doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.23.014

复方透骨宽筋洗剂提取工艺优化

周 俊,李雪芹△,唐 蕾,赵伟国

(广东省中山市人民医院,广东 中山 528403)

摘要:目的 优化复方透骨宽筋洗剂的提取工艺。**方法** 采用亚硝酸钠－硝酸铝－氢氧化钠显色法测定洗剂中总黄酮的含量;以浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,以总黄酮和总固形物的含量为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$正交试验优化复方透骨宽筋洗剂的提取工艺。**结果** 总黄酮测定方法的平均回收率为98.23%,*RSD*为0.77%($n=6$);最优提取工艺为加10倍量水,浸泡30 min,煎煮1.5 h,煎煮2次。**结论** 建立的总黄酮测定方法可行,优选的工艺合理、稳定、可靠。

关键词:复方透骨宽筋洗剂;总黄酮;总固形物;提取工艺;正交试验

中图分类号:R932;TQ460.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)23－0048－04

Optimization of Extraction Process of Compound Tougukuanjin Lotion

ZHOU Jun, LI Xueqin, TANG Lei, ZHAO Weiguo

(*Zhongshan People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China* 528403)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Compound Tougukuanjin Lotion. **Methods** The content of total flavonoids in Compound Tougukuanjin Lotion was determined by the sodium nitrite($NaNO_2$)－aluminum nitrate[$Al(NO_3)_3$]－sodium hydroxide(NaOH) colorimetry. The extraction process of Compound Tougukuanjin Lotion was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with soaking time, amount of water, decocting time and decocting times as the investigation factors, and with the content of total flavonoids and total solids as the comprehensive evaluation indexes. **Results** The average recovery of total flavonoids was 98.23% with the *RSD* of 0.77% ($n=6$). The optimal extraction process was as follows: adding 10 times of water, soaking for 30 min, decocting twice with 1.5 h each time. **Conclusion** The established method for the content determination of total flavonoids is feasible, and the optimized extraction process is reasonable, stable and reliable.

Key words: Compound Tougukuanjin Lotion; total flavonoids; total solids; extraction process; orthogonal test

第一作者:周俊,女,硕士,副主任药师,研究方向为医院制剂质量控制,(电子信箱)zhoujun200806@126.com。

△**通信作者:**李雪芹,女,博士,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)8371596@qq.com。

致急性肝损伤的作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(12):1440－1443.

[12] ZHAO XM, CONG XN, ZHENG LL, et al. Dioscin, a natural steroid saponin, shows remarkable protective effect against acetaminophen－induced liver damage *in vitro* and *in vivo*[J]. Toxicology Letters, 2012, 214(1): 69－80.

[13] LI M, WANG S, LI XJ, et al. Diallyl sulfide protects against lipopolysaccharide/d－galactosamine－induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 120: 500－509.

[14] ZHOU S, GU J, LIU R, et al. Spermine Alleviates Acute Liver Injury by Inhibiting Liver－Resident Macrophage Pro－Inflammatory Response Through ATG5－Dependent Autophagy[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 948－959.

[15] ZHENG LL, YIN LH, XU LN, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide－induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway *in vivo*[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 481－488.

[16] HU YB, YE XT, ZHOU QQ, et al. Sestrin 2 Attenuates Rat Hepatic Stellate Cell (HSC) Activation and Liver Fibrosis via an mTOR/AMPK－Dependent Mechanism[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(5): 2111－2122.

[17] SHU GW, QIU YH, HAO J, et al. γ－Oryzanol alleviates acetaminophen－induced liver injury: roles of modulating AMPK/GSK3β/Nrf2 and NF－κB signaling pathways[J]. Food Funct, 2019, 10(10): 6858－6872.

[18] KOSURU R, KANDULD V, RAI U, et al. Pterostilbene Decreases Cardiac Oxidative Stress and Inflammation via Activation of AMPK/Nrf2/HO－1 Pathway in Fructose－Fed Diabetic Rats[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2018, 32(2): 147－163.

[19] BIZZARO D, CRESCENZI M, DI LIDDO R, et al. Sex－dependent differences in inflammatory responses during liver regeneration in a murine model of acute liver injury[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(2): 255－272.

[20] TANG FY, FAN KF, WANG KL, et al. Amygdalin attenuates acute liver injury induced by *D*－galactosamine and lipopolysaccharide by regulating the $NLRP_3$, NF－κB and Nrf2/NQO1 signalling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 527－536.

