

正交设计优选元胡止痛方乙醇提取工艺研究

于定荣,翁小刚*,杜茂波,李 丽,刘 颖,陈 畅,王海林

(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

摘 要:目的:优选元胡止痛方的乙醇提取工艺,为元胡止痛方的醇提工艺及工业化生产提供实验依据。方法:以乙醇浓度、溶剂体积、提取时间及提取次数为考察因素,按正交表 $L_9(3^4)$ 进行正交设计实验;通过 HPLC 法同时测定其指标成分延胡索乙素、欧前胡素的含量,以加权法进行评判,优选其最佳醇提工艺。结果:各因素对元胡止痛方乙醇提取效果的影响由大到小的顺序依次为: $B > C > A > D$; B、C 及 A 起主要作用,其中提取溶剂(B)、提取时间(C)均有极显著性差异($P < 0.01$);乙醇浓度(A)有显著性差异($P < 0.05$);而提取次数(D)无统计学意义($P > 0.05$)。结论:优选出的元胡止痛方的乙醇提取最佳工艺条件为 $A_3B_3C_3D_2$,即以 10 倍量 80%乙醇回流提取 2 次,每次 3h 为最佳。验证结果表明该工艺稳定、可行,可为元胡止痛方的工业化生产提供参考。

关键词:元胡止痛方;正交设计;延胡索;白芷;醇提取工艺

DOI:10.11954/ytctyy.202107013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1673-2197(2021)07-0041-04



下总蒽醌含量测定的波长 254 nm,作为本方法的检测波长。

《本草新编》记载大黄性甚速,走而不守,善荡涤积滞、调中化食、通利水谷、推陈致新、导瘀血、破症结、散坚聚、止疼痛、败痈疽热毒、消肿胀,俱各如神。《日华子本草》提及大黄可“调血脉,利关节,泄壅滞”,外敷用于各类疮疖痛毒。历代医家以及《神农本草经》《纲目》《药性论》等对大黄的应用均有详细阐述:①积滞便秘;②血热吐衄,目赤咽肿;本品性味苦寒能降,可下泄上炎之火,具清热泻火、凉血止血之功;③跌扑损伤、热毒疮疡及水火烫伤;④瘀血证:下瘀血,清瘀热,能活血逐瘀通经,为临床骨伤科常用药物;⑤湿热证、淋证。文献报道大黄蒽醌类成分有较强的抑制 PGE2 及抑制 MAPK 级联系统的作用,表明大黄可通过抑制 PGE2 生成而产生抗炎作用^[6]。另有报道,大黄外用具有显著的消炎、镇痛、抗菌等作用。本试验采用 HPLC 法对制剂中大黄酚成分开展了方法学考察,建立了适宜的色谱方法,通过三批中试样品进一步验证了大黄酚含量测定的稳定性。本试验样品 200501-200503 批次因使用的是同一批中间体生产,本品大黄酚含量为 1.62 mg/g,考虑到转移率等问题,建议将含量初定为 1.50 mg/g。后期跟进积累 3~5 批大黄原料所生产成品大黄

酚含量,再确定具体值。同时对大黄原料及中间体分别建立内控标准,以确保产品质量的稳定性。

参考文献:

- [1] 胡志俊,侯宝兴,郝明,等. 消瘀止痛膏治疗急性软组织损伤疗效观察[J]. 上海中医药杂志,2006,40(6):44-45.
- [2] 薛峰,许金海,叶洁,等. 消瘀止痛膏贴治疗运动性踝关节急性软组织损伤的临床研究[J]. 中国中医急症,2011,20(3):350-352.
- [3] 孙汉青,李锦萍,刘力宽,等. 大黄化学成分与药理作用研究进展[J]. 青海草业,2018,27(1):47-51.
- [4] 高亮亮. 唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的化学成分和生物活性研究[D]. 北京:北京协和医学院研究生院,2012:1-141.
- [5] 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,2015:248.
- [6] 土屋千家子. 大黄及其成分的抗炎作用[M]. 国外医学:中医中药分册,2003,25(1):54.

