

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.013

正交试验优选通癰颗粒提取工艺

陈 淼¹,李曙光²,杨淡梅³

(1. 中国人民解放军空军第九八六医院第二门诊点,陕西 西安 710054; 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; 3. 广东省深圳市药品检验研究院,广东 深圳 518057)

摘要:目的 优选通癰颗粒的提取工艺。方法 以加水量、提取时间、提取次数为考察因素,以毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷含量及干膏得率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选通癰颗粒的提取工艺。结果 最佳提取工艺为加8倍量水,提取3次,每次1.0 h。在此工艺下制备的样品中,毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷的平均含量分别为24.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和53.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$,平均干膏得率为17.21% ($n=3$)。结论 该提取工艺稳定、可行,可为通癰颗粒的工业化生产提供参考。

关键词:通癰颗粒; $L_9(3^4)$ 正交试验;毛蕊花糖苷;马钱苷;莫诺苷;提取工艺

中图分类号:R932;R284.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)11-0051-05

Optimization of Extraction Process of Tonglong Granules by the Orthogonal Test

CHEN Miao¹, LI Shuguang², YANG Danmei³

(1. Second Clinic, 986th Hospital of PLAAF, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518033; 3. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen, Guangdong, China 518057)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of Tonglong Granules. **Methods** The extraction process of Tonglong Granules was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the amount of water addition, extraction time and extraction times as the investigation factors, with the contents of verbascoside, loganin and morroniside and the dry extract yield rate as the evaluation indexes. **Results** The optimal extraction process was to add eight times the amount of water and exact for three times with 1.0 h every time. The average contents of verbascoside, loganin and morroniside in the samples prepared through this process were 24.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 53.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the average dry extract yield rate was 17.21% ($n=3$). **Conclusion** The extraction process is stable and feasible, which can provide a reference for the industrial production of Tonglong Granules.

Key words: Tonglong Granules; $L_9(3^4)$ orthogonal test; verbascoside; loganin; morroniside; extraction process

第一作者:陈淼,女,大学本科,药师,研究方向为中药制剂,(电子信箱)28638908@qq.com。

量稳定、可控,可为小儿哮喘巴布剂的制备提供参考。

参考文献

- [1] 刘 茜,刘永平. 穴位贴敷治疗慢性阻塞性肺疾病缓解期研究现状[J]. 实用中医药杂志,2016,32(6):630-632.
- [2] 郝桂彤,陈宇洲,李 姣. 脐疗糊剂制剂学研究进展[J]. 中华中医药杂志,2014,29(2):534-536.
- [3] 李保林,王建辉,黄露露,等. 中药凝胶贴膏的研究进展[J]. 医学综述,2019,25(2):380-384.
- [4] 刘 基,王 媚,王 露,等. 经皮给药系统研究进展[J]. 现代中医药,2018,38(6):156-159.
- [5] 董 礼,徐希明,余江南. 中药凝胶膏剂研究概述[J]. 中国药师,2011,14(1):129-132.
- [6] 黄 丽,余冰欣,袁 雪,等. 亲水性凝胶膏剂的研究进展[J]. 中国民族民间医药,2016,25(19):102-104.
- [7] 李光华. 中药巴布剂的研究现状与展望[J]. 天津药学,2016,28(4):48-50.
- [8] 刘龙云,何晓梅,方丽波,等. 丹皮酚巴布剂的基质处方研究[J]. 广州化工,2020,48(7):73-75.
- [9] 顾圣莹,张 玮,张丽娟,等. 巴布剂的黏性评价研究进展[J]. 实用药物与临床,2017,20(12):1441-1444.
- [10] 张洪兵,朱雪瑜,张铁军,等. 星点设计-效应面优化法优选复方止痛巴布剂基质处方[J]. 中草药,2013,44(8):985-988.
- [11] 姜 旭,王宇卿. 复方青风藤巴布剂基质处方的优化[J]. 中成药,2017,39(9):1943-1947.
- [12] 张彩霞. 变应性鼻炎巴布剂医院制剂的药学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2017.
- [13] 黎婉婉. 三子巴布剂的制备及体外透皮吸收研究[D]. 广州:广东药学院,2014.
- [14] 刘亚男,樊金伟. 巴布剂的研究现状及发展前景[J]. 黑龙江医药,2010,23(5):766-768.
- [15] 李 颖,赵增成,林树乾,等. 丹参主要化学成分及提取分离方法研究进展[J]. 中医药学报,2021,49(1):106-111.
- [16] 刘 涛,焦 芳,张 敏,等. 丹参茎叶提取工艺研究[J]. 成都大学学报(自然科学版),2016,35(2):127-129.
- [17] 李国转,于 凡,姚文琪,等. 正交试验结合 HPLC 指纹图谱优选丹参总酚酸的提取工艺[J]. 中药材,2017,40(5):1159-1162.
- [18] 晏 菲,王景媛,曾永成,等. 正交试验优选抗风止痛宁提取工艺[J]. 中国药业,2021,30(23):40-43.
- [19] 陈良胜. 正交试验优选当归药材中阿魏酸提取工艺[J]. 中国药业,2021,30(22):71-73.
- [20] 汤秀珍,王承满,张 皓,等. 星点设计-效应面法优化关节止痛膏贴剂处方[J]. 中草药,2012,43(1):86-90.
- [21] 吴 伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学:药学分册,2000,27(5):292-298.

