

[科研报道]

化 瘀 通 络 蠲 痹 酊 渗 漉 工 艺 的 优 化

闫治攀，李喜香*，张 鹏
(甘肃省中医院，甘肃 兰州 730000)

摘要：目的 优化化瘀通络蠲痹酊渗漉工艺。**方法** 在单因素试验基础上，以浸泡时间、药材粒度、乙醇体积分数、渗漉液收集量、渗漉体积流量为影响因素，芍药苷总溶出量为评价指标，Box-Behnken 响应面法优化渗漉工艺。**结果** 最佳条件为药材装罐前用 2 倍量乙醇浸泡 24 h，粒度以粗粉为优，再用 12 倍量 70% 乙醇渗漉，体积流量 1.75 mL/(min·kg)，芍药苷总溶出量为 38.218 mg。**结论** 该方法稳定可行，预测性好，可用于渗漉化瘀通络蠲痹酊。
关键词：化瘀通络蠲痹酊；渗漉；Box-Behnken 响应面法
中图分类号：R284.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2020)05-1297-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.035

化瘀通络蠲痹酊是甘肃省中医院骨科中药制剂，由川续断、当归、赤芍、桑枝、威灵仙、桃仁、红花、木香、苍术、伸筋草、枳壳、独活、花椒 13 味药材组成，具有行气活血、祛瘀止痛功效，主要用于治疗气滞血瘀型膝骨性关节炎等病变局部疼痛、拘挛、活动受限等症。经十余年临床应用，该方组成独特固定，临床疗效显著，故欲将其开发并注册为医院院内制剂，根据注册要求，在原配制方法（将处方药材粉碎，10 倍量 70% 乙醇溶液静置浸提 24 h，取上清液）的基础上作进一步研究。

2015 年版《中国药典》四部酊剂（0120 项下）的制备方法包括溶解法、稀释法、浸渍法、渗漉法^[1]，其中渗漉法为酊剂工业生产的常用手段。在实际生产中，处方饮片本身理化性质、制备酊剂辅料溶剂、设备功能均可能对酊剂质量造成影响。本实验综合考虑上述因素，在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 响应面法优化化瘀通络蠲痹酊渗漉工艺，以期为该方制备工艺研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；AR124CM 电子天平 [0.01、0.1 mg，奥豪斯仪器（上海）有限公司]；渗漉设备（常熟市制药化工机械总厂）；FW-200 高速万能粉碎机（北京科伟水兴仪器有限公司）。

1.2 试剂与药物 川续断（产地四川）、苍术（产地内蒙古）、独活（产地湖北）、花椒（产地四川）购于甘肃金羚集团药业有限公司；当归（产地甘肃）、桑枝（产地江苏）、木香（产地云南）、枳壳（产地湖南）购于甘肃康乐药业有限公司；赤芍（产地甘肃）购于甘肃安泰堂中药饮

片有限公司；威灵仙（产地安徽）、桃仁（产地四川）、红花（产地新疆）、伸筋草（产地湖北）购于甘肃陇脉药材有限公司，均经甘肃省药品检定研究院宋平顺主任药师鉴定为正品，符合 2015 年版《中国药典》一部各药材项下相关规定。芍药苷对照品（中国食品药品检定研究院，批号 110736-200934）。甲醇（色谱纯）、无水乙醇（分析纯）购于天津市科密欧化学试剂有限公司；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取芍药苷对照品 3.04 mg 于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容，摇匀，作为贮备液，精密量取 1 mL 于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，即得。

2.1.2 供试品溶液制备 精密称取样品液 10 mL，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.3 阴性样品溶液制备 按处方比例分别取不含赤芍的阴性样品处方药，按“2.1.2”项下方法制备，取 10 mL，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.4 方法学考察 参考文献 [2] 报道的方法。

2.1.4.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 分析柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇-水（30：70）；体积流量 1 mL/min；柱温 25℃；检测波长 230 nm^[3]；进样量 5 μL。色谱图见图 1。

2.1.4.2 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下贮备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，精密吸取 1、3、5、9、15、20 μL，在“2.1.4.1”项色谱条件下进样测定。

收稿日期：2019-08-17

基金项目：中医药行业科研专项（201507001-06）

作者简介：闫治攀（1988—），男，硕士，主管中药师，从事中药新制剂研究与开发。Tel：18193140379，E-mail：yanzhipan0403@126.com

