doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.21.013

正交试验结合特征图谱法优选蛇蚁喷雾剂渗漉工艺*

叶炳皇[1],张 军[2△]

(1. 广东省中山市黄圃人民医院,广东 中山 528429; 2. 广州中医药大学,广东 广州 510006)

摘要:目的 优选蛇蚁喷雾剂乙醇渗漉工艺。**方法** 以芍药苷、丹酚酸 B 与延胡索乙素的综合保留率为评价指标,以乙醇体积分数、粉碎粒度、渗漉流速、溶剂用量为考察因素,采用 $L_9(3^4)$正交试验筛选渗漉工艺参数,并建立特征图谱,以相似度验证优选工艺的合理性。**结果** 渗漉工艺影响因素大小依次为乙醇体积分数>溶剂用量>渗漉流速>粉碎粒度。渗漉最佳工艺条件为,赤芍、丹参、延胡索等 18 味药材粉碎成粗粉,加 2 倍量 70% 乙醇浸渍 24 h,加 10 倍量 70% 乙醇进行渗漉,渗漉流速为 9 mL/(min·kg)。与传统工艺相比,9 个正交渗漉工艺 12 个共有峰的相似度均大于 0.90。**结论** 优选的工艺稳定、合理,可为蛇蚁喷雾剂的规模化生产提供理论依据。

关键词:蛇蚁喷雾剂;渗漉工艺;正交试验;特征图谱;芍药苷;丹酚酸 B;延胡索乙素

中图分类号:R932;TQ460.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)21－0048－05

Optimization of Percolation Process for Sheyi Sprays by the Orthogonal Test and Specific Chromatogram

YE Binghuang[1], *ZHANG Jun*[2]

(1. Huangpu People's Hospital of Zhongshan, Zhongshan, Guangdong, China 528429; 2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To optimize ethanol percolation process for Sheyi Sprays. **Methods** Taking the comprehensive retention rate of paeoniflorin, salvianolic acid B and tetrahydropalmatine B as the evaluation index and the volume fraction of ethanol, solvent dosage, crushing particle size and flow rate of percolation as the investigation indexes, the percolation process parameters were selected by the $L_9(3^4)$ orthogonal test, and the specific chromatogram was established to verify the rationality of the optimized process by the similarity. **Results** The influencing factors of percolation process were as follows: ethanol volume fraction > solvent dosage> solvent dosage > flow rate of percolation > crushing particle size. The optimal percolation process conditions were as follows: 18 medicinal flavors such as Paeoniae Radix Rubra, Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma and Corydalis Rhizoma were crushed into the coarse powder, soaked in two times of 70% ethanol for 24 h, and percolated with 12 times of 70% ethanol with the flow rate of 9 mL/(min·kg). Compared with the traditional process, the similarity of 10 common peaks of nine orthogonal percolation processes was higher than 0.90. **Conclusion** The optimial process is stable and reasonable, which can provide a theoretical basis for the large－scale production of Sheyi Sprays.

Key words: Sheyi Sprays; percolation process; orthogonal test; specific chromatogram; paeoniflorin; salvianolic acid B; tetrahydropalmatine

我院临床经方“蚁蛇方”是借鉴孙思邈《千金方》中治疔痹症的经典药酒方剂,通过加减药味形成的独特配方,以祛风散寒、通络止痛为治则,主治风寒湿三气杂至所致各种痹证,以酒剂形式长期应用于临床,疗效确切,安全可靠。但由于“蚁蛇方”药酒浸泡、携带、使用不方便的缺陷,本研究中按《医疗机构制剂注册管理办法》项下医疗机构制剂注册申报资料要求第二项第五条规定,“根据中医药理论组方,利用传统工艺配制”,即制剂配制过程未使原组方中治疗疾病的物质基础发生变化,在遵循“蚁蛇方”药酒制备工艺路线的基础上,采用乙醇溶剂进行渗漉提取,并采用正交试验法,以芍药苷、丹酚酸 B 和延胡索乙素的综合保留率为评价指标。目前,特征图谱或指纹图谱已普遍用于提取工艺优化[1－7],特征强,信息量大,整体性强,能更全面地评价药品质量。在产业模式下成方制剂存在长时间浓缩过程,与传统药酒相比,特征图谱、指标成分量可能存在差异[8]。本研究中结合特征图谱法对“蚁蛇方”的渗漉工艺进行评价,进一步验证优选的蛇蚁喷雾剂的渗漉工艺参数,为提高基于临床传统工艺配制制剂而研制的成药制剂的质量与临床疗效提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

