doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.23.012

正交试验优选抗风止痛宁提取工艺*

晏 菲,王景媛,曾永成,高佳蓉,强选萍,史亚军△

(陕西中医药大学药学院·陕西省中药基础与新药研究重点实验室,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 优选抗风止痛宁的最佳提取工艺。**方法** 以丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素A和总固体含量为综合评价指标,以乙醇体积分数、乙醇用量、浸渍时间、提取次数为考察因素,采用$L_9(3^4)$正交试验法优选抗风止痛宁的最佳提取工艺,并验证。**结果** 抗风止痛宁的最佳提取条件为加15倍量70%乙醇,浸渍3次,每次3 d;在此条件下,丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素A和总固体的平均含量分别为0.016 2 mg/mL(*RSD*为1.23%)、0.485 5 mg/mL(*RSD*为1.38%)和18.81%(*RSD*为2.06%)。**结论** 该研究为抗风止痛宁制剂的规范化生产奠定了一定基础。

关键词:抗风止痛宁;提取工艺;多指标综合评分法;丹参酮ⅡA;羟基红花黄色素A;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)23－0040－04

Optimization of Extraction Process of Kangfeng Zhitongning by the Orthogonal Test

YAN Fei, WANG Jingyuan, ZENG Yongcheng, GAO Jiarong, QIANG Xuanping, SHI Yajun

(*College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine· Shaanxi Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Xianyang, Shaanxi, China 712046*)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Kangfeng Zhitongning. **Methods** The optimal extraction process of Kangfeng Zhitongning was optimized and verified by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the contents of tanshinone ⅡA, hydroxysafflor yellow A and total solid as the comprehensive evaluation indexes and with the ethanol volume fraction, ethanol dosage, soaking time and extraction times as the investigation factors. **Results** The optimal extraction conditions of Kangfeng Zhitongning were as follows: adding 15 times the dosage of 70% ethanol, soaking for three times, and 3 d each time. Based on these conditions, the average contents of tanshinone ⅡA, hydroxysafflor yellow A and total solid were 0.016 2 mg/mL(*RSD* = 1.23%), 0.485 5 mg/mL(*RSD* = 1.38%) and 18.81% (*RSD* = 2.06%), respectively. **Conclusion** This study lays a certain foundation for the standardized production of Kangfeng Zhitongning preparation.

Key words: Kangfeng Zhitongning; extraction process; multi－index integrated evaluation method; tanshinone ⅡA; hydroxysafflor yellow A; orthogonal test

类风湿关节炎(RA)属中医痹证范畴。《黄帝内经·素问·痹论》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹也。”风、寒、湿、热等外邪侵袭人体,邪留关节,经脉气血闭阻不通,不通则痛。RA患者疼痛、水肿、四肢麻木等体征大都表露于体肤,针对寒湿痹阻症患者,以中药外用,如熏洗、外敷、蜡疗、艾灸等[1－4],直接作用于皮肤或黏膜,吸收更快,直达病所,发挥舒筋活血、通络止痛、驱邪外出的作用[5]。抗风止痛宁酊剂是我校附属医院治疗寒湿痹

*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2020SF－316];陕西省教育厅专项科研计划项目[09JK403]。

第一作者:晏菲,女,硕士研究生,实验师,研究方向为中药新剂型与新技术,(电子信箱)faye0140@163.com。

△通信作者:史亚军,男,博士研究生,教授,研究方向为中药新剂型与新技术,(电子信箱)2051004@sntcm.edu.cn。

[5] 李 晖,李文静,马 荣,等. 大黄素甲醚8－*O*－*β*－吡喃葡萄糖苷对皮肤黑色素瘤A375细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 中国药房,2017,28(28):3941－3945.

[6] 王 佳,李进霞,刘斌焰,等. 响应曲面法优化虎杖多糖提取工艺[J]. 广州化工,2018,46(15):96－99.

[7] 贾伟炜,赵映瑜,陈振斌. 酶解辅助法提取虎杖中白藜芦醇的研究[J]. 应用化工,2018,47(6):1132－1136.

[8] 余志芳,欧 泉,文 静,等. 不同干燥方法对虎杖主要有效成分含量的影响[J]. 中药与临床,2016,7(2):11－14.

[9] 徐向君,余金鹏,袁 媛,等. 闪式提取及高速逆流色谱联用提取高纯度甘草苷[J]. 中成药,2016,38(1):72－76.

[10] 张晴晴. 闪式提取法在中药制剂工艺中的应用[J]. 长春师范学院学报(自然科学版),2019,38(1):65－68.

