

正交试验法优选桃红四物汤的水提工艺

李珊珊,李 翊,彭代银,陈卫东,韩 岚,贾步云,王飞龙

(安徽中医药大学药学院,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 优选桃红四物汤的水提工艺。方法 以芍药苷和浸膏得率为考察指标,以加水量、提取时间、提取次数为考察因素,采用正交试验优选桃红四物汤的最佳水提工艺。结果 桃红四物汤的最佳水提工艺为加12倍量水提取3次,每次1.5 h。结论 优选出的桃红四物汤的水提工艺合理,可为其工业化生产提供依据。

[关键词]桃红四物汤;水提工艺;正交试验;芍药苷;浸膏得率

[中图分类号]R283 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.06.021

桃红四物汤源自清代吴谦所著《医宗金鉴·妇科心法要诀》,该方由桃仁、红花、熟地黄、当归、白芍、川芎6味中药所构成,为传统活血化瘀方剂之一,具有活血化瘀、养血补血之功效,为治疗血虚血瘀证尤其是妇科血瘀证的常用经典方剂^[1]。现代研究发现,桃红四物汤还具有抗血栓^[2],增加冠状动脉血液流量,改善血液流变性及微循环,降低血管通透性,降低血脂,增强免疫功能等方面的作用^[3]。但是桃红四物汤在临床用药上多以汤剂为主,存在服用、携带不便,稳定性差,易霉变等缺点^[4],导致其在使用及推广中受到限制。现拟将其改制成桃红四物颗粒,既可保留汤剂吸收迅速、疗效确切的特点,又可改善汤剂在应用中的缺点,扩大使用范围,为以后的应用与开发提供基础。为保证颗粒剂的质量及疗效,本研究根据组方药物有效成分的理化性质对桃红四物汤的提取工艺进行优选。前期已对组方中桃仁、红花、当归、川芎4味药材的醇提工艺进行了研究,其最佳醇提工艺为6倍量80%乙醇提取3次,每次1.5 h。本研究将对桃红四物汤的水提工艺进

行研究,最终确定桃红四物汤的提取工艺。

1 材料

1.1 药物及试剂 桃仁、红花、熟地黄、当归、白芍、川芎药材均购自安徽济人药业有限公司,批号依次为130331、130406、130405、130625、130519、130519;芍药苷对照品:批号121402-201337;甲醇、乙腈为色谱纯。

1.2 仪器 LC-15C型高效液相色谱仪、SPD-15C型紫外检测器:日本岛津;AB135-S型十万分之一分析天平、PL601-S型电子天平:瑞士梅特勒公司;SHB-III型旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂;HH-S2型水浴锅:江苏省常州普天仪器制造有限公司;DZF-6050型真空干燥箱:上海博讯实业有限公司;DL-1型电炉:北京中兴伟业仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定^[5]

2.1.1 色谱条件:色谱柱为COSMOSIL C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(14:86);流速为1.0 mL/min;柱温为30℃;检测波长为230 nm;进样量为20 μL。依上述色谱方法进行。色谱图见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备:取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成60 μg/mL溶液,即得。

基金项目:国家自然科学基金项目(81073091);安徽省自然科学基金项目(1408085QH163)

作者简介:李珊珊(1990-),女,硕士研究生

通信作者:彭代银, pengdy@ahtcm.edu.cn

were (84.65±0.98)% and (2.73±0.03)%, respectively. The Myr-MMs were spherical or near-spherical, showed smooth surfaces, and had no adhesion, according to transmission electron microscopy. The mean particle size, polydispersity index, and Zeta potential were (41.74±0.27) nm, (0.115±0.004), and (-25.47±1.22) mV, respectively. The *in vitro* release profile of Myr-MMs followed the Weibull equation: $\ln(\ln(1/(1-Q/100))) = 0.9271 \ln t - 2.0576$ ($r=0.9538$). **Conclusion** Myr-MMs can be successfully prepared by acetone solvent evaporation, have good appearance, small and uniform particle sizes, and high encapsulation efficiency and drug loading, and show sustained *in vitro* release.

