

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.11.005

◇ 药学研究 ◇

正交试验优化参白散结颗粒的水提工艺

吴静鸣¹, 黄晓青¹, 曹阳², 黄顺旺²作者单位:¹安徽天星医药集团有限公司, 安徽 合肥 230601;²合肥创新医药技术有限公司, 安徽 合肥 230088

通信作者: 黄顺旺, 男, 主任药师, 研究方向为新药研究, E-mail: huangsw5503@163.com

摘要:目的 优选参白散结颗粒的最佳水提工艺。方法 党参等九味药材合煎, 分别采用正交设计, 以浸膏得率和芍药苷含量为考察指标, 优选最佳水提工艺条件。结果 参白散结颗粒水提最佳工艺条件: 党参等九味药材加入 10 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 2 h。结论 优选出的提取工艺稳定, 主要有效成分转移率高, 为参白散结颗粒的生产工艺提供试验依据。

关键词: 中草药/分离和提纯; 颗粒物; 党参; 白芍; 参白散结颗粒; 正交设计; 高效液相色谱法; 芍药苷

Optimization of water extraction process for *Shenbai Sanjie* granules by orthogonal test

WU Jingming¹, HUANG Xiaqing¹, CAO Yang², HUANG Shunwang²Author Affiliations: ¹Anhui Tianxing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Hefei, Anhui 230601, China;²Hefei Innovative Medical Technology Co., Ltd., Hefei, Anhui 230088, China

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of *Shenbai Sanjie* granules. **Methods** Taking the ratio of dry extract yielding and the content of paeoniflorin as two main reference indexes, orthogonal design method was used to determine the optimal water extraction process for *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. and other nine medicinal herbs. **Results** The optimum extraction condition was described as follow: ten times amount of water, decocting 3 times, 2 hours each time. **Conclusion** The optimal extraction process is stable and has a high transfer rate of active ingredient, and it could provide experimental basis for the production process of *Shenbai Sanjie* granules.

Key words: Drugs, Chinese herbal/isolation & purification; Particulate matter; *Codonopsis pilosula*; *Radix paeoniae alba*; *Shenbai sanjie* granules; Orthogonal test; HPLC; Paeoniflorin

在妇科领域, 中医药在长期的临床治疗实践中积累了丰富的经验, 有较为独特的治疗优势。子宫肌瘤是育龄妇女生殖系统中的最常见的良性肿瘤, 发病率高达 20%~30%, 中医药通过辨证论治对机体内环境进行整体调节, 有效抑制子宫肌瘤的形成和发展, 可以更好地满足临床治疗需求。参白散结颗粒来源于医院临床验方, 临床应用多年, 数万病例, 疗效确切, 安全可靠, 处方由党参、白芍、益母草、白术、茯苓、炙甘草等九味药材组成, 具有疏肝理气, 活血散结的功效, 主治气滞血瘀型子宫肌瘤、卵巢囊肿。

原方用以汤剂, 使用不便, 为此, 我们将汤剂改为颗粒剂, 为了保证与原汤剂物质基准的一致性, 提取工艺仍采用水提, 根据处方中党参、炒白芍、益母草、白炒术、茯苓、炙甘草等九味药材所含成分的理化性质^[1-6], 本研究自 2018 年 1 月至 2019 年 6 月采用正交试验设计优选参白散结颗粒中党参、炒白芍

等九味药材的最佳水提工艺。以处方中臣药炒白芍中主要有效成分芍药苷为指标^[7], 结合提取得膏率优选该颗粒剂的水提工艺, 为该颗粒剂生产工艺提供试验依据。

1 试药与仪器

1.1 实验试药 党参(批号 180412)、白芍(批号 180603)、益母草(批号 180505)等九味药材均购自安徽普仁中药饮片有限公司, 经鉴定符合《中国药典》2015 年版一部相关项下规定。芍药苷对照品(批号 110736-201713, 含量测定用)购自中国食品药品检定研究院, 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为重蒸馏水, 磷酸等试剂均为分析纯。