AUW220D 型电子天平(日本岛津公司,精度为万分之一);Water e2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世科技公司),配有 2998 检测器。

1.2 试药

延胡索乙素对照品(批号为 110726－201515),芍药苷对照品(批号为 110736－201539),丹酚酸 B 对照品(批号为 111562－201514),纯度均为 99.99%,均购于中国食品药品检定研究院;黑蚂蚁(批号为 150124,

*基金项目:广东省中山市医学科研项目[2019A020503]。

第一作者:叶炳皇,男,硕士,主管药师,研究方向为医院药学及中药制剂质量控制,(电话)0760－23215976(电子信箱)ybh634@163.com。

△通信作者:张军,男,博士,研究员,研究方向为中药新药,(电话)020－39356997(电子信箱)zhjxsh@yahoo.com.cn。

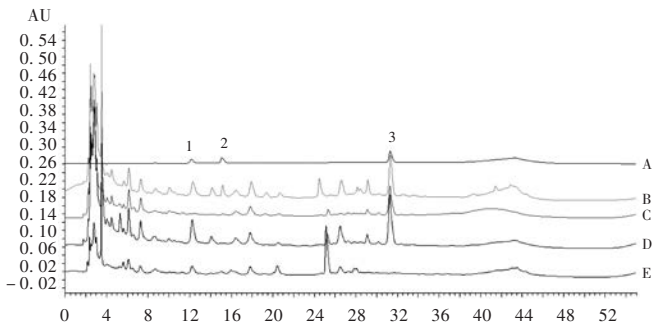
广东盏玉制药有限公司);丹参(批号为 151201－1),红花(批号为 160301－1),黄藤(批号为 160301),辣椒(批号为 160702),木瓜(批号为 150501),牛大力(批号为 160401),桑寄生(批号为 151201－1),乌梢蛇(批号为 160402),均购于广西容县亿生中药饮片厂;当归(批号为 160301),丁香(批号为 150601),均购于广州市集芝宝中药有限公司;赤芍(批号为 160301),醋延胡索(批号为 160501),独活(批号为 151201－1),羌活(批号为 160402),均购于广西京联中药饮片有限责任公司;威灵仙(批号为 150501,贵港市百草坊中药饮片有限公司);乙醇(批号为 20170901,广东省广宁县顺宁葡萄糖药业有限公司);甲醇(色谱纯,Merck 公司);水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 芍药苷、丹酚酸 B、延胡索乙素含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇－0.1%磷酸溶液,梯度洗脱(0～20 min 时 30% A～37% A,20～25 min 时 37% A～45% A,25～35 min 时 45% A,35～40 min 时 45% A～60% A,40～45 min 时 60% A～30% A,45～55 min 时 30% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相应位置上有相同保留时间的色谱峰,阴性对照无干扰。色谱图见图 1。



1. 芍药苷 2. 延胡索乙素 3. 丹酚酸 B
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C－E. 阴性对照药材溶液(分别缺赤芍、延胡索、丹参)

图 1 高效液相色谱图

1. paeoniflorin 2. tetrahydropalmatine 3. salvianolic acid B
A. Mixed reference solution B. Test solution C－E. Negative reference medicinal material solution(lacking Paeoniae Radix Rubra, Corydalis Rhizoma, and Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma)

