

多指标全概率评分法优选参芪益气胶囊醇提工艺

牛晓静¹, 张文鑫¹, 段晓颖^{1*}, 刘晓龙²

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:** 优选参芪益气胶囊的醇提工艺。**方法:** 以人参总皂苷、马钱苷含量和浸膏得率为指标, 利用正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间及提取次数对醇提工艺的影响, 通过全概率评分法确定最佳醇提工艺。采用 HPLC 测定人参总皂苷及马钱苷含量, 流动相分别为乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min, 18.5% A; 30~47 min, 29% A; 47~57 min, 29%~40% A; 57~65 min, 40%~18.5% A), 乙腈-水(8:92), 检测波长依次为 203, 240 nm。**结果:** 参芪益气胶囊最佳醇提工艺为加6倍量80%乙醇提取2次, 每次2 h; 人参总皂苷和马钱苷提取量分别为 167.28, 319.51 mg, 浸膏得率 22.54%。**结论:** 采用多指标全概率评分法优选的提取工艺科学、合理, 为改善该制剂的临床疗效提供参考。

[关键词] 多指标全概率评分法; 参芪益气胶囊; 马钱苷; 人参皂苷类成分; 浸膏得率

[中图分类号] R283.6; R944.5; R289.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0026-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180026

Optimization of Extraction Process of Shenqi Yiqi Capsules by Multi-index Test Breakdown Formula Evaluation

NIU Xiao-jing¹, ZHANG Wen-xin¹, DUAN Xiao-ying^{1*}, LIU Xiao-long²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450000, China; 2. Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol extraction process of Shenqi Yiqi capsules. **Method:** With dry extract yield, contents of total ginsenosides and loganin as indexes, orthogonal design was carried out for optimizing extraction process by taking the concentration and amount of ethanol, extracting time and times as factors, optimum process was determined by multi-index test breakdown formula evaluation. Contents of total ginsenosides and loganin were determined by HPLC, mobile phase were consisted of acetonitrile (A) -water (B) in gradient elution (0-30 min, 18.5% A; 30-47 min, 29% A; 47-57 min, 29% -40% A; 57-65 min, 40% -18.5% A) and acetonitrile-water (8: 92), detection wavelength were set at 203, 240 nm, respectively. **Result:** Optimal alcohol extraction technology was as following: extracted twice with 6 times the amount of 80% ethanol for 2.0 h per time; extracting amounts of total ginsenosides and loganin were 167.28 mg and 319.51 mg, dry extract yield was 22.54%. **Conclusion:** This optimized extraction process is reasonable and scientific, which can provide a reference for improving clinical efficacy of Shenqi Yiqi capsules.

[Key words] multi-index test breakdown formula evaluation; Shenqi Yiqi capsules; loganin; total ginsenosides; dry extract yield

参芪益气胶囊为河南中医学院第一附属医院临床常用验方, 由人参、黄芪、山茱萸、太子参、蜜款冬

[收稿日期] 20140117(002)

[第一作者] 牛晓静, 硕士, 药师, 从事中药新药开发及其质量控制研究, Tel: 0371-66633639, E-mail: niuxiaojing314@163.com

[通讯作者] * 段晓颖, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新技术与新剂型研究, E-mail: dxy137@sina.com

花、紫苏子等 12 味中药组成,具有补肺益气、化痰、活血的功效,是中医治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期肺肾气虚证的有效药物,可减轻炎症反应和黏液分泌、解除气道阻塞、提高免疫功能,从而降低对肺组织的损伤,延缓肺功能的下降。方中人参为君药,主要活性成分为人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 等皂苷类成分;山茱萸为臣药,主要活性成分为马钱苷,这些活性成分均具有一定的脂溶性。故本实验选择乙醇为提取溶剂,以人参皂苷 Rg_1 , 人参皂苷 Re , 人参皂苷 Rb_1 , 马钱苷含量和浸膏得率为综合评价指标,通过正交试验优选参芪益气胶囊的醇提工艺,为该制剂的临床推广提供参考。

1 材料

e2695 型高效液相色谱仪(2998 型紫外检测器, Empower 色谱工作站,美国沃特世公司), AEL-200 型电子分析天平(日本岛津公司), CP225D 型电子天平(德国赛多利斯集团)。

