

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0051-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.013



正交试验优选麝香化瘀醒脑颗粒水提工艺*

黄江, 黄锐, 袁渊, 蒲清荣, 杨思进, 白雪, 杨云芳[△]

(西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 优选麝香化瘀醒脑颗粒的水提工艺。方法 以样品提取液中总蒽醌含量和干浸膏质量的综合评分为评价指标, 以加水量、浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选麝香化瘀醒脑颗粒的水提工艺。结果 优选的最佳水提工艺参数为加10倍量水, 浸泡0.5 h, 煎煮2次, 每次1.0 h。结论 该水提工艺简便、可行, 结果稳定, 可用于麝香化瘀醒脑颗粒的提取。
关键词: 麝香化瘀醒脑颗粒; 总蒽醌; 干浸膏; 正交试验; 水提工艺

Optimization of Water Extraction Process of Shexiang Huayu Xingnao Granules by the Orthogonal Test

HUANG Jiang, HUANG Rui, YUAN Yuan, PU Qingrong, YANG Sijin, BAI Xue, YANG Yunfang

(The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: **Objective** To optimize the water extraction process of Shexiang Huayu Xingnao Granules. **Methods** The water extraction process of Shexiang Huayu Xingnao Granules was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the comprehensive score of the total anthraquinone content in the sample extraction solution and the amount of the dry extract as the evaluation index, and with the water addition, soaking time, decocting time and decocting times as the investigation factors. **Results** The optimal water extraction process parameters were as follows: adding 10 times of water, soaking for 0.5 h, decocting twice, each time for 1.0 h. **Conclusion** The water extraction process is simple and feasible with stable results, which can be used for the extraction of Shexiang Huayu Xingnao Granules.
Key words: Shexiang Huayu Xingnao Granules; total anthraquinone; dry extract; orthogonal test; water extraction process

麝香化瘀醒脑方是我院国家临床重点专科中医脑病团队治疗出血性中风病的临床经验方。该方由麝香、黄芪、三七、生大黄、桂枝、大血藤、泽泻等药材制成, 有风药开窍、活血利水功效, 治疗出血性中风病急性期疗效较好, 且安全可靠^[1-5]。为方便患者服用与携带, 我院拟将其研制成中药颗粒剂。为充分发挥方中药物活性成分功效, 根据该制剂处方中各药材相关的化学成分与药理作用, 对方中君药麝香、臣药三七(打粉)直接入药, 其余药材以水为溶剂进行煎煮提取; 以具有泻下利湿、逐瘀通经功效, 且与该方功效基本一致的其余药材(除上述2味药材)中总蒽醌含量和干浸膏质量作为综合评价指标^[5-8], 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选该制剂的水提工艺参数, 为其制备提供参考。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、AUW120D型电子天平(日本Shimadzu公司); QP-01型真空泵(天津奥特赛恩仪器有限公司); JPGT0328型全数字超声波发生器(武汉嘉鹏电子有限公司); NRB17S3W型电冰箱(日

本Panasonic公司); HH数显电热恒温水浴箱(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); ZK072型电热真空干燥箱(上海实验仪器厂)。

1.2 试药

大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄酸对照品、大黄素甲醚对照品、芦荟大黄素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110756-200110, 110796-201520, 110757-201607, 110758-201415, 110795-201710, 含量分别为96%, 99.4%, 99.3%, 99.2%, 98.3%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。麝香、黄芪、三七、大黄、桂枝、大血藤、泽泻药材饮片(泸州宝光医药有限公司, 批号分别为19052001, 191202, 191102, 190701, 200101, 190402, 191001)。

2 方法与结果

2.1 干浸膏质量测定

按麝香化瘀醒脑方处方比例称取黄芪、生大黄、桂枝、大血藤、泽泻等5味中药材饮片9份, 提取, 滤过、浓缩, 加甲酸定容至500 mL(相当于原药材46 g)。精密量

*基金项目: 国家中医临床研究基地建设单位科研项目[西南医大中医院[2020]33号]。

第一作者: 黄江, 男, 硕士, 副主任中药师, 研究方向为中药制剂, (电子信箱)huangjiang0818@163.com。

[△]通信作者: 杨云芳, 女, 硕士, 副主任中医师, 研究方向为中西医结合防治脑血管疾病, (电子信箱)yangyunfang84@163.com。

取提取液 50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴浓缩至膏状,105 °C干燥至恒重,置干燥器中 30 min,迅速精密称定质量,计算干浸膏质量(g)^[9]。

2.2 总蒽醌含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate™ C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(85:15, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40 °C;进样量:10 μL。

2.2.2 溶液制备

对照品溶液:称取大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素对照品各适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素各 80 μg,大黄素甲醚 40 μg 的单一对照品溶液,各精密量取 2 mL,混匀,即得混合对照品溶液。