(收稿日期:2021-11-16;修回日期:2021-12-20)

通癍颗粒为医院临床应用多年的经验方,由山茱萸、熟地黄等10味中药材组方,具有温肾通阳、清热通淋等功效,用于治疗肾虚血瘀证,症见尿频、夜尿增多、尿流变细、尿无力、尿余沥不尽、腰膝酸软等。临床多以汤剂使用,但煎煮麻烦、携带不便、不易保存,难以保证煎煮质量。颗粒剂使用和携带方便,稳定性好,生产参数稳定,质量均一性较好。本研究中原临床汤剂制备工艺的基础上,以临床用药煎煮条件为基础,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化其提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);KQ-250E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);Sartoris BP 211D型电子分析天平(德国Sartoris公司,精度为0.01 mg);101-2-BS-II型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 试药

毛蕊花糖苷对照品(批号为111530-201713,纯度为92.5%),马钱苷对照品(批号为111640-201707,纯度为99.2%),莫诺苷对照品(批号为11998-201703,纯度为97.4%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯,德国默克公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水;山茱萸、熟地黄、车前子等药材均由深圳市宏盛昌药业有限公司提供,经广东省深圳市中医院药检室简晓莉副主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:毛蕊花糖苷为乙腈-0.1%醋酸溶液(15:85, V/V)^{[1]125,[2]},马钱苷和莫诺苷为乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B)、梯度洗脱(0~20 min时7%A, 21~50 min时7%A→20%A)^{[1]27,[3]};流速:1.0 mL/min;检测波长:334 nm(毛蕊花糖苷)和240 nm(马钱苷和莫诺苷);柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液:取毛蕊花糖苷、马钱苷、莫诺苷对照品各适量,精密称定,加甲醇分别制成质量浓度为200.910, 222.100, 209.520 μg/mL的对照品贮备液。取上述毛蕊花糖苷对照品贮备液适量,配制成质量浓度分别为4.018 2, 10.045 5, 20.091 0, 40.182 0, 100.455 0 μg/mL的系列毛蕊花糖苷对照品溶液;取马钱苷、莫诺苷对照品贮备液适量,配制成马钱苷和莫诺苷质量浓度分别为4.442, 8.884, 22.210, 44.420, 111.050 μg/mL和4.190, 8.381, 20.952, 41.904,

