量/最大甘草酸铵含量) × 40%;没食子酸评分 = (没食子酸含量/最大没食子酸含量) × 40%;浸膏得率评分 = (浸膏得率/最大浸膏得率) × 20%

综合评分计算方法:综合评分 = 甘草酸铵评分 + 没食子酸评分 + 浸膏得率评分

2.5 单因素试验

2.5.1 加水量考察 按处方比例称取甘草、金钱草(酌余断碎)、诃子、黄芪,分别加 6 倍、8 倍、10 倍、12 倍量水,提取 2 次,每次 2 小时,测定甘草酸铵含量、没食子酸含量和水浸出物量,并计算综合评分。溶剂量对甘草酸铵的提取率影响较大,随着溶剂量的增加,提取率呈上升趋势,当溶剂量在 10 倍以上时,影响趋于稳定;当溶剂量在药材量的 8 倍以上时,对浸膏得率的影响不大;另外,随着溶剂量的增加,没食子酸的提取率呈现先增加后稳定并略微下降的趋势,总体趋于平衡。就综合评分看,在 10 倍量溶剂时综合评分最高,综合考虑各因素的相互影响,确定采用 8~12 倍量溶剂进一步进行正交试验设计,优化提取工艺。见表 1。

2.5.2 提取时间考察 按处方比例称取甘草、金钱草(酌余断碎),诃子,黄芪,加 8 倍量水,提取 2 次,分别提取不同时间,测定甘草酸铵含量、没食子酸含量和水浸出物量,并计算综合评分。提取时间对没食子酸的提取率影响较大,随着溶剂量的增加,提取率呈上升趋势,当提取时间在 1.5 小时以上时,影响趋于稳定;提取时间在 1.0 小时以上时,对浸膏得率的影响不大;另外,随着溶剂量的增加,甘草酸铵的提取率呈现先增加后稳定并略微下降的趋势,可能是复方中发生成分相互作用,其机理有待于进一步阐明。就综合评分看,在提取时间达 1.5 小时时综合评分最高,综合考虑各因素的相互影响,确定采用 1.0~2.0 小时进一步进行正交试验设计,优化提取工艺。见表 2。

2.5.3 提取次数考察 按处方比例称取甘草、金钱草(酌余断碎),诃子,黄芪,总共加 20 倍量水,分别提取不同次数,总共提取 2 小时,测定甘草酸铵含量、

表 1 加水量对甘草酸铵、没食子酸含量和浸膏得率的影响

溶媒倍数 (倍)	甘草酸铵含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	没食子酸含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	浸膏得率 [% (评分)]	综合评分
6	6.41 (17.20%)	19.14 (24.34%)	21.92 (12.87%)	54.41%
8	10.17 (27.34%)	24.09 (30.64%)	33.32 (19.51%)	77.49%
10	14.70 (39.52%)	31.45 (40.00%)	33.81 (19.86%)	99.38%
12	14.88 (40.00%)	28.33 (36.03%)	34.05 (20.00%)	96.03%

表 2 提取时间对甘草酸铵、没食子酸含量和浸膏得率的影响

提取时间 (小时)	甘草酸铵含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	没食子酸含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	浸膏得率 [% (评分)]	综合评分
0.5	7.62 (29.35%)	19.50 (28.46%)	25.56 (15.85%)	73.66%
1.0	10.88 (40.00%)	21.08 (30.77%)	29.40 (18.23%)	89.00%
1.5	10.43 (39.74%)	25.79 (37.64%)	32.25 (20.00%)	97.37%
2.0	9.14 (34.84%)	27.41 (40.00%)	32.25 (20.00%)	94.84%

表 3 提取次数对甘草酸铵、没食子酸含量和浸膏得率的影响

提取次数 (次)	甘草酸铵含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	没食子酸含量 [mg·g ⁻¹ (评分)]	浸膏得率 [% (评分)]	综合评分
1	10.41 (31.88%)	17.88 (26.44%)	28.12 (17.52%)	75.84%
2	11.09 (33.97%)	26.21 (38.76%)	31.10 (19.37%)	92.10%
3	13.06 (40.00%)	27.05 (40.00%)	32.10 (20.00%)	100.00%

