

正交试验优选扶阳软坚清脉方的提取工艺

常锦明¹ 宋清宏² 曹烨民³ 魏 莉¹

(1 上海中医药大学中药学院, 上海, 201203; 2 上海市中医老年医学研究所, 上海, 200031; 3 上海市中西医结合医院脉管科, 上海, 200082)

摘要 目的: 优化软坚清脉方的最佳提取工艺。方法: 以奇壬醇、肉桂酸及得膏率为指标, 采用正交试验, 利用多指标综合评价的方法及对权重系数的设置, 优选最佳提取工艺。结果: 处方药材最佳提取工艺为加 8 倍量的水, 浸泡 0.5 h, 提取 3 次, 2 h/次。结论: 该提取工艺科学、稳定、可行。

关键词 软坚清脉方; 奇壬醇; 肉桂酸; 正交试验; 提取工艺

Optimal Extraction Technology for Ruanjian Qingmai decoction by Orthogonal Test

Chang Jinming¹, Song Qinghong², Cao Yemin³, Wei Li¹

(1 Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2 Shanghai Geriatric Institute of Chinese Medicine, Shanghai 200031, China; 3 Combine Traditional Chinese and Western Medicine Hospital of Shanghai, Shanghai 200082, China)

Abstract Objective: To establish the optimal extraction technology for Ruanjian Qingmai decoction. **Methods:** With the extraction rate and the content of Qirenchun and Cinnamic acid as indexes, choose the best extraction technology by orthogonal design. **Results:** The best extraction process was as follow: the ratio of sample to water was 1:8, soaking for 0.5 hours, extracting for 2 hours, 3 times of extraction. **Conclusion:** The optimal extraction technology is rational, stable and feasible.

Key Words Ruanjian Qingmai decoction; Qirenchun; Cinnamic acid; Orthogonal test; Extraction technology

中图分类号: R289.5; R284.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.01.034

扶阳软坚清脉方应用奚九一教授“因痰致瘀”观点的经验方^[1], 由制附子、肉桂、豨莶草、垂盆草、干姜等 9 味药物组成, 主治肢体动脉硬化闭塞, 是益气温阳、健脾化饮的代表方。肢体动脉硬化闭塞症 (ASO) 是一种肢体慢性或急性缺血的疾病^[2]。随着社会老龄化, 我国 ASO 患者在逐年增加, 其死亡率和病残率均较高, 位居周围血管病的首位^[3]。本方以附子、肉桂回阳救逆^[4]为君药, 以昆布、豨莶草祛风软坚为臣药, 以垂盆草、煅牡蛎、蒲黄化痰祛瘀为佐药, 以干姜、炙甘草温中调和为使药, 临床用于治疗多种心血管疾病, 对肢体动脉硬化闭塞症有显著疗效, 能有效改善肢体动脉硬化闭塞症的临床缺血症状和体征, 有改善肢体动脉供血的作用^[5]。本实验根据每味药君臣佐使的药效关系和主要药效成分, 以奇壬醇、肉桂酸含量^[6]及干膏得率为考察指标, 通过正交试验优选提取工艺, 为制剂规范化加工提供技术参数。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪; 电子分析天平 (Sartorius CPA225D); 旋转蒸发器 (BUCHI B49);

L-120042 超声清洗仪 (100 w, 50 Hz, 江苏昆山力波超声设备有限公司)。

1.2 试药 奇壬醇对照品: 购于中国药品生物制品检定所 (批号: 111726-200601); 肉桂酸对照品: 购于中国药品生物制品检定所 (批号: 110786-200503); 制附子、肉桂、豨莶草、垂盆草、干姜、炙甘草、生蒲黄、昆布、煅牡蛎购于上海康桥中药饮片有限公司 (经鉴定符合《中华人民共和国药典》2010 年版规定)。