人参、山茱萸、紫苏子等饮片均购自河南中医药大学第一附属医院中药房,经本院陈天朝主任药师鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部相关项下规定;马钱苷、人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 对照品(批号分别为 110703-201027, 110754-200822, 110704-200921, 111640-201005, 中国食品药品检定研究院), 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 正交试验设计 人参、山茱萸、紫苏子中有效成分包括皂苷类、环烯醚萜苷、糖类、有机酸类等,其中皂苷类、环烯醚萜苷类成分为脂溶性,采用醇提工艺路线,而糖类成分可采用水提煎煮;醇提后过滤,合并滤液,药渣与其余药味合并,采用水煎煮提取。从主要成分性质分析,人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 及马钱苷脂溶性较好,根据 4 种成分的性质,选择乙醇为提取溶媒。以人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 及马钱苷含量、浸膏得率为评价指标,选择乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间及提取次数为考察因素,运用全概率评分法^[1] 优选醇提工艺。按处方配比称取处方药材 9 份,每份共计 156 g,通过乙醇加热回流提取,分别收集提取液,平行操作 2 次,因素水平见表 1。

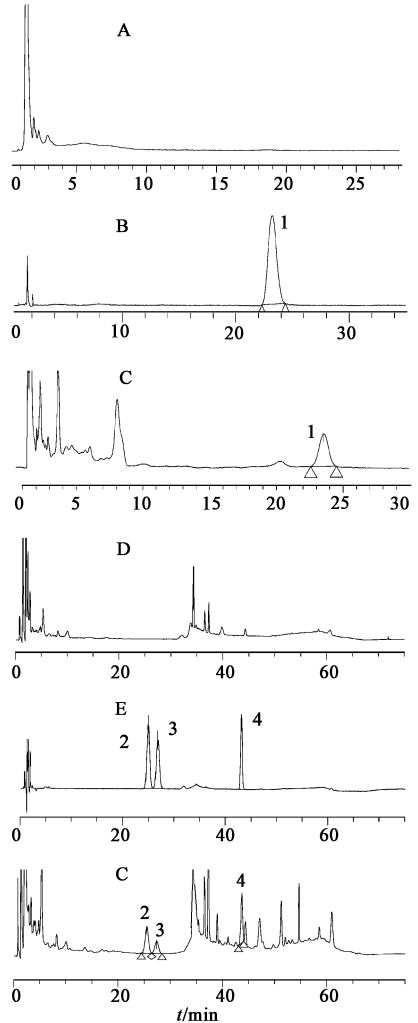
2.2 指标成分的含量测定

2.2.1 人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 色谱条件^[2] Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 18.5% A; 30 ~ 47 min, 29% A; 47 ~ 57 min, 29% ~ 40% A; 57 ~ 65 min, 40% ~ 18.5% A), 柱温

表 1 参芪益气胶囊醇提工艺正交试验因素水平

| 水平 | A 乙醇体积分数/% | B 加醇量 /倍 | C 提取时间 /h | D 提取次数 /次 |
|----|------------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 60 | 5 | 1.0 | 1 |
| 2 | 70 | 6 | 1.5 | 2 |
| 3 | 80 | 7 | 2.0 | 3 |

30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 203 nm, 见图 1。



A. 缺山茱萸阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; D. 缺人参阴性样品; E. 混合对照品

1. 马钱苷; 2. 人参皂苷 Rg_1 ; 3. 人参皂苷 Re ; 4. 人参皂苷 Rb_1

图 1 参芪益气胶囊醇提液 HPLC

2.2.2 马钱苷色谱条件^[2] Agilent-ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(8:92), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 240 nm, 见图 1。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 对照品适量, 置 25 mL 量瓶中, 加甲

醇溶解并定容, 摇匀, 得 0.191 04, 0.198 5, 0.195 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。精密称取马钱苷对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 摇匀, 得 52 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 25 mL, 水浴蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 加乙醚萃取 2 次, 每次 20 mL, 弃去乙醚层, 水层用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇提取液, 用氨试液充分洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去氨液, 正丁醇液用正丁醇饱和的水充分洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加适量甲醇溶解并洗涤蒸发皿, 溶液和洗涤液一并转入 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 得人参皂苷类成分的供试品溶液^[2]。精密量取提取液 20 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 摇匀, 得马钱苷供试品溶液。

2.2.5 阴性对照溶液配制 按处方比例分别称取除人参、山茱萸以外的其余药味, 按提取工艺分别制成缺人参、山茱萸的阴性样品溶液, 按 2.2.4 项下方法分别制成缺人参、山茱萸的阴性对照溶液。

2.2.6 线性关系 精密吸取各对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μL , 分别按 2.2.1 和 2.2.2 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 及马钱苷的回归方程分别为 $Y = 421\ 602X + 6\ 210$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 339\ 663X + 8\ 075.9$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 280\ 891X + 8\ 224.7$ ($r =$