(收稿日期:2020－10－30;修回日期:2021－04－25)

复方透骨宽筋洗剂为医院特色制剂，临床应用历史悠久，疗效确切，由宽筋藤、苏木、透骨草等多味中药组方，具有活血散瘀、舒筋活络、消肿止痛功效，多用于治疗跌打扭伤、骨折、脱位后期功能恢复等。根据临床用药经验和处方药材有效成分，制剂提取工艺采取水煎煮。方中透骨草、苏木、千年健等均含有大量黄酮类物质，因此本研究中以总黄酮和总固形物的含量为综合评价指标，采用正交试验优化制剂的提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

DZTW 型调温电热套（北京市永光明医疗仪器有限公司）；KA－1000C 型低速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；AUW2200 型电子分析天平（精度为 0.1 mg/0.01 mg），UV－1800 型双光束紫外可见分光光度计，均购自日本岛津公司。

1.2 试药

药材饮片（广州康圣药业有限公司）；芦丁对照品（中国食品药品检定研究院，批号为 100080－201811，含量为 92.4%）；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 溶液制备

取芦丁对照品 25 mg，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加 80% 乙醇溶解并定容，摇匀，即得质量浓度为 0.25 mg/mL 的对照品溶液。按处方称取药材 135 g（其中荆芥穗水煎 1 次，于第 2 次煎液中加入），加 10 倍量水，煎煮 1.5 h，煎煮 2 次，合并、浓缩滤液，加入含苯甲酸钠 0.3 g、羟苯乙酯 0.06 g 的乙醇溶液，搅拌使溶解，添加适量蒸馏水，得 100 mL 药液；精密量取药液 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，用水定容，得样品溶液；精密量取样品溶液 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，用 80% 乙醇定容，摇匀，以 3 000 r/min 的速率离心 10 min，取上清液，即得供试品溶液。

2.1.2 测定方法

精密量取对照品溶液和供试品溶液各 3 mL，分别置 25 mL 容量瓶中，各加入 30% 乙醇至 15 mL，加入 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL，摇匀，放置 3 min；加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL，摇匀，放置 3 min；加入 4.3% 氢氧化钠溶液 3.0 mL，摇匀，放置 5 min，用 30% 乙醇定容至 25 mL。在 400～600 nm 波长范围内扫描，测定吸光度，结果对照品溶液和供试品溶液均在 510 nm 波长处有最大吸收，故选择 510 nm 为测定波长。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察：精密量取对照品溶液 1.0，2.0，3.0，4.0，5.0，6.0，7.0 mL，分别置 25 mL 容量瓶中，各加入 30% 乙醇至 15 mL，按 2.1.2 项下方法操作，以相应试剂作空白对照，在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度（A）为纵坐标、对照品溶液质量浓度（C，mg/mL）为横坐标进行线性回归，得回归方程 $A = 12.395C + 0.0096$（$r = 0.9998$，$n = 7$）。结果表明，芦丁质量浓度在 0.01～0.07 mg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验：精密量取对照品溶液 3 mL，共 6 份，分别置 25 mL 容量瓶中，按 2.1.2 项下方法操作，在 510 nm 波长处测定吸光度。结果芦丁吸光度的 *RSD* 为 0.21%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：精密量取供试品溶液 3 mL，按 2.1.2 项下方法操作，分别于显色后 0，5，10，15，20，25 min 时在 510 nm 波长处测定吸光度。结果芦丁吸光度的 *RSD* 为 1.64%（$n = 6$），表明显色后 25 min 内吸光度基本稳定，故应在显色后 25 min 内测定。

重复性试验：取供试品溶液 6 份，按 2.1.2 项下方法操作，在 510 nm 波长处测定吸光度。结果芦丁吸光度的 *RSD* 为 0.53%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：精密量取已知含量的样品溶液 0.5 mL，共 6 份，分别置 10 mL 容量瓶中，精密加入对照品溶液 6.0 mL，用 80% 乙醇定容，摇匀，以 3 000 r/min 的速率离心 10 min，取上清液，依法制备供试品溶液，取 3 mL，按 2.1.2 项下方法操作，在 510 nm 波长处测定吸光度，代入回归方程，并计算供试品的含量。结果芦丁的平均回收率为 98.23%，*RSD* 为 0.77%（$n = 6$）。

2.2 总固形物含量测定

精密量取样品溶液 20 mL，置干燥至恒重的蒸发皿中蒸干，将所得干膏于 105 ℃下干燥至恒重，精密称定，计算总固形物含量。

2.3 工艺参数优化

采用正交试验优化工艺参数。在确定水提工艺路线基础上，以浸泡时间（因素 A）、加水量（因素 B）、煎煮时间（因素 C）、煎煮次数（因素 D）为考察因素[1－3]，以总黄酮和总固形物的含量为综合评价指标，综合评分＝总黄酮含量隶属度×0.5＋总固形物含量隶属度×0.5，隶属度＝（测定值－最小测定值）/（最大测定值－最小测定值）。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化复方透骨宽筋洗剂的工艺。正交试验因素水平设计见表 1，试验设计及结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素 A（min）	因素 B（倍）	因素 C（h）	因素 D（次）
1	0	8	1.0	1
2	30	10	1.5	2
3	60	12	2.0	3

表 2 $L_9(3^4)$正交试验结果

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

序号	A	B	C	D	含量(mg/mL)		综合评分(分)
					总黄酮	总固形物	
1	1	1	1	1	15.76	126.08	0
2	1	2	2	2	32.03	196.34	0.626
3	1	3	3	3	45.60	225.13	0.999
4	2	1	2	3	36.23	225.36	0.843
5	2	2	3	1	23.34	159.62	0.296
6	2	3	1	2	30.61	200.86	0.625
7	3	1	3	2	33.45	198.58	0.662
8	3	2	1	3	37.20	216.80	0.816
9	3	3	2	1	20.73	161.71	0.263
K_1	0.542	0.502	0.480	0.186			
K_2	0.588	0.579	0.577	0.638			
K_3	0.580	0.629	0.652	0.886			