1.2 仪器设备 微压循环中药煎药机(北京东华原医疗设备有限公司); HL-SHZ-95 循环水式真空泵(河南巩义市英峪仪器厂); RE-200E 旋转蒸发仪(上海东玺制冷仪器设备有限公司); HH-2K4 一列回孔智能水浴锅(巩义市予华仪器责任有限公司); 湘仪

L-550型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);Waters高效液相色谱仪;Waters-2998紫外检测器;Waters Empower 色谱工作站;6010紫外-可见分光光度计(安捷伦科技上海有限公司);AR1140型电子天平(上海加惠仪器仪表有限公司);CQF-I-6超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器公司);真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

2 水提取工艺

2.1 药材吸水率试验 为了提高正交试验加水量的准确度,对药材的吸水率进行考察。按处方配比称取党参、白芍等九味药材,加入10倍量水,密闭浸泡12 h,滤过,量取滤液,计算吸水率(%),实验结果见表1。由表1可见,药材的吸水率约为自身重量的1.9倍,因此,在正交试验第一次提取时,需多加1.9倍量的水煎煮。

表1 吸水率测定表

编号	药材量/g	加水量/mL	滤液量/mL	吸水量/mL	吸水率/%	平均吸水率/%
1	106	1 060	865	195	184	
2	212	2 120	1 715	405	191	190
3	371	3 710	3 030	680	183	

2.2 正交试验设计^[8-15] 以浸膏得率、芍药苷含量为指标,选择加水量、煎煮时间、煎煮次数三个因素,每个因素选择3个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交设计,因素水平见表2。

表2 水提取因素水平表

水平	因素		
	加水量A/倍	煎煮时间B/h	煎煮次数C/次
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

2.3 药材的提取及浸膏得率的测定^[7] 按表2设计9组试验,按处方配比称取党参、白芍等九味药材9份,每份382 g,根据正交试验设计的条件进行提取,为提高煎煮效果,将药材加水浸泡1 h使其浸透后,煎煮,合并提取液,滤过,滤液浓缩,置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,70℃减压干燥至恒重后,称重,计算浸膏得率。

2.4 浸膏中芍药苷含量测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱条件:

COSMOSIL 5C₁₈-MS-Ⅱ色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温为25℃;流动相为乙腈:0.1%磷酸(14:86);检测波长为230 nm;流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL;理论板数按芍药苷峰计算应不低于2 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含60 μg,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 取样品研细,取约0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加稀乙醇35 mL,密塞,精密称定重量,超声处理(功率250 W,频率25 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用稀乙醇补足减失的重量,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.4.4 阴性样品溶液的制备 按处方组成,取除白芍外其余药材,按制剂工艺制成阴性样品,按“2.4.3”项下方法,制成阴性对照溶液。

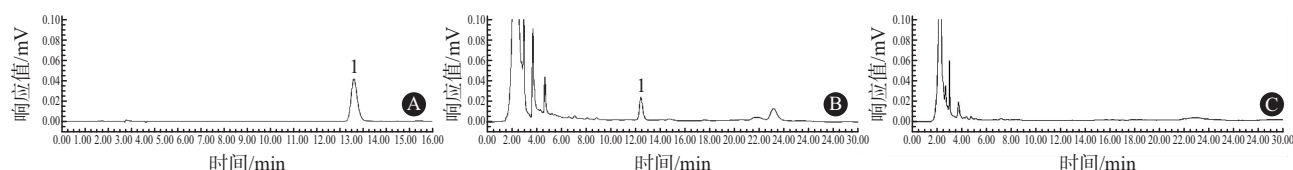
2.4.5 干扰试验 按照“2.4.1”项色谱条件,将对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各10 μL分别进样测定,结果:供试品中芍药苷的色谱峰与相邻色谱峰达到基线分离,阴性对照无干扰,见图1。

2.4.6 标准曲线的制备 精密称取芍药苷对照品7.5 mg,置25 mL容量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取0.5、1、2、4、6、8 mL,分别置10 mL量瓶中,用甲醇释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,分别进样量10 μL,按照“2.4.1”项色谱条件测定,量取峰面积,以对照品浓度(μg/mL)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程 $Y=13\,128X-1\,893.9$, $r=1$,结果表明:芍药苷在15~240 μg/mL范围内线性关系良好。