[11] 关亮俊,高荣凯,任海东,等. Plackett－Burman与Box－Behnken试验设计优化苦豆子中氧化苦参碱提取工艺[J]. 中国药师,2018,21(9):1509－1513.

[12] 梁 俊,郑江萍,黄良永. 虎杖配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药师,2015,18(4):578－582.

[13] 刘慧文,王国凯,储宣宁,等. 不同产地虎杖HPLC指纹图谱及6种成分含量测定[J]. 现代中药研究与实践,2018,32(3):13－17.

[14] 赵 萍,王 森,欧水平,等. HPLC法同时测定虎杖膏中4种成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(3):405－407.

[15] 颜宝红,杨世民. Box－Behnken效应面法优化板蓝根药材闪式提取工艺[J]. 中国药师,2017,20(1):64－68.

(收稿日期:2021－01－12;修回日期:2021－07－03)

阻型 RA 的临床经验方，由丹参、红花、三七、全蝎、生川乌、伸筋草等药材组方，原工艺采用传统制备方法，将上述药材用白酒（规定浓度）浸泡地藏 1～3 个月而得，此法生产周期较长，提取工艺缺乏科学的评价手段和方法。为进一步规范制剂的制备工艺，本研究中采用正交试验法，以乙醇为提取溶剂，丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素 A 和总固体含量为综合评价指标，优化抗风止痛宁的提取工艺，为其现代制剂开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U－3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）；BT－25S 型电子天平（赛多利斯＜上海＞贸易有限公司，精度为十万分之一）；DHG－9140 型电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科技有限公司）。

1.2 试药

丹参酮ⅡA 对照品（批号为 110766－201721，含量≥99.5%），羟基红花黄色素 A 对照品（批号为 111637－201810，含量≥93.1%），均购自中国食品药品检定研究院；乙醇为分析纯，甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯，水为娃哈哈纯净水。丹参、红花、三七、全蝎、生川乌、伸筋草饮片（陕西兴盛德饮片有限公司，批号分别为 20180107，20180825，20180921，20180910，20180910，201800927）。

2 方法与结果

2.1 丹参酮ⅡA 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Agilent TC－C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－水（75∶25，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：270 nm；柱温：25 ℃；进样量：10 μL。

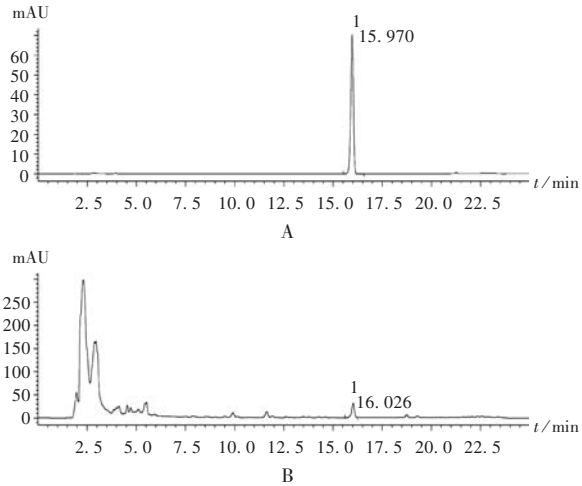
2.1.2 溶液制备

取丹参酮ⅡA 对照品 6.13 mg，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，以甲醇溶解并定容，即得质量浓度为 122.6 μg/mL 的丹参酮ⅡA 对照品溶液。采用浸渍法提取，将浸出液滤过，浓缩至每 100 mL 相当于原饮片 10 g（总处方量），即得样品溶液；精密量取样品溶液 25 mL，减压回收溶剂，残渣加甲醇溶解并定容至 25 mL，即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验：取 2.1.2 项下丹参酮ⅡA 对照品溶液和供试品溶液各适量，按 2.1.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果理论板数按丹参酮ⅡA 计应不低于 3 000，分离度大于 1.5，基线分离良好。详见图 1。

线性关系考察：精密量取丹参酮ⅡA 对照品溶液 0，0.5，1.0，1.5，2.0，2.5，3.0 mL，分别置 10 mL 容量瓶中，加甲醇定容，按 2.1.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以丹参酮ⅡA 质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 *Y*＝134.19*X*＋28.911（*r*＝0.999 7，*n*＝7）。结果表明，丹参酮ⅡA 质量浓度在 6.13～36.78 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 丹参酮ⅡA