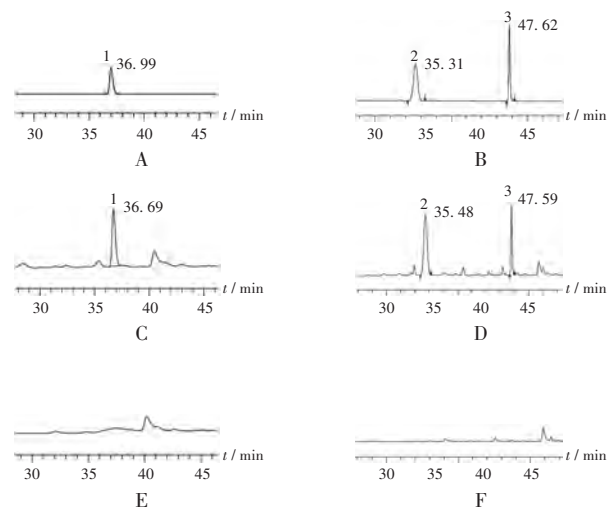
104.760 μg/mL的系列马钱苷和莫诺苷对照品溶液。

供试品溶液:按处方比例称取各中药饮片(2倍处方量),共9份,每份320 g,按拟订工艺煎煮,滤过,合并滤液,浓缩至约200 mL,放冷至室温,加水定容至250 mL,分别编号为1~9号,备用,即得供试品贮备液。精密吸取供试品贮备液2 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)30 min,取出,放冷,用甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按处方比例称取中药饮片2份(分别不含熟地黄、山茱萸),按供试品贮备液制备方法分别制备缺熟地黄和山茱萸的阴性样品贮备液,按供试品溶液制备方法分别制备缺熟地黄和缺山茱萸的阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:取2.1.2项下5种溶液,按2.1.1项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图。结果毛蕊花糖苷、马钱苷、莫诺苷的分离度均大于2.0,在供试品溶液与对照品溶液色谱中均有相应色谱峰,阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。



1. 毛蕊花糖苷 2. 马钱苷 3. 莫诺苷
A-B. 对照品溶液 C-D. 供试品溶液 E-F. 阴性对照
溶液(分别缺熟地黄和山茱萸)

图1 高效液相色谱图

1. Verbascoside 2. Loganin 3. Morroniside
A-B. Reference solution C-D. Test solution E-F. Negative reference solution (lack of Rehmanniae Radix Praeparata and Corni Fructus, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察:分别精密吸取2.1.2项下系列毛蕊花糖苷对照品溶液、马钱苷和莫诺苷对照品溶液各10 μL,分别按2.1.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_{\text{毛}} = 12.386 1X_{\text{毛}} - 29.395 8$ ($r = 0.999 1, n = 5$), $Y_{\text{马}} = 27 986.76X_{\text{马}} + 14 731.16$ ($r =$

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(μg)			加入量(μg)			量测得(μg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
21.03	20.35	32.50	10.045 5	11.105 0	16.761 6	31.070	31.429	49.256	99.95	99.77	99.97						
21.03	20.35	32.50	10.045 5	11.105 0	16.761 6	31.112	31.314	49.072	100.36	98.73	98.87						
21.03	20.35	32.50	10.045 5	11.105 0	16.761 6	30.956	31.487	49.434	98.81	100.29	101.03						
21.03	20.35	32.50	20.091 0	22.210 0	33.523 2	40.621	42.482	65.944	97.51	99.65	99.76						
21.03	20.35	32.50	20.091 0	22.210 0	33.523 2	41.093	42.448	65.316	99.86	99.50	97.89	99.46	99.34	99.56	1.21	0.81	0.97
21.03	20.35	32.50	20.091 0	22.210 0	33.523 2	40.687	42.122	66.124	97.84	98.03	100.30						
21.03	20.35	32.50	30.136 5	33.315 0	50.284 8	51.545	53.075	82.036	101.26	98.23	98.51						
21.03	20.35	32.50	30.136 5	33.315 0	50.284 8	51.130	53.685	82.782	99.88	100.06	99.99						
21.03	20.35	32.50	30.136 5	33.315 0	50.284 8	51.071	53.592	82.664	99.68	99.78	99.76						

注:A为毛蕊花糖苷,B为马钱苷,C为莫诺苷。表3同。

Note:A refers to verbascoside,B refers to loganin and C refers to morroniside (for Tab. 1 and Tab. 3).