供试品溶液:取 2.1 项下提取液适量,以甲醇定容至 500 mL,滤过。精密吸取续滤液 5 mL 置烧瓶中,水浴挥干,加 8% 盐酸溶液 10 mL,超声(功率 350 W,频率 35 kHz;下同)处理 2 min,加三氯甲烷 10 mL,加热回流 1 h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 3 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:称取处方量麝香化瘀醒脑颗粒阴性样品(不含大黄),按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,理论板数按大黄素峰计应不低于 3 000^[10],专属性良好,见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶

液 1, 4, 8, 12, 16, 32 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的回归方程分别为 $Y_1 = 4\,991.2X_1 - 35.6$ ($R^2 = 0.999\,8$)、 $Y_2 = 3\,476.4X_2 - 37.3$ ($R^2 = 0.999\,7$)、 $Y_3 = 5\,610.2X_3 - 22.4$ ($R^2 = 0.999\,9$)、 $Y_4 = 4\,079.3X_4 - 33.7$ ($R^2 = 0.999\,9$)、 $Y_5 = 869.4X_5 - 69.5$ ($R^2 = 0.999\,8$)。结果表明,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚进样量均在 0.016 ~ 0.512 μg 范围内,大黄素甲醚在 0.008 ~ 0.256 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 5 次,记录峰面积。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.15%, 1.25%, 1.33%, 1.27%, 0.66% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.01%, 0.59%, 1.09%, 1.46%, 1.29% ($n = 6$),表明供试品溶液室温下放置 12 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一提取液 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.35%, 1.51%, 1.53%, 1.36%, 1.25% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取已知含量的样品 9 份,每份约 5 g,精密称定,分别按其中所含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的 50%, 100%, 150%, 加入各单一对照品溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 1。

耐用性试验:取同一供试品溶液适量,分别在色谱

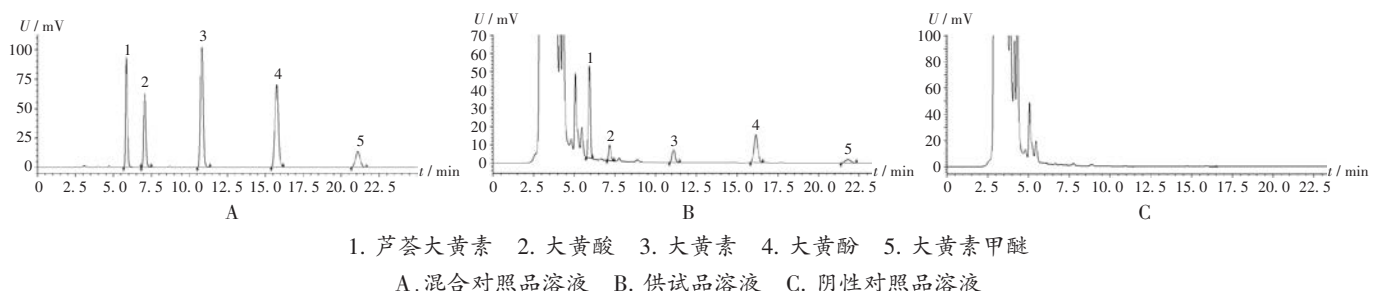


图1 高效液相色谱图

1. Aloe emodin 2. Rhein 3. Emodin 4. Chrysophanol 5. Emodin methyl ether
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