*** 通信作者：**李喜香（1968—），女，硕士，主任中药师，从事中药新制剂研究与开发。Tel：15002550389，E-mail：lixixiang929@163.com

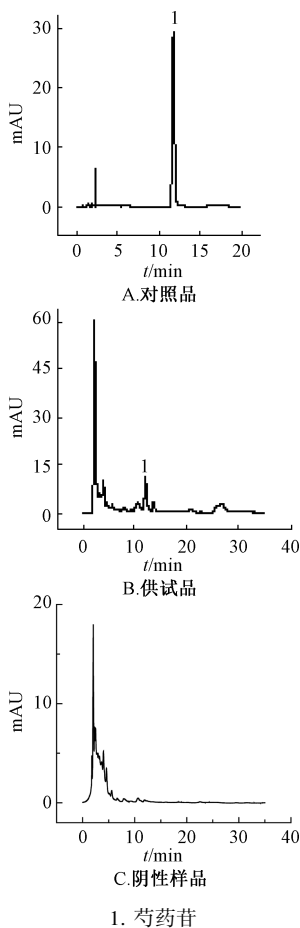


图 1 芍药苷 HPLC 色谱图

以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得到方程为 $Y=1\,943.836\,68X+3.036\,668\,3$ ($r=0.999\,7$), 在 $0.030\sim0.608\,\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.1.4.3 精密度的试验 取“2.1.1”项下一对对照品溶液, 在“2.1.4.1”项色谱条件下进样测定 5 次, 测得芍药苷峰面积 RSD 为 0.5%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.4 稳定性的试验 取“2.1.2”项下供试品溶液, 分别于 0、3、6、12、24、48、72 h, 在“2.1.4.1”项色谱条件下进样测定, 测得芍药苷峰面积 RSD 为 1.54%, 表明溶液在 72 h 内稳定性良好。

2.1.4.5 重复性的试验 取 13 组样品液, 按“2.1.2”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 在“2.1.4.1”项色谱条件下进样测定, 测得芍药苷峰面积 RSD 为 1.07%, 表明该方法重复性良好。

2.1.4.6 加样回收率的试验 取“2.5”项下 13 号样品液 9 份, 每份 120 mL (含芍药苷 1.25 mg), 按 80%、100%、120% 水平加入对照品溶液, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.4.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 芍药苷平均加样回收率为 99.57%, RSD 为 2.39%。

2.2 吸水率的测定 取 3 份酞剂细粉, 每份 30 g, 置于烧杯中, 加 10 倍量 70% 乙醇, 封口, 室温下静置 24 h, 400

目尼龙网过滤, 称定细粉吸水后质量, 计算吸水率。结果, 3 份酞剂细粉湿重分别为 100.72、103.89、101.07 g, 吸水率分别为 235.73%、246.30%、236.90%, 平均 239.64%。

2.3 浸泡时间的确定 参考文献 [4] 报道的方法。取 5 份酞剂超粗粉, 每份 30 g, 置于烧杯中, 加 150 mL 70% 乙醇, 封口, 室温下放置 0、12、24、36、48 h, 摇匀, 滤过, 加 70% 乙醇补足至 150 mL, 按“2.1”项下方法测定芍药苷含量。结果, 浸泡 0、12、24、36、48 h 后该成分含量分别为 0.05、11.32、16.95、17.30、16.89 $\mu\text{g/mL}$, 可知当浸泡时间超过 24 h 后其溶出基本上达到平衡状态, 而且浸泡 36、48 h 无明显差异, 故确定处方粉末装筒后浸泡时间为 24 h。

2.4 单因素试验 本实验根据中医药君臣佐使配伍理论和选择针对病症具有疗效的物质作为评价指标原则, 结合各指标理化性质, 以芍药苷总溶出量为评价指标, 考察药材粒度 (A)、乙醇体积分数 (B)、渗漉液收集量 (C)、渗漉体积流量 (D) 对渗漉效果的影响, 为 Box-Behnken 响应面设计提供依据。