没食子酸含量和水浸出物量,并计算综合评分。提取次数对没食子酸的提取率影响较大,随着提取次数的增加,提取率呈上升趋势,当提取次数在 2 次以上时,影响趋于稳定;提取次数对浸膏得率和甘草酸铵的影响不显著。就综合评分看,综合评分随提取次数的增加呈现上升趋势,考虑大生产的可操作性和控制成本,综合考虑各因素的相互影响,确定采用 1~3 次进一步进行正交试验设计,优化提取工艺。见表 3。

2.6 水提取正交试验^[4]

2.6.1 因素水平安排 在单因素试验结果基础上,考察提取次数(A)、提取时间(B)、加水量(C)三个因素对甘草酸铵含量、没食子酸含量及浸膏得率的影响。按 L₉(3⁴)正交表设计试验,见表 4。

表 4 L₉(3⁴)正交试验的因素水平表

水平	A	B	C
	A 提取次数/%	提取时间/h	加水量/倍
1	1	1.0	8
2	2	1.5	10
3	3	2.0	12

2.6.2 正交试验结果 实验结果见表 5,方差分析见表 6。

从直观分析知,各因素对综合评分的影响大小顺序为:A(提取次数)>B(提取时间)>C(加水量);每个因素三个水平之间的趋势为 A₃>A₂>A₁, B₃>B₁>B₂, C₂>C₁>C₃,直观分析得提取工艺为 A₃B₃C₂,即加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 2 小时。方差分析结果表明:A 因素的影响具有显著性(P<

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	甘草酸含量 /mg·g ⁻¹	没食子酸含量 /mg·g ⁻¹	浸膏得率 /%	综合评分 /%
1	1	1	1	1	5.76	10.38	19.42	43.84
2	1	2	2	2	6.94	9.04	19.67	44.37
3	1	3	3	3	7.15	15.08	24.37	58.68
4	2	1	2	3	6.37	17.28	28.55	63.05
5	2	2	3	1	5.62	12.13	20.35	47.26
6	2	3	1	2	7.82	16.78	30.81	66.87
7	3	1	3	2	10.39	19.66	30.87	78.68
8	3	2	1	3	11.59	20.95	36.93	87.22
9	3	3	2	1	16.15	21.26	38.68	100.00
K1	146.89	185.57	193.93	191.10				
K2	177.18	178.85	207.42	189.92				
K3	265.90	225.55	184.62	208.95				
R	119.01	46.70	22.80	15.92				

表 6 $L_9(3^4)$ 正交试验的方差分析结果

变异来源	离差平方和/SS	自由度/γ	方差/MS	F	显著性/P
A	2550.2336	2	1275.1168	26.8100	<0.05
B	424.9338	2	212.4694	5.6064	>0.05
C	87.4507	2	43.7253	1.1538	>0.05
D	75.7951	2	37.8975		
总变异	3138.4182	8			

注： $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

0.05), B 和 C 因素的影响均不显著 ($P > 0.05$), 结合单因素试验结果, 从大工业生产和节能降耗等综合考虑, 以 $A_3B_1C_1$ 组合为佳。由于优选的工艺未包括在正交设计表的 9 次试验中, 故对其进行了验证实验, 结果见表 7。

三次验证试验结果表明, 所测各项指标均高于正交试验的结果。说明筛选的工艺可行。故最终优化的水提工艺为: 甘草、金钱草、诃子、黄芪四味, 加水 8 倍量提取 3 次, 每次 1 小时。

表 7 $L_9(3^4)$ 正交试验优选工艺的验证试验结果

次数	甘草酸铵含量 (mg/g)	没食子酸含量 (mg/g)	浸膏得率 (%)
1	24.45	11.51	26.19
2	19.01	11.30	30.66
3	18.78	12.04	30.10

3 讨论

3.1 采用水提取的依据

本文采用水为溶剂复方共煎, 主要兼顾了处方各药味所含化学成分的理化性质及其与功能主治的相关性。甘草中主要有效成分为甘草酸, 而其 α 体甘草酸二铵具有治疗慢性乙型肝炎作用^[5], 对人肝癌细胞 SMMC-7721 具有明显细胞毒性和抑制增殖作用^[6]; 诃子中总酚类化合物对抗氧化活性呈良好的线性相关^[7]; 黄芪中黄芪甲苷及黄芪多糖可抑制人肝癌细胞株的增殖, 诱导肝癌细胞凋亡^[8]。金钱草水提取液具有清热解毒、利尿排石、活血散瘀之功效, 用于肝、胆结石、胆囊炎、黄疸性肝炎。根据上述四味药所含有有效成分的理化性质及其药理学特点, 确定采用水提取, 结合其临床曾以汤剂复方煎煮的用药习惯, 本文选择复方共煎。

