

正交试验法优选芪术颗粒提取工艺

陈贝贝^{1,2}, 仝燕², 马振山², 王琳², 王倩倩^{1,2},
洪晓华³, 王杨慧³, 刘建勋³, 莫舒^{2,4}, 王锦玉^{2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 北京 100091; 4. 天津中医药大学, 天津 300193)

〔摘要〕 目的: 优选芪术颗粒的提取工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 以黄芪甲苷、芍药苷提取量为综合评价指标, 通过正交试验考察加水量、煎煮时间和煎煮次数对芪术颗粒水提工艺的影响。以特女贞苷和盐酸小檗碱提取量的综合评分为指标, 通过正交试验考察溶剂用量、提取时间和提取次数对芪术颗粒醇提工艺的影响。采用 HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量, 流动相乙腈-水 (34:66)。采用 HPLC-DAD 测定芍药苷、特女贞苷和盐酸小檗碱的含量, 流动相分别为甲醇-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (30:70), 甲醇-水 (32:68) 和乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (50:50), 检测波长依次为 230, 224, 345 nm。结果: 最佳水提取工艺为加 12, 10 倍量水提取 2 次, 每次 2 h。最佳醇提工艺为加 6 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 2 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 适合推广于芪术颗粒的工业化生产。

〔关键词〕 芪术颗粒; 黄芪甲苷; 特女贞苷; 盐酸小檗碱; 芍药苷
〔中图分类号〕 R283.6; R284.1; R284.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903 (2015) 05-0046-04
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050046

Optimization of Extraction Process of Qizhu Granules by Orthogonal Test CHEN Bei-bei^{1,2}, TONG Yan², MA Zhen-shan², WANG Lin², WANG Qian-qian^{1,2}, HONG Xiao-hua³, WANG Yang-hui³, LIU Jian-xun³, MO Shu^{2,4}, WANG Jin-yu^{2*} (1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 4. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize extraction technology of Qizhu granules. **Method:** With contents of astragaloside and paeoniflorin as comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize water extracting technology. Taking composite score of extracting amounts of specnuezhenide and berberine hydrochloride as index, orthogonal test was adopted to optimize ethanol extraction process. The content of astragaloside was determined by HPLC-ELSD, mobile phase consisted of acetonitrile-water (34:66). HPLC-DAD was employed to determine contents of paeoniflorin, specnuezhenide and berberine hydrochloride with mobile phases of methanol-0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution (30:70), methanol-water (32:68), 0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (50:50) and detection wavelengths of 230, 224, 345 nm, respectively. **Result:** The best water extraction process was: extracted twice with 12, 10 times the amount of water for 2 h per time. Optimum ethanol extraction process was as following: extracted thrice with 6 times the amount of 60% ethanol for 2 h each time. **Conclusion:** These optimized technologies are stable, feasible and suitable for standardized production of Qizhu granules.

〔Key words〕 Qizhu granules; astragaloside; specnuezhenide; berberine hydrochloride; paeoniflorin

〔收稿日期〕 20141022(015)
〔基金项目〕 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09103201-040)
〔第一作者〕 陈贝贝, 在读硕士, 从事中药制剂分析研究, Tel:18810336905, E-mail:494452609@ qq.com
〔通讯作者〕 * 王锦玉, 副研究员, 从事中药制剂研究, Tel:010-84027721, E-mail:dgzwyj@126.com

芪术颗粒来源于临床经验方,由生黄芪、女贞子、赤芍、黄连等药味组成,具有健脾补肾、活血化瘀的功效,对糖尿病肾病早期伴有尿蛋白患者有很好的疗效,症见疲乏无力,脸发黄、颜面、下肢水肿、纳差、贫血。原方为汤剂,存在存放、使用和携带不便等问题。本实验根据方中药物有效成分的理化性质及药效筛选试验结果,确定采用乙醇回流法提取女贞子、黄连等药材中脂溶性成分,用水提取黄芪、赤芍等药材中水溶性成分^[1]。根据处方量及临床应用经验,将该复方研制成颗粒剂。方中君药为黄芪和女贞子,故选择黄芪甲苷和特女贞苷为评价指标,以臣药中主要活性成分为次要评价指标,通过正交试验优选芪术颗粒的提取工艺,为该制剂的临床推广提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BP211D 型 1/10 万和 BSA224S-CW 型 1/1 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。黄芪、女贞子等药材均购于河北神农中药饮片有限公司,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部相关项下要求;黄芪甲苷、芍药苷、盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111920-201203,110736-201035,110713-200911),特女贞苷对照品(成都普思生物科技有限公司,批号 PS09101901),甲醇为优级纯,乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的含量测定^[2-3]