(编辑:陈湧涛)

收稿日期:2020-11-06

基金项目:国家自然科学基金(81803594)

作者简介:于定荣(1975—),男,博士,中国中医科学院副研究员,研究方向为中药炮制、中药化学。E-mail:yudingrong0826@sina.com

通讯作者:翁小刚(1975—)男,博士,中国中医科学院副研究员,研究方向为中药复方配伍机制及中药药代动力学。E-mail:xgweng@icmm.ac.cn

Study on the Optimization of Ethanol Extraction Process in Orthogonal Design of Yuanhu Zhitong Recipe

Yu Dingrong, Weng Xiaogang*, Du Maobo, Li Li, Liu Ying, Chen Chang, Wang Hailin
(Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: **Objective:** To optimize the ethanol extraction process of Yuanhu Zhitong Recipe and provide experimental basis for the alcohol extraction technology and industrial production of Yuanhu Zhitong Recipe. **Methods:** Taking ethanol concentration, solvent volume, extraction time and extraction times as investigating factors, orthogonal design experiment was carried out according to orthogonal table $L_9(3^4)$; the content of dl-tetrahydropalmatine and imperatorin were determined simultaneously by HPLC. Judging by weighting method, optimizing the best alcohol extraction process. **Results:** The order of the influence of various factors on the ethanol extraction effect of Yuanhu Zhitong Recipe is: $B > C > A > D$; B, C and A play the main role, among which (B) extraction solvent, (C) the extraction time has extremely significant difference ($P < 0.01$); (A) the ethanol concentration has a significant difference ($P < 0.05$); and (D) the number of extractions is not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** The optimal technological condition for ethanol extraction of Yuanhu Zhitong Recipe is $A_3 B_3 C_3 D_2$, that is, 10 times the amount of 80% ethanol is refluxed twice, and each time is 3 hours. The verification results show that the process is stable and feasible, and can provide a reference for the industrial production of Yuanhu Zhitong Recipe.

Keywords: Yuanhu Zhitong Recipe; Orthogonal Design; Corydalis Yanhusuo; Angelica Dahurica; Alcohol Extraction Process

元胡止痛方由延胡索加白芷组成,在临床上用于治疗气滞血瘀引起的多种疼痛,包括胃痛、肋痛及头痛等证。目前,研究报道中关于元胡止痛方的醇提取方法主要有超声提取法,如甲醇超声提取^[1]、浓氨—甲醇超声提取^[2],回流提取法,如甲醇、乙醇回流提取^[3-7],但多集中在元胡止痛软胶囊、元胡止痛滴丸、元胡止痛片^[8-9]等制剂的提取研究,而对元胡止痛方的提取报道较少。此外,2015版《中华人民共和国药典》中收录的元胡止痛方制剂如元胡止痛滴丸、元胡止痛软胶囊、元胡止痛口服液等制剂中采用的乙醇浓度各不相同,且均无明确的提取溶剂量。在查阅、分析元胡止痛方醇提取相关文献后,结合2015版《中华人民共和国药典》中元胡止痛方类制剂的提取工艺,并在前期元胡止痛方正交设计水提取工艺研究的基础上,本实验以乙醇浓度、加入溶剂体积、提取时间以及提取次数为考察因素,以正交设计对延胡止痛方进行乙醇提取工艺优选。通过建立 HPLC 法,采用梯度洗脱的同时测定方中药效成分延胡索乙素、欧前胡素 2 个指标的含量,通过加权法评判其最佳提取工艺条件,可为元胡止痛方的提取工艺及其工业化生产提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(型号为 LC-20AT, 购于日本岛津)、二极管阵列检测器(SPD-M20A-型, 购于日本岛津);十万分之一天平(型号为 ME155DU, 购于瑞士梅特勒—托利多仪器有限公司)。

1.2 饮片

延胡索饮片购自聚药堂药业有限公司(河北省安国市, 批号为 1907004);白芷饮片来源于同一公司,批号为 1907002;符合 2015 版《中华人民共和国药典:一部》延胡索、白芷饮片项下规定。将延胡索、白芷饮片以 2:1 的量(延胡索:白芷=2:1)进行混合、粉碎,得其粗粉用于实验。

1.3 对照品

延胡索乙素对照品来源于曼思特生物科技有限公司(四川省成都市,批号为 MUST-20032011,其纯度为 99.86%);欧前胡

素来源于同一公司(批号为 MUST-20031810,其纯度 98.27%)。

1.4 试剂

甲醇为色谱纯,娃哈哈矿泉水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 因素及水平确定

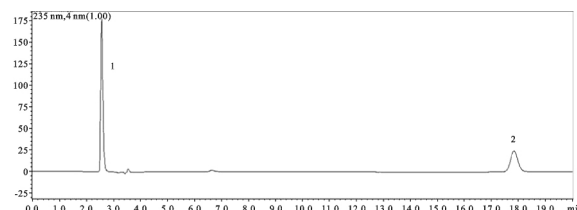
在元胡止痛方的粉碎度、浸泡时间、过滤等条件相同的前提下,参考 2015 版《中华人民共和国药典》元胡止痛方类制剂的提取工艺以及相关研究报道,选择醇提浓度为 60%、70%、80%;提取溶剂为药物的 6 倍量、8 倍量、10 倍量;提取时间为 1.5 h、2.0 h、3.0 h;提取次数分别为 1 次、2 次、3 次^[10],正交设计见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交设计因素、水平