2.4.1 药材粒度 参考文献 [5] 报道的方法。根据 2015 年版《中国药典》规定, 本实验选择细粉 (100~80 目)、中粉 (80~65 目)、粗粉 (65~24 目)、最粗粉 (24~10 目)、超粗粉 (10~5 目) 进行考察, 每种粒度酞剂药粉各取 300 g, 600 mL 70% 乙醇浸润后分装于渗漉筒中, 加入 70% 乙醇浸泡 24 h, 以 $2.0\text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{kg})$ 的渗漉体积流量收集 12 倍量渗漉液, 按“2.1”项下方法测定芍药苷总溶出量。结果, 当药材粒度分别为细粉、中粉、粗粉、最粗粉、超粗粉时, 该成分总溶出量分别为 36.26、37.59、38.29、36.42、34.10 mg, 可知它随着药材粉末粒度增加呈先升后降的趋势, 主要是因为药材粉末粒度过小时比表面积比较大, 对芍药苷吸附作用增大, 同时颗粒间空隙减小, 从而增加渗漉难度; 粒度过大时, 提高了芍药苷从药材中溶出的难度^[6], 故确定药材粒度为粗粉。

2.4.2 乙醇体积分数 取 5 份酞剂粗粉, 每份 300 g, 600 mL 50%、60%、70%、80%、90% 乙醇浸润后分装于渗漉筒中, 加入上述乙醇浸泡 24 h, 以 $2.0\text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{kg})$ 的渗漉体积流量收集 12 倍量渗漉液, 按“2.1”项下方法测定芍药苷总溶出量。结果, 当乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 时, 该成分总溶出量分别为 36.14、37.52、38.29、37.28、31.20 mg, 故确定乙醇体积分数为 70%。

2.4.3 渗漉液收集量 取 5 份酞剂粗粉, 每份 300 g, 600 mL 70% 乙醇浸润后分装于渗漉筒中, 加入 70% 乙醇浸泡 24 h, 以 $2.0\text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{kg})$ 的渗漉体积流量收集 6、8、12、15、20 倍量渗漉液, 按“2.1”项下方法测定芍药苷总溶出量。结果, 当渗漉液收集量分别为 6、9、12、15、18 倍时, 该成分总溶出量分别为 24.77、36.24、38.29、

38.43、38.18 mg，故确定渗漉液收集量为 12 倍。

2.4.4 渗漉体流量 参考文献 [7] 报道的方法。取 5 份酞剂粗粉，每份 300 g，600 mL 70% 乙醇浸润后分装于渗漉筒中，加入 70% 乙醇浸泡 24 h，分别以 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL/(min·kg) 的渗漉体流量收集 12 倍量渗漉液，按“2.1”项下方法测定芍药苷总溶出量。结果，当渗漉体流量分别为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL/(min·kg) 时，该成分总溶出量分别为 38.62、38.34、38.29、35.15、24.69 mg，故确定渗漉体流量为 0.5 mL/(min·kg)。

2.5 Box-Behnken 响应面法 在单因素试验基础上，根据 Box-Behnken 响应面法原理^[8-9]，以乙醇体积分数（*B*）、渗漉液收集量（*C*）、渗漉体流量（*D*）为影响因素，以芍药苷总溶出量为评价指标，优化酞剂渗漉工艺。因素水平见表 1，结果见表 2。

因素	水平		
	-1	0	1
<i>B</i> 乙醇/%	60	70	80
<i>C</i> 渗漉液收集量/倍	9	12	15
<i>D</i> 渗漉体流量/[mL·(min·kg) ⁻¹]	0.5	1.75	3

表 2 试验设计与结果				
试验号	<i>B</i> /%	<i>C</i> /倍	<i>D</i> /[mL·(min·kg) ⁻¹]	<i>Y</i> 芍药苷总溶出量/mg
1	60	9	1.75	34.62
2	80	9	1.75	35.10
3	60	15	1.75	37.56
4	80	15	1.75	37.84
5	60	12	0.5	37.03
6	80	12	0.5	37.21
7	60	12	3	36.45
8	80	12	3	37.14
9	70	9	0.5	36.98
10	70	15	0.5	38.86
11	70	9	3	33.07
12	70	15	3	37.62
13	70	12	1.75	37.54
14	70	12	1.75	38.57
15	70	12	1.75	38.21
16	70	12	1.75	38.87
17	70	12	1.75	38.14