2.1.1 色谱条件 月旭 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(34:66),检测器为蒸发光散射检测器,载气流速 2.7 mL·min⁻¹,漂移管温度 105 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。理论板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 4 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芪甲苷对照品适量,加甲醇溶解并制成 0.246 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取水煎液适量,通过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,长 25 cm),加水 200 mL 洗脱,弃去水洗液,加 20% 乙醇 200 mL 洗脱,弃去洗脱液,加 70% 乙醇 200 mL 洗脱,收集洗脱液,水浴浓缩至约 10 mL,转移至分液漏斗中,加水 10 mL 清洗残留的浓缩液并转移至分液漏斗中,用水饱和的正丁醇提取 4 次,每次 20

mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去氨试液,用正丁醇饱和水溶液洗 2 次,每次 20 mL,弃去水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.4 方法学考察 精密量取对照品溶液 5,10,15,20,25,30,35,40,50 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量对数为纵坐标,峰面积对数为横坐标,得回归方程 $Y = 1.58X + 23.43$ ($r = 0.999\ 8$),线性范围 1.23 ~ 12.3 μg。精密度试验测得黄芪甲苷峰面积值的 RSD 1.4%,表明仪器精密度良好。重复性试验测得黄芪甲苷含量的 RSD 1.5%,表明本方法重复性好。稳定性试验显示 24 h 内供试品溶液中黄芪甲苷含量的 RSD 2.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。精密吸取同一水提液 9 份,等分为 3 组,分别精密加入黄芪甲苷对照品 0.732,0.915,1.098 mg,计算平均回收率 99.55%,RSD 1.3%。

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 月旭 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(30:70),检测波长 230 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇溶解并制成 0.112 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取水煎液适量,用水稀释至一定浓度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.4 方法学考察 精密量取对照品溶液 2,4,6,8,10,15 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 1.4 \times 10^6 X - 78\ 961$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围 0.224 ~ 1.68 μg。精密度试验测得芍药苷峰面积值的 RSD 1.8%,表明仪器精密度良好。重复性试验测得芍药苷含量的 RSD 1.0%,表明本方法重复性良好。稳定性试验发现供试品溶液中芍药苷含量在 24 h 内的 RSD 0.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。精密吸取同一水提液 9 份,等分为 3 组,分别精密加入对照品 0.177 6,0.222 0,0.266 4 mg,计算平均回收率 99.36%,RSD 2.8%。

2.3 水提工艺优选 选择加水量、煎煮时间和煎煮次数为考察因素,每个因素设定 3 个水平,以黄芪甲

苷和芍药苷提取量的综合评分为评价指标^[4],权重系数分别为 0.7,0.3。按处方比例称取黄芪等药材共 9 份,每份 84 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验^[5],试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 A 、 C 对提取效果有显著影响,因素 B 则无显著性影响,确定最佳提取工艺 $A_3B_2C_2$ 。为了缩短生产周期、节约成本,考虑到初次煎煮药材吸水量大,最终确定水提工艺为分别加 12,10 倍量水煎煮 2 次,每次 2 h。根据正交设计结果进行验证试验,结果提取 3 次(每次 1 h)和提取 2 次(每次 2 h)结果相近,考虑实际生产情况,故确定最佳提取工艺为加 12,10 倍量水煎煮 2 次,每次 2 h。

表 1 芪术颗粒水提工艺正交试验分析
Table 1 Orthogonal test analysis of water extracting technology of Qizhu granules

No.	A 加水量 /倍	B 提取 时间 /h	C 提取数 /次	D (空白)	黄芪甲苷 /mg·g ⁻¹	芍药苷 /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	6	1	1	1	0.343	17.838	53.7
2	6	1.5	2	2	0.587	26.840	88.5
3	6	2	3	3	0.623	29.583	95.0
4	8	1	2	3	0.558	28.380	86.8
5	8	1.5	3	1	0.632	31.609	97.8
6	8	2	1	2	0.330	20.458	54.8
7	10	1	3	2	0.648	32.132	100.0
8	10	1.5	1	3	0.414	23.407	66.6
9	10	2	2	1	0.622	28.838	94.1

表 2 芪术颗粒水提工艺方差分析
Table 2 Variance analysis of water extracting technology of Qizhu granules

方差来源	SS	F	P
A	112.55	26.08	<0.05
B	27.05	6.27	>0.05
C	2 588.81	599.82	<0.05
D(误差)	4.32		

注: $F_{0.05}(2,2)=19$ 。(表 4 同)。

2.4 特女贞苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 月旭 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(32:68),检测波长 224 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。理论板数按特女贞苷峰计算应不低于4 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取特女贞苷对