[Key words]myricetin; mixed micelles; methoxy polyethylene glycol-poly(lactic acid)/Pluronic F68; *in vitro* release

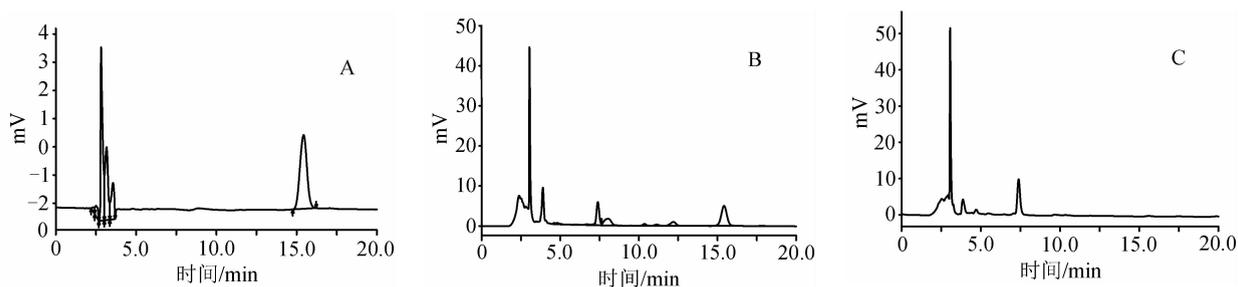


图1 对照品(A)、供试品(B)和缺白芍阴性样品(C)高效液相色谱图

2.1.3 供试品溶液的制备:按处方比例称取桃仁、当归各9g,红花、川芎各6g,共9份,经最佳醇提工艺提取后,药渣与白芍9g、熟地黄12g合并,按水提正交 $L_9(3^4)$ 正交试验进行水煎煮提取,滤液浓缩后置真空干燥箱干燥至恒质量,计算浸膏得率。取干浸膏粉适量,精密称定,至50mL容量瓶中,精密加入50%乙醇35mL,超声处理30min,放冷,加50%乙醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的测定:分别精密吸取芍药苷对照品溶液0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL至10mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀后分别精密吸取20 μ L进样,按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积。以峰面积(y)为纵坐标,浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=28\ 297x-1\ 763.2(r=0.999\ 6)$,线性范围为0.60~15.00 μ g/mL。

2.1.5 精密度实验:取一定浓度的芍药苷对照品溶液,重复进样6次,测定峰面积,其RSD值为0.79%,表明该方法精密度良好。

2.1.6 重复性实验:取同一样品6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,测定峰面积,计算其芍药苷含量,结果得RSD值为1.60%,表明此方法重复性良好。

2.1.7 稳定性实验:取样品适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别于0、4、8、12、24h测定峰面积,计算芍药苷含量,结果RSD值为0.67%,表明供试品溶液在24h内基本稳定。

2.1.8 加样回收率实验:精密称取已知含量的同一样品6份,采用加样回收试验,分别加入1mL芍药苷对照品溶液(60 μ g/mL),按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件测定芍药苷含量,结果显示平均加样回收率为99.94%,RSD为0.96%,结果表明该方法回收率良好。

2.1.9 芍药苷测定法:分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20 μ L,注入高效液相色谱仪,测定,即得。

2.2 浸膏得率测定 按水提正交试验提取后将药液滤过,滤液浓缩,置已干燥至恒质量的蒸发皿中,水

浴蒸干后置真空干燥箱60 $^{\circ}$ C干燥至恒质量,计算浸膏得率(浸膏得率=干浸膏质量/药材质量 \times 100%)。

2.3 水提正交试验

2.3.1 正交试验设计:将经醇提后的桃仁、红花、当归、川芎与白芍、熟地黄按处方比例合并后采用水煎煮提取,以芍药苷含量和浸膏得率为评价指标进行综合评价(浸膏得率和芍药苷的权重系数分别为0.4、0.6),以加水量(A)、提取次数(B)、提取时间(C)为因素,选取3个水平,按 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验,优选最佳的水提工艺条件,水提正交试验因素水平表见表1。

表1 正交试验因素水平表

水平	因素		
	A/倍	B/次	C/h
1	8	1	1.0
2	10	2	1.5
3	12	3	2.0

2.3.2 水提正交试验结果:由直观分析可得,对水提取效果的因素影响为 $B>C>A$,最佳工艺的组合为 $A_3B_3C_2$ 。以空白项为误差项进行方差分析,结果显示B因素对水提工艺具有显著性影响,结合生产实际与成本考虑,选择水提取的最优组合为 $A_3B_3C_2$,即12倍量水提取3次,每次1.5h。见表2、表3。