通过 Design-expert 8.0 软件进行多元非线性逐步拟合^[10]，得二次多元线性拟合方程为 $Y = -24.73213 + 1.18522B + 3.39108C - 2.35928D - 0.00133BC + 0.0102BD + 0.178CD - 0.008305B^2 - 0.12839C^2 - 0.30592D^2$ ($R^2 = 0.9070$)，方差分析见表 3。由此可知，模型 $P < 0.01$ ，表明较符合实际渗漉情况；失拟项 $P > 0.05$ ，表明模型拟合程度较好；因素 *C*、*D*、 B^2 、 C^2 的 $P < 0.05$ ，表明它们对渗漉工艺有显著影响；因素 *BC*、*BD*、*CD* 的 $P > 0.05$ ，表明它们

表 3 方差分析					
来源	离均差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	35.17	9	3.91	7.58	0.0070
<i>B</i>	0.33	1	0.33	0.64	0.4484
<i>C</i>	18.33	1	18.33	35.58	0.0006
<i>D</i>	4.20	1	4.20	8.16	0.0244
<i>BC</i>	0.01	1	0.01	0.019	0.8931
<i>BD</i>	0.065	1	0.065	0.13	0.7329
<i>CD</i>	1.78	1	1.78	3.46	0.1052
B^2	2.90	1	2.90	5.64	0.0493
C^2	5.62	1	5.62	10.91	0.0131
D^2	0.96	1	0.96	1.87	0.2141
残差	4.08	7	0.58	—	—
失拟项	3.08	3	1.03	4.09	0.1036
总和	35.54	16	—	—	—

之间无显著交互作用；各因素影响程度依次为 $C > D > B$ 。

响应面分析见图 2。由此可知，当固定渗漉体流量为 1.75 mL/(min·kg) 时，芍药苷总溶出量随着渗漉液收集量增加而升高，随着乙醇体积分数增加先升后降；当固定渗漉液收集量为 12 倍时，该成分总溶出量随着乙醇体积分数增加而升高，到达临界值后逐渐变小，随着渗漉体流量增加而降低；当固定乙醇体积分数为 70% 时，该成分总溶出量随着渗漉液收集量增加而升高，随着渗漉体流量增加而降低。最终确定，最优工艺为乙醇体积分数 70%，渗漉液收集量 12 倍，渗漉体流量 1.75 mL/(min·kg)，芍药苷总溶出量为 38.266 mg。

2.6 验证试验 为了验证所建立模型的可靠性，本实验按“2.5”项下优化工艺进行 3 批平行验证试验。结果，芍药苷总溶出量分别为 38.231、38.407、33.015 mg，平均 38.218 mg，与预测值 38.266 mg 的偏差为 -0.13%，表明工艺准确稳定。

3 讨论与结论

Box-Behnken 响应面法是一种基于三水平的二阶试验设计方法^[11]，与星点设计、正交设计、均匀设计相比具有试验次数少、节约成本、精度高、回归方程预测性良好等优点^[12]，但需先根据因素最佳水平来设定试验中心点，否则无法得到准确的结果^[13]。本实验首先对化瘀通络蠲痹酞渗漉工艺有影响的药粉吸水率、渗漉浸泡时间、药材粒度、乙醇体积分数、渗漉液收集量、渗漉体流量进行单因素试验，初步确定了参数范围，再采用 Box-Behnken 响应面法考察乙醇体积分数、渗漉液收集量、渗漉体流量对芍药苷总溶出量的影响，得到最优工艺为乙醇体积分数 70%，渗漉液收集量 12 倍，渗漉体流量为 1.75 mL/(min·kg)，芍药苷总溶出量为 38.218 mg。经验证试验发现，上述优化工艺符合实际生产要求，而且稳定可行，预测性良好。

