

正交试验优选欢天安神饮的水提工艺

郭 华 李 文 赵 颖 朱维娜

(南京市中医院,江苏南京 210001)

摘 要 目的:研究欢天安神饮中部分药物的水提工艺,优选提取工艺条件。方法:采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以饮片 $(-)$ -丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷和丹酚酸 B 的提取率为考察指标,以浸泡时间、加水量、提取次数、提取时间等为考察因素,采用 HPLC 法测定,所得的结果进行方差分析,综合两个指标结果确定最佳工艺。结果:此复方中合欢皮、丹参等药物确定的最佳水提工艺条件为:加饮片总量 25 倍量的水分 3 次提取,每次 1.5h。结论:优选的工艺稳定,方法可行。

关键词 欢天安神饮 提取工艺 正交试验

中图分类号 R289.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2015)11-0056-03

欢天安神饮为临床上使用多年的安全、有效方,主要由合欢皮、景天三七、丹参、酸枣仁等 9 味中药组成,具有解郁安神、活血消肿的功效。因方中君药为合欢皮,其有效成分为水溶性成分,且临床应用剂型为汤剂,故本实验选用水提工艺进行研究,以浸泡时间、加水量、提取次数、提取时间等工艺条件为考察因素,以 $(-)$ -丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、丹酚酸 B 的含量为考察指标,进行提取工艺的优化研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器 1290 型安捷伦超高效液相色谱仪;紫

外检测器;电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产;KQ-500 型医用超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司生产;水浴锅,上海跃进医疗器械厂生产;RV10 旋转蒸发器(IKA)。

1.2 试药 $(-)$ -丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品(中国药品生物制品检定所),供含量测定用,批号:111911-201101;丹酚酸 B 对照品(中国药品生物制品检定所),供含量测定用,批号:111562-201212;甲醇、乙腈为色谱纯;其余所用试剂均为分析纯,均购自上海化学试剂有限公司;水为娃哈哈纯净水。

- [5] 王芳,程慧莲.痛经的中西医发病机制研究概况.内蒙古中医药,2010,29(2):105
- [6] 彭智聪,鲁汉兰,易生富.甘草蜜炙后对小鼠的止痛作用.中国中药杂志,1989,14(8):22
- [7] 王明喜,石志强.生甘草炙甘草临证应用考辨.实用中医内科杂志,2005,19(4):383
- [8] 吕圭源,俞丽霞.甘草不同炮制品对家兔离体肠活动的影响.中国中药杂志,1986,11(9):21
- [9] 张娜.痛经及其发病原因.中国临床医生,2010,38(2):16
- [10] 马悦颖,李沧海,李兰芳,等.桂皮醛解热镇痛抗炎作用的实验研究.中国临床药理学与治疗学,2006,11(12):1336
- [11] 郭显椿.炙甘草汤和归脾汤对小白鼠补血作用的试验研究.中兽医医药杂志,1997(5):12
- [12] 刘艳明,王雪芳,张晓云.炙甘草汤对低镁诱发豚鼠心律失常的电生理影响.陕西中医,2009,30(6):734
- [13] 罗颂平,谈勇.中医妇科学.14 版.北京:人民卫生出版

社,2014:95

- [14] 何梦瑶.医编.北京:人民卫生出版社,1994:54
 - [15] 张瑾.《傅青主女科》痛经论治的学术特点.中国校医,2014,28(7):559
 - [16] 丛慧芳,谷翔萌,武文鹏.丛慧芳教授从“心”论治“痛经”的临床经验总结.中医药学报,2015,43(1):98
 - [17] 丁正香,郑纯.郑纯从心论治妇科痛证经验.湖南中医杂志,2015,31(5):32
 - [18] Halbreich U, Rojansky N, Bakhai Y, et al. Menstrual irregularities associated with bupropion treatment. The Journal of clinical psychiatry, 1991, 52 (1):15
- 第一作者:金晶(1986—),女,医学硕士,住院医师,中医学专业,研究方向为中医妇科学。
jinjingtcm@163.com