2.4.7 精密度试验 精密吸取“2.4.2”项下的芍药苷对照品溶液10 μL,注入液相色谱仪,在“2.4.1”项色谱条件下重复进样6次,测得峰面积,计算得其RSD为0.12%,表明本法测定精密度良好。

2.4.8 重复性试验 取同一批号样品共6份,按“2.4.3”项下方法分别制备6份供试品溶液,在“2.4.1”项色谱条件下测定,芍药苷的平均含量为1.12 mg/g, RSD为0.16%,本法重复性良好。

2.4.9 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于0、2、4、6、8、10 h进样10 μL,测定芍药苷的峰面积,计算得其RSD为1.5%,表明本品在10 h内稳定。



注:1.芍药苷

图1 高效液相色谱图:A为对照品,B为供试品,C为阴性对照

2.4.10 加样回收率试验 取已知含量为 1.12 mg/g 的同一批号的样品细粉适量,精密称定,共 6 份,分别加入定量芍药苷对照品,按“2.4.3”项下方法制备,在“2.4.1”项色谱条件下测定,并按外标法以芍药苷峰面积计算,平均回收率为 108.00%,RSD 为 0.98%。

2.4.11 测定方法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μ L,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,代入线性方程,计算芍药苷($C_{23}H_{28}O_{11}$)的含量。

2.5 正交试验方法与结果 由表 3 直观分析可知,以浸膏得率为考察指标时, $A_3 > A_2 > A_1$, $B_2 > B_3 > B_1$, $C_3 > C_2 > C_1$,最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$ 。以芍药苷含量为考察指标时, $A_3 > A_2 > A_1$, $B_2 > B_3 > B_1$, $C_3 > C_2 > C_1$,最佳工艺条件为 $A_3B_2C_3$ 。

表 3 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	浸膏得率/%	芍药苷含量/mg
1	1	1	1	1	20.06	309.43
2	1	2	2	2	28.18	383.05
3	1	3	3	3	30.54	402.16
4	2	1	2	3	27.73	379.95
5	2	2	3	1	31.92	412.08
6	2	3	1	2	24.35	332.69
7	3	1	3	2	36.65	429.85
8	3	2	1	3	33.59	394.73
9	3	3	2	1	37.41	414.69
浸膏得率	K_1 26.26	28.15	26.00	29.80		
	K_2 28.00	31.23	31.11	29.73		
	K_3 35.88	30.77	33.04	30.62		
	R_1 9.62	3.08	7.04	0.89		
芍药苷含量	K_1 364.88	373.08	345.62	378.73		
	K_2 374.91	396.62	392.56	381.86		
	K_3 413.09	383.18	414.70	392.28		
	R_2 48.21	23.54	69.08	13.55		

注: A 为加水量, B 为煎煮时间, C 为煎煮次数

由表 4 方差分析可知,以浸膏得率为评价指标时, A 因素、C 因素均差异有统计学意义, B 因素差异无统计学意义,且重要性依次为 $A > C > B$; 以芍药苷含量为评价指标时, A 因素和 B 因素差异无统计学意义, C 因素差异有统计学意义,重要性依次为 $C > A > B$ 。

综合考虑,水提最佳工艺为 $A_3B_2C_3$,即 10 倍量(考虑药材吸水率,第一次多加 1.9 倍量)水,煎煮 3 次,每次 2 h。合并煎液,滤过,滤液静置,取上清液备用。

2.6 工艺验证 取 3 份药材(每份 382 g),将 $A_3B_2C_3$ 组合平行试验 3 次,结果浸膏得率分别为 37.59%, 37.83%, 38.35%,平均值为 37.92%,RSD 为 1.02%;芍药苷的量分别为 425.62 mg, 430.37 mg, 433.84 mg,平均值为 429.94 mg,RSD 为 0.96%。