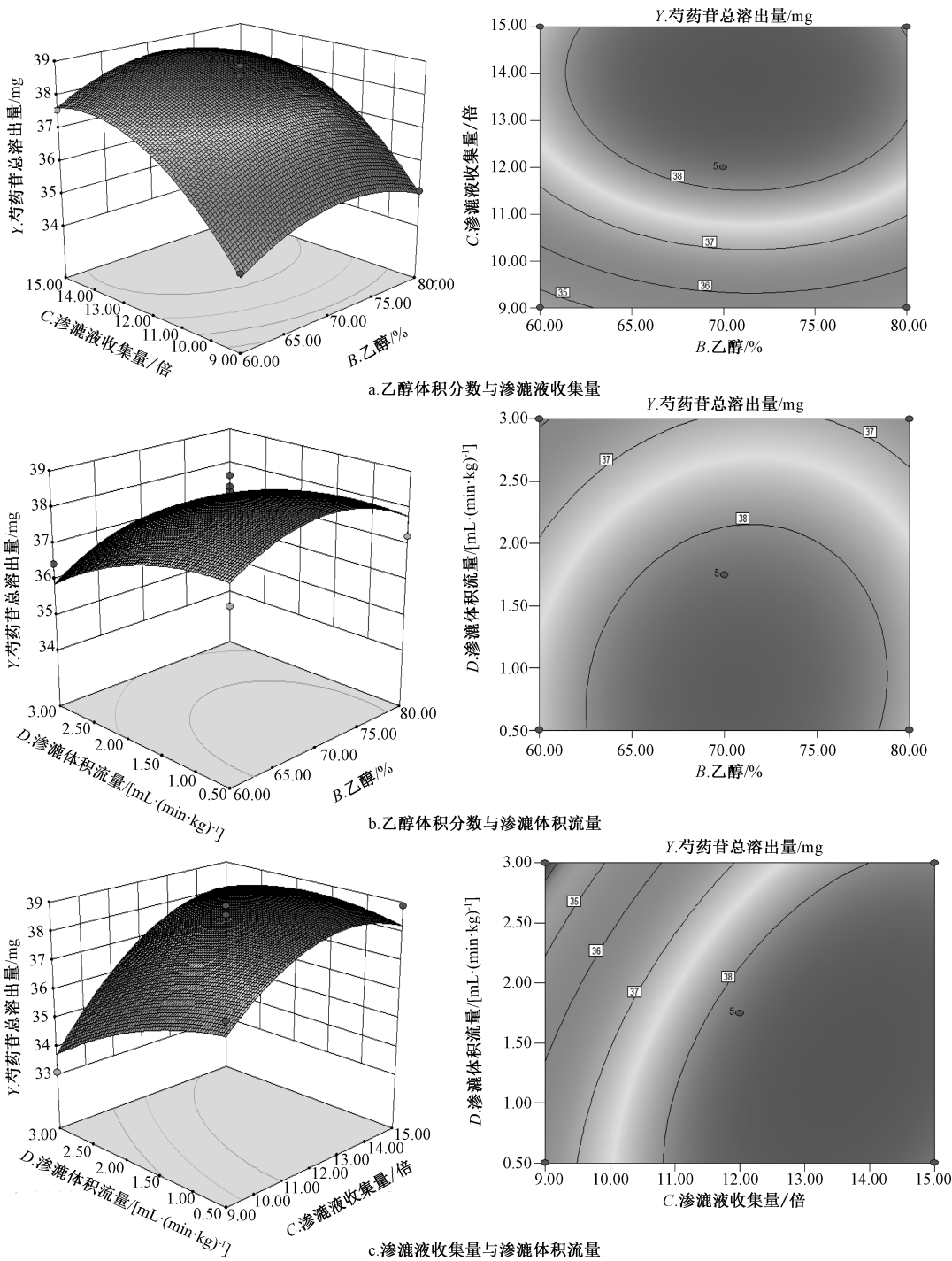


图 2 各因素响应面图

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 21-22.

[2] 王道东. 龙苁蓉骨胶胶囊中苁蓉苷含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(10): 51-53.

[3] 汤磊, 刘本. 响应面法优化白芍中苁蓉苷的超临界流体提取研究[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1332-1337.

[4] 汪洁, 李宁, 夏鹏飞, 等. 中心复合设计-效应面法优化大黄渗漉提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2301-2307.

[5] 秦学功, 徐馨. 二次回归正交旋转组合设计优化苦参生物碱渗漉提取条件[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2712-2715.

[6] 王丹, 龚涛, 孙冰, 等. 红参循环渗漉提取工艺的优化研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(1): 110-112.

[7] 鲁劲松, 王红芬, 李云霞. 藿香正气水中陈皮渗漉工艺的优化[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1096-1101.

[8] 徐向宏, 何明珠. 试验设计与 Design-Expert、SPSS 应用

[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 146-149.

[9] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.