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

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
芦荟大黄素	5.524 2	0.182 4	0.088 3	0.265 4	94.00			大黄酚	5.527 0	0.034 8	0.034 8	0.070 1	101.44		
	5.525 3	0.182 4	0.088 3	0.262 9	91.17				5.526 1	0.034 8	0.052 2	0.087 8	101.53		
	5.527 2	0.182 5	0.088 3	0.263 7	91.96				5.526 9	0.034 8	0.052 2	0.087 6	101.15		
	5.526 2	0.182 4	0.176 5	0.356 9	98.87				5.527 1	0.034 8	0.052 2	0.084 6	95.40		
	5.526 9	0.182 4	0.176 5	0.359 5	100.34	97.49	4.06		5.524 2	0.069 1	0.034 6	0.103 9	100.58		
	5.527 0	0.182 4	0.176 5	0.358 9	100.00				5.525 3	0.069 1	0.034 6	0.103 5	99.42		
	5.526 1	0.182 4	0.264 8	0.446 9	99.89				5.527 2	0.069 1	0.034 6	0.105 7	105.78		
	5.526 9	0.182 4	0.264 8	0.450 8	101.36				5.526 2	0.069 1	0.069 1	0.135 8	96.53		
	5.527 1	0.182 4	0.264 8	0.446 8	99.85				5.526 9	0.069 1	0.069 1	0.136 9	98.12	99.57	3.20
大黄酸	5.524 2	0.049 2	0.024 6	0.071 6	91.06			大黄素甲醚	5.527 0	0.069 1	0.069 1	0.134 7	94.93		
	5.525 3	0.049 2	0.024 6	0.071 3	89.84				5.526 1	0.069 1	0.103 7	0.173 5	100.68		
	5.527 2	0.049 2	0.024 6	0.070 8	87.80				5.526 9	0.069 1	0.103 7	0.170 9	98.17		
	5.526 2	0.049 2	0.049 2	0.098 9	101.02				5.527 1	0.069 1	0.103 7	0.174 8	101.93		
	5.526 9	0.049 2	0.049 2	0.099 2	101.63	96.90	6.03		5.524 2	0.045 3	0.021 4	0.066 4	98.60		
	5.527 0	0.049 2	0.049 2	0.100 3	103.86				5.525 3	0.045 3	0.021 4	0.066 1	97.20		
	5.526 1	0.049 2	0.073 8	0.121 7	98.24				5.527 2	0.045 3	0.021 4	0.065 7	95.33		
	5.526 9	0.049 2	0.073 8	0.123 7	100.95				5.526 2	0.045 3	0.041	0.085 2	97.32		
	5.527 1	0.049 2	0.073 8	0.121 3	97.70				5.526 9	0.045 3	0.041	0.084 6	95.85	98.36	2.29
大黄素	5.524 2	0.034 8	0.017 4	0.052 8	103.45				5.527 0	0.045 3	0.041	0.086 1	99.51		
	5.525 3	0.034 8	0.017 4	0.051 9	98.28				5.526 1	0.045 3	0.062 4	0.109 4	102.72		
	5.527 2	0.034 8	0.017 4	0.051 2	94.25				5.526 9	0.045 3	0.062 4	0.107 1	99.04		
	5.526 2	0.034 8	0.034 8	0.069 3	99.14				5.527 1	0.045 3	0.062 4	0.107 5	99.68		
	5.526 9	0.034 8	0.034 8	0.070 6	102.87	99.72	3.23								

条件一定波动范围[流速(0.8 ± 0.2) mL/min,检测波长(254 ± 2)nm,柱温(40 ± 5)℃]内进样测定,记录峰面积并计算含量。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的 *RSD* 分别为 0.73%,0.65%,1.01%,1.12%,1.05%,表明该色谱条件小范围变化时本方法能满足试验要求,耐用性良好。

2.3 正交试验优选水提工艺

根据处方中各药物性质,麝香、三七(打粉)直接入药,其余药物采用传统的水煎煮法提取。以加水量(因素 A)、浸泡时间(因素 B)、提取时间(因素 C)、提取次数(因素 D)为考察因素,以干浸膏质量与总蒽醌含量的综合评分为评价指标,优选最佳水提工艺参数。综合评分 = [(干浸膏质量/干浸膏质量最大值) × 0.5 + (总蒽醌含量/总蒽醌含量最大值) × 0.5] × 100^[11-12]。因素与水平见表 2,正交试验设计与结果见表 3,方差分析结果见表 4。

由表 3 可知,各因素对水提工艺综合评分的影响顺序为 D > A > C > B,最佳工艺组合为 A₃B₁C₃D₂。由表 4 可知,各因素对结果均有显著影响。综合考虑提高生产效

表 2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	A(倍)	B(h)	C(h)	D(次)
1	8	0.5	1.0	1
2	10	1.0	1.5	2
3	12	1.5	2.0	3

率与节约能耗等因素,最终优化提取工艺为 A₂B₁C₁D₂,即加 10 倍量水,浸泡 0.5 h,煎煮 2 次,每次 1.0 h。

2.4 验证试验

按选定的最佳工艺进行 3 次提取试验,结果稳定。详见表 5。

3 讨论

本研究中根据麝香化瘀醒脑方中各药材药理活性特点等信息,同时考虑我院制剂生产特点,将方中麝香、三七(打粉)直接入药,黄芪、大黄等 5 味药材进行水提。以提取液作为黏合剂,以糊精为辅料,加入三七粉、麝香,采用湿法制粒法制粒,干燥、整粒即得麝香化瘀醒脑颗粒^[11-12]。提取工艺为药物制剂的关键因素,因此本研究中采用正交试验研究麝香化瘀醒脑颗粒的提

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 3 Deign and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test							
序号	A	B	C	D	干浸膏质量(g)	总蒽醌含量(%)	综合评分
1	8	0.5	1	1	8.21	0.199 3	50.51
2	8	1	1.5	2	10.92	0.293 1	69.89
3	8	1.5	2	3	11.71	0.377 6	81.16
4	10	0.5	2	3	11.30	0.381 1	79.99
5	10	1	1	1	10.01	0.238 4	61.14
6	10	1.5	1.5	2	12.11	0.396 9	84.56
7	12	0.5	1.5	2	13.23	0.512 4	100.00
8	12	1	2	3	12.81	0.294 6	77.23
9	12	1.5	1	1	9.11	0.273 3	61.14
K_1	201.56	230.50	212.30	172.79			
K_2	225.70	208.26	211.02	254.45			
K_3	238.37	226.87	242.31	238.39			
R	36.81	22.24	31.29	81.66			

