

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.20.003

正交试验设计优选肝纤颗粒水提工艺*

卢雪盈¹, 彭怡文¹, 姜新根¹, 王玉梅¹, 赵金花¹, 张尚斌², 陈剑平², 胡世平^{1△}

(1. 广东省深圳市龙岗区中医院, 广东 深圳 518172; 2. 广东省深圳市中医院·深圳市医院中药制剂研究重点实验室, 广东 深圳 518033)

摘要:目的 优选肝纤颗粒的水提工艺。方法 采用单因素法考察先煎药材的粉碎粒度和提取时间,以固形物质量为评价指标优选先煎工艺;采用正交试验考察加水倍数、提取时间、提取次数等影响因素,以丹酚酸B含量和总固形物质量为评价指标,综合加权评分法优选水提工艺。结果 优选工艺为醋鳖甲粉碎成最粗粉,加10倍量水,先煎30 min;加入其余药材,加10倍量水,提取2次,每次1 h。按优选工艺进行验证试验的综合评分平均值为95.20%,与正交试验综合评分最大值结果接近。结论 优选的工艺科学合理,简便可行,稳定性好。

关键词:肝纤颗粒;水提工艺;先煎工艺;正交试验;指标成分;固形物

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)20-0009-04

Optimization of Water Extraction Process of Ganxian Granules by Orthogonal Array Design

LU Xueying¹, PENG Yiwen¹, JIANG Xingen¹, WANG Yumei¹, ZHAO Jinhua¹, ZHANG Shangbin², CHEN Jianping², HU Shiping¹

(1. Shenzhen Longgang Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518172; 2. Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518033)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of Ganxian Granules. Methods The single factor method was used to investigate the crushing granularity and extraction time of the medicinal herbs decocted first, and the quality of the solid was taken as the evaluation index to optimize the first decoction process. The orthogonal test was used to investigate the influencing factors such as water content, extraction time and extraction times. The content of salvianolic acid B and the quality of total solid were taken as evaluation indexes to optimize the water extraction process by synthetical weighted mark method. Results The optimum extraction process was as follows: crushing vinegar turtle shell into the crudest powder, adding 10 times water and decocting for 30 min, then adding other medicinal herbs and 10 times water, extracting twice, 1 h each time. The average synthetic weighted value of validation test according to the optimum process was 95.20%, which was close to the maximum synthetic weighted value of the orthogonal test. Conclusion The optimized process is scientific, reasonable, simple and feasible with good stability.

Key words: Ganxian Granules; water extraction process; process of decoction first; orthogonal test; index components; solids

肝纤方又名益肝化瘀方,是深圳市龙岗区中医院胡世平主任医师的临床经验方,具有疏肝理气、活血化瘀、健脾祛湿的功效,主要用于治疗慢性肝纤维化、慢性肝病及终末期肝病,对兼有湿浊、血瘀等证疗效显著。为了方便服用并保证原方疗效,医院将其进一步研制成质量可控的中药颗粒剂。本研究中先确定醋鳖甲的先煎工艺,再采用正交试验对提取工艺进行优化。由于丹参中的丹酚酸B具有抗纤维化作用^[1],故以丹酚酸B为含量测定指标,并综合总固形物质量为评价指标。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪,包括柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、LC solution 色谱工作站(日本岛津公司);AUW220D型电子天平(十万分之一,日本岛津公司);CQ-250-DST型超声波清洗机

(上海跃进医用光学器械厂);LD5-2A型低速离心机(北京京立离心机有限公司)。

1.2 试药

柴胡、当归、赤芍、白芍、醋莪术、醋鳖甲、丹参、醋香附、党参、麸炒苍术、白术、茯苓、泽泻、黄芪、垂盆草、叶下珠、醋青皮、陈皮(深圳华辉药业有限公司,批号分别为171104, 20171102, 17061001, 17112901, 17110601, 17091001, 17121001, 1711083, 17112601, 20171018, 171101, 171101, 1704001, 20171202, 170901, 17051101, 170701, 1709030302),均经深圳市中医院张尚斌主任中药师鉴定为正品;丹酚酸B对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111562-201716,含量以94.1%计);乙腈为色谱纯(默克公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 先煎提取工艺考察^[2]