0.999 9, $n=5$), $Y_{\text{莫}}=43\,126.99X_{\text{莫}}+21\,171.56$ ($r=0.999\,9,n=5$)。结果表明,毛蕊花糖苷、马钱苷、莫诺苷质量浓度分别在4.018 2~100.455 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.442~111.050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.190~104.760 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取2.1.2项下毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷对照品溶液各适量,倍比稀释,按2.1.1项下色谱条件分别进样测定,以信噪比(S/N)为10时的进样量为定量限,以 S/N 为3时的进样量为检测限。结果毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷的定量限分别为6.17,1.59,1.64 ng,检测限分别为1.85,0.48,0.49 ng。

精密度试验:取2.1.2项下毛蕊花糖苷对照品溶液、马钱苷和莫诺苷对照品溶液各适量,分别按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果峰面积的RSD分别为0.56%,0.43%,0.41%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.1.2项下1号供试品贮备液,分别于0,2,4,8,12 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷峰面积的RSD分别为0.67%,0.83%,0.88%($n=5$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

重复性试验:取2.1.2项下1号供试品贮备液6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷的含量分别为21.03,20.35,32.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,RSD分别为0.84%,1.11%,1.07%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的供试品贮备液(毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷质量浓度分别为21.03,20.35,32.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1 mL,共9份,按50%,100%,150%分别加入毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷适量,按

2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

2.2 干膏得率测定

精密吸取各样品浓缩液20 mL,置已恒重的蒸发皿中,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,于105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速称定质量,按2015年版《中国药典(四部)》0831项下干燥失重法测定,计算干膏得率。

$$\text{干膏得率}(\%)=(W\times V)/(20\times W_t)\times 100\%$$

式中, W 为20 mL浓缩液中干浸膏质量; V 为定容体积; W_t 为饮片质量。

2.3 $L_9(3^4)$ 正交试验优选提取工艺

正交试验设计与结果:通癍颗粒为医院协定处方,临床长期使用,日常的煎煮条件为中药饮片加水没过药面2 cm(约10倍量水),煎煮2次,每次1.5 h。本研究中根据临床经验和预试验,并参考文献[4-5],以加水量(因素A)、提取时间(因素B)、提取次数(因素C)为考察因素,以指标性成分毛蕊花糖苷含量、马钱苷和莫诺苷含量及干膏得率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选通癍颗粒的提取工艺。同时,按公式计算综合评分。因素与水平见表2, $L_9(3^4)$ 正交试验及结果见表3。

$$\text{综合评分}=(40/\text{最大干膏得率})\times \text{干膏得率}+(30/\text{最大毛蕊花糖苷含量})\times \text{毛蕊花糖苷含量}+(30/\text{最大马钱苷和莫诺苷含量})\times \text{马钱苷和莫诺苷含量}$$

表2 因素与水平

Tab. 2 Factors and levels			
水平	因素A(倍)	因素B(h)	因素C(次)
1	8	1.0	1
2	10	1.5	2
3	12	2.0	3

方差分析:采用SPSS 20.0统计学软件分析数据, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。方差分析结果见表4。由

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验及结果

Tab. 3 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素				干膏得率(%)	含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)		综合评分(分)
	A	B	C	D		A	B+C	
1	1	1	1	1	12.59	21.03	42.50	68.00
2	1	2	2	2	14.99	30.78	47.28	83.58
3	1	3	3	3	17.07	38.31	51.97	96.68
4	2	1	2	3	15.26	27.45	46.09	80.89
5	2	2	3	1	17.22	28.03	53.02	89.55
6	2	3	1	2	14.46	21.33	45.31	73.91
7	3	1	3	2	18.32	25.00	52.69	89.39
8	3	2	1	3	14.17	20.46	48.06	74.15
9	3	3	2	1	18.25	25.18	50.53	88.16
K_{11}	44.65	46.17	41.22	48.06				
K_{12}	46.94	46.38	48.50	47.77				
K_{13}	50.74	49.78	52.61	46.50				
R_1	2.03	1.20	3.80	0.52				
K_{21}	90.12	73.48	62.82	74.24				
K_{22}	76.81	79.27	83.41	77.11				
K_{23}	70.64	84.82	91.34	86.22				
R_2	6.49	3.78	9.51	3.99				
K_{31}	141.75	141.28	135.87	146.05				
K_{32}	144.42	148.36	143.90	145.28				
K_{33}	151.28	147.81	157.68	146.12				
R_3	3.18	2.36	7.27	0.28				
K_1	248.30	238.30	216.10	245.70				
K_2	244.30	247.30	252.70	246.90				
K_3	251.80	258.80	275.60	251.80				
R	7.50	20.50	59.50	6.10				

