

正交实验法优选复方水牛角颗粒提取工艺的研究

曹雯¹, 许道龙¹, 李铁军² (1. 上海市普陀区中医医院, 上海 200062; 2. 第二军医大学药理教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 选择复方水牛角颗粒制剂的最佳提取工艺。方法 对提取溶剂、加水量、提取次数及提取时间作为考察因素, 采用正交设计法每个因素拟订 3 个水平, 并用相应的药效学实验结果评价每一种工艺的药效作用的优劣, 再结合得率和实际生产选择最佳工艺。结果 用 8 倍量 50% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h, 此工艺所得的复方水牛角颗粒制剂的得率和药效学结果最佳。结论 采用正交设计和相应的药效学实验的结果优选提取工艺是一个合理的和值得提倡的方法。

[关键词] 提取工艺; 正交实验; 药效学实验

[中图分类号] R 285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)03-0209-03

Optimization of extraction process of compound Shuiniujiao granule by orthogonal test

CAO Wen¹, XU Daolong¹, LI Tiejun² (1. Chinese Medicine Hospital, Shanghai Putuo District, Shanghai 200062; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[Abstract] **Objective** To select the best extraction process in preparation of compound Shuiniujiao granule. **Methods** The extraction solvent, add water, extraction times and extraction time as the study factors, each factor orthogonal design method developed three horizontal, and use the results of the corresponding pharmacodynamic evaluation of the efficacy of each role in a process, combined with the yield and the actual production process to select the best. **Results** 50% ethanol plus 8 times the amount of extracted three times, each time a small process when the compound derived from buffalohorn grain yield of preparation and pharmacodynamics of the most satisfactory results. **Conclusion** Orthogonal design and the corresponding pharmacodynamic results of the experiment to select the extraction process is a reasonable approach should be advocated.

[Key words] extraction process; orthogonal test; pharmacodynamic experiment

复方水牛角颗粒是我院长期使用的医院制剂, 该制剂有水牛角、金银花、地黄、连翘、板蓝根、淡豆豉、玄参、石菖蒲、麦冬、天花粉、紫草、甘草等中药组成, 具有清热、凉血、解毒的功效。临床主要用于痛风疾病的治疗。该制剂已在本院治疗近万例的痛风病人, 显示了疗效确切、副作用小的优点。为确定更为合理的提取工艺, 保证制剂的疗效和质量稳定, 笔者采用正交试验法对制剂工艺中的提取溶剂、加水量、提取次数及提取时间进行多次试验, 并对每种提取方法所得的提取物, 采用研制痛风药新药的药理实验模型作为评价药效的方法进行试验, 为确定该制剂最佳生产工艺的参数提供科学的实验依据。

1 仪器与药品

1.1 仪器 旋转蒸发仪、水浴锅、分析天平 (日本岛津 AUW 220D)、循环水真空泵、紫外分光光度计

和容积测量器 (7140 plethysmeter 意大利)。

1.2 受试药物 复方水牛角颗粒。

1.3 工具用药 尿酸钠 (SIGMA 公司)。

1.4 动物 雄性 SD 大鼠, 体重 180~220 g 清洁级, 由第二军医大学动实验中心提供。实验动物质量许可证号: SCXK(沪) 2008-0016。

2 方法与结果

2.1 影响提取效果主要因素的选择 溶剂、加水量、提取次数及提取时间作为考察因素, 每个因素拟订 3 个水平 (见表 1), 选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 实验安排见表 2。

表 1 正交试验因素水平表

水平	A 提取溶剂	B 溶剂倍量	C 提取时间	D 提取次数
1	水	4	2	1
2	50% 乙醇	8	3	2
3	80% 乙醇	12	4	3

[基金项目] 上海市卫生局 2008~2009 年度中医药科研基金 (2008X006A)。

[作者简介] 曹雯 (1976-), 女, 主管中药师。E-mail: caowen320@yahoo.cn

原工艺中水牛角需先水煎 3 h 浓缩的清膏和水牛角残渣混合物再和其余 11 味中药一起煎煮。考

考虑到水牛角系动物类药, 活性成分类型多, 我们又设计了采用 50% 乙醇代替先回流 3 h 的方法, 将所得浓缩的清膏和水牛角残渣混合物再和其余 11 味中药一起煎煮。再获得 9 个提取物 (2 批共 18 个) 进行药效学试验。实验安排见表 3。