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	浸膏得率/%	芍药苷含量/%	综合评分
1	1	1	1	1	17.65	0.92	67.78
2	1	2	2	2	21.96	1.28	90.68
3	1	3	3	3	27.06	1.09	88.90
4	2	1	2	3	18.63	1.01	73.37
5	2	2	3	1	26.27	1.03	84.99
6	2	3	1	2	26.08	0.97	81.90
7	3	1	3	2	20.78	1.09	80.13
8	3	2	1	3	23.14	1.13	85.29
9	3	3	2	1	28.63	1.10	91.56
K_1	82.45	73.76	78.32	81.44			
K_2	80.09	86.99	85.20	84.24			
K_3	85.66	87.45	84.67	82.52			
R	5.57	13.69	6.88	2.79			

表3 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	F值	P值
A	46.95	2	3.94	>0.05
B	362.67	2	30.45	<0.05
C	87.94	2	7.38	>0.05
D(误差)	11.91	2	1	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.3.3 验证实验:按处方比例称取桃仁、当归各9g,红花、川芎各6g,共3份,按最优醇提工艺提取后药渣与白芍9g、熟地黄12g合并,按最佳水提工艺进行试验。结果见表4,显示优选的水提工艺稳定、可靠。

表4 水提工艺验证实验结果

试验号	药材量/g	浸膏得率/%	芍药苷含量/%
1	51	27.25	1.06
2	51	26.67	1.05
3	51	26.49	1.03
平均值	51	26.80	1.05

3 讨论

桃红四物汤是治疗血虚血瘀证的常用方,原多用于治疗妇科月经不调、痛经等证,现代临床将其广泛用于全身各系统疾病的治疗,疗效显著^[6]。在桃红四物汤提取工艺研究中,根据方中药物有效成分的理化性质,采取先醇提后水提的方式进行提取,通过浸膏得率和含量测定进行综合评分优选出的工艺

更具有合理性和有效性。其中,在桃红四物汤的水提工艺研究中,浸膏得率是工艺优选中的传统指标,芍药苷为白芍中的指标性成分。本实验通过正交试验法,得到桃红四物汤的最佳水提工艺为12倍量水提取3次,每次1.5h。采用多指标综合评分,能够全面地评价桃红四物汤的水提工艺,且方法简单、成本低廉、便于操作,为日后桃红四物颗粒的研制和开发提供了必要的基础和保障。

参考文献:

- [1] 梁杰,尹登科,李白坤,等.桃红四物汤对药物致不完全流产早孕大鼠的血管生成及Ang-1,Ang-2,Tie-2表达的影响[J].中国中药杂志,2013,38(21):3731-3735.
- [2] 韩岚,彭代银,许钊,等.桃红四物汤抗血栓形成作用研究[J].安徽中医学院学报,2010,29(1):47-49.
- [3] 张正升,彭代银.桃红四物汤临床应用研究进展[J].安徽医药,2011,15(9):1162-1165.
- [4] 王权,吴德玲,黄金玲,等.多指标正交试验优选苓桂术甘颗粒水提工艺[J].安徽中医学院学报,2013,32(4):87-90.
- [5] 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.
- [6] 丁艳杰,张前德.桃红四物汤临床与实验研究进展[J].江苏中医药,2010,42(1):77-79.

(收稿日期:2014-06-20)

Optimization of Water Extraction Process for Taohong Siwu Decoction by Orthogonal Test

LI Shan-shan, LI Yi, PENG Dai-yin, CHEN Wei-dong, HAN Lan, JIA Bu-yun, WANG Fei-long
(Department of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the water extraction process for Taohong Siwu Decoction. **Methods** With paeoniflorin content and extract yield as indices, the orthogonal test was adopted to determine the optimal water amount, extraction time, and extraction times in the water extraction process for Taohong Siwu Decoction. **Results** In the optimal process, extraction was performed 3 times (1.5 h each) using water (12 times). **Conclusion** The optimized water extraction process is reasonable and feasible, which can provide a reference for the industrial production of Taohong Siwu Decoction.

[Key words] Taohong Siwu Decoction; water extraction process; orthogonal test; paeoniflorin; extract yield