$0.999\ 9$), $Y = 2 \times 10^6 X - 38\ 800$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围分别为 0.382 1 ~ 3.821, 0.397 ~ 3.97, 0.391 2 ~ 3.912, 0.104 4 ~ 1.04 μg 。

2.3 浸膏得率的测定 取提取液适量, 测定总体积, 按《中国药典》2010 年版附录“浸膏得率”项下方法测定。

2.4 数据处理 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 按 2.2 项下方法测定人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 及马钱苷含量, 试验数据用多指标全概率评分法处理^[3]。设定 b_i 为第 i 号试验, a_j 为第 j 个指标, $i = 1, 2, 3, \dots, n$, $j = 1, 2, 3, \dots, k$, 但 $a_1, a_2, a_3, \dots, a_n$ 互不相容, 又设定各指标的重要程度之比为 $a_1 : a_2 : a_3 : \dots : a_r = M_1 : M_2 : \dots : M_r$, 设定 $N = M_1 + M_2 + \dots + M_r$, 则 $P(a_j) = M_j/N$, $j = 1, 2, 3, \dots, k$; 以 X_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值, 以 S_j 表示第 j 个指标下各次 (n 次) 试验结果的和, $S_j = \sum_{i=1}^n x_{ij}$, $i = 1, 2, 3, \dots, n$, $j = 1, 2, 3, \dots, k$, 得 $P(b_i/a_1) = X_{ij}/S_j$, 故全概率公式为 $P(b_i)_{j=1}^k = \sum P(a_j)P(b_i/a_j)$, $i = 1, 2, 3, \dots, n$ 。本文选择的 4 个指标中, 按重要性不同, 确定人参总皂苷-马钱苷-浸膏得率 = $a_1 : a_2 : a_3 = 5 : 4 : 1$, $N = 5 + 4 + 1 = 10$, 故综合分值按 $P(b_i) = 0.5P(b_i/a_1) + 0.4P(b_i/a_2) + 0.1P(b_i/a_3)$ 计算, $i = 1, 2, 3, \dots, 9$, 数据处理见表 2, 3, 方差分析见表 4。

表 2 参芪益气胶囊醇提工艺正交试验的含量测定

| No. | 人参总皂苷 1/mg | 概率 | 人参总皂苷 2/mg | 概率 | 马钱苷 1 /mg | 概率 | 马钱苷 2 /mg | 概率 | 浸膏得率 1 /% | 概率 | 浸膏得率 2 /% | 概率 |
|-----|------------|-------|------------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| 1 | 87.67 | 0.067 | 67.70 | 0.052 | 232.87 | 0.085 | 236.49 | 0.085 | 15.70 | 0.087 | 15.85 | 0.087 |
| 2 | 146.63 | 0.113 | 144.74 | 0.112 | 307.90 | 0.113 | 294.49 | 0.106 | 24.40 | 0.135 | 21.29 | 0.117 |
| 3 | 162.95 | 0.125 | 149.49 | 0.116 | 321.60 | 0.118 | 333.93 | 0.120 | 19.52 | 0.108 | 24.11 | 0.132 |
| 4 | 157.82 | 0.121 | 143.76 | 0.111 | 334.28 | 0.122 | 350.20 | 0.126 | 25.59 | 0.141 | 23.91 | 0.131 |
| 5 | 118.43 | 0.091 | 136.53 | 0.106 | 278.21 | 0.102 | 277.31 | 0.100 | 16.20 | 0.089 | 16.59 | 0.091 |
| 6 | 151.26 | 0.116 | 168.56 | 0.131 | 337.44 | 0.123 | 334.70 | 0.121 | 20.56 | 0.113 | 21.40 | 0.117 |
| 7 | 160.19 | 0.123 | 178.64 | 0.138 | 320.88 | 0.117 | 334.43 | 0.121 | 19.74 | 0.109 | 20.29 | 0.111 |
| 8 | 181.95 | 0.14 | 176.33 | 0.137 | 317.45 | 0.116 | 319.02 | 0.115 | 23.07 | 0.127 | 22.11 | 0.121 |
| 9 | 134.46 | 0.103 | 124.97 | 0.097 | 285.38 | 0.104 | 291.58 | 0.105 | 16.47 | 0.091 | 17.07 | 0.093 |

由表 3 直观分析可知, 各因素作用主次顺序依次为 $D > A > B > C$ 。方差分析表明 A, D 两因素具有极显著性差异, B, C 两因素具有显著性差异, 基于生产成本的考虑, 选择最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_3$, 即加 6 倍量 80% 乙醇煎煮提取 3 次, 每次 2 h。