表3可知,各因素影响大小顺序为提取次数>提取时间>加水量,综合评分最高工艺组合为 $A_3B_3C_3$ 。由表4可知,提取次数对综合评分结果有显著影响,而提取时间和加水量无显著影响;提取次数对干膏得率有显著影响;各因素对毛蕊花糖苷含量均无显著影响,对马钱苷和莫诺苷含量均有显著影响。综合考虑,为了降低生产成本、缩短生产周期等,选择 $A_1B_1C_3$ 为优选工艺,即加8倍量水,提取3次,每次1.0 h。

2.4 验证试验

为确定该水煎煮工艺的优劣和稳定性,按处方比例称取饮片3份,每份320 g,按正交试验优选工艺参数进行验证试验,所得提取液加水定容至250 mL。按2.1.1项下色谱条件进样测定,并计算干膏得率,毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷含量。结果见表5,表明工艺合理、可行。

3 讨论

通癰颗粒方中,熟地黄为君药,具有补血滋阴、益

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of ANOVA

指标		离差平方和	自由度	均方	F值	P
干膏得率	A	6.31	2.00	3.15	13.74	
	B	2.74	2.00	1.37	5.96	
	C	22.18	2.00	11.09	48.33	<0.05
	D(误差)	0.46	2.00	0.23	1.00	
毛蕊花糖苷含量	A	66.08	2.00	33.04	2.53	
	B	21.44	2.00	10.72	0.82	
	C	144.47	2.00	72.23	5.54	
	D(误差)	26.08	2.00	13.04	1.00	
马钱苷和莫诺苷含量	A	16.11	2.00	8.06	111.25	<0.05
	B	10.34	2.00	5.17	71.41	<0.05
	C	81.12	2.00	40.56	560.11	<0.05
	D(误差)	0.14	2.00	0.07	1.00	
综合评分	A	9.39	2.00	4.69	1.35	
	B	70.39	2.00	35.19	10.11	
	C	600.47	2.00	300.23	86.25	<0.05
	D(误差)	6.96	2.00	3.48	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

表5 验证试验结果

Tab. 5 Results of the verification test

项目	1	2	3	$\bar{X}$
干膏得率(%)	17.62	16.97	17.05	17.21
毛蕊花糖苷含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	25.03	24.78	24.52	24.78
马钱苷和莫诺苷含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	53.56	54.23	53.97	53.92

精填髓功效,含有环烯醚萜、单萜和糖苷、氨基酸等化学成分。熟地黄多糖能增强机体造血功能和免疫力,有抗氧化、抗突变、中枢抑制作用。熟地黄水提取液能增强记忆功能,具有抗焦虑、抗肿瘤及促进内皮细胞增殖作用;其有效成分毛蕊花糖苷具有抗自由基损伤、抑制细胞内钙超载、抗神经毒性等活性,具有降低血液黏度、抗血小板聚集、保护神经等药理学作用^[6]。山茱萸为臣药,具有补益肝肾、收涩固脱功效,主要含有苷类(马钱苷和莫诺苷等)、挥发性成分、多糖、有机酸类、鞣质类等成分,具有保护肝脏和肾脏、抗糖尿病、抗氧化等药理学作用^[7-9]。2015年版《中国药典(一部)》中熟地黄、山茱萸饮片分别以毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷作为指标性成分^[1-2]。故本研究中以君臣药中指标性成分毛蕊花糖苷、马钱苷和莫诺苷的含量作为正交试验的评价指标,综合评分权重均定为30%。中药提取成分浓缩为干膏,干膏得率对中药提取效果具有重要意义。故设定干膏得率权重为40%。

本研究中最终确定的提取工艺为加8倍量水,提取3次,每次1 h。按此工艺进行验证试验,测得平均干膏得