表 2 水牛角水先煎 3 h 的正交试验结果

因素序号	A	B	C	D	浸膏得率 (%)
1	1	1	1	1	7.8
2	1	2	2	2	14.4
3	1	3	3	3	16.8
4	2	1	2	3	11.8
5	2	2	3	1	9.8
6	2	3	1	2	13.2
7	3	1	3	2	9.6
8	3	2	1	3	13.8
9	3	3	2	1	11.2

注: 其中 2 号为原提取工艺条件

2.2 提取实验 将同一处方的复方水牛角颗粒, 按正交试验设计表的安排 (见表 2 表 3) 进行提取实验, 所得提取液过滤, 收集滤液, 浓缩, 得 18 份浸膏, 备用。

表 3 水牛角用 50% 乙醇先煎 3h 的正交试验结果

因素序号	A	B	C	D	浸膏得率 (%)
10	1	1	1	1	7.6
11	1	2	2	2	13.9
12	1	3	3	3	16.2
13	2	1	2	3	10.8
14	2	2	3	1	14.4
15	2	3	1	2	12.8
16	3	1	3	2	9.4
17	3	2	1	3	13.2
18	3	3	2	1	10.8

上述实验结果表明, 从不同的提取条件中所得浸膏的得率来看, 2 号、3 号、12 号和 14 号条件的得率较高。

2.3 药效学实验与结果

2.3.1 2.5% 尿酸钠溶液制备 取 1 g 尿酸钠结晶, 加入 36 ml 生理盐水, 同时加入 4 ml 吐温 80 加热搅拌, 配成 2.5% 尿酸钠溶液 40 ml 备用。

2.3.2 大鼠痛风模型制备 6 号注射针用灭菌注射针在大鼠右距小腿踝关节背侧, 45 度方向插入至胫骨肌腱内测, 将尿酸钠溶液 0.2 ml 注入关节腔内造模。分别在造模前, 造模后 24、48、72h 观察大鼠, 并测试受试踝关节肿胀度。

2.3.3 给药方法 取 160 只大鼠, 随机分为 20 组, 每组 8 只。造模前 2 天开始灌胃给药, 每日 1 次, 每

次 3 ml 模型组给予同等体积的生理盐水, 各组大鼠造模后, 每天继续给药一次。

2.3.4 药效学实验结果 大鼠右距小腿踝关节背侧注射尿酸钠溶液入胫骨肌腱内 24 h 后, 踝关节肿胀, 肿胀度可达 (33.41 ± 8.35)%, 之后逐渐消肿, 但在 48、72 h 肿胀度仍可达 (29.29 ± 8.30)% 和 (22.85 ± 4.11)%, 表明大鼠痛风模型制备成功。复方水牛角颗粒不同的提取条件中所得提取物对大鼠踝关节肿胀的抑制作用不同, 从 24 h 实验的结果看 1 号、3 号和 14 号浸膏的作用较强。从 72 h 实验的结果看, 1 号、6 号和 14 号浸膏的作用较强。具体结果见表 4。