1.3 试剂 KromasilC₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm): 大连依利特分析仪器有限公司; 甲醇为色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司 (批号: 40064292); 乙腈为色谱纯: 上海豪申化学试剂有限公司 (批号: 40064193); 磷酸为色谱纯: 上海豪申化学试剂有限公司 (批号: 20100315); 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 奇壬醇和肉桂酸含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取奇壬醇和肉桂酸对照品适量, 精密称定, 加 70% 甲醇溶液制成 1 mL 含 226.8 μg 和 164.8 μg 的对照品溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 按处方比例称取药材,根据正交试验表提取得水提液9组,均浓缩至200 mL以下,定容与250 mL的容量瓶中,分别精密移取20 mL放入真空干燥箱中,70 ℃干燥至恒重,各移取所得浸膏粉于50 mL容量瓶中,加70%甲醇稀释,超声30 min,放冷,加70%甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例除去豨莶草和肉桂称取药材,再按“2.1.2”供试品溶液制备的方法分别制得不含豨莶草和肉桂的阴性对照溶液。

2.1.4 色谱条件与系统适用性试验 根据2010版《中华人民共和国药典》及有关文献文献^[7-10]确定奇壬醇和肉桂酸含量测定的色谱条件:色谱柱为Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相分别为乙腈:甲醇:水(23:18:59)和乙腈:0.1%磷酸(35:65);流速为1.0 mL/min;检测波长为215 nm和285 nm;柱温:25 ℃;理论板数按奇壬醇和肉桂酸分别不得低于5 000和3 000。

2.1.5 专属性试验 分别精密吸取奇壬醇和肉桂酸的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液,进样量分别为20 μL和10 μL,两者在上述色谱条件下,峰型良好,阴性样品无干扰,见图1至图6。

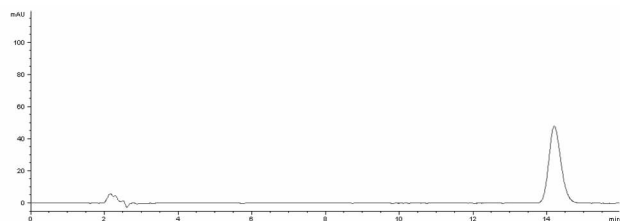


图1 奇壬醇对照品的HPLC色谱图

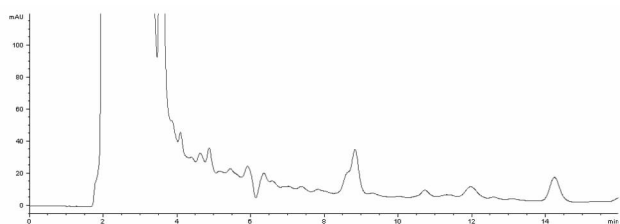


图2 供试品溶液HPLC色谱图

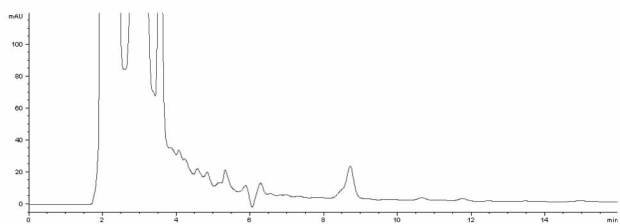


图3 阴性样品的HPLC色谱图

2.2 线性关系的考察 分别精密吸取奇壬醇和肉桂酸的对照品溶液0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mL于10 mL的容量瓶中,加70%的甲醇定容,摇匀,分别得到浓度

梯度为11.34 ~ 68.04 μg/mL和1.64 ~ 9.89 μg/mL的对照品溶液。按照上述色谱条件进行测定,分别以对照品的浓度为横坐标(X),以各自峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,拟合方程为: $Y = 16\,312X - 6.689$, $r = 0.999\,8$ 和 $Y = 72\,470X$, $r = 0.999\,8$,在11.34 mg/mL - 68.04 μg/mL和1.65 μL/mL - 9.89 μL/mL的范围内与峰面积呈良好线性关系。