收稿日期:2015-07-31

编辑:王沁凯

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 采用 L9(3⁴) 正交表进行正交设计,对浸泡时间、加水量、提取次数、提取时间进行考察,以 (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷及丹酚酸 B 的含量为考察指标,进行水提工艺最佳参数的确定^[1]。提取工艺因素水平设计见表 1。称取 4 剂处方量的合欢皮、丹参等 9 味药材共 9 份,按相应的因素水平进行水煎,水煎液浓缩成约 250mL,备用。

表 1 提取工艺因素水平设计

	A 浸泡时间(h)	B 加水量(倍)	C 提取次数(次)	D 提取时间(h)
1	0	20	1	1.0
2	0.5	25	2	1.5
3	1	30	3	2.0

2.2 供试品溶液的制备 取约相当于 0.5g 合欢皮药材的浓缩液 5mL,精密量取,置锥形瓶中,精密加入甲醇 10mL、水 5mL,使溶液甲醇浓度为 50%,称定重量,超声 30min,放冷,再称定重量,用 50%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 测定 (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷含量

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Di-amonsil C18(2)5u 柱(250mm×4.6mm,225-1125);流动相为甲醇:水梯度洗脱,0~30min (18:82),35~40min(100:0),45~50min (18:82);检测波长:204nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃。

2.3.2 对照品溶液制备及线性关系考察 精密称取于五氧化二磷减压干燥器中干燥 24h 的 (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品适量,加甲醇制成 1mg/mL 的溶液,作为对照品储备溶液。精密吸取

1mg/mL (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品溶液 0.125、0.25、0.75、1.25、1.75、2.5mL 分别置于 25mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,使浓度分别为 0.005、0.01、0.03、0.05、0.07、0.1mg/mL。分别吸取上述各对照品溶液 20μL,进样,按上述色谱条件测定峰面积

值,以峰面积均值(Y)为纵坐标,进样浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=59.12.83X+9.68$, $r=0.9989$ 。结果表明(-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷进样量在 0.1~2μg 范围内呈良好的线性。

2.3.3 样品中 (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量测定 分别精密吸取对照品溶液(浓度为 0.01、0.05mg/mL)及各供试品溶液 20μL 注入液相色谱仪,每个样品平行进样 2 次,以外标两点法计算,测定各样品中(-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量。结果见表 2、表 3。

2.4 HPLC 法测定丹酚酸 B 含量

2.4.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相为乙腈:2%乙酸溶液梯度洗脱,0~5min (17:83);19~26min(27:73);流速:1.0mL/min;检测波长:284nm;柱温:30℃;进样量:10μL;理论板数按丹酚酸 B 峰计算不低于 2000。

2.4.2 对照品溶液及线性关系考察 精密称取经五氧化二磷减压干燥器中干燥 24h 的丹酚酸 B 对照

表 2 正交试验结果

序号	A	B	C	D	丁香树脂酚 含量(mg)	丹酚酸 B 含量(mg)
1	1	1	1	1	8.58	303.17
2	1	2	2	2	14.79	390.56
3	1	3	3	3	19.19	348.39
4	2	1	2	3	10.90	228.69
5	2	2	3	1	18.13	390.82
6	2	3	1	2	14.54	272.60
7	3	1	3	2	18.61	373.48
8	3	2	1	3	10.85	265.35
9	3	3	2	1	17.72	405.16
(-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷						
I j	42.56	38.09	33.97	44.44	CT=1974.84	
II j	43.58	43.78	43.42	47.94		
III j	47.18	51.45	55.93	40.94		
SSj	3.93	29.99	80.87	8.18		
丹酚酸 B						
I j	1042.12	905.34	841.12	1099.15	CT=985535.59	
II j	892.12	1046.73	1024.41	1036.65		
III j	1043.98	1026.15	1112.69	842.43		
SSj	5062.95	3890.13	12793.67	11947.49		

表 3 (-)-丁香树脂酚-4-O-β-D-呋喃芹糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷方差分析

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
C	80.87	2	40.44	20.59	*
B	29.99	2	14.99	7.63	
D	8.18	2	4.09	2.08	
误差 A	3.93	2	1.96		