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results of ANOVA

方差来源	极差	偏差平方和	自由度	$F_{比}$	P
A	0.046	0.004	2	0.019	>0.05
B	0.127	0.025	2	0.121	>0.05
C	0.172	0.045	2	0.217	>0.05
D	0.700	0.755	2	3.643	>0.05

注：$F_{0.05}(2,2)=4.46$。

Note: $F_{0.05}(2,2)=4.46$。

采用正交试验设计助手Ⅱ(V3.1 专业版)进行方差分析，结果见表 3。可见，考察因素对综合评分均无显著影响。直观分析结果表明，影响最大为因素 D；极差分析显示，其水平 3 提取效果最佳，水平 2 与水平 3 相差不大，从生产成本方面考虑，最优工艺选择水平 2；其次为因素 C 和因素 B，极差分析显示，两者水平 3 提取效果最佳，水平 2 与水平 3 相差不大，从生产成本方面考虑，最优工艺选择水平 2；因素 A 对提取效果影响最小，水平 2 与水平 3 几乎无差异，最优工艺选择水平 2。故最终确定的工艺为 $A_2B_2C_2D_2$，即加 10 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 1.5 h，煎煮 2 次。

2.4 验证试验

对优选工艺参数 $A_2B_2C_2D_2$ 的可靠性与重现性进行验证，并与理论最大提取工艺参数 $A_2B_3C_3D_3$(即加 12 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 2 h，煎煮 3 次)进行比较。按验证试验优选工艺条件平行制备 3 份样品，理论最大工艺条件平行制备 2 份，测定提取液中总黄酮和总固形物的含量。详见表 4。可见，优化工艺条件下总固形物和总黄酮含量的平均值分别为理论工艺条件下的 85.83% 和 80.04%。

表 4 验证试验结果(mg/mL)

Tab. 4 Results of the validation test(mg/mL)

项目	$A_2B_3C_3D_3$			$A_2B_2C_2D_2$			
	1	2	$\bar{X}$	1	2	3	$\bar{X}$
总固形物	232.62	233.82	233.22	195.58	203.69	201.26	200.18
总黄酮	36.94	36.49	36.72	29.24	29.24	29.69	29.39

3 讨论

3.1 评价指标选择

方中，透骨草中黄酮、香豆素、多肽、甾醇、萘醌等化学成分的主要药理成分为黄酮、香豆素、萘醌[4-6]，苏木、威灵仙、千年健、钩藤、荆芥穗等含有黄酮类物质[7-14]，故本研究中以总黄酮的含量为提取工艺优化的评价指标。总固形物的含量是中药制剂提取工艺中常用评价指标[15-16]，考虑到中药有效成分的复杂性，故以总黄酮和总固形物的含量为综合评价指标。

3.2 总黄酮测定方法选择

尚未见复方透骨宽筋洗剂总黄酮测定方法的报道，本研究中选择紫外可见分光光度法进行测定。方法建立过程中，以芦丁为对照品，比较了直接测定法、三氯化铝显色法和硝酸铝显色法 3 种总黄酮测定方法，发现直接测定法和三氯化铝测定法的对照品溶液与供试品溶液最大吸收波长不一致，而硝酸铝显色法中芦丁对照品溶液与供试品溶液的最大吸收波长均为 510 nm。因此，采用硝酸铝显色法，并考察了影响因素，对硝酸铝浓度、氢氧化钠浓度及用量、显色条件等进行了优化。最后，对所建立的方法进行了验证，重复性试验结果和加样回收率均符合药典要求。

3.3 最优提取工艺确定

提取工艺优化后的验证试验结果显示，优选的提取工艺合理。故最优提取工艺确定为 $A_2B_2C_2D_2$，即加 10 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 1.5 h，煎煮 2 次。

参考文献

[1] 华兰英. 正交试验设计优选柴芍归术颗粒的提取工艺[J]. 按摩与康复医学，2018，9(24)：53-54.

[2] 刘效栓，李喜香，李季文，等. 五福饮口服液的提取工艺研究[J]. 西部中医药，2018，31(9)：51-55.

[3] 冯子芳，袁晓航，陈晓伟，等. 多指标正交试验优选葆肾合剂最佳提取工艺[J]. 中国药业，2020，29(17)：43-46.

[4] 赵卫星，姜红波，王 艳，等. 透骨草化学成分的研究进展[J]. 应用化工，2011，40(4)：696-697.

[5] 陈秀梅，钱士辉，冯 锋. 凤仙透骨草的化学成分[J]. 药学与临床研究，2009，17(1)：31-33.

[6] 王 璇，崔景荣，肖志平，等. 透骨草类药材抗炎镇痛作用的比较[J]. 北京医科大学学报，1998，30(2)：145.

[7] 蔡晨秋，赵明波，唐 丽，等. 苏木的化学成分研究[J]. 中草药，2012，43(2)：230-233.