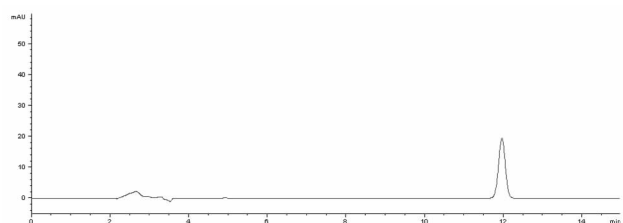


图4 肉桂酸对照品的HPLC色谱图

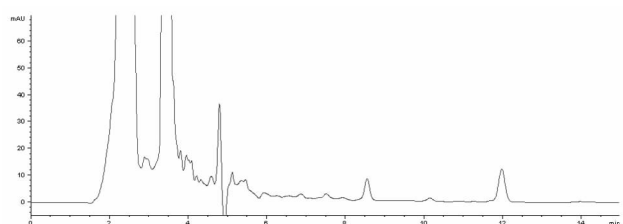


图5 供试品的HPLC色谱图

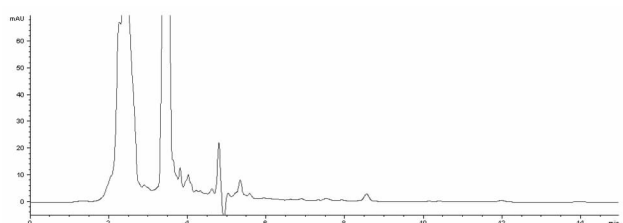


图6 阴性样品的HPLC色谱图

2.3 精密度试验 分别精密吸取同一浓度奇壬醇和肉桂酸对照品溶液,按照上述色谱条件分别连续重复进样6次,测定各自峰面积,结果该方法测得6次峰面积的相对标准偏差(Relative Standard deviation, RSD)分别为: $RSD = 0.17\%$ 和 0.86% ,表明奇壬醇和肉桂酸的含测方法精密度良好。

2.4 重复性试验 取同一批号处方量药材6份,按“2.1.2”供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件进样,测定各自峰面积,RSD分别为:1.83%和0.30%,表明含测方法重复性良好。

2.5 稳定性试验 取处方量取药材,按“2.1.2”供试品溶液方法制备,精密吸取该供试品溶液,分别在0、4、8、10、12、24 h内不同的时间点进样,按上述色谱条件测定峰面积,结果该方法测得供试品中奇壬醇和肉桂酸峰面积RSD分别为:1.43%和0.36%,表明供试品溶液中的奇壬醇和肉桂酸在24 h内稳定。

2.6 加样回收率试验 精密称定3个不同比例(80%、100%、120%)已知含量的样品9份,分别加入

一定量的奇壬醇和肉桂酸对照品溶液,按加样回收试验计算回收率,结果平均加样回收率分别为:98.10%和98.47%,*RSD* 分别为:0.93%和1.01%,说明本方法具有良好的准确度,见表1和表2。

表1 奇壬醇回收率试验结果

已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	<i>RSD</i> /%
0.0866	0.1134	0.1983	98.00		
0.0866	0.1134	0.1976	97.90		
0.0866	0.1134	0.2005	100.30		
0.1160	0.1134	0.2272	98.00		
0.1160	0.1134	0.2267	97.50	98.10	0.93
0.1160	0.1134	0.2268	97.70		
0.1464	0.1134	0.2572	97.70		
0.1464	0.1134	0.2570	97.50		
0.1464	0.1134	0.2572	97.60		

表2 肉桂酸回收率试验结果

已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	<i>RSD</i> /%
0.0107	0.0165	0.0261	98.90		
0.0107	0.0165	0.0271	99.75		
0.0107	0.0165	0.0272	100.00		
0.0142	0.0165	0.0303	97.88		
0.0142	0.0165	0.0303	97.45	98.47	1.01
0.0142	0.0165	0.0302	96.94		
0.0199	0.0165	0.0361	98.33		
0.0199	0.0165	0.0361	98.59		
0.0199	0.0165	0.0361	98.34		

2.7 供试品中奇壬醇和肉桂酸的含量测定 取“2.1.2”项下供试品溶液,按上述色谱条件进样,测定其峰面积,并按标准曲线计算奇壬醇和肉桂酸的含量。

2.8 得膏率的测定 取按 $L_9(3^4)$ 正交试验表提取所得水提液,浓缩至200 mL以下,定容与250 mL的容量瓶中,精密移取20 mL于干燥至恒重的蒸发皿中,放入70℃的真空干燥箱干燥至恒重,取出置干燥器中,冷却30 min后,精密称定,再在上述温度干燥1 h,冷却,称定质量,至连续2次称质量的差异不超过3 mg为止,计算干膏得率。