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.1.2 溶液制备

取芍药苷对照品 10.08 mg、丹酚酸 B 19.87 mg,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,加甲醇使溶解并定容,摇匀,作为芍药苷对照品贮备液、丹酚酸 B 对照品贮备液。取延胡索乙素对照品 16.38 mg,精密称定,置 200 mL 容量瓶中,加甲醇使溶解并定容,摇匀,作为延胡索乙素对照品贮备液。分别精密量取芍药苷对照品贮备液、丹酚酸 B 对照品贮备液、延胡索乙素对照品贮备液各 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇使溶解并定容,摇匀,制得芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 质量浓度分别为 1.987,1.008,0.819 mg/mL 的混合对照品溶液。按处方比例称取全方药材,粉碎,过 2 号筛,加 2 倍量 70% 乙醇使润湿,装柱,浸渍 24 h,加 8 倍量 70% 乙醇,以 3 mL/(min·kg)的速率渗漉,收集渗漉液,加 70% 乙醇稀释至 1 000 mL,即得供试品原液。精密量取上述溶液 5 mL,置 10 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例分别称取缺赤芍、延胡索、丹参的全方药材,分别按供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 2,4,8,10,12,16,20 μL,注入色谱仪,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分值(Y)为纵坐标、对照品进样量(X,μg)为横坐标绘制标准曲线,得芍药苷、丹酚酸 B、延胡索乙素回归方程,分别为 $Y_{芍}=1\,028\,157.067\,4X_{芍}+4800.323\,9$($r=0.999\,6$, $n=7$),$Y_{丹}=1\,095\,713.646\,9X_{丹}+4075.183\,1$($r=0.999\,9$, $n=7$),$Y_{延}=1\,584\,988.564\,0X_{延}-2.436\,6$($r=1.000\,0$, $n=7$)。结果表明,芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 进样量分别在 0.201 6～2.016 0 μg、0.016 4～0.163 8 μg、0.397 4～3.974 0 μg 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 平均峰面积的 *RSD* 分别为 0.20%,0.33%,0.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,分别于 0,2,4,8,16,24 h 时按 2.1.1 项下色谱条件进样测定峰面积积分值。结果芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 平均峰面积的 *RSD* 分别为 1.87%,1.99%,1.23%($n=6$),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验:取 2.1.2 项下混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件分别进样 10 μL,重复操作 6 次。结果芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 含量的 *RSD* 分别为 0.52%,0.43%,0.20%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的同一供试品溶液 5.0 mL,共 9 份,置 10 mL 容量瓶中,分别精密加入 2.1.2 项下芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 质量浓度分别为 1.987,1.008,0.819 mg/mL 的混合对照品溶液

0.5,1.0,1.5 mL,按 2.1.1 项下色谱条件进样 10 μL,测定峰面积,计算回收率。结果芍药苷、延胡索乙素、丹酚酸 B 的平均回收率分别为 100.16%,100.34%,100.15%,*RSD* 分别为 0.75%,1.97%,0.38%(n=9)。表明方法回收率良好,符合定量分析要求。

2.2 工艺优选

优选渗漉工艺条件:临床采用酒浸渍的传统配制工艺,故本研究中选取乙醇渗漉工艺。基于中药渗漉工艺的关键因素分别为粉末粒度、溶剂组成、渗漉流速、溶剂用量[9]及预试验结果。按处方比例称取全方药材 96 g,含丹参 8 g,赤芍 6 g,延胡索 10 g,考察乙醇体积分数(因素 A)、溶剂用量(因素 B)、粉碎粒度(因素 C)、渗漉流速(因素 D)对指标成分保留率的影响。因素水平见表 1。按 $L_9(3^4)$正交试验进行设计(见表 2),其中加 2 倍量相应浓度的溶剂,润湿药粉,浸渍 24 h 进行渗漉。按供试品溶液制备方法制备,测定并计算指标成分芍药苷、延胡索乙素及丹酚酸 B 的综合保留率。保留率(%)=提取液中指标成分的含量/药材中指标成分的含量×100%;综合保留率(%)=芍药苷保留率×0.25+延胡索乙素保留率×0.42+丹酚酸 B 保留率×0.33。$L_9(3^4)$正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 The factor levels of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素 A(%)	因素 B(倍)	因素 C	因素 D[mL/(min·kg)]
1	30	8	最粗粉	3
2	50	10	粗粉	6
3	70	12	中粉	9

表 2 $L_9(3^4)$正交试验结果

Tab. 2 Results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因素				保留率(%)			
	A	B	C	D	芍药苷	延胡索乙素	丹酚酸 B	综合
1	1	1	1	1	72.10	38.37	56.23	54.30
2	1	2	2	2	78.50	48.09	65.22	62.89
3	1	3	3	3	85.58	59.26	69.47	70.13
4	2	1	2	3	84.38	75.95	80.22	79.85
5	2	2	3	1	80.39	75.59	80.63	78.90
6	2	3	1	2	83.13	85.81	89.21	86.57
7	3	1	3	2	76.40	75.63	86.30	80.31
8	3	2	1	3	86.68	92.97	90.11	90.20
9	3	3	2	1	86.49	95.92	96.32	93.73
K_1	62.440	71.487	77.023	75.643				
K_2	81.773	77.330	78.823	76.590				
K_3	88.080	83.477	76.447	80.060				
R	25.640	11.990	2.376	4.417				