因方中含有醋鳖甲药味,按传统工艺煎煮提取要求,

*基金项目:广东省深圳市科技计划项目[ZDSYS201606081515458]。

第一作者:卢雪盈,女,大学本科,中药师,研究方向为中药制剂学,(电子信箱)marsonone@163.com。

△通信作者:胡世平,男,博士研究生,主任医师,研究方向为中医肝病,(电话)0755-89918129。

需对其进行先煎考察。故本研究中采用单因素考察法,加水单煎醋鳖甲制得先煎考察样品,以水溶性固形物质量为评价指标,分别对药材粉碎粒度和提取时间进行考察。

水溶性固形物质量的测定^[3]:精密量取各样品溶液50 mL,置已恒重的蒸发皿中,100 ℃水浴蒸干,于105 ℃干燥至恒重。按2015年版《中国药典(四部)》通则0831干燥失重测定法测定,计算固形物含量。

固形物含量(%) = (50 mL 浓缩液中固形物质量 × 250) / (醋鳖甲质量 × 250) × 100%

不同粉碎粒度的醋鳖甲单煎考察:取醋鳖甲的饮片、最粗粉、粗粉、中粉各50 g,精密称定,分别加水500 mL,煎煮1 h,过滤,浓缩,定容至250 mL,测定水溶性固形物质量,计算固形物含量。结果饮片煎煮所得固形物含量较低(8.21%),最粗粉(10.19%)、粗粉(9.88%)、中粉(10.95%)的固形物含量差异不大。

不同煎煮时间单煎考察:取醋鳖甲最粗粉5份,各50 g,精密称定,加水500 mL,分别煎煮0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h,过滤,浓缩,定容至250 mL,测定水溶性固形物质量,计算固形物含量。结果固形物含量分别为10.19%, 10.82%, 10.72%, 10.43%。可见,煎煮0.5 h后对固形物含量的影响差异不大。

综合固形物含量及时间成本等因素,醋鳖甲先煎提取优选工艺的粉碎粒度为最粗粉,先煎时间为0.5 h。

2.2 水提取工艺考察

2.2.1 因素水平

根据前期预试验结果,分别以加水倍数(因素A)、提取次数(因素B)、煎煮时间(因素C)为考察因素,每个因素各取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,以丹参中丹酚酸B含量和总固形物质量为评价指标,进行优选。因素水平设计见表1。

2.2.2 样品制备

按优选的先煎工艺条件,对醋鳖甲进行先煎提取,在醋鳖甲先煎提取液与药渣中,加入丹参、黄芪等17味药材,按表1所示正交试验因素水平表进行提取,滤过,合并滤液,滤液全部浓缩至约300 mL,用少量蒸馏水清洗浓缩锅多次,全部转移至500 mL容量瓶中,定容,摇

表1 因素水平表

水平	因素 A(倍)	因素 B(次)	因素 C(h)
1	8	1	1.0
2	10	2	1.5
3	12	3	2.0

匀,取适量浓缩液,4 500 r/min 离心5 min,取上清液,测定丹酚酸B含量和总固形物质量。

2.2.3 总固形物测定^[4]

精密量取样品50 mL,置已恒重的蒸发皿,在水浴上蒸干后,参照2015年版《中国药典(四部)》通则2201浸出物测定法,于105 ℃下干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,立即称定质量,按公式计算总固形物含量。