因素	乙醇浓度 (A)(%)	溶剂体积(B) (倍数)	提取时间 (h)	提取次数 (D)(次)
水平 1	60	6	1.5	1
水平 2	70	8	2.0	2
水平 3	80	10	3.0	3

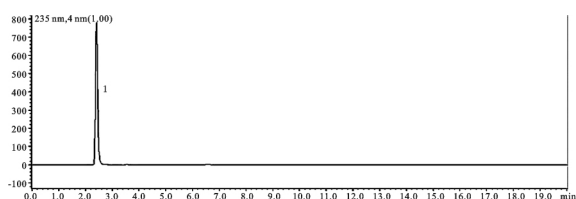
2.2 延胡索乙素及欧前胡素含量测定^[1,11]

2.2.1 色谱条件 Inertsil[®] ODS-2 型(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:甲醇(A)、0.1%磷酸水溶液(B),通过梯度洗脱:(0~7 min, 45%~55% A; 7~9 min, 55%~63% A; 9~12 min, 63%~64% A; 12~20 min, 64%~78% A)。进样量:10 μL;检测波长为 235 nm,柱温为 35℃,流速为 0.8 mL · min⁻¹。结果:延胡索乙素及欧前胡素二个色谱峰可完全分离,峰型良好,见图 1—图 4。



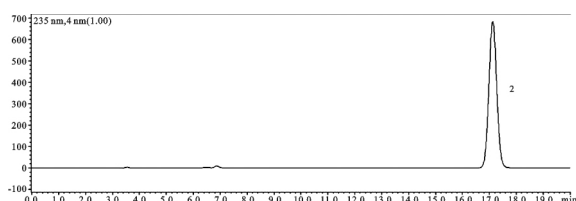
注:1. 延胡索乙素;2. 欧前胡素。

图 1 混合对照品(延胡索乙素、欧前胡素)的 HPLC 色谱



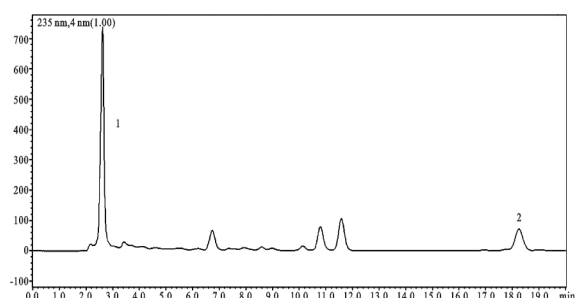
注:1. 延胡索乙素。

图2 对照品(延胡索乙素)HPLC 色谱



注:2. 欧前胡素。

图3 对照品(欧前胡素)HPLC 色谱



注:1. 延胡索乙素;2. 欧前胡素。

图4 供试品 HPLC 色谱

2.2.2 供试品溶液的制备 取“1.2”项中的元胡止痛方粗粉,精密称定,得9个试验号,置于500mL圆底烧瓶中,按表1中正交设计方案操作。分别加入不同体积、不同浓度的乙醇进行回流提取。将各次提取液以纱布过滤,滤液合并,定容,精密量取一定量滤液于蒸发皿中,以水浴浓缩,蒸干得浸膏。所得浸膏以甲醇溶解于5mL量瓶中,定容至刻度,再以0.22μm的滤膜进行过滤,得9个供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取7.28mg延胡索乙素、5.42mg欧前胡素置于10mL容量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,制备得延胡索乙素、欧前胡素对照品储备液。分别精密吸取延胡索乙素、欧前胡素对照品储备液适量,置于同一10mL容量瓶中,加甲醇稀释,定容至刻度,即配制得混合对照品溶液(质量浓度:每1mL含延胡索乙素291.2μg、含欧前胡素162.6μg)。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取延胡索乙素、欧前胡素混合对照品溶液2μL、5μL、8μL、10μL、40μL注入高效液相色谱仪,按“2.2.1”项色谱条件测定。以各对照品的进样量为横坐标(μg)、峰面积为纵坐标(mAU),分别绘制标准曲线,得延胡索乙素回归方程: $Y_1 = 2.0 \times 10^6 X + 7746$, $R^2 = 0.9999$;欧前胡素回归方程: $Y_2 = 4.0 \times 10^6 X + 5478$, $R^2 = 0.9998$ 。结果:延胡索乙素在0.5824~11.648μg,欧前胡素在0.3252~6.504μg,对照品的进样量与峰面积有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取第2实验号样品供试品溶液(加8倍量60%的乙醇,提取2次,每次提取2h)10μL,按“2.2.1”项色谱条件连续进样6次,结果测得延胡索乙素的峰面积RSD为0.43%,欧前胡素的峰面积RSD为0.52%,仪器精密度良好。