试验结果分析:由表 2 可见,各因素对综合保留率影响的顺序由大至小依次为 A>B>D>C,即乙醇体积分数对综合保留率影响最大,70% 乙醇渗漉效果最佳;溶剂用量对综合保留率影响次之,12 倍量 70% 乙醇渗漉效果最佳;粉碎粒度对综合保留率影响不大,粗粉渗漉效果较佳;渗漉流速对综合保留率影响最小,渗漉流速为 9 mL/(min·kg)时渗漉效果较佳,且有利于缩短生产时间,降低时间成本。渗漉工艺的最佳工艺为 $A_3B_3C_2D_3$,即处方药材粉碎成粗粉,加 2 倍量 70% 乙醇使润湿,浸渍 24 h,用 10 倍量 70% 乙醇以 9 mL/(min·kg)的速率进行渗漉。

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results of ANOVA

因素	*SS*	*df*	*MS*	*P*
A	1 070.961	2	33.010	<0.05
B	215.686	2	6.648	>0.05
C	9.221	2	0.284	>0.05
D(误差列)	32.444	2	1.000	>0.05
合计	32.44	8		

工艺验证试验:按最佳渗漉工艺条件 $A_3B_3C_2D_3$ 进行重复试验,3 批验证结果中,芍药苷平均保留率为 88%,延胡索乙素平均保留率为 90%,丹酚酸 B 平均保留率为 91%,与正交渗漉结果一致,表明该工艺合理、稳定可行。

2.3 特征图谱比较

利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)软件,将正交渗漉工艺和传统工艺的供试品溶液高效液相色谱特征图谱进行叠加,并对相似度进行分析。结果见图 2 和表 4。

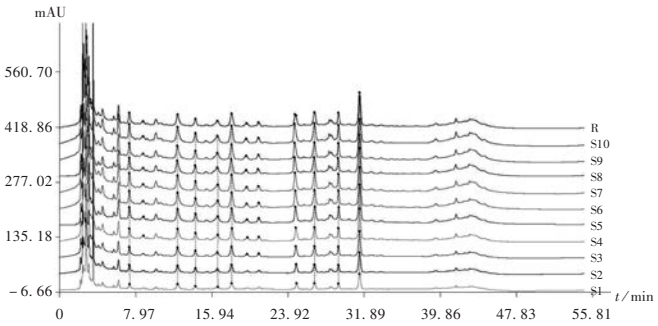


图 2 正交渗漉工艺和传统工艺供试品溶液高效液相色谱特征图谱叠加图

Fig. 2 Superposed HPLC specific chromatogram of test solution with orthogonal percolation process and traditional process

由图 2 可知,9 个正交渗漉工艺与传统工艺供试品共标定了 12 个共有峰,各特征峰出峰时间无差异,仅为量的差异,S9 最大,S1 最小,提示不同提取工艺对有效成分提取量大小有显著影响。相似度分析结果表明,以 S10 为对照特征图谱,S1-S9 相似度均大于 0.90,提示本组方乙醇渗漉工艺与传统药酒浸泡工艺的有效物质

表 4 不同工艺相似度分析结果

Tab. 4 The similarities of different processes

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1.000	1.000	0.992	0.990	0.914	0.921	0.911	0.920	0.911	0.911
S2	1.000	1.000	0.993	0.990	0.908	0.915	0.905	0.914	0.905	0.905
S3	0.992	0.993	1.000	0.998	0.915	0.922	0.914	0.922	0.913	0.913
S4	0.990	0.990	0.998	1.000	0.917	0.924	0.915	0.924	0.915	0.915
S5	0.914	0.908	0.915	0.917	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999
S6	0.921	0.915	0.922	0.924	1.000	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999
S7	0.911	0.905	0.914	0.915	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000
S8	0.920	0.914	0.922	0.924	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999
S9	0.911	0.905	0.913	0.915	1.000	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000
S10	0.911	0.905	0.913	0.915	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000

注：S1－S9 为试验号 1－9 正交渗漉工艺，S10 为传统工艺。

Note：S1－S9 is the orthogonal percolation process of Tests No. 1－9，and S10 is the traditional process.

