

· 论著 ·

正交试验优选逐瘀止痛凝胶膏剂的水提工艺研究

杨东^{1,2}, 毕建云³, 郭艳伟¹, 张震宇³ (1. 潍坊市益都中心医院, 山东 潍坊, 262500; 2. 长春中医药大学, 吉林 长春, 130117; 3. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

[摘要] 目的 优选逐瘀止痛凝胶膏剂的水提工艺。方法 以赤芍中的芍药苷得率及干膏得率为考察指标, 在单因素实验的基础上, 采用正交设计优选出逐瘀止痛凝胶膏剂水提取工艺。结果 优选出的水提工艺为: 浸泡 1 h, 加 8 倍量水(第 2、3 次加 8 倍水), 回流提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 该提取工艺科学合理、稳定可行, 可用于逐瘀止痛凝胶膏剂的工业化生产。

[关键词] 逐瘀止痛; 凝胶膏剂; 芍药苷; 正交试验

[中图分类号] R943.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)02-0146-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.02.012

Optimization of the water extraction process for Zhuyu Zhitong gel paste by orthogonal experiment

YANG Dong^{1,2}, BI Jianyun³, GUO Yanwei¹, ZHANG Zhenyu³ (1. Yidu Central Hospital of Weifang, Weifang 262500, China; 2. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective** To study the water extraction process of Zhuyu Zhitong gel paste. **Methods** With the yields of paeoniflorin and the dry paste as target, the water extraction process of Zhuyu Zhitong gel paste was optimized by an orthogonal experimental design based on the single factor experiment. **Results** The optimized water extraction process of Zhuyu Zhitong gel paste was soaking the materials for 1 h with 8 times of water, then extracting 1.5 h for three times with the same amount of water. **Conclusion** The optimized extraction process was consistent, reasonable and feasible for large production.

[Key words] Zhuyu Zhitong; gel paste; paeoniflorin; orthogonal experiment

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)是临床上常见的妇科疾病,我国原发性痛经的发生率为36.06%^[1]。金元时代,朱丹溪以气血立论提出:“气滞、气血俱虚、血瘀等均可引起经行腹痛”。现代医家多认同痛经的发生在经期及其前后,由于气血变化,瘀血阻滞胞宫、冲任失于濡养,从而导致“不通则痛”和“不荣则痛”^[2,3]。治疗当选“活血化瘀,行气止痛”之方。逐瘀止痛方来源于血府逐瘀汤一方,该方主要由赤芍、桃仁、红花、川芎、当归、牛膝等十一味药材组成,方中桃仁、红花破血而润燥、活血化瘀而止痛为君药,赤芍、川芎助君药活血化瘀为臣药,

方中其他药材多以滋阴养血、清热凉血、行气止痛之药,因此临床上常用于治疗原发性痛经、流产后腰痛或出血或者月经血块等症^[4]。但是,现在该方多为汤剂,口感不佳,还常引起腹泻等胃肠道不良反应,反而会加重经痛的程度。本课题组改进组方的剂型为凝胶膏剂,以贴敷的方式使用,方便耐用。凝胶膏剂是现代中医药外用剂型中最常使用的一种,具有载药量大,对皮肤无刺激性、无致敏性,并可反复揭扯和贴敷,不污染衣物,无残留等优点,它主要是由药膏、基质及衬布组成的。笔者选择赤芍中芍药苷的得率及干膏得率为指标,同时根据药材主要成分的性质及该方的临床应用,确定对红花、赤芍、枳壳、桔梗、甘草等药材进行水提,现将水提工艺研究报道如下。

1 仪器与试药

所用药材均购自山东省药材有限公司。芍药苷(批号:110736-201328,中国食品药品检定研究院)

[基金项目] 山东中医药大学教育科学研究实验教学专项(sy2016021)

