

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.021

正交试验设计法优选六高康颗粒水提工艺*

黄庆宝¹, 黄诗莹^{1,2}, 陈剑平¹, 张尚斌^{1,2}, 谢静静², 张剑勇^{2△}

(1. 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; 2. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518033)

摘要:目的 优选六高康颗粒的水提工艺。方法 以高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)法测定落新妇苷的含量;以落新妇苷的含量及出膏率为评价指标,以煎煮时间、加水倍数、煎煮次数为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法筛选六高康方的最佳提取工艺并进行验证。结果 落新妇苷质量浓度在4.84~154.75 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9994$)范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率为102.73%, RSD 为1.95% ($n=9$);最佳提取工艺为煎煮3次,每次加8倍量水,每次煎煮45 min;验证试验结果显示,落新妇苷平均含量为64.17 $\mu\text{g/mL}$,平均出膏率为25.12%。结论 优选的水提工艺重复性好、稳定可行。

关键词:六高康颗粒;落新妇苷;干膏率;正交试验;水提工艺

中图分类号:R932;TQ460.6;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)07-0074-04

Optimization of Water Extraction Process for Liugaokang Granules by Orthogonal Experiment

HUANG Qingbao¹, HUANG Shiyang^{1,2}, CHEN Jianping¹, ZHANG Shangbin^{1,2}, XIE Jingjing², ZHANG Jianyong²

(1. Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation · Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518033; 2. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518033)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of Liugaokang Granules. Methods The content of astilbin was determined by high performance liquid chromatography-diode array detector(HPLC-DAD). The extraction yield rate of astilbin was used as comprehensive evaluation index. $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to screen the optimal extraction technology of Liugaokang Granules with decoction time, water volume and decoction times as factor. Validation test was also performed. Results The excellent linearity with

*基金项目:中央引导地方科技发展专项资金项目[2016-14];广东省深圳市科技计划项目[JCYJ20170817094922513]。

第一作者:黄庆宝,男,大学本科,主管中药师,研究方向为中药制剂生产工艺及质量控制,(电子信箱)aice29@163.com。

△通信作者:张剑勇,男,博士研究生,教授,主任医师,研究方向为中医药治疗风湿病,(电子信箱)13823396319@163.com。

经国家批准,因而对肝酶产生作用的可能性不大。故最终选择帕罗西汀药品作为本研究中的选择性抑制剂。

参考文献:

- [1] 张奉春. 环氧化酶-2 特异性抑制剂[J]. 中国药学杂志, 2011(11):875-876.
- [2] XU HY, ZHANG P, GONG AS, et al. Formation of 4'-carboxyl acid metabolite of imrecoxib by rat liver microsomes[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2006, 27(4):506-512.
- [3] XU H, ZHANG Y, SUN Y, et al. Metabolism and excretion of imrecoxib in rat [J]. Xenobiotica, 2006, 36(5):441-455.
- [4] CHEN XH, BAI JY, SHEN F, et al. Imrecoxib: a novel and selective cyclooxygenase-2 inhibitor with anti-inflammatory effect [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(7):927-931.
- [5] 段桂花, 陈福新. 帕罗西汀与抗精神病药物的相互作用[J]. 四川精神卫生, 2013, 26(2):141-144.
- [6] 张家堂, 高玉明. 米塔扎平和帕罗西汀的新剂型的药理学和临床评价[J]. 海军总医院学报, 2009, 22(4):227-229.
- [7] AZUMA J, HASUNUMA T, KUBO M, et al. The relationship between clinical pharmacokinetics of aripiprazole and CYP 2D6 genetic polymorphism: effects of CYP enzyme inhibition by coadministration of paroxetine or fluvoxamine [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2012, 68(1):29-37.
- [8] JURICA J, ZOURKOV ÁA. Dynamics and persistence of CYP 2D6

inhibition by paroxetine[J]. J Clin Pharm Ther, 2013, 38(4): 294-300.