2.5 验证试验 取处方量药材共 3 份, 按最佳提取工艺进行验证试验, 结果见表 5。表明该工艺稳定可行; 同时试验发现煎煮 2 次和 3 次区别不大, 考虑到工业生产中能耗成本, 故确定最佳醇提工艺为 $A_3B_2C_3D_2$, 即加 6 倍量 80% 乙醇煎煮提取 2 次, 每次 2 h。

表3 参芪益气胶囊醇提工艺正交试验安排及直观分析

| No. | A | B | C | D | $P(b_1)$ | $P(b_2)$ | 综合评分 |
|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|---------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.076 4 | 0.069 0 | 0.145 4 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.114 8 | 0.110 2 | 0.225 0 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 0.120 4 | 0.119 3 | 0.239 7 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0.123 6 | 0.119 3 | 0.242 9 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 0.095 1 | 0.102 0 | 0.197 1 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 0.118 8 | 0.125 3 | 0.244 1 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 0.119 4 | 0.128 6 | 0.247 9 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 0.129 0 | 0.126 4 | 0.255 5 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 0.102 5 | 0.099 8 | 0.202 3 |
| K_1 | 6.101 | 6.363 | 6.450 | 5.448 | | | |
| K_2 | 6.841 | 6.776 | 6.703 | 7.171 | | | |
| K_3 | 7.057 | 6.861 | 6.847 | 7.381 | | | |
| R | 1.338 | 1.335 | 1.334 | 1.356 | | | |

表4 综合评分方差分析

| 方差来源 | SS | f | MS | F | P |
|-------|-----------------------|---|-----------------------|------|-------|
| A | 8.37×10^{-4} | 2 | 4.19×10^{-4} | 26.6 | <0.01 |
| B | 2.37×10^{-4} | 2 | 1.18×10^{-4} | 7.52 | <0.05 |
| C | 1.35×10^{-4} | 2 | 6.73×10^{-5} | 4.27 | <0.05 |
| D | 3.75×10^{-3} | 2 | 1.87×10^{-3} | 119 | <0.01 |
| E(误差) | 1.42×10^{-4} | 9 | 1.58×10^{-5} | | |

注: $F_{0.05}(2,9) = 4.2, F_{0.01}(2,9) = 8.02$ 。

表5 参芪益气胶囊醇提工艺验证试验

| No. | 人参总皂苷/mg | | 马钱苷/mg | | 浸膏得率/% | |
|-------|----------|------|--------|-------|--------|------|
| | 前2次 | 第3次 | 前2次 | 第3次 | 前2次 | 第3次 |
| 1 | 171.89 | 4.77 | 319.86 | 13.11 | 22.02 | 2.52 |
| 2 | 162.70 | 4.45 | 327.10 | 13.46 | 22.15 | 2.53 |
| 3 | 167.25 | 4.65 | 311.56 | 13.33 | 23.44 | 2.45 |
| RSD/% | 2.80 | 3.50 | 2.40 | 1.30 | 3.50 | 1.74 |

3 讨论

中药提取是生产过程中的关键环节^[4]。本文的工艺路线设计充分考虑到处方中各药味的主要成分,同时兼顾脂溶性成分和水溶性成分,选用醇提工艺对处方中人参、山茱萸等脂溶性成分进行提取;考虑到人参中糖类成分具有免疫调节作用,可控制慢性气道炎症,减轻慢性阻塞性肺病,故醇提完再水提,使其水溶性有效成分得到有效保留,充分发挥药效作用。根据人参、山茱萸中已知有效成分的性质,选择乙醇作为提取溶剂,采用多指标成分全概率评分法,通过主客观赋权相结合,进行综合评分,所得结果既反映了中药复方的配伍信息,又反映了实际样本数据的信息,使得综合评价结果更合理和客观。在醇提工艺考察时测定了紫苏子中迷迭香酸的含

量,但发现阴性对照有干扰,故未将迷迭香酸作为评价指标之一。

[参考文献]

- [1] 杨福炎,李伟,陈兴.多指标试验全概率评分法对羌活、当归混合挥发油包合工艺的研究[J].中国现代药物应用,2009,3(7):25.
- [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,2010:8,26.
- [3] 魏毅,罗杰英.用多指标试验全概率评分法研究茶多酚颗粒制备工艺[J].中国中药杂志,1999,24(5):279.
- [4] 李军红,刘淑芝,金日显.中药提取新技术研究概述[J].中国中医药信息杂志,2008,15(1):93.

[责任编辑 刘德文]