2.2.6 供试品溶液测定 分别精密吸取9个供试品溶液,按“2.2.1”项分别进样,测定样品中延胡索乙素及欧前胡素的含量。见表2。

2.2.7 稳定性实验 取第2实验号样品供试品溶液,放置0h、1h、2h、4h、12h、24h,按“2.2.1”项测得延胡索乙素峰面积的RSD为0.99%,欧前胡素峰面积的RSD为1.02%,表明供试品溶液在测定的24h内稳定。

2.2.8 重复性试验 按第2实验号方案,取“1.2”项同量的元胡止痛方粗粉6份,按“2.2.2”项中方法制备得供试品溶液,按“2.2.1”项条件,依法测得延胡索乙素峰面积的RSD为1.12%,欧前胡素峰面积的RSD为1.33%,表明方法重复性良好。

2.2.9 回收率实验 取“1.2”项相同量的元胡止痛方粗粉,精密称定9份,置250mL圆底烧瓶中,按“2.1”项正交设计表中第1实验号方案,分别精密加入对照品适量,制备低、中、高质量浓度样品,按“2.2.1”项色谱条件,依法测定延胡索乙素、欧前胡素含量并计算回收率。结果延胡索乙素平均加样回收率为98.81%,RSD为1.39%;欧前胡素平均加样回收率为99.41%,RSD为1.84%。

2.3 结果

2.3.1 直观分析与方差分析 结果表明,4因素中A、B、C三因素均具有统计学意义,其中A(乙醇浓度)对提取效果有显著性影响($P < 0.05$),故A选A₃;而B(提取溶剂体积)、C(提取时间)对提取效果均有极显著性影响($P < 0.01$);故B选B₃;C选C₃;而D(提取次数)无显著性差异,其水平可以任取,结合R值及生产实际,D选D₂。各因素对实验结果的影响由大到小依次为:B>C>A>D;B、C及A起主要作用,而D影响较小。确定元胡止痛方醇提取的最佳方案为A₃B₃C₃D₂,即加10倍量的80%乙醇,回流提取2次,每次提取3h。见表2、表3。

2.3.2 工艺验证实验 按“1.2”项称取处方比例量元胡止痛方粗粉,共3份,按优选出的A₃B₃C₃D₂工艺条件重复实验,按“2.2.1”项分别测定延胡索乙素及欧前胡素的含量,经加权评判,测定得其平均含量分别为0.6821%、0.6823%、0.6816%,高于正交设计表中其他实验号的平均含量,说明优选出的最佳乙醇提取工艺条件稳定、可行。见表4。

3 讨论

2015年版《中华人民共和国药典》中收录的元胡止痛口服液、元胡止痛颗粒的提取工艺以60%乙醇浸泡24h再回流提取2次(第1次3h,第2次2h),以延胡索乙素含量为其质控指标。元胡止痛片、元胡止痛滴丸的提取工艺与其相同,但在质控指标中增加了欧前胡素含量。而元胡止痛软胶囊的提取工艺则以80%乙醇浸泡12h,再分别回流提

表 2 $L_9(3^4)$ 正交设计及延胡索乙素、欧前胡素含量加权评判结果

实验号	A 浸泡时间 (min)	B 加水量 (倍)	C 提取时间 (h)	D 提取次数 (次)	延胡索乙素 (A)(%)	欧前胡素 (B)(%)	综合评判值 $Y=0.6 \times A + 0.4 \times B$
1	1	1	1	1	0.592 1	0.118 7	0.402 7
2	1	2	2	2	0.633 6	0.126 8	0.430 9
3	1	3	3	3	0.994 8	0.204 8	0.678 8
4	2	1	2	3	0.716 3	0.143 7	0.487 3
5	2	2	3	1	0.773 4	0.155 0	0.526 0
6	2	3	1	2	0.853 8	0.170 8	0.580 6
7	3	1	3	2	0.882 1	0.176 7	0.599 9
8	3	2	1	3	0.672 6	0.134 8	0.457 5
9	3	3	2	1	0.983 1	0.196 9	0.668 6
K1	1.51	1.49	1.44	1.60			
K2	1.59	1.41	1.59	1.61			
K3	1.73	1.93	1.80	1.62			
R	0.07	0.17	0.12	0.01			