[作者简介] 杨东, 中药师. 研究方向: 中药制剂研究. E-mail: ydong921@126.com

[通讯作者] 毕建云, 初级实验师. 研究方向: 中药新剂型与新制剂研究. Tel: 18765872361; E-mail: bji1217@126.com

供含量测定用。水为纯净水(Millipore 公司纯水器制备);所用试剂为色谱纯或分析纯。高效液相色谱仪(Ultimate 3000),紫外检测器、泵、控制器(Thermo),数据处理器为 Chromeleon7 工作站;KQ-250E 型超声波中药处理机(昆山市超声仪器有限公司);FA1604N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);DZKW-S-6 数显电子恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定方法的建立^[5,6]

2.1.1 色谱条件 色谱柱: DiamonsiL C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 迪马公司);流动相: 乙腈-0.1%磷酸(15:85);流速: 1 ml/min;检测波长: 230 nm;进样量: 10 μl;柱温: 30 ℃。

2.1.2 溶液的制备 供试品溶液:按处方比例称取含红花 9 g、赤芍 6 g、枳壳 6 g、桔梗 4.5 g、甘草 6 g 的水提取药材共 31.5 g,加入 8 倍量的水,浸泡 1 h,煎煮 1.5 h,水煎 2 次,滤过、静置,放冷后于 500 ml 量瓶中以水稀释至刻度。精密量取 20 ml 于水浴上蒸发至 5 ml,加入 1 g 硅藻土拌匀、干燥、研细,精密加入 25 ml 甲醇,超声 30 min,滤过,取续滤液 1 ml 置于 10 ml 量瓶中,以甲醇稀释至刻度。

对照品溶液:精密称取芍药苷对照品 2.13 mg 于 10 ml 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度为 0.213 mg/ml 的溶液作为对照品溶液。

阴性对照液:按处方比例称取除赤芍外的水提药材,按照供试品溶液的制备方法,制得缺赤芍的阴性对照溶液。

2.1.3 专属性试验 按以上色谱条件分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、缺赤芍的阴性对照品溶液各 10 μl,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件检测。结果对照品溶液与供试品溶液在相同的保留时间有相应的峰,阴性对照无干扰峰。说明该测定方法的专属性好、无干扰(图 1)。

2.1.4 线性关系考察 将芍药苷对照品溶液制成一系列不同浓度(4.26、8.52、21.3、30.42、42.60、71.00 μg/ml)的溶液,按上述色谱条件进样分析,以对照品浓度(X, μg/ml)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归,结果芍药苷在 4.26~71.00 μg/ml 范围内有良好的线性关系,回归方程 $Y=197.8X+0.8$,相关系数 $r=0.9999$ 。

2.1.5 精密度试验 分别精密吸取“2.1.2”项下的供试品溶液 10 μl,注入高效液相色谱仪,连续测定 6 次,测定峰面积,结果 RSD 为 1.28%(n=6)。表