- [9] ZOURKOV ÁA, HADASOV ÁE. Paroxetine-induced conversion of cytochrome P450 2D6 phenotype and occurrence of adverse effects [J]. Gen Physiol Biophys, 2003, 22(1):103-113.
- [10] 李海菊, 王峰, 李煥德. 新型抗抑郁药的代谢与细胞色素 P450 介导的药物相互作用[J]. 中国临床药理学, 2004, 20(5): 392-394.
- [11] KHOJASTEH SC, PRABHU S, KENNY JR, et al. Chemical inhibitors of cytochrome P450 forms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 form selectivity[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2011, 36(1):1-16.
- [12] DALY AK. Pharmacogenetic of the major polymorphism metabolizing enzymes[J]. Clin Pharmacogenetic, 2003, 35(17):27-41.
- [13] 管晓波, 陆峥. 新型抗抑郁药物的药物相互作用[J]. 世界临床药物, 2012, 33(7):395-400.
- [14] XU HY, XIE ZHY, ZHANG P, et al. Role of rat liver cytochrome P450 3A and 2D in metabolism of imrecoxib[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2006, 27(3):372-380.
- [15] 李强, 黄海华, 董宇, 等. 采用重组人源 CYP 酶研究艾瑞昔布的体外羟基化代谢[J]. 药学学报, 2005, 40(10): 912-915.

(收稿日期:2019-08-22)

correlation coefficients were 4.84 – 154.75 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 4$), and the average recovery of astilbin was 102.73%, RSD was 1.95% ($n=9$). The optimal extraction process was extracting 3 times, adding 8 folds of water, 45 min each time. The results of validation test showed that the average extraction rate of astilbin was 64.17 $\mu\text{g/mL}$; the yield rate was 25.12%. **Conclusion** The optimized water extraction process is reproducible, stable and feasible.

Key words: Liugaokang Granules; astilbin; extraction yield rate; orthogonal experiment; water extraction process

痛风患者常合并有其他疾病,如高血压、糖尿病、高脂血症、肥胖等^[1]。深圳市中医院张剑勇教授根据多年风湿病临证经验,在代谢综合征(MS)的基础上提出“痛风六高症”学说,临床表现为高尿酸血症(痛风)、高体重(肥胖)、高血压(高血压病)、高血糖(糖尿病)、高脂(高脂血症)等症。六高康方具有泄浊利湿、消积排毒、润肺健脾、补益肝肾、标本兼治的功效,治疗痛风疗效明确且可改善其他代谢指标^[2-3]。但本方在使用前需先进行煎煮,使用和携带都不方便。颗粒剂具有载药量大、吸收快、稳定性好、服用和携带方便等优点^[4],可弥补汤剂的不足,故本研究拟将其开发成颗粒剂。查阅文献^[5-6],君药土茯苓中有效活性成分落新妇苷具有泄浊解毒、通利关节功效,与六高康方的治疗功效相符。此外,干膏率可反映其他成分的溶出程度^[7-8]。故本研究中选择落新妇苷含量及干膏率作为评价指标,采用正交试验法对该方的水提过程中加水倍数、煎煮时间、煎煮次数等影响因素进行考察,优选出六高康方的水提工艺,为该院内制剂的提取工艺优化提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, SIL-20A 自动进样器); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 250 W, 40 kHz); EP 225SM-DR 型电子分析天平(瑞士 Pricisa 公司, 精度为十万分之一); GZX-9140MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司); HHS 型电热恒温水浴锅(上海博迅实业有限公司)。

1.2 试剂

土茯苓、百合、葛根、金钱草、玉米须、益母草、灵芝、炒决明子、山楂、炒牛蒡子、山慈菇、钩藤、刺五加、郁金、菊花、柴胡、天麻、山茱萸, 均购自深圳市华辉药业有限公司, 批号分别为 190213, 190117, 180911, 190120,

190210, 181211, 181225, 181208, 190112, 181125, 190118, 181203, 190118, 190215, 190115, 181209, 180211, 经深圳市中医院张尚斌主任中药师鉴定为正品。落新妇苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为 111798-201504, 纯度 93.9%); 水为纯化水, 冰醋酸为分析纯, 甲醇为色谱纯(默克公司)。