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

品适量,加甲醇制成每 1mg/mL 的溶液,作为对照品储备溶液。精密吸取 1mg/mL 的丹酚酸 B 储备液 0.1、0.5、1、2、3、5mL,用 50% 甲醇定容至 10mL 的容量瓶中,摇匀,分别得到浓度为 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5mg/mL 的丹酚酸 B 系列对照品溶液。分别吸取上述各对照品溶液 10 μ L,进样,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积均值(Y)为纵坐标,进样浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。得回归方程 $Y=11784.73X-58.80$, $r=0.9999$ ($n=6$)。结果表明丹酚酸 B 进样量在 0.1~5 μ g 范围内呈良好的线性。

2.4.3 样品中丹酚酸 B 的含量测定 分别精密吸取对照品溶液(浓度为 0.1mg/mL, 0.5mg/mL)及各供试品溶液 10 μ L 注入液相色谱仪,每个样品平行进样 2 次,以外标两点法计算,测定各样品中丹酚酸 B 的含量。结果见表 2、表 4。

表 4 丹酚酸 B 方差分析

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
C	12793.67	2	6396.84	3.29	
D	11947.49	2	5973.75	3.07	
A	5062.95	2	2531.48	1.30	
误差 B	3890.13	2	1945.07		

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

综合(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、丹酚酸 B 含量的方差分析结果,同时结合生产实际中降低成本、节约时间等因素,最终确定最优工艺条件为 $A_1B_2C_3D_2$ 。即加饮片总量 25 倍量水分 3 次提取,每次 1.5h。

2.5 最佳工艺验证 取 4 剂处方量的合欢皮、丹参等 9 味药材各 3 份,按最佳水提工艺进行提取,即药材不浸泡,加饮片总量 25 倍量的水,分 3 次煎煮,每次 1.5h。合并水煎液,浓缩至 250mL,取样测定水煎液中(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷及丹酚酸 B 的含量,色谱条件和供试品溶液的制备方法与水提正交样品相同。结果见表 5。结果可见,3 次试验所测得的(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷及丹酚酸 B 的含量与最佳工艺所测得的平均含量比较相近,说明该工艺稳定、可行。

表 5 水提工艺验证结果

序号	每份样品中(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷含量(mg)	每份样品中丹酚酸 B 含量(mg)
1	18.38	388.48
2	18.54	379.62
3	18.37	385.94

3 讨论

实验过程中,饮片的品种繁多,质量差异很大,而且有的饮片中含有的有效成分很低,不能达到制剂的要求,因此在投料前必须控制饮片的质量。

(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷的含量测定参照 2010 版《中国药典》一部合欢皮项下(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷的含量测定方法。实验曾比较了文献中合欢皮的含量测定方法,流动相为甲醇:水(34:66)^[2],但峰形不好,干扰多,故最终确定 2010 版《中国药典》一部合欢皮项下含量测定方法。因该方药味多,60 多分钟仍有峰出现,故最终确定的流动相为梯度洗脱。

丹酚酸 B 的含量测定参照 2010 版《中国药典》一部丹参项下丹酚酸 B 的含量测定方法。实验曾比较了文献中丹参的含量测定方法,流动相为甲醇-乙腈-甲酸-水(30:10:1:59),流动相复杂,因本试验所用高效液相色谱仪为二元泵,需要人工将流动相进行混合,增加了误差,经查阅了大量的文献和反复摸索,故最终确定丹参的流动相为上述梯度洗脱方法。

本实验采用正交试验法优选欢天安神饮水提工艺,以(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷和丹酚酸 B 含量为指标,采用 HPLC 法进行含量测定,结果进行方差分析,最终优选出 $A_2B_2C_3D_2$ 的制备工艺,又通过最佳水提工艺验证实验也证明了该工艺的合理性。

参考文献

- [1] 张建玲,贺祝英,吴红梅.正交试验优选心衰宁合剂水提工艺.中国实验方剂学杂志,2011,17(7):30
- [2] 千国平,朱红,师磊,等.不同产地山合欢皮中(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-葡萄糖苷含量的比较.药物分析杂志,2009,29(4):606

第一作者:郭华(1976—),女,本科学历,主管中药师,中药学专业。

通讯作者:李文,本科学历,主任中药师。
510531043@qq.com

收稿日期:2015-05-26

编辑:吴 宁