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 1 丹参酮ⅡA 高效液相色谱图

1. tanshinone ⅡA

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of tanshinone ⅡA

检测限确定：精密量取 2.1.2 项下丹参酮ⅡA 对照品溶液适量，倍比稀释，并按 2.1.1 项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）为 3∶1 时计算检测限。结果丹参酮ⅡA 的检测限为 0.01 μg/mL。

精密度、稳定性、重复性、加样回收试验：按规定方法进行试验。结果精密度试验的 *RSD* 为 0.71%，表明仪器精密度良好；稳定性试验的 *RSD* 为 1.91%，表明室温下供试品溶液在 12 h 内稳定；重复性试验的 *RSD* 为 1.25%，表明方法重复性良好；平均加样回收率为 99.03%，*RSD* 为 0.96%（*n*＝6），表明方法准确度良好。

2.2 羟基红花黄色素 A 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱：BD Hypersil C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－乙腈－0.7% 磷酸水溶液（26∶2∶72，*V*/*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；检测波长：403 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

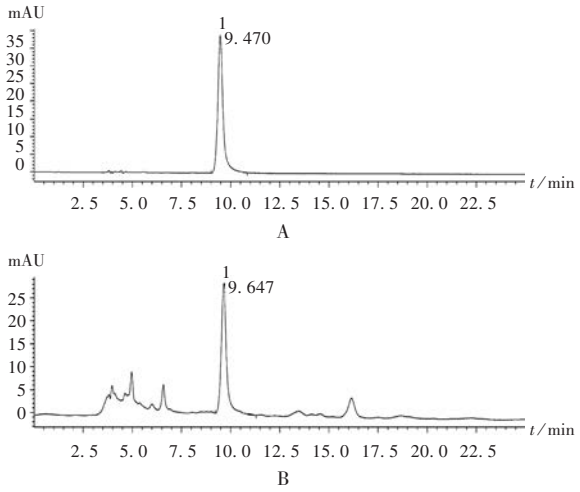
2.2.2 溶液制备

取羟基红花黄色素 A 对照品 3.07 mg，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，以甲醇溶解并定容；取 1 mL 置 50 mL 容量瓶中，以甲醇定容，即得质量浓度为 12.28 μg/mL 的羟基红花黄色素 A 对照品溶液。精密量取 2.1.2 项下样品溶液 1 mL，减压回收溶剂，残渣加甲醇溶解并定容至 100 mL，即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验：取 2.2.2 项下羟基红花黄色素 A

对照品溶液和供试品溶液各适量，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果理论板数以羟基红花黄色素 A 计应不低于 3 000，分离度大于 1.5，基线分离良好。详见图 2。



1. 羟基红花黄色素 A

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图 2 羟基红花黄色素 A 高效液相色谱图

1. hydroxysafflor yellow A

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of hydroxysafflor yellow A

线性关系考察：精密吸取羟基红花黄色素 A 对照品溶液 0，0.5，1.0，2.0，3.0，4.0，5.0 mL，分别置 10 mL 容量瓶中，加甲醇定容，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以羟基红花黄色素 A 质量浓度（X，μg/mL）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y=26.767X-1.364\ 4$（$r=0.999\ 8$，$n=7$）。结果表明，羟基红花黄色素 A 的质量浓度在 0.61～6.14 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限确定：精密量取 2.2.2 项下羟基红花黄色素 A 对照品溶液适量，倍比稀释，并按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，以信噪比（S/N）分别为 10∶1 和 3∶1 时计算定量限和检测限。结果，羟基红花黄色素 A 的定量限和检测限分别为 0.012 μg/mL 和 0.005 μg/mL。

精密度、稳定性、重复性、加样回收试验：按规定方法进行试验。结果精密度试验的 *RSD* 为 0.86%，表明仪器精密度良好；稳定性试验的 *RSD* 为 1.78%，表明室温下供试品溶液在 12 h 内稳定；重复性试验的 *RSD* 为 2.31%，表明方法重复性良好；平均加样回收率为 101.75%，*RSD* 为 1.16%（$n=6$），表明方法准确度良好。

2.3 总固体含量测定

参照 2020 年版《中国药典（四部）》通则“固体总量测定法”，计算总固体含量（%）。精密量取样品溶液 25 mL，置已干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，于 105 ℃干燥 3 h，置干燥器中冷却 30 min，迅速精密称定质量，计算供试品中总固体含量（%）。

2.4 单因素考察

乙醇体积分数：取处方量药材粗粉 5 份，分别加 10 倍量 50%，60%，70%，80%，90% 乙醇浸渍 3 d，综合评分显示，在乙醇体积分数为 70% 时达到最大值。故选择乙醇体积分数因素的三水平分别为 60%，70%，80%。