表 3 延胡索乙素、欧前胡素含量测定方差分析结果

方差来源	离差平均和	自由度	均(MS)	F 值	P 值	显著性
浸泡时间 A	0.01	2	0	67.92	<0.05	*
加水量 B	0.05	2	0.01	449.40	<0.01	* *
提取时间 C	0.02	2	0	196.05	<0.01	* *
提取次数 D	0	2	0	1.00	>0.05	
误差	0	0	0			
总误差	0.08	8	0			

注: F 临界值: $F_{0.01}(2,2)=99$; $F_{0.05}(2,2)=19$; F 值 $>F_{0.01}$, $P<0.01$ 表示有极显著性差异; F 值 $>F_{0.05}$, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

表 4 正交实验验证结果 ($\bar{x} \pm s$)

编号	延胡索乙素平均 含量(%)	欧前胡素平均 含量(%)	加权评判平均 含量(%)
1	0.997 1 $\pm$ 0.63	0.209 6 $\pm$ 0.39	0.682 1
2	0.998 4 $\pm$ 0.27	0.208 2 $\pm$ 0.45	0.682 3
3	0.996 8 $\pm$ 0.52	0.208 9 $\pm$ 0.71	0.681 6

取 2 次(每次 2h),以延胡索乙素含量为其质控指标。可见,元胡止痛方类制剂的提取工艺中采用的乙醇浓度各不相同,且均无明确的提取溶剂量。目前的元胡止痛方研究报道也以元胡止痛滴丸、元胡止痛软胶囊、元胡止痛片等制剂的研究居多。

本实验以乙醇浓度、溶剂体积、提取时间及提取次数为考察因素,以 HPLC 法同时测定元胡止痛方中指标成分延胡索乙素、欧前胡素的含量,以加权法进行评判,通过正交设计优选出其最佳醇提工艺。考虑到元胡止痛方中延胡索为君药,白芷为臣药,故将延胡索乙素含量加权系数定为 0.6,欧前胡素含量的加权系数定为 0.4,通过综合评分公式 $Y=(\text{延胡索乙素含量} \times 0.6) + (\text{欧前胡素含量} \times 0.4)$ 进行评判,并对其评判结果进行显著性分析^[12]。这种采用多指标评价提取工艺的方式较采用单一的延胡索乙素或欧前胡素成分含量作为指标进行评价更科学、合理,也提高了质量控制标准。结果优选出元胡止痛方的最佳乙醇提取工艺条件为 $A_3B_3C_3D_2$,即将元胡止痛方以 10 倍量 80%乙醇回流提取 2 次,每次 3h 为最佳,三批工艺验证结果表明该工艺可行,稳定性好,可为元胡止痛方的工业化生产提供参考。

参考文献:

[1] 高晓艳,凌娅,徐汇,等. HPLC 法测定元胡止痛软胶囊中延

胡索乙素和欧前胡素的含量[J]. 海峡药学,2015,27(6):74-76.

- [2] 杨芳,万丽,杨荣平,等. 一测多评法测定元胡止痛胶囊中欧前胡素、异欧前胡素和延胡索乙素的含量[J]. 中国药房,2012,23(32):3046-3049.
- [3] 章军,王跃生,李慧,等. HPLC 法同时测定元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(12):10-12.
- [4] 施婷婷,韩丽妹,李希,等. 元胡止痛方有效组分不同配伍对大鼠胃溃疡的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志,2015,24(3):141-147.
- [5] 刘涛,冯晶晶,李鹏程,等. 元胡止痛系列制剂 4 种工艺比较[J]. 中成药,2017,39(4):851-854.
- [6] 李俊芳,王鹏,翟兴,等. 元胡止痛方对小鼠疼痛模型的镇痛作用及其“量-效”关系探索研究[J]. 现代中药研究与实践,2017,31(3):21-24.
- [7] 吴婷婷,周江,李美云,等. 元胡止痛方提取工艺的均匀设计法优化[J]. 时珍国医国药,2015,26(12):2912-2913.
- [8] 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,2015:601-605.
- [9] 杜茂波,刘淑芝,刘树扬,等. 元胡止痛软胶囊中延胡索提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):50.
- [10] 李思思,许浚,张铁军,等. HPLC 法同时测定元胡止痛滴丸中 6 种成分[J]. 中草药,2015,46(21):3198-3201.
- [11] 朱央央,余伯阳. RP-HPLC 测定元胡止痛方中延胡索乙素和欧前胡素的含量[J]. 中成药,2004,26(6):455-458.
- [12] 陆岳涛. 元胡止痛片治疗痛经的疗效成分及组方原理初步研究[D]. 西安:第四军医大学,2013.

(编辑:赵 可)