2 方法与结果

2.1 落新妇苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Sepax Bio-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(B)-0.1% 冰醋酸(A), 梯度洗脱(0~20 min 时 28% B, 20.01~23 min 时 28% → 90% B, 23.01~24 min 时 90% A → 28% B, 24~31 min 时 28% B); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 291 nm; 进样量: 5 μL ; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.2 溶液制备

样品溶液: 取处方量饮片, 每份 221 g, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验法进行提取, 趁热滤过, 浓缩, 放冷至室温, 加水定容至 500 mL, 备用。

供试品溶液: 精密量取样品溶液 1 mL, 加甲醇定容至 20 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

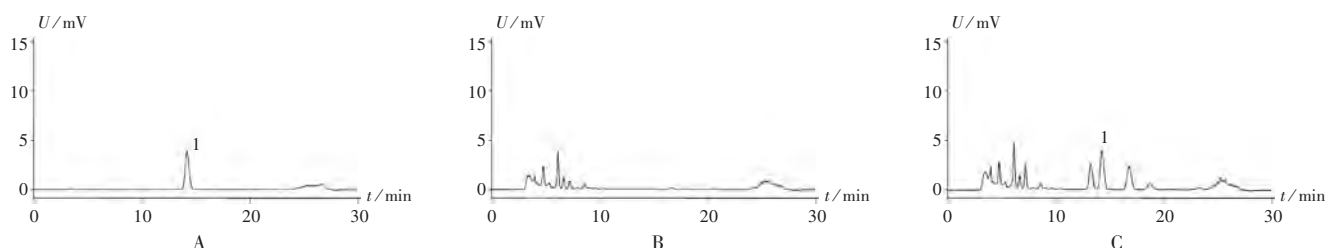
对照品溶液: 取落新妇苷 1.03 mg, 精密称定, 加甲醇溶液溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 即得。

阴性对照品溶液: 称取缺土茯苓的处方量, 按样品溶液提取方法制备样品溶液, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.1.2 项下对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 5 μL , 按拟订色谱条件进样测定。供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰, 而阴性对照无干扰。详见图 1。

标准曲线绘制: 精密量取落新妇苷对照品溶液适



1. 落新妇苷

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

量,加甲醇溶液逐级稀释,分别制得质量浓度为 4.84, 9.67, 19.34, 38.69, 77.37, 154.75 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,分别量取 5 mL,按拟订色谱条件进样测定,以落新妇苷峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 6\,286.01X - 14\,572.7$ ($r = 0.999\,4$, $n = 6$)。结果表明,落新妇苷质量浓度在 4.84 ~ 154.75 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。同时,以峰面积为噪音 3 倍($S/N = 3$)和 10 倍($S/N = 10$)的进样质量浓度分别测得检测限为 0.12 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.34 $\mu\text{g/mL}$ 。

精密度试验:精密量取同一落新妇苷对照品溶液,按拟订色谱条件连续进样 6 次,计算落新妇苷峰面积。结果落新妇苷峰面积的 RSD 为 0.87% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取样品溶液 1 mL,依法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样分析,计算峰面积。结果落新妇苷峰面积的 RSD 为 1.01% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:精密量取样品溶液 6 份,每份 1 mL,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,计算峰面积。结果落新妇苷的平均质量浓度为 54.065 2 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 1.55% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取质量浓度为 54.065 2 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液 1 mL,平行 9 份,分别加入低、中、高 3 组不同含量的落新妇苷对照品,加入量与落新妇苷含量比例分别为 0.5 : 1, 1 : 1, 1.5 : 1, 每组 3 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,测定峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 落新妇苷加样回收试验结果 ($n = 9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
54.065 2	25	79.703 5	102.55		
54.065 2	25	78.942 8	99.51		
54.065 2	25	78.970 8	99.62		
54.065 2	49	104.331 3	102.58		
54.065 2	49	104.678 2	103.29	102.73	1.95
54.065 2	49	104.779 7	103.50		
54.065 2	73	130.442 3	104.63		
54.065 2	73	130.424 0	104.60		
54.065 2	73	130.198 9	104.29		

2.2 干膏率测定

精密量取 2.1.2 项下水提溶液 50.00 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,精密称定质量,计算出膏率。出膏率(%) = $[(W \times 500) / 50.00 / 221] \times 100\%$,其中常数 221 为处方药材总质量, W 为 50.00 mL 浓缩液中固形