乙醇用量：取处方量药材粗粉 5 份，分别加入 5，10，15，20，25 倍 70% 乙醇浸渍 3 d，综合评分显示，随着乙醇用量的增加，综合评分逐渐升高，但当乙醇用量超 20 倍后增加不明显。故选择乙醇用量的三水平分别为 15，20，25 倍。

浸渍时间：取处方量药材粗粉 5 份，加入 10 倍量 70% 乙醇，分别浸渍 1，2，3，4，5 d，综合评分显示，在提取 1～3 d 时逐渐升高，4 d 以上时基本无变化。综合提取次数的影响，从提高效率方面考虑，故选择浸渍时间的三水平分别为 2，3，4 d。

提取次数：取处方量药材粗粉 5 份，分别加入 10 倍量 70% 乙醇，浸渍 3 d 为 1 次，分别考察提取 1，2，3，4，5 次的情况。综合评分显示，在提取 1～3 次时升高，提取 3 次后基本无变化，说明 3 次时已基本提取完全。故选择提取次数的三水平分别为 1，2，3 次。

2.5 正交试验

以丹参酮 $\mathrm{\text{Ⅱ}_A}$ 含量（Ⅰ）、羟基红花黄色素 A 含量（Ⅱ）、总固体含量（Ⅲ）及综合评分（Ⅳ）为评价指标，采用综合加权评分法[6]，根据影响提取工艺因素的大小、权重系数分别记为 0.4，0.4，0.2，综合评分 = 丹参酮 $\mathrm{\text{Ⅱ}_A}$ 含量/丹参酮 $\mathrm{\text{Ⅱ}_A}$ 含量 $_{max}\times0.4\times100$ + 羟基红花黄色素 A 含量/羟基红花黄色素 A 含量 $_{max}\times0.4\times100$ + 总固体含量/总固体含量 $_{max}\times0.2\times100$。以乙醇体积分数（A）、乙醇用量（B）、浸渍时间（C）、提取次数（D）为考察因素，设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。结果见表 1 至表 3。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

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

水平	因素 A（%）	因素 B（倍）	因素 C（d）	因素 D（次）
1	60	15	2	1
2	70	20	3	2
3	80	25	4	3

由表 2 和表 3 可知，各因素对提取效果的影响强度依次为乙醇体积分数 > 提取次数 > 浸渍时间 > 乙醇用量，最佳参数为 $A_2B_3C_2D_3$；仅 A 因素对提取有显著影响。从节约能源和提高效率的角度出发，选择最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_3$，即加 15 倍量 70% 乙醇，浸渍 3 次，每次 3 d，将浸出液滤过、浓缩，调整至含醇量为 70%，且每 100 mL 相当于原饮片（总处方量）10 g。

表 2 $L_9(3^4)$正交试验设计方案及结果

Tab. 2 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素				评价指标			
	A	B	C	D	Ⅰ(mg/mL)	Ⅱ(mg/mL)	Ⅲ(%)	Ⅳ(分)
1	1	1	1	1	0.011 7	0.365 7	7.462 3	66.813 1
2	1	2	2	2	0.012 6	0.458 4	9.693 1	79.040 6
3	1	3	3	3	0.012 9	0.484 9	10.356 0	82.668 0
4	2	1	2	3	0.016 3	0.358 2	18.775 8	89.512 0
5	2	2	3	1	0.014 7	0.321 2	16.507 3	80.121 5
6	2	3	1	2	0.015 9	0.326 8	18.157 4	85.282 6
7	3	1	3	2	0.011 5	0.278 4	14.806 7	66.929 8
8	3	2	1	3	0.010 7	0.272 3	16.232 1	65.979 1
9	3	3	2	1	0.011 2	0.259 9	15.560 1	65.468 6
K_1	76.174	74.418	72.692	70.801				
K_2	84.972	75.047	78.007	77.084				
K_3	66.126	77.806	76.573	79.386				
R	18.846	3.388	5.315	8.585				

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Results of ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	533.550	2	266.775	27.378	<0.05
B	19.488	2	9.744	1.000	
C	45.376	2	22.688	2.328	
D	118.486	2	59.243	6.080	
误差	19.490	2	9.745		

注：$F_{0.05}(2,2)=19.00$。

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$.