[10] 李喜香, 刘效栓, 刘维忠, 等. 姜石肠炎康颗粒醇沉工艺的星点设计-效应面法优化[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1887-1891.

[11] 张南生, 孙卫军, 郭虹, 等. Box-Behnken Design 效应面法在制剂处方优化中的应用[J]. 中国医药导报, 2015, 12(23): 34-37.

[12] Hao J F, Fang X S, Zhou Y F, *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 683-692.

[13] 李颖, 曾茂贵, 郑笈, 等. 星点设计-效应面法优化鱼腥草挥发油- β -环糊精包合物的制备工艺[J]. 中草药, 2014, 45(13): 1855-1862.

高橙皮中柠檬苦素超声提取工艺的优化

尤文挺¹, 江天¹, 王洒¹, 何龙¹, 杨诗奕², 李云岳³

(1. 温州医科大学附属温岭医院, 浙江 温岭 317500; 2. 台州市肿瘤医院, 浙江 温岭 317500; 3. 温岭市茗果高橙专业合作社, 浙江 温岭 317500)

摘要: **目的** 优化高橙皮中柠檬苦素的超声提取工艺。**方法** 在单因素试验的基础上, 以声强、乙醇体积分数、液料比、提取时间为影响因素, 柠檬苦素提取率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。**结果** 最佳条件为声强 0.255 6 W/cm², 乙醇体积分数 70%, 料液比 30:1, 提取时间 30 min, 柠檬苦素提取率为 60.90 mg/100 g。**结论** 该方法合理可行, 可用于超声提取高橙皮中柠檬苦素。

关键词: 高橙皮; 柠檬苦素; 超声提取; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2020)05-1301-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.036

温岭高橙是浙江省温岭市传统的柑橘类品种, 早在明代嘉靖《太平县志》中就有其种植的记载, 其栽培历史至少有 470 年以上, 我国著名园艺学家吴耕民教授曾专门考证并推定它为葡萄柚原生种^[1]。温岭高橙果实风味独特、酸甜适中、略带苦味, 当地人认为它具有清热降火、醒酒护肝等功效, 深受该市及周边地区消费者的喜爱^[2], 但在日常食用过程中其果皮和种子往往被丢弃, 不仅易造成生态环境污染, 更让柠檬苦素这种具有潜在药用价值的生物活性物质白白浪费, 造成极大的损失。

柠檬苦素是存在于芸香科、楝科植物中的一类三萜类化合物^[3-4], 在柑橘中含有量最高, 具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗疟疾、抗病毒、抗菌、神经保护、改善骨质量等生物活性^[5-6], 随着相关研究的深入, 如何从植物中提取该成分也越来越受研究者的关注。超声提取作为一种新技术, 它与传统溶剂提取相比可利用超声波产生的搅拌、强烈振动、高加速度、热效应、空化效应等作用来有效破坏植物细胞壁, 加速细胞内活性成分进入提取溶剂, 从而提高提取效率, 缩短提取时间, 节约溶剂, 并且避免高温对提取

成分的破坏^[7]。因此, 本实验超声提取高橙皮中柠檬苦素, 并在单因素试验基础上, 采用正交试验对其工艺进行优化, 以期筛选出一种高效经济的提取方法, 为今后相关工业化应用提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器 DHG-9 423 A 鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); FW-135 植物粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); SK2510HP 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); E-UEC-200I 超声波声强测量仪 (杭州成功超声电源技术有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器、SHZ-Ⅲ真空泵 (上海亚荣生化仪器厂); Waters 2695 HPLC 色谱仪、Waters 2487 紫外检测器 (美国 Waters 公司); DU800 紫外/可见光分光光度计 (美国 Beckman 公司); BS110S 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); PHS-3C 型精密 PH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试剂与药物 新鲜高橙于 2015 年 12 月由温岭国庆塘高橙场、温岭坞根茗果高橙专业合作社提供, 丢弃过度成熟和有损坏者, 符合要求者通过手工剥皮并切碎, 将皮置

收稿日期: 2019-08-10

基金项目: 温岭市科技计划项目 (2015C213025)

作者简介: 尤文挺 (1986—), 男, 硕士生, 主管药师, 从事中药药理学、神经药理学研究。Tel: (0576) 89668008, E-mail: youwenting2012@126.com