表 4 不同时间各组大鼠踝关节肿胀度变化 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

药物序号	不同时间关节肿胀度 (%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0
模型	33.41 ± 8.35	29.29 ± 8.30	22.85 ± 4.11
1	22.47 ± 9.41	12.02 ± 5.58 ²⁾	5.70 ± 4.00 ²⁾
2	28.73 ± 6.92	22.17 ± 7.42	18.82 ± 10.30
3	19.20 ± 4.98 ²⁾	12.21 ± 4.23 ²⁾	13.12 ± 6.81 ¹⁾
4	26.51 ± 4.63	14.43 ± 4.47 ²⁾	11.57 ± 5.93 ²⁾
5	29.24 ± 4.24	17.30 ± 5.76 ¹⁾	16.27 ± 6.82
6	25.28 ± 4.42	15.57 ± 3.94 ²⁾	9.62 ± 5.59 ²⁾
7	30.61 ± 9.86	22.05 ± 9.39	14.88 ± 6.91 ¹⁾
8	25.44 ± 8.80	16.89 ± 9.21 ¹⁾	12.23 ± 10.07 ¹⁾
9	25.83 ± 9.71	18.56 ± 8.79	13.34 ± 9.62
10	29.35 ± 8.54	19.95 ± 7.82	16.97 ± 14.10
11	31.02 ± 8.69	17.33 ± 7.14 ¹⁾	12.96 ± 6.66 ¹⁾
12	29.17 ± 15.07	23.33 ± 12.83	19.83 ± 14.05
13	25.21 ± 4.99	18.30 ± 4.43 ¹⁾	11.48 ± 5.97 ²⁾
14	19.49 ± 3.61 ²⁾	12.68 ± 3.38 ²⁾	9.07 ± 5.74 ²⁾
15	26.20 ± 8.02	20.41 ± 4.36 ¹⁾	20.79 ± 5.78
16	30.19 ± 5.08	22.75 ± 5.72	18.28 ± 10.38
17	20.88 ± 6.70 ¹⁾	16.06 ± 3.44 ²⁾	10.88 ± 2.68 ²⁾
18	25.38 ± 8.63	19.02 ± 6.16 ¹⁾	14.82 ± 4.59 ²⁾

¹⁾ P < 0.05 ²⁾ P < 0.01 与模型组比较。

2.3.5 统计学处理 数据用 [AVG ± ANOV] 表示, 采用 t 检验进行差异的显著性分析。

3 结论和讨论

3.1 从水牛角经水和醇预煮 3 h 的的总得率 (或平均得率) 为 108.4% (或 12.0%) 和 104.1% (或 11.2%) 来看, 两种处理的方法的浸膏量并没有明显差异, 但对于以后相同的提取条件所得浸膏量还是有影响。从药效实验的结果来看, 两种方法对同一提取条件所得的浸膏抑制肿胀的效果也有所不同。说明水牛角预处理方法的差异, 也是影响得率和药效学结果的原因之一。

(下转第 222 页)

的电子云密度降低造成的。其中苯环上邻位氟取代化合物 4d 的活性弱于邻位氯取代化合物 4a 这同样可能是由氟吸电子诱导作用强于氯致使 4d 的苯环上电子云密度低于 4a 的苯环上电子云密度而引起的。而苯环上邻对位二氯取代的化合物 4f 也因其苯环上电子云密度低于单氯取代化合物 4a 或 4e

的电子云密度而活性降低。

结果提示苯环上有供电子基取代时活性较高, 对化合物 4c 进行更深入的毒性评价, 有望找到高效、低毒的新型抗高原反应药物。此外, 利用不同电性基团对苯环进行取代, 可能会找到活性更高的化合物。

表 2 乙酰唑胺对小鼠存活时间、T-AOC 活性和 T-ChE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	用药剂量 g/(kg·d)	存活时间 (t/s)	T-AOC(U/ml)	T-ChE(U/ml)
1% 羧甲基纤维素钠	0.2	1 628.4 ± 189.5	15.13 ± 1.94	31.09 ± 1.26
乙酰唑胺	0.2	2 011.1 ± 445.7	18.14 ± 0.76	36.14 ± 1.77
4 a	0.2	1 763.4 ± 144.6	18.19 ± 1.25 ²⁾	35.46 ± 1.00 ²⁾
4 b	0.2	1 696.5 ± 313.2	17.78 ± 2.30 ¹⁾	35.28 ± 3.04 ²⁾
4 c	0.2	1 989.1 ± 209.8 ²⁾	18.27 ± 1.57 ²⁾	36.09 ± 1.57 ²⁾
4 d	0.2	1 259.3 ± 118.9 ²⁾⁴⁾	14.75 ± 1.22 ⁴⁾	34.49 ± 3.31 ²⁾
4 e	0.2	1 556.7 ± 149.3 ⁴⁾	13.38 ± 0.35 ¹⁾⁴⁾	30.45 ± 5.25 ⁴⁾
4 f	0.2	1 489.9 ± 111.0 ⁴⁾	12.74 ± 1.79 ¹⁾⁴⁾	35.98 ± 1.33 ²⁾
4 g	0.2	1 600.4 ± 141.8 ¹⁾	10.88 ± 0.68 ²⁾⁴⁾	29.07 ± 1.55 ²⁾⁴⁾

¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 与 1% 羧甲基纤维素钠组比较; ³⁾ P < 0.05 ⁴⁾ P < 0.01 与乙酰唑胺组比较。

【参考文献】

[1] Wicks S, Bain N, Duttaoy A, et al Hypoxia rescues early mortality conferred by superoxide dismutase deficiency [J]. Free Radical Biology and Medicine 2009, 215(46): 176

[2] Chow T, Browne V, Heilesen HL, et al Ginkgo biloba and acetazolamide prophylaxis for acute mountain sickness: a randomized placebo controlled trial [J]. Archives of Internal Medicine, 2005, 165(3): 296

[3] 王川平, 孙莉, 苏春平. 乙酰唑胺临床应用中罕见的不良反应 [J]. 中国综合临床, 2001, 17: 567.

[4] Kozet A, Gafer U, Flom S et al Deteriorating renal function with acetazolamide in a renal transplant patient with pseudotumor cerebri [J]. Am J Kidney Dis 1993, 21: 322

[5] 谢建伟, 许建帆, 徐天有. 乙酰唑胺药物中间体的合成研究 [J]. 化工生产与技术, 2004, 11(6), 17

[收稿日期] 2009-11-25
[修回日期] 2010-02-22

(上接第 210 页)

3.2 综合上述提取工艺的得率和各个提取物的药效学实验结果, 再结合生产过程中考虑工艺的繁简、节约能源、节约成本等因素, 采用 14 号浸膏的提取工艺最为理想, 即 50% 乙醇、8 倍量、提取 3 次、每次 1 h 的工艺, 所得浸膏相对较高, 药效学实验效果最好。

3.3 本院制剂室复方水牛角颗粒的原提取工艺与 2 号工艺相同, 与本实验所选出的工艺相比较, 浸膏的得率基本相同, 但所选出的工艺的药效学效果则明显不如后者, 故可考虑对原工艺进行进一步研究后改进。

3.4 中药制剂的质量和提取工艺有很大的关系, 在优选制剂的工艺时, 一般以制剂的某一活性成分为指标, 选取活性成分含量高, 浸膏得率高的工艺为最佳工艺。但在对于一些传统的药味多、药量少、疗效好的复方制剂, 但暂时还无法确定其活性成分或指标性用于质量控制时, 根据相应的药效学实验的结

果来选择提取工艺是一个值得提倡的方法。另外, 中药制剂发挥作用, 往往不是单一活性成分起作用, 而是多成分在多靶点综合作用的结果, 这是目前大家所公认的。因此以药效学的结果为导向, 进行工艺优选就显得更为合理。

【参考文献】

[1] 孟昭亭. 痛风 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1997: 51

[2] 孙晓波, 李会芳, 代竹青, 等. 藏药桑当抗痛风作用的试验研究 [J]. 四川中医, 2005, 6(23): 19.

[3] 董玉秀, 张村, 熊国良. 水牛角四种不同提取方法的实验研究 [J]. 河南中医药学刊, 1996, 11(1): 27.

[4] 陈赤. 水牛角的研究与应用 [J]. 广西中医学院学报 2004, 7(4): 72

[5] 李保国, 杜雪, 张孝卫. 正交实验优选水牛角酶解的提取工艺研究 [J]. 中国当代医药, 2009, 16(14): 24

[收稿日期] 2009-12-25
[修回日期] 2010-05-14