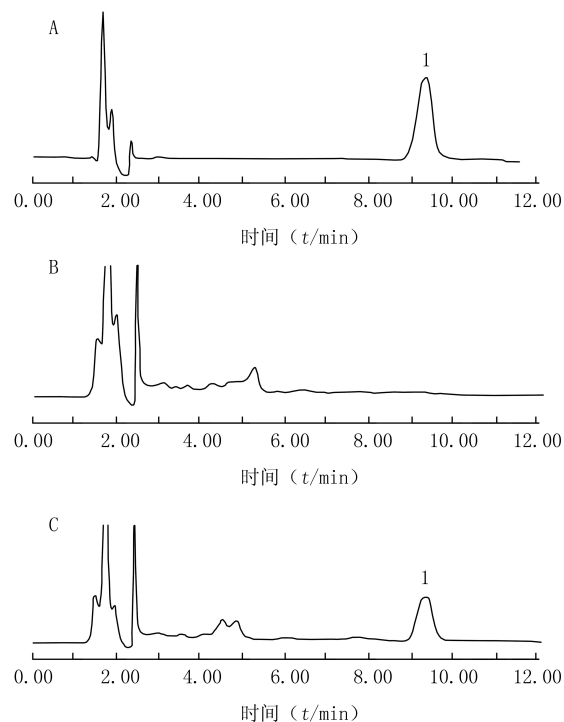


图 1 逐瘀止痛凝胶膏剂水提液 HPLC 图

A. 芍药苷对照品溶液; B. 缺赤芍的阴性液;
C. 供试品溶液; 1. 芍药苷

明色谱系统的精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 分别精密吸取“2.1.2”项下的供试品溶液 10 μl,在 0、2、4、8、12、24 h 各进样 1 次,测其峰面积积分值,结果 RSD 为 0.97%(n=6),表明芍药苷在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性考察 精密量取“2.1.2”项下的提取液 20 ml,平行 6 份,按上述方法制备供试品溶液并测定芍药苷的含量,RSD 为 0.993%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知芍药苷含量的供试品溶液 10 ml,分别加入芍药苷对照品 2.980 0 mg,混匀,平行 6 份,按上述方法测定,结果芍药苷平均回收率 98.10%,RSD 为 0.0802%(n=6),结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

取样 序号量(v/ ml)	样品中 含芍药 苷的量 (m/mg)	对照品 加入量 (m/mg)	实测值 (m/mg)	回收率 (%)	平均 回收率 (%)	RSD (%)	
1	10	2.907 8	2.980 0	5.829 8	98.01	98.10	0.080 2
2	10	3.039 6	2.980 0	5.965 9	98.23		
3	10	3.038 4	2.980 0	5.961 6	98.13		
4	10	3.046 2	2.980 0	5.967 8	98.08		
5	10	3.045 1	2.980 0	5.965 7	98.05		
6	10	3.036 1	2.980 0	5.957 8	98.08		

2.2 水提工艺的考察^[7]

2.2.1 因素与水平 选择考察因素为加水量、提取时间、提取次数,每种因素各取3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平设置见表2。

表2 正交试验因素水平表

水平	A. 加水量* (倍)	B. 提取时间 (t/h)	C. 提取次数 (次)
1	6	1	1
2	8	1.5	2
3	10	2	3

注:*表示第1次加水量,第2、3次加水量均与第1次相同

2.2.2 试验安排及结果 按比例称取含红花9g、赤芍6g、枳壳6g、桔梗4.5g、甘草6g的水提取药材共31.5g,按照正交试验表安排试验。将芍药苷与干膏得率进行直观及方差分析,结果见表3、4。

表3 正交试验结果

序号	因素				芍药苷 (mg/g)	干膏 得率 (%)
	A	B	C	D(误差)		
1	1(6倍)	1(1h)	1(1次)	1	20.88	24.26
2	1	2(1.5h)	2(2次)	2	34.67	36.87
3	1	3(2h)	3(3次)	3	32.85	42.71
4	2(8倍)	1	2	3	29.01	39.85
5	2	2	3	1	31.98	44.83
6	2	3	1	2	26.78	28.04
7	3(10倍)	1	3	2	32.02	38.50
8	3	2	1	3	29.13	29.38
9	3	3	2	1	38.14	34.64
K_1	88.40	81.91	76.79	91.00		
K_2	87.77	95.78	101.82	93.47		
K_3	99.29	97.77	96.85	90.99		
R	11.52	15.86	25.03	2.48		
K_1	103.84	102.61	81.68	103.73		
K_2	112.72	111.08	111.36	103.41		
K_3	102.52	105.39	126.04	111.94		
R	10.20	8.47	44.36	8.53		

表4 方差分析结果

	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
芍药苷得率	A	27.97	2	13.98	20.545	
	B	49.76	2	24.88	36.557	$P<0.05$
	C	117.07	2	58.53	85.999	$P<0.05$
	D(误差)	1.36	2	0.68		
干膏得率	A	20.52	2	10.26	1.465	
	C	340.47	2	170.23	24.308	$P<0.01$
	B+D(误差)	28.01	4	7.00		