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA					
方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	233.112	2	116.56	2.46	<0.05
B	94.861	2	47.43	1.00	<0.05
C	208.980	2	104.49	2.21	<0.05
D	1247.786	2	623.89	13.44	<0.05

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

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

表5 验证试验结果

Tab. 5 Results of the validation test			
序号	干浸膏质量(g)	总蒽醌含量(%)	综合评分
1	13.51	0.501 3	98.90
2	13.70	0.513 2	100.75
3	13.45	0.508 6	99.38
$\bar{X} \pm s$	13.56 ± 0.13	0.51 ± 0.01	99.68 ± 0.96
RSD(%)	0.95	1.18	0.96

取工艺,综合比较各因素对提取效果的影响程度,并研究各因素的主次及相互作用,从而确定最优提取工艺条件^[13]。

麝香化瘀醒脑颗粒中,大黄具有泻下利湿、逐瘀通经功效,与麝香化瘀醒脑颗粒组方原理基本一致,故笔者根据预试验结果,选择大黄有效成分总蒽醌含量及干浸膏质量各占50%权重的综合评价指标^[14-15]控制质量,采用正交试验设计优选麝香化瘀醒脑颗粒水提工艺参数,并经验证其参数稳定、可靠。测定大黄总蒽醌含量的高效液相色谱(HPLC)法及色谱条件参考了2020年版《中国药典(一部)》中大黄药材项下相关内容,结果分离效果好且峰形不拖尾,能较好地将5种蒽醌类物质分离。

综上所述,本研究中优化的工艺操作简便,结果稳定,可用于麝香化瘀醒脑颗粒的水提。建立的HPLC法快速、灵敏度、准确度高,可为麝香化瘀醒脑颗粒生产过程中的质量控制及其后续质量标准研究提供参考。

参考文献

[1] RANGANATHAN R, DOHERTY C, GUSSERT M, et al. Scientific basis and active ingredients of current therapeutic interventions for stroke rehabilitation[J]. Restorative Neurology and Neuroscience, 2022, 40(2):97-107.

[2] LUO CY, WU YM, CHEN XL, et al. Chemical Composition, Protective Effects, and Mechanisms of Volatile Oil from Fructus Gleditsiae Abnormalis with Nasal Administration against Ischemic Injury in HFD and MCAO-Induced Rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021:8880996.

[3] 付晓兵,贾春红,陈智华,等.缺血性中风患者发病时间周期性的临床研究[J].光明中医,2020,35(11):1610-1611.

[4] 王小亮.中医药治疗出血性中风研究进展[J].光明中医,2020,35(10):1598-1601.

[5] 刘涛,王杨,崔寒尽,等.基于蛋白质组学大黄异病同治急性中风大鼠脑物质的基础及相关机制[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(19):160-168.

[6] 李建香,过伟峰,傅淑平,等.基于脑肠互动探讨通腑泻热法治疗中风的机制[J].中医杂志,2018,59(4):292-294.

[7] 肖晓燕,苏联麟,陈鹏,等.基于正交试验及AHP-综合评分法优选酒黄精炮制工艺及调节免疫作用研究[J].中国中药杂志,2022,47(23):6391-6398.

[8] 曾海生,陈勇,谢臻,等.清蒸大黄的炮制及其五种游离蒽醌的含量测定分析[J].湖北农业科学,2019,58(7):111-114.

[9] 吴娜,赵重博,胡美变,等.BP-ANN结合正交试验法优化白附子多糖提取工艺[J].中成药,2016,38(6):1248-1253.

[10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:105.

[11] 翟红伟,程佩佩,成焕波,等.保元颗粒制备工艺研究[J].上海中医药大学学报,2022,36(1):14-19.

[12] 王远革,余楚钦,杨怡,等.蒿甲虚热清颗粒的制备及其含量测定方法研究[J].中国药业,2017,26(3):8-11.

[13] 刘静.正交设计法在药物制备工艺研究中的应用[J].齐鲁药事,2011,30(11):668-669.

[14] 肖兰英,刘洋,吴东,等.多指标综合评分法优选黄芪通便颗粒水提醇沉工艺[J].江西中医药,2019,50(3):57-61.

[15] 马冬妮,李芸,张金梅,等.多指标综合评分法优选琼玉润肺膏的提取工艺[J].时珍国医国药,2020,31(2):337-339.

(收稿日期:2022-06-01;修回日期:2022-09-09)