总固形物质量(g) = (50 mL 浓缩液中固形物质量 / g × 500 mL) / 50 mL

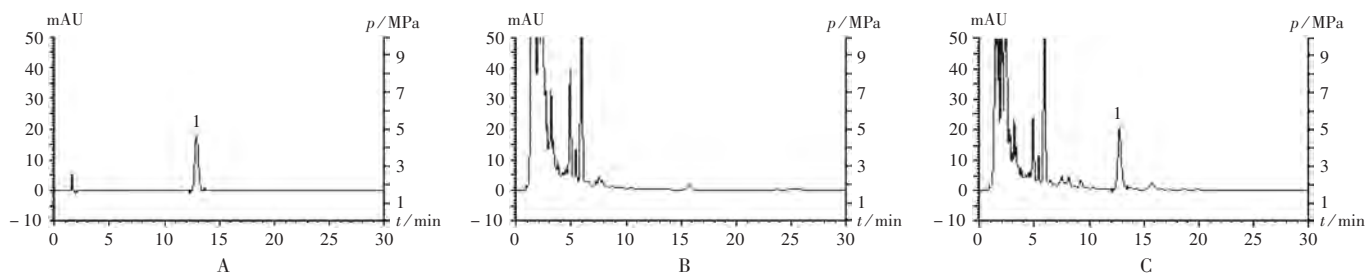
2.2.4 丹酚酸B含量测定

色谱条件^[5]:色谱柱为Inertsil ODS-SP柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(22:78, V/V);流速为1.2 mL/min;二极管阵列检测器,检测波长为286 nm。

溶液制备:取丹酚酸B对照品适量,精密称定,加80%甲醇溶解并制成每1 mL含丹酚酸B约1 mg的溶液,摇匀,即得对照品溶液。取2.2.2项下的样品溶液适量,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按优选的先煎工艺条件,对醋鳖甲进行先煎提取,在醋鳖甲先煎提取液与药渣中,加入黄芪等16味药材(除丹参外),加10倍量水,提取2次,每次2 h,制得不含丹参的阴性对照样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

专属性试验:取上述3种溶液各10 μL,按拟订色谱条件进样测定。结果阴性对照品溶液色谱中,在与丹酚酸B、供试品溶液色谱相应位置上无色谱峰出现,表明方法专属性良好(见图1)。

线性关系考察:精密吸取对照品溶液(1 060 μg/mL),加80%甲醇制成每1 mL含1 000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60, 40, 20 μg的溶液。按拟订色谱条件进样,测得峰面积。以进样量(X, μg)为横坐标、峰面积(Y)为纵



1. 丹酚酸B

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,065\,467.411X - 23\,845.970$, $r = 0.999\,9$ ($n = 10$)。结果表明,丹酚酸 B 进样量在 $0.103\,6 \sim 4.144\,0\,\mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度、重复性、稳定性及回收率试验:按相关方法进行的操作,结果精密度、重复性、稳定性(24 h)试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$),平均加样回收率为 98.85% ,表明该方法稳定、可行。

2.2.5 水提正交试验结果

采用综合加权评分法^[4],以总固形物质量和丹酚酸 B 含量 9 次试验的最大值为 100 分,将各指标成分的总量转换为评分值,考虑到丹参在处方中为君药,故总固形物质量和丹酚酸 B 含量的加权系数分别设为 0.5,进行综合评价,筛选最佳工艺。结果见表 2 和表 3。

表 2 正交设计试验结果

序号	因素 A (倍)	因素 B (次)	因素 C (h)	因素 D (空白)	固形物质量 (g)	丹酚酸 B 含量 (mg)	综合评分 (分)
1	8	1	1	1	34.31	124.52	59.09
2	8	2	1.5	2	52.02	163.01	83.19
3	8	3	2	3	50.92	183.34	87.17
4	10	1	1.5	3	48.32	127.87	71.69
5	10	2	2	1	57.06	208.98	98.53
6	10	3	1	2	58.78	192.22	95.99
7	12	1	2	2	43.47	184.76	81.18
8	12	2	1	3	54.05	206.65	95.42
9	12	3	1.5	1	58.08	202.63	97.88
K_1	228.98	211.48	249.93	255.15			
K_2	265.56	276.55	252.41	259.80			
K_3	274.08	280.60	266.28	253.68			
R	15.03	23.04	5.45	2.04			