注: $F_{0.1(2,4)}=4.32, F_{0.05(2,4)}=6.94, F_{0.01(2,4)}=18.0; F_{0.1(2,2)}=19.0, F_{0.05(2,2)}=99.0, F_{0.01(2,2)}=9.0$

直观分析发现,各因素对芍药苷得率的影响程度依次为 $C>B>A$,即提取次数>提取时间>加水量,且提取次数3次与2次接近,2h与1.5h接近,加水量10倍明显高于前两者。方差分析结果显示,因素B、C具有显著性影响,因素A无显著性影响。直观分析发现,各因素对干膏得率的影响程度依次为 $C>A>B$,即提取次数>加水量>提取时间,加8倍量的水提要高于6倍与10倍量,且提取1.5h与2h接近,提取3次明显高于另两者。方差分析结果显示,因素C对结果的影响具有显著性。两种考察因素方差分析结果一致。综合两种指标的直观分析与方差分析,同时从省时节能的角度考虑,综合平衡确定最佳提取工艺为 $A_2B_3C_2$ 。即加8倍量水(第2、3次加8倍),回流提取3次,每次1.5h。

2.2.3 优选工艺验证试验 以上述优化条件,平行3次验证试验,结果见表5。芍药苷得率平均值为34.59mg/g, RSD为1.60%($n=3$)。干膏得率平均值为41.94%, RSD为0.330%($n=3$)。表明工艺条件稳定可行。

表5 验证性试验结果($n=3$)

序号	芍药苷得率 (mg/g)	干膏得率 (%)
1	33.96	41.78
2	35.01	42.04
3	34.79	41.99
平均值	34.59	41.94
RSD(%)	1.60	0.330

3 讨论

逐瘀止痛凝胶膏剂主要由红花、赤芍、牛膝等十一味中药材组成。红花主要成分红花黄素是其主要的水溶性成分,主要起到抗凝血、抗血栓、改善血液的微循环作用^[8]。赤芍总苷(TPG)是赤芍的主要成分,TPG可显著降低血小板、红细胞聚集,活化部分凝血酶原时间,降低高、低切变率下全血黏度及血浆黏度,减少血栓的生成,从而起到抗凝血、抗血栓的作用^[9]。芍药苷(PF)是TPG中的主要组成部分,PF在起活血化瘀作用的同时,兼具明显的镇痛效果。大量实验研究发现,在氮酮、薄荷醇等促渗剂作用下,PF透皮效果明显,故本研究中水提部分以PF作为指标成分^[10,12]。红花为君药,现代文献对其有效成分研究不甚透彻,主要的水提成分为红花黄色素类(主要为羟基红花黄色素),但是该成分是水溶性大分子化合物,不易透过皮肤,在有较少促渗

剂(20%~30%乙醇)的条件下,其累积透过率仅约1.26%;赤芍的主要水提成分为PF,其理化性质中分子量小于600、熔点低于200℃、油水分配系数适中,是较易透过皮肤屏障的水溶性药物的代表,PF的透皮性能要强于红花黄色素类成分^[13,14]。基于将处方制备成透皮贴剂,以制剂中透过足量的有效成分为有效,因此,优选工艺最终以水提工艺选择赤芍中的PF为指标成分。

水提工艺研究中,笔者先单因素考察了浸泡时间,结果发现药材浸泡后,芍药苷得率及干膏得率明显提高,但浸泡1h与1.5h得率接近,考虑到生产遵从省时、高效原则,故浸泡时间确定为1h。在单因素基础上正交试验筛选出最佳提取工艺为:加8倍量水(第2、3次加8倍),回流提取3次,每次2h。在水提基础上,后续研究中还要对剩余药材进行醇提的操作,筛选出最佳提取工艺为浸泡1h,加8倍量乙醇(第2、3次加8倍),回流提取3次,每次1.5h。组方中当归、川芎及桃仁预期采用超临界提取药材的挥发油,以期采用最行之有效的方法最大程度地提取药材的有效成分。