照品适量,加甲醇溶解并制成 0.138 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密吸取醇提液适量,用 60% 乙醇稀释至一定浓度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4.4 方法学考察 精密量取对照品溶液 2,4,6,8,10,15 μL,按 2.4.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 1.2 \times 10^6 X - 87\,837$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.276 ~ 2.07 μg。精密度试验测得特女贞苷峰面积值的 RSD 0.6%,表明仪器精密度良好。重复性试验测得特女贞苷含量的 RSD 0.9%,表明本方法重复性好。稳定性试验显示供试品溶液在 24 h 内特女贞苷含量的 RSD 1.4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。精密吸取同一醇提液 9 份,等分为 3 组,分别精密加入特女贞苷对照品 0.358 4,0.448 0,0.537 6 mg,计算平均加样回收率 98.37%,RSD 1.1%。

2.5 盐酸小檗碱的含量测定

2.5.1 色谱条件 月旭 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(50:50)(每 100 mL 中加十二烷基硫酸钠 0.4 g,用磷酸调节 pH 4.0),检测波长 345 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。理论板数按盐酸小檗碱峰计算应不低于 5 000。

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇溶解并制成 0.070 8 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 精密吸取醇提液适量,用 60% 乙醇稀释至一定浓度,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.5.4 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 2,4,6,8,10,15,20,30 μL,按 2.5.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 3.9 \times 10^6 X - 51\,251$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.141 6 ~ 2.124 μg。

2.6 醇提工艺优选 单因素试验确定乙醇体积分数为 60% 的提取效果最佳。选择溶剂用量、提取时间和提取次数为考察因素,每个因素设定 3 个水平,以特女贞苷和盐酸小檗碱提取量的综合评分为评价指标,权重系数分别为 0.7,0.3。按处方比例称取女贞子等药材共 9 份,每份 26 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。由直观分析可知,各因素影响醇提工艺的秩序为 $G > F > E$ 。方差分析表明因素 F 和 G 有显著性

表 3 芪术颗粒醇提工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of ethanol extracting technology of Qizhu granules

No.	<i>E</i> 溶剂用 量/倍	<i>F</i> 提取 时间 /h	<i>G</i> 提取数 /次	<i>H</i> (空白)	盐酸 小檗碱 /mg·g ⁻¹	特女 贞苷 /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	4	1	1	1	33.936	0.631	29.590
2	4	2	2	2	49.526	2.211	66.775
3	4	3	3	3	53.864	3.828	98.651
4	6	1	2	3	49.861	1.885	60.992
5	6	2	3	1	55.721	2.942	83.437
6	6	3	1	2	43.757	1.929	58.549
7	8	1	3	2	56.400	2.575	77.087
8	8	2	1	3	46.614	1.590	53.870
9	8	3	2	1	52.732	3.822	97.939

表 4 芪术颗粒醇提工艺方差分析

Table 4 Variance analysis of ethanol extracting technology of Qizhu granules

方差来源	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>E</i>	209.221	9.279	>0.05
<i>F</i>	1 287.081	57.082	<0.05
<i>G</i>	2 428.137	107.687	<0.05
<i>H</i> (误差)	22.55		

影响,因素 *E* 则无显著性影响。设计溶剂用量为 6 倍,提取时间分别为 2,3 h,提取数 2,3 次。结果提取时间 2 h 和 3 h 时,盐酸小檗碱和特女贞苷的含量相差不大,故确定最佳提取工艺为加 6 倍量 60% 乙

醇回流提取 3 次,每次 2 h。

3 讨论

特女贞苷与芍药苷峰按 2010 年版《中国药典》相关项下条件进行测定,均受到其他成分的干扰,色谱峰拖尾变形,分离效果不佳,通过调整流动相比例,最终将特女贞苷和芍药苷的流动相分别调整为甲醇-水(32:68)和甲醇-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(30:70),分离度得到明显改善。本方设计的工艺方案均进行药效筛选试验,综合药效结果,采用正交试验对方中 4 个指标性成分进行考察,结合大生产实际情况,确定了最佳水提取和乙醇提取工艺,该工艺稳定、简便、合理、可行,可为芪术颗粒的临床研究和工业生产提供实验依据。

[参考文献]

[1] 吴立明. 正交试验法考察黄芪的提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(11):39-40.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283-284.
[3] 李建芳,黄劲通. 参芪益气安神合剂中黄芪甲苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):102-104.
[4] 苑玉凤. 多指标正交试验分析[J]. 湖北汽车工业学院学报,2005,19(4):53-56.
[5] 胡建军,周冀衡,柴家荣,等. 多指标正交试验数据的优化分析及应用[J]. 中国烟草学报,2008,14(2):9-14.

[责任编辑 刘德文]