3.2 考察指标在综合评分中的权重分配

中药复方的化学成分非常复杂,采用单个指标成分或活性成分难以全面反映提取工艺的优劣,本文对药效明确的药味采用化学成分,如甘草中的甘草酸铵和诃子中的没食子酸为考察指标。但此两种成分并不能够完全代表有效成分,所以同时结合复方药物的特点,采用浸膏得率为考察指标,兼顾了现代研究和传统复方的优势,并根据相对贡献值分配权重。通过上述考察指标,使工艺考察紧扣处方功能主治,保证了临床有效性。

参 考 文 献

- [1] 焦胜春, 杨飞, 杨伟俊, 等. 复方刺山柑胶囊提取工艺的优化[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2169-2171.
- [2] 黄富宏, 王健, 茅渊, 等. 高效液相色谱法测定小青龙颗粒中甘草酸铵含量[J]. 中国药业, 2012, 21(21): 28-29.
- [3] 张雅, 曹蔚, 谢艳华, 等. HPLC 法测定复方烧伤膏中没食子酸的含量[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 425-426.
- [4] 杨伟俊, 薛桂莲, 邢建国, 等. 秋水仙风湿滴丸的成型工艺研究及体外溶出度测定[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1240-1242.
- [5] 李光学, 丁原凤. 肝炎灵联合甘草酸二铵治疗慢性乙型肝炎的临床效果观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(36): 250-251.
- [6] 张剑锋, 李浩, 李超乾, 等. 甘草酸二铵对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖和 p53 表达的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(27): 2852-2853, 2856.
- [7] Harpreet Walia, Rajbir Singh, Subodh Kumar, et al. Effect of fractionation on antiradical efficacy of ethyl acetate extract of Terminalia chebula Retz[J]. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2010, 4(5): 276-285.
- [8] 吴强, 杨雁, 薛绍礼, 等. 黄芪总苷对肝星状细胞增殖和合成胶原的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(8): 892.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 204-205.

(收稿日期:2013-04-15)

(本文编辑:张磊)

基于共享系统研究血小板聚集率对针刺治疗中风偏瘫疗效的影响

刘丹 张鑫鑫 王舒 孟智宏 郑健刚 高旻 高淑红 路明 赵红 韩宝杰
马涛 于涛

【摘要】 目的 基于中医药临床科研信息共享系统采集的临床病例资料,探讨血小板聚集率水平对中风偏瘫患者针刺疗效的影响。**方法** 依据入院时第一次血小板聚集率将患者分为血小板聚集率降低组、血小板聚集率正常组和血小板聚集率升高组,观察 3 组患者入院第一天、第一周、第二周的卒中患者运动功能评估量表(motor assessment scale, MAS)、美国国立卫生研究院卒中量表(national institutes of health stroke scale, NIHSS)、日常生活能力评定量表(barthel index, BI)评分。**结果** 采用重复测量方差分析三组针刺治疗前后 MAS、NIHSS、BI 量表评分变化,各组均较治疗前有所改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。非参数检验对每组治疗前后量表评分差值进行分析,结果显示血小板聚集率正常组的运动功能和神经功能改善均优于其他两组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 血小板聚集率正常有利于提高针刺疗效。

【关键词】 中医药临床科研信息共享系统; 中风; 偏瘫; 血小板聚集率; 卒中患者运动功能评估量表; 美国国立卫生研究院卒中量表; 日常生活能力评定量表

基金项目:国家中医药管理局 2012 年中医药行业科研专项(201207001-10)

作者单位:天津中医药大学第一附属医院针灸部

作者简介:刘丹(1986 -),女,医师,硕士。研究方向:针灸学。E-mail:momo_8080_303@163.com

通讯作者:王舒(1965 -),博士,主任医师,教授,博士生导师,中国针灸学会实验针灸分会副主任委员、中华中医药学会博士学术研究会常委。研究方向:针灸学。E-mail:wangs2008@163.com。于涛(1972 -),博士,主任医师,硕士生导师,中国针灸学会临床分会理事。研究方向:针灸学。E-mail:doctoryutao@163.com。王舒、于涛并列本文通讯作者。