逐瘀止痛凝胶膏剂主要用于治疗血瘀型痛经、流产后出血等症,本课题组在后续的研究中还考虑制备一种磁疗发热贴,配合药物的活血化瘀之效起到行经止痛的作用,在缓解患者腹部不适的基础上,采用加热的方式还可以加速药物的透皮吸收。

【参考文献】

[1] 迟晓丽,刘国云,周文霞,等.原发性痛经的治疗药物和治疗靶

点研究进展[J].军事医学,2007,31(5):470-473.

- [2] 王艳英.原发性痛经发病机制及治疗的研究进展[J].中华中医药杂志,2015,30(7):2447-2449.
- [3] 连伟清,王唯迪,徐梅,等.原发性痛经发病机制及治疗的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2012,39(1):29-31.
- [4] 李廷付.血府逐瘀口服液治疗原发性痛经临床观察[J].实用中西医结合临床,2014,14(9):27-28.
- [5] 王平,刘善新,单玲玲,等.正交试验法优选颈痛舒贴膏水提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):24-26.
- [6] 于定荣,顾雪竹,张村,等.白芍中芍药苷提取工艺的对比研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(15):49-51.
- [7] 王平,梁瑞雪,毕建云,等.正交实验优选复方活血巴布膏的水提工艺研究[J].中华中医药杂志,2015,30(12):4467-4471.
- [8] 江蔚新,侯明阳.红花药材中的化学成分及其药理作用[J].黑龙江医药,2015,4(28):732-734.
- [9] 陆小华,马骁,王建,等.赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(4):595-602.
- [10] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等.芍药苷药理作用研究新进展[J].中国药物警戒,2012,9(2):100-103.
- [11] 金英善,陈曼丽,陶俊.芍药化学成分和药理作用研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(4):745-750.
- [12] 吴璐,罗永明,梁乘文,等.制川乌-白芍配伍对芍药苷经皮吸收的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(13):1-4.
- [13] 温然,郝博,高瑛,等.骨愈方中羟基红花黄色素A的体外透皮性能考察[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):40-42.
- [14] 李芸,魏舒畅,刘永琦,等.不同生物碱透皮吸收促进剂对芍药苷透皮吸收的影响[J].北京中医药大学学报,2014,37(6):410-413.

【收稿日期】 2016-12-28 【修回日期】 2017-01-18

【本文编辑】 李睿旻

(上接第107页)

- [27] Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD, et al. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase[J]. J Nat Prod, 1991, 54(1): 143-154.
- [28] Tankeo SB, Damen F, Awouafack MD, et al. Antibacterial activities of the methanol extracts, fractions and compounds from *Fagara tessmannii*[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169: 275-279.
- [29] Tavares LdC, Zanon G, Weber AD, et al. Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* having antimicrobial activity[J]. PloS one, 2014, 9(5): e97000.
- [30] Del Poeta M, Chen SF, Von Hoff D, et al. Comparison of *in vitro* activities of camptothecin and nitidine derivatives against

fungal and cancer cells[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(12): 2862-2868.

- [31] Addae-Mensah I, Munenge R, Guantai AN. Comparative examination of two *Zanthoxylum benzophenanthridine* alkaloids for effects in rabbits[J]. Phytother Res, 1989, 3(5): 165-169.
- [32] 韦锦斌,龙盛京,覃少东,等.氯化两面针碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国临床康复,2006,10(27):171-174.
- [33] Zhang Y, Luo Z, Wang D, et al. Phytochemical profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the leaves of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Scientific World J, 2014, 2014: 181072.

【收稿日期】 2016-03-07 【修回日期】 2016-12-22

【本文编辑】 顾文华