物质量。

2.3 正交试验设计

因素与水平:查阅相关文献及单因素试验结果^[7-8],采用正交试验设计法,以样品溶液中落新妇苷含量和干膏率为评价指标,对影响提取工艺的加水倍数(因素 A)、提取次数(因素 B)、提取时间(因素 C)进行优选,各因素水平见表 2。

表 2 因素水平表

水平	因素 A(倍)	因素 B(次)	因素 C(min)
1	8	1	45
2	10	2	60
3	12	3	90

正交试验结果:按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计试验,采用加权评分法分析试验结果,设定落新妇苷的含量加权系数为 0.6、干膏率的加权系数为 0.4,综合评分值 = (干膏率/干膏率最大值 $\times 0.4$ + 落新妇苷含量/落新妇苷含量最大值 $\times 0.6$) $\times 100$,结果见表 3 和表 4。由表 3 直观分析可得,综合各因素影响水平为 $B > C > A$,提取条件以 $A_3B_3C_3$ 为佳。为了验证直观分析结果,对试验数据进行了方差分析,方差分析结果表明,提取次数对水提工艺中干膏率和落新妇苷含量的影响有显著性差异。称取处方量饮片,对 $A_1B_3C_1$ 和 $A_3B_3C_3$ 2 个工艺进行比较验证试验。由见表 5 可见,两者正交试验方差分析结

表 3 正交试验设计及试验结果

序号	因素				干膏率 (%)	落新妇苷含量 ($\mu\text{g/mL}$)	综合评 分(分)
	A	B	C	D(误差)			
1	1	1	1	1	10.12	45.70	57.46
2	1	2	2	2	22.85	60.27	90.20
3	1	3	3	3	25.25	65.08	98.28
4	2	1	2	3	12.43	52.98	67.68
5	2	2	3	1	24.16	63.55	95.20
6	2	3	1	2	23.75	57.97	89.45
7	3	1	3	2	14.58	57.42	75.03
8	3	2	1	3	22.24	60.64	89.60
9	3	3	2	1	26.39	60.74	96.00
K_1	245.94	200.17	236.51	248.66			
K_2	252.33	275.00	253.88	255.56			
K_3	260.63	283.73	268.51	254.68			
R	14.69	83.56	32.00	6.90			

表 4 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	36.18	2	18.09	3.85	$P > 0.05$
B	1 406.31	2	703.15	149.55	$P < 0.05$
C	171.08	2	85.54	18.19	$P > 0.05$
D	9.40	2	4.70	1.00	

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$, $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

表5 优选提取工艺比较验证试验结果

提取工艺	干膏率(%)	落新妇苷含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	综合评分(分)
A ₁ B ₃ C ₁	25.21	64.33	97.52
A ₃ B ₃ C ₃	25.32	64.45	97.80

果差异不大。故从节省溶剂及节省时间考虑,确定最佳提取工艺为 A₁B₃C₁,即煎煮 3 次,每次加 8 倍量水,每次煎煮 45 min。

2.4 验证试验

为验证所得组合工艺的可行性,进行了 3 批验证试验。取处方量,按优选工艺进行提取,测定干膏率及落新妇苷含量。结果见表 6。可见,验证试验综合评分值的平均值为 97.23,表明正交试验优选的条件稳定可行,可作为六高康颗粒的提取工艺。

表6 工艺验证试验结果($n=3$)

序号	干膏率(%)	落新妇苷含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	综合评分(分)
1	25.36	64.23	97.66
2	24.98	63.58	96.48
3	25.02	64.69	97.56
$\bar{X}$	25.12	64.17	97.23

3 讨论

本方由 18 味中药材组方,根据前期药理研究表明^[9-14],方中主要药效活性成分为生物碱类、黄酮类及多糖类,以水溶性成分为主,考虑到各成分溶解性能和临床疗效,故选择以水为溶剂煎煮提取。