注:综合评分 = (丹酚酸 B 含量/丹酚酸 B 最大含量) $\times$ 50 + (固形物质量/最大固形物质量) $\times$ 50。 Y 为综合评分值平均数。

表 3 方差分析结果

因素	SS	f	S	F	P
A(倍)	382.68	2.00	191.34	56.11	>0.10
B(次)	1\,003.05	2.00	501.52	147.06	<0.05
C(h)	51.77	2.00	25.89	7.59	>0.10
D(误差)	6.82	2.00	3.410 4		

注: $F_{0.10(2,2)} = 9.00$, $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

可见,提取条件以 $A_3B_3C_3$ 为佳。方差分析结果表明,提取次数对丹酚酸 B 含量和总固形物质量具显著性差异,且差异主要来源于第 1 水平与第 2 水平,而第 2 水平与第 3 水平差异不显著,故选择第 2 水平,即提取 2 次。综合考虑,各因素影响水平为提取次数(B) $>$ 加水量(A) $>$ 提取时间(C),综合考虑到缩短生产周期、降低生产成本等,故确定优选提取工艺为黄芪、丹参等 17 味药材,加 10 倍量水,提取 2 次,每次 1 h。

2.3 验证试验

为验证水提工艺的可行性,进行 3 批重复验证试验。每批称取黄芪、丹参等 18 味药材,照先煎工艺优选结果和正交试验最佳提取工艺条件进行提取,并测定水提液中丹酚酸 B 和总固形物质量,计算综合评分值。结果见表 4。可见,3 次平行试验的干膏得率的平均值为 31.25% ,平均综合评分为 95.20 分,与正交试验综合评分最大值的结果接近,提示所筛选的提取工艺条件基本稳定。

表 4 优选提取工艺验证试验结果

试验号	固形物质量(g)	固形物得率(%)	丹酚酸 B 含量(mg)	综合评分(分)
1	54.39	31.44	205.90	95.52
2	53.92	31.17	205.74	95.08
3	53.86	31.13	205.63	95.01
$\bar{X}$	54.06	31.25	205.76	95.20

3 讨论

3.1 提取工艺设计

肝纤方中有多味含挥发油成分的中药,但收集以水提取的挥发油量较少,根据挥发油提取预试验结果及处方中挥发油的性质分析,可能由于挥发油含量低、不稳定、水溶性大^[3]等因素,将所有药材直接用水提取,成本低、安全性高,且与传统工艺相契合^[6]。

本研究中采用单因素试验法考察醋鳖甲先煎工艺、以正交试验法考察水提工艺,2 种方法结合研究该处方的提取工艺,一方面可明显缩短研究的时间,降低研究成本;另一方面可保证原方的提取效果^[7],尽可能与传统工艺保持一致,从而为充分发挥临床疗效提供基础。采用正交试验进行水提工艺优化,综合考虑提取过程的各种影响因素,明确各因素的影响程度和相互作用,获得诸因素各水平的最佳搭配,结合实际生产优选最佳工艺条件。预试验结果表明,当水提液浓缩至相对密度大约为 1.20(70 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$)时,与辅料(糊精、蔗糖粉)混合,利于颗粒的成型,颗粒外观、均一度、成型率和溶化性等均符合药典标准,进一步提示该方水提工艺合理、可行。

3.2 指标成分选择与综合评分权重比例

丹参为方中君药,结合预试验结果,指标成分选择其水溶性有效成分丹酚酸 B。测定方法参照药典方法,结果丹酚酸 B 色谱峰分离良好,与其他成分不互相干扰,保留时间适中。曾考察以丹酚酸 B 和丹参酮为正交试验的指标成分,建立多指标成分评价方法,综合优选水提工艺。但由于丹参酮为脂溶性成分,在水提液中含水量较低,故最终仅选取丹酚酸 B 作为正交试验的指标成分。同时,试验过程中发现丹酚酸 B 受热易分解^[8],因此供试品处理后应及时测定丹酚酸 B 含量,避免产生误差。

中药制剂的提取工艺正交试验多以干膏率为指标,其方法多数参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0831