2.6 验证试验

按最佳提取工艺进行 6 次平行试验，并测定丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素 A 及总固体含量。结果丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素 A 和总固体的平均含量分别为 0.016 2 mg/mL（*RSD* 为 1.23%）、0.485 5 mg/mL（*RSD* 为 1.38%）和 18.81%（*RSD* 为 2.06%）。结果表明，该工艺合理可行。

3 讨论

该制剂处方药材的主要有效成分为丹参中丹参酮类、红花中黄酮类、三七中皂苷类、川乌和伸筋草中生物碱类等，为了确保有效成分提取率，参考文献[7－8]和原工艺白酒浸泡地藏方法，本研究中采用乙醇浸渍提取。主药丹参、红花为经典药对，为活血化瘀之要药。丹参中丹参酮ⅡA 具有抗血小板聚集、抗炎、抗氧化等作用[9－11]，红花中羟基红花黄色素 A 具有抗血小板聚集、抗炎、镇痛及抑制软骨细胞凋亡的作用[12－16]，二者为主要指标性成分，总固体含量测定在中药提取物质量和制剂有效成分含量控制上具有重要意义，故选择丹参酮ⅡA、羟基红花黄色素 A 及总固体含量作为工艺优化的评价指标。

优化工艺中用 70% 乙醇提取，有利于有效成分的浸出，且乙醇无毒、价低易得，适合用于工业化大生产，在确保有效成分含量的同时大大提高了制剂效率、制剂质量和疗效。临床应用的大部分中药制剂以经验配制为主，多数尚未完善提取工艺和质量标准，对其成分缺乏科学监测，该类制剂提取工艺的考察能较好地解决这一问题，也为今后制剂配制的规范化与工业化生产提供了依据。

参考文献

[1] 王 洋，王苗苗，孙志岭，等. 中药熏洗治疗类风湿关节炎优选方案的实验研究[J]. 中华中医药学刊，2018，36(7)：1609－1612.

[2] 黄 炜，闫仲恺，张 鸽，等. 蠲痹方外用治疗类风湿性关节炎疗效及对患者生活质量影响观察[J]. 世界中医药，2016，11(11)：2308－2310.

[3] 郭锦晨，刘 健，忻 凌，等. 基于随机行走模型评价芙蓉膏外敷联合中药内服对活动期类风湿关节炎患者炎症指标的影响[J]. 中国免疫学杂志，2018，34(6)：854－860.

[4] 申江曼，方 珣，陈文莉，等. 芎附痛痹汤联合中药穴位敷贴及熏蒸治疗类风湿性关节炎临床疗效[J]. 中华中医药学刊，2018，36(8)：1943－1946.

[5] 朱跃兰，刘小平，王华新. 类风湿关节炎中医应对策略[J]. 现代中医临床，2014，21(1)：1－5.

[6] 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.

[7] 史红星，张华潭，张静宜，等. 多指标综合评价优选葶苈生脉方中丹参、红花提取工艺[J]. 中国现代中药，2015，17(12)：1317－1320.

[8] 蓝晓庆，陆兰娟，黄 敏，等. 基于层次分析法的正交试验优选跌打酒的渗漉提取工艺[J]. 中医药导报，2020，26(12)：32－35.

[9] 徐筱跃. 丹参酮ⅡA 对免疫性血管炎、血小板及凝血活性的影响[J]. 中国老年学杂志，2013，33(17)：4201－4203.

[10] TANG J，ZHOU SW，ZHOU FH，et al. Inhibitory effect of tanshinone ⅡA on inflammatory response in rheumatoid arthritis through regulating β－arrestin 2[J]. Exp Ther Med，2019，17(5)：3299－3306.

[11] 吴林芸，蔡周权，沈 驰. 丹参酮ⅡA 对超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 中国药业，2019，28(14)：17－18.

[12] 徐 露，董 志. 羟基红花黄色素 A 注射剂对家兔血小板聚集、超微结构及血浆 GMP－140 含量的影响[J]. 中药药理与临床，2012，28(4)：35－37.

[13] 刘金连，王海芳，马淑惠，等. 羟基红花黄色素 A 通过抑制动脉内皮细胞中 TNFR1/NF－κB 信号通路而发挥抗炎作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2015，31(7)：945－948.

[14] 杨 宇，史昌乾，佟 杰. 羟基红花黄色素 A 镇痛作用及机制初步研究[J]. 中南药学，2019，17(1)：53－56.

[15] 张 宇，郑为超，李 冬，等. 羟基红花黄素 A 调控退变软骨终板细胞周期的作用研究[J]. 中国药理学通报，2018，34(10)：1425－1429.

[16] 卜祥伟，张红红，张建萍，等. 类风湿关节炎的中医药研究进展[J]. 环球中医药，2019，12(2)：297－303.

（收稿日期：2020－12－26；修回日期：2021－06－22）