传统中药复方组分复杂,研究采用多指标成分考察提取工艺^[17-81]。臣药中天麻有效活性成分天麻素、对羟基苯甲醇,臣药钩藤中有效活性成分钩藤碱、异钩藤碱,佐药决明子中有效活性成分大黄酚、橙黄决明素,以上 3 种饮片中的有效活性成分含量较低,难以检测。同时对佐药葛根中有效活性成分葛根素进行测定,结果表明,与方中其他成分互相干扰,通过改变流速、调整流动相比比例及更换不同流动相进行洗脱,结果在相同保留时间内存在干扰,分离度低,均无显著效果,不能选择以上 4 种饮片中的有效活性成分作为提取工艺的指标成分^[15-19]。落新妇苷属黄酮苷类化合物,具有抗炎、免疫抑制、抑制排异反应、保肝护肾、抗氧化、镇痛、抗水肿、抗菌、抗糖尿病等多种药理活性,临床上可用于治疗痛风,其效果显著,且不良反应少^[20]。试验发现,君药土茯苓中落新妇苷分离度好,紫外吸收强,出峰位置无干扰,保留时间相对适中,故最终选取落新妇苷含量作为水提工艺的评价指标。

参考文献[7-8]与单因素试验结果可见,加水倍数、提取时间、提取次数 3 个因素对该处方的提取效率影响较大。因方中多为全草类、根茎类饮片,饮片吸水较多,故设置加水倍数的参数较大。正交试验结果显示,优选

的 3 个影响因素均为极值,但只有提取次数具有显著性。

综上所述,该方法操作简便,优选出的提取工艺稳定性好、可靠性强,可为六高康颗粒进一步开发成中药制剂提供重要参考。

参考文献:

- [1] 阎胜利,赵世华,李长贵,等. 山东沿海居民高尿酸血症及痛风五年随访研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(7):548-552.
- [2] 尚新伟. 六高康颗粒剂治疗痛风六高症的临床疗效观察[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [3] 尚新伟,张剑勇,谢静静. 六高康颗粒治疗痰瘀互结型痛风临床研究[J]. 中医学报,2017,32(229):1086-1089.
- [4] 李江. 中药新药开发学[M]. 北京:中国中医药出版社,2017:90-91.
- [5] 陈红梅,秀兰,吴占全,等. 土茯苓的化学与药理研究进展[J]. 中国民族医药杂志,2008,11(11):71-73.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:133-134,209,249.
- [7] 贾成友,李微,张传辉,等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J]. 中草药,2016,47(6):917-922.
- [8] 石征谷,谷江华,杨秀青,等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选糖肾清毒颗粒的提取工艺[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(3):577-582.
- [9] 冀麟麟,王欣,钟祥健,等. 山茱萸的化学成分及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技,2019,35(5):137-143.
- [10] 李军,蔡泓,王君明,等. 金钱草化学成分、药理作用及临床应用[J]. 中国老年学杂志,2017,37(24):6262-6264.
- [11] 罗林明,裴刚,覃丽,等. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(6):824-837.
- [12] 李琦,陈宇纵,辛海量. 山慈菇的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志,2014,32(4):250-253.
- [13] 楼陆军,罗洁霞,高云. 山楂的化学成分和药理作用研究概述[J]. 中国药业,2014,23(3):92-94.
- [14] 王建平,张海燕,傅旭春. 土茯苓的化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2013,25(1):42-44.
- [15] 李玉琪,袁婷婷,茅凤燕,等. 落新妇苷的药理活性及植物来源研究进展[J]. 中国药房,2017,28(19):2718-2723.
- [16] 周慧君. 天麻有效成分的药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医临床研究,2016,8(22):56-58.
- [17] 高晓宇,丁茹,王道平,等. 钩藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 天津医科大学学报,2017,23(4):380-382.
- [18] 李昕,潘俊娟,陈士国,等. 葛根化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国食品学报,2017,17(9):189-195.
- [19] 孔祥峰,臧恒昌. 决明子化学成分及药理活性研究进展[J]. 药学研究,2013,32(11):660-662.
- [20] 巧静,梁维萍,李琼,等. 土茯苓抗痛风作用研究进展[J]. 世界中医药,2018,13(11):2937-2940.

(收稿日期:2019-08-27)