基础无本质区别，正交试验优化所得工艺参数基本遵循临床用药经验，制剂配制过程没有使原组方中治疗疾病的物质基础发生变化。可见，所优选的工艺稳定、合理，可为蛇蚁喷雾剂的规模化生产提供参考。

3 讨论

3.1 指标性成分及综合评分选择

基于本组方为中药复方制剂，采用单一指标不能完整、真实地反映全方的有效成分。臣药赤芍、丹参、延胡索的主要成分均易溶于乙醇，2015 年版《中国药典（一部）》收载成方制剂多采用乙醇提取[10]，故采用乙醇进行提取。芍药苷具有镇痛作用[11]，丹参活血化瘀功效的潜在标志物为丹酚酸 B[12]，延胡索乙素是延胡索镇痛作用最强的成分[13－14]，故选择芍药苷、延胡索乙素和丹酚酸 B 综合保留率为考察指标。根据臣药赤芍、丹参、延胡索方中组成比例为 6∶8∶10（$m/m/m$），故设定综合保留率的权重系数分别为 0.25，0.33，0.42。

3.2 与传统工艺比较评价

“蚁蛇方”药酒的制备工艺为“粉碎，浸泡 10 d 以上，滤过，即得”。基于遵循“蚁蛇方”药酒的制备工艺，本研究中采用乙醇溶剂渗漉提取，优选蛇蚁喷雾剂的渗漉工艺参数，但考虑到工艺参数的差异可能导致化学成分变化，对原方临床疗效产生影响[8]。还采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对不同提取工艺特征图谱进行分析，以传统工艺为参考图谱，时间窗宽度设为 0.1 min，采用多点校正后自动匹配 S1－S9 及 S10 的指纹图谱，建立高效液相色谱特征图谱的共有模式，并计算特征图谱中 12 个特征峰的相对峰面积及相似度。结果表明，不同工艺所得样品与临床传统工艺所得药酒在已有化学成分共有模式下无本质区别。另外，后续研究还需比较药效学参数，进一步验证所优化工艺的临床疗效[15－16]。

3.3 色谱条件选择

采用二极管阵列检测器，于 200～400 nm 波长范围进行扫描，结果于 230 nm 和 316 nm 波长处色谱峰多，且主要色谱峰具有较高的响应值及峰形，基线干扰小。当检测波长为 230 nm 时，基线稳定，各共有峰在同一波长下均有较好吸收，干扰最少，结合主要色谱峰的 3D 图谱，检测波长最终选用 230 nm。另外，比较了甲醇－水、乙腈－水、甲醇－0.1% 磷酸溶液、乙腈－0.1% 磷酸溶液等多个流动相系统。结果显示，采用乙腈－0.1% 磷酸溶液、甲醇－0.1% 磷酸溶液时，所得峰形均对称，理论板数均高，且分离度良好。出于有机试剂毒性与劳动保护的考虑，选择毒性相对较低的甲醇－0.1% 磷酸溶液作为流动相。

参考文献

[1] 谢兴亮，薛棱芬，殷雅卓，等. 基于指纹图谱及多指标成分定量的丹参提取工艺对比研究[J]. 成都医学院学报，2017，12(3)：237－240.

[2] 刘 悦，龚苏晓，张铁军，等. 头痛滴丸不同提取工艺指纹图谱比较研究[J]. 中成药，2014，36(1)：85－89.

[3] 谢 凡，施崇精，杨秀清，等. 基于信息熵理论的正交设计结合指纹图谱优选加味四妙颗粒的提取工艺[J]. 中草药，2018，49(6)：1331－1337.

[4] 苏 梦，刘雅敏，白月明，等. 特征图谱法优选小儿清热宁颗粒中 4 种药材热回流提取工艺的研究[J]. 中药材，2017，40(4)：902－906.

[5] 张秋燕，杨志伟，杨兴鑫，等. 用于黄芩提取物质量评价及制法影响因素考察的 HPLC 特征图谱的构建[J]. 中国中药杂志，2020，45(20)：4938－4948.

[6] 张玉玲，汪聪聪，葛 鼎，等. 基于标准汤剂的桔梗汤经典方制备工艺优化研究[J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21(12)：52－56.

[7] 何杨虎，吴安明，占小勤. 肿节风配方颗粒制备工艺和高效液相色谱特征图谱研究[J]. 中国医院药学杂志，2016，36(23)：2077－2080.

[8] 贺 倩，黄宝明，陈 成，等. 银翘散煎剂与 5 种银翘解毒成药 HPLC 特征图谱的比较研究[J]. 中药新药与临床药理，2012，23(3)：303－307.

[9] 王婉莹，瞿海斌，龚行楚. 中药渗漉提取工艺研究进展[J]. 中国中药杂志，2020，45(5)：1039－1046.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2015：681，683，602.

[11] 吴 丽，王丽丽，费文婷，等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β－EP、PGE_2 的影响[J]. 中华中医药杂志，2018，33(3)：915－918.

[12] 马 婧，陈 茜，边亚倩，等. 基于系统中药学的丹参活血化瘀功效标志物研究[J]. 中国中药杂志，2020，45(14)：3259－3265.