表 4 方差分析

考察指标	方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
干浸膏得率	A	157.78	2	78.89	106.54	<0.01
	B	16.59	2	8.30	11.20	
	C	79.32	2	39.66	53.56	<0.01
	D	1.48	2	0.74		
芍药苷含量	A	3 882.71	2	1 941.36	12.86	
	B	837.00	2	418.50	2.77	
	C	7 465.92	2	3 732.96	24.74	<0.05
	D	301.82	2	150.91		

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99$ $F_{0.05}(2, 2) = 19$

3 讨论

3.1 多基原药材的确定^[7] 本处方各味药材中,党参、炙甘草为多基原药材,本试验采用党参药材为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.,炙甘草药材为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch。

3.2 含量测定指标的选择及转移率计算^[1,3,7] 本处方有由九味药材组成,党参为君药,炒白芍、益母草为臣药,炒白术、茯苓等为佐药。其中党参、白术、茯苓在中国药典标准项下暂未收载含量测定指标;在此处方中,在 HPLC-ELSD 条件下益母草中的盐酸水苏碱、盐酸益母草碱与其它峰未得到较好分离,暂不作为考核指标;因此,我们选择炒白芍中的芍药苷作为含量测定指标,所选方法简便、准确、灵敏度高,可用于水提工艺的含量考察指标。投料药材炒白芍中芍药苷含量为 1.24%,同时根据处方中炒白芍所占比例,计算出水提工艺得到的干膏中芍药苷的含量,其转移率稳定在 75% 左右,转移率高。

本研究优选出的水提工艺稳定,干膏得率适中,主要有效成分转移率高,为参白散结颗粒的中试、大生产提供试验依据。

参考文献

- [1] 王洁,邓长泉,石磊,等.党参的现代研究进展[J].中国医药指南,2011,9(31):279-281.
- [2] 张晓燕,李铤.白芍的化学研究进展[J].沈阳药科大学学报,2002,19(1):70-73.
- [3] 聂媛媛.对益母草成分及药理活性的研究[J].求医问药,2012,10(3):57-58.
- [4] 阳柳平.研究白术的化学成分及药理作用概况[J].中国医药指南,2012,10(21):607-609.
- [5] 胡斌,杨益平,叶阳.茯苓化学成分研究[J].中草药,2006,37(5):655-658.
- [7] 国家药典委员会.中国药典(一部)、(四部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [8] 刘春亮,蒋克海.逍遥软胶囊中白芍和甘草的提取工艺研究[J].安徽医药,2007,11(2):111-112.
- [9] 席小兰,冯俭,谢玉.正交试验法优化养血愈风颗粒中白芍的提

- 取工艺[J].中国中医药信息杂志,2013,20(4):50-51.
- [10] 张慧,付京,陈杨,等.正交试验法优化白金胶囊中白芍的提取工艺[J].中国中医药信息杂志,2014,21(7):64-66.
- [11] 贺青蛟,邓阳,颜苗,等.正交试验法优选白芍当归复方的提取工艺[J].中国医药工业杂志,2014,45(1):28-31.
- [12] 陈锋,严常开,张进.正交试验法优选复方白芍肠康颗粒提取工艺[J].中国现代中药,2016,18(9):1192-1195.
- [13] 初茂忠.正交试验法优选偏散汤颗粒的提取工艺[J].中国社区医师,2019,35(2):5-6.
- [14] 曹丽萍,梁奇,李曙光,等.正交试验优化养心安神颗粒提取工艺[J].中国中医药信息杂志,2018,25(7):79-82.
- [15] 黄顺旺,陈师农.正交试验研究功血宁颗粒的提取工艺[J].安徽医药,2011,15(8):949-950.
- (收稿日期:2019-07-29,修回日期:2019-09-11)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.11.006

◇ 药学研究 ◇

异丙酚预处理通过上调 Caveolin-3 增加缺血心肌细胞线粒体膜稳定性的机制研究

田香¹,邓德传²,兰运辉²,杨坤淘¹作者单位:¹湖北民族大学附属民大医院麻醉科,湖北 恩施 445000;²巴东县民族医院,湖北 恩施 444324

通信作者:杨坤淘,男,主任医师,研究方向为心肌保护,E-mail:108386507@qq.com

基金项目:湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(WJ2017F124)