2.9 提取工艺研究

2.9.1 因素水平的确设定和正交试验结果 本方长期用于治疗肢体动脉硬化闭塞,效果良好,临床用水煎服,因此本实验提取溶剂为水。根据附子和煅牡蛎用法^[11],并参考相关文献^[12-15]取日处方量制附子、煅牡蛎加10倍量水先煎2 h,收集煎液,残渣与处方量肉桂、豨莶草、垂盆草、干姜等药材合并,以奇壬醇、肉桂酸的含量及得膏率为综合评价指标,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验,考察加水量(A)、提取时间(B)、浸泡

时间(C)、提取次数(D)对提取结果的影响,优选的最佳工艺,因素水平见表3。在根据王晖等对多指标综合评价方法研究及权重系数如何选择和确立^[16]的基础上,结合自身试验的特点和考察指标间的关系,合理、科学地设置各指标的权重系数分别为,肉桂酸:奇壬醇:得膏率(0.4:0.3:0.3)(综合评分=奇壬醇的含量×0.3+肉桂酸的含量×0.4+得膏率×0.3),结果见表4。

表3 因素水平表

因素/水平	1	2	3
A 加水量/倍	8	10	12
B 提取时间/h	1.5	2.0	2.5
C 浸泡时间/min	0	30	60
D 提取次数/次	1	2	3

表4 正交试验设计与结果

试验 编号	A 加水 倍数	B 提取 时间	C 浸泡 时间	D 提取 次数	肉桂酸 的含量 /(mg/g)	奇壬醇 的含量 /(mg/g)	得膏率 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.722	0.921	9.834	3.007
2	1	2	2	2	0.924	1.279	17.31	5.268
3	1	3	3	3	0.527	0.809	22.85	6.900
4	2	1	2	3	0.620	1.261	20.37	6.174
5	2	2	3	1	0.560	1.236	11.97	3.720
6	2	3	1	2	0.718	1.537	14.35	4.360
7	3	1	3	2	0.572	1.128	19.84	6.009
8	3	2	1	3	0.727	1.635	23.75	7.203
9	3	3	2	1	1.084	1.637	13.95	4.277
K1	5.058	5.063	4.857	3.668				
K2	4.751	5.397	5.240	5.212				
K3	5.830	5.179	5.543	6.462				
R	1.079	0.334	0.686	2.794				

2.9.2 正交试验结果的方差分析 对以上正交数据进行方差分析,直观分析结果表明,影响水提工艺程度的四个因素的次序为:D>A>C>B,最佳提取工艺为: $D_3A_3C_3B_2$ 。方差分析结果表明,D因素对水提工艺有显著的影响,A、B、C因素无显著性差异,但综合考虑到节约成本、方便生产等各方面原因,扶阳软坚清脉方的最佳提取工艺为: $D_3A_1C_2B_2$,即加8倍的水,浸泡半个小时,提取3次,每次提取2 h,结果见表5。

表5 方差分析结果表

误差来源	A	B	C	D
偏差平方和	1.791	0.176	0.708	14.486
f	2	2	2	2
均值	0.895	0.088	0.354	4.23
F值	10.17	1.00	7.243	82.31
显著性	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

注: $F_{0.01}=99$, $F_{0.05}=19$ 。

2.9.3 验证试验 为考察上述优选提取工艺的稳定性,按该工艺条件进行重复性试验($n=3$),分别测定奇壬醇、肉桂酸的含量和得膏率。试验结果表明,该工艺合理可行,重现性较好,试验结果见表6。

表6 验证试验

编号	1	2	3
肉桂酸的含量/(mg/g)	0.945	0.849	0.824
奇壬醇的含量/(mg/g)	1.538	1.687	1.547
得膏率/%	18.68	20.74	19.54
RSD/%	1.20		