摘要:目的 探讨异丙酚通过上调小窝蛋白-3(Caveolin-3)增加缺血心肌线粒体膜稳定性的机制。方法 筛选健康 SD 大鼠 36 只,体质量范围为 250~300 g,采用随机数字表法分为 3 组,每组 12 只。①正常心肌细胞组:仅开胸不结扎;②心肌缺血再灌注组:单纯给予以 5% 葡萄糖稀释的脂肪乳,持续静脉滴注;③缺血心肌细胞+异丙酚预处理组:缺血前 10 min 开始持续静脉滴注异丙酚 12 mg·kg⁻¹·h⁻¹,异丙酚用 5% 葡萄糖稀释。通过蛋白质免疫印迹检测 Caveolin-3 和细胞色素 C;通过荧光探针 DCFH-DA 测定 ROS 产生;通过阳离子染料 JC-1 评估线粒体膜电位;caspase-3 比色测定试剂盒测定心肌细胞 caspase-3 活性。结果 心肌缺血再灌注组 Caveolin-3 蛋白活性(0.57±0.09)低于正常心肌细胞组(2.24±0.25)和缺血心肌细胞+异丙酚预处理组(2.02±0.14),异丙酚改善心肌缺血诱导的 Caveolin-3 下调($P<0.05$);心肌缺血再灌注组 DCF 荧光强度(2.79±0.21)高于正常心肌细胞组(1.00±0.12),缺血心肌细胞+异丙酚预处理组心肌细胞 DCF 荧光强度(1.23±0.14)低于心肌缺血再灌注组($P<0.05$);与正常心肌细胞组(1.00±0.06)相比,经受心肌缺血的心肌细胞显示出线粒体去极化降低(0.13±0.02),缺血心肌细胞+异丙酚预处理组(0.83±0.11)稳定了线粒体膜电位($P<0.05$)。正常心肌细胞组线粒体细胞色素 C 为(1.00±0.08),心肌缺血再灌注组为(2.76±0.24),心肌缺血增加线粒体细胞色素 C 释放到胞质溶胶中,缺血心肌细胞+异丙酚预处理组(1.37±0.18)降低细胞色素 C 释放($P<0.05$);心肌缺血再灌注组显示出 caspase-3 和 caspase-9 活性增加。与心肌缺血再灌注组相比,异丙酚降低了 caspase-3 和 caspase-9 活性($P<0.05$)。结论 异丙酚在心肌缺血下的保护作用取决于 Caveolin-3 的上调,后者降低活性氧产生、增加线粒体膜电位、减少细胞凋亡和细胞色素 C 释放。

关键词:二异丙酚; 心肌再灌注; 小窝蛋白-3; 心肌缺血; 线粒体膜; 细胞色素 C; 大鼠, Sprague-Dawley

Propofol increases mitochondrial membrane stability, decreases apoptosis and cytochrome C release in rats with myocardial ischemia by up-regulating Caveolin-3

TIAN Xiang¹, DENG Dechuan², LAN Yunhui², YANG Kunqing¹

Author Affiliations:¹Department of Anesthesiology, Affiliated Minda Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000, China; ²Badong County Hospital for Nationalities, Enshi, Hubei 444324, China

Abstract: Objective This study was designed to investigate whether propofol reduces mitochondrial membrane stability in patients with myocardial ischemia by up-regulating Caveolin-3. **Methods** 36 healthy SD rats, weighing 250 to 300 g, were screened by the laboratory animal center of the academy of military medical sciences. 36 rats were randomly divided into 3 groups with 12 rats in each group. (1) Normal myocardial cell group: only thoracotomy without ligation; (2) Ischemic myocardial cell group: in the experiment, fat milk diluted with 5% glucose was given, and continuous intravenous drip was given. (3) Ischemic myocardial cells + propofol treatment group: During the experiment, continuous intravenous infusion of propofol 12 mg·kg⁻¹·h⁻¹ was started 10 min be-