3 讨论

软坚清脉方处方中药味较多,并且所含药味活性成分比较复杂,试验以多个有效成分和指标进行考察,优选最出佳提取工艺,确保了新药的临床疗效。本试验用多指标进行正交试验工艺优选时,首先要解决指标结果间是否矛盾和两个指标成分含量和得膏率之间量纲不一致的问题,为此,采用多指标综合评分法,设置各个指标结果的权重系数,综合评分后再进行分析,这样优选出的工艺条件更加合理。从肉桂中可分离出肉桂醛和肉桂酸等药效成分,但由于肉桂醛在提取过程中极易转化成肉桂酸,很不稳定,而肉桂酸稳定可控,为此本试验选用肉桂酸做指标药效检测成分。在检测奇壬醇的过程中,试验曾选用过的流动相还有乙腈:水(25:75),乙腈:甲醇:水(18:18:64),乙腈:甲醇:水(20:18:62)结果均不太理想,峰得不到较好的分离,且拖尾比较严重,采用本试验方法成分分离效果好,结果准确,灵敏度较高。

参考文献

[1] 奚九一,王建,赵兆琳,等. 软坚清脉方对肢体动脉硬化的临床研究

[J]. 上海中医药杂志,1997,31(1):2-5.

[2] 叶建荣. 下肢动脉硬化闭塞症的治疗进展[J]. 中国临床医学,2001,8(3):197.

[3] 原焕勇. 动脉硬化闭塞症辨证分型施治体会[J]. 中医药临床杂志,2007,6(3):219.

[4] 杜杰,王龙虎,周海燕,等. 附子炮制研究进展[J]. 中国现代中药,2007,9(8):28-31.

[5] 方豫东,曹焯民,相盛敏,等. 扶阳软坚饮治疗肢体动脉硬化闭塞症[J]. 中国临床医学,2010,17(4):588-589.

[6] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:345,127-128.

[7] 闫东旭,王运君,段琼,等. RP-HPLC 同时测定稀莪草中奇壬醇与稀莪精醇的含量[J]. 中国药理学杂志,2010,45(12):945-947.

[8] 林佳,徐利珍,刘江云,等. 桂枝中桂皮醛、肉桂酸含量与分布研究[J]. 中国药理学杂志,2005,40(23):1784-1787.

[9] 朱晓薇,蔡刚,潘桂湘. HPLC 法测定桂枝中桂皮醛和桂皮酸的含量[J]. 中草药,2004,35(4):696-696.

[10] 刘赞,王峥涛,俞桂新,等. 高效液相色谱法测定酒稀莪草中奇壬醇的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(6):729-731.

[11] 黄金玲,王慧慧,陈慧芳,等. 正交试验法优选苓桂术甘汤的提取工艺[J]. 安徽中医学院学报,2011,30(6):65-67.

[12] 陈安东,易进海,黄志芳,等. 附子煎煮过程中酯型生物碱含量的动态变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):64-68.

[13] 邓广海,龚有明,林华,等. 不同煎煮时间对熟附子生物碱的影响[J]. 今日学报,2011,21(12):727-729.

[14] 赵文静,冯丽,常惟智,等. 牡蛎的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药信息,2011,28(1):114-116.

[15] 吴庆光,梁幼雅,刘四军,等. 介类中药研究进展[J]. 广东药学院学报,2012,28(2):212-217.

[16] 王晖,陈丽,陈昱,等. 多指标综合评价方法及权重系数的选择[J]. 广东药学院学报,2007,23(5):583-589.

(2013-04-23 收稿 责任编辑:徐晖)

投稿须知:关于摘要与关键词

摘要:论著类的文章,均须附中文和英文摘要。中、英文摘要的内容要一致。采用第三人称撰写,不用“本文”等主语。论著类文稿的摘要形式使用结构式。结构式摘要主要分目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)4部分。

关键词:选词要规范,应尽量从美国国立医学图书馆编辑的最新版 Index Medicus 的 Medical Subject Heading (MeSH) 词表中选用规范用词,中文译名可参照中国医学科学院医学信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。中医药词汇以中国中医研究院图书情报研究所编著的《中医药学主题词表》为准。未被词表收录的词,如确有必要可作为关键词标注。关键词数目一般3~5个,关键词之间用“;”分隔。无摘要的文稿,只需标注中文关键词,关键词置于正文之前;附中英文摘要的文稿须中英文关键词,中文关键词置于中文摘要下方;英文关键词应与中文词相对应,置于英文摘要下方。