

正交试验法优选温阳活血颗粒的提取工艺

马明悦¹, 张明雪², 田原², 于艳², 周旭¹, 翟延君^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 优选温阳活血颗粒的提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定芍药苷含量, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (14:86), 检测波长 230 nm; 利用 HPLC-ELSD 测定人参皂苷 R_{g1}, Re, Rb₁ 含量, 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~35 min, 19% A; 35~55 min, 19%~29% A; 55~70 min, 29% A; 70~100 min, 29%~40% A)。以干膏率和有效成分(人参皂苷 R_{g1}, Re, Rb₁ 和芍药苷)总含量的综合评分为评价指标, 通过正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对温阳活血颗粒提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量水回流提取 3 次, 每次 1.5 h; 干膏率依次为 39.65%, 人参皂苷 R_{g1}, Re, Rb₁ 和芍药苷提取量分别为 3.49, 2.79, 6.64, 218.60 mg。结论: 优选的提取工艺科学合理、简便可行, 适用于温阳活血颗粒的工业化生产。

[关键词] 温阳活血颗粒; 人参皂苷 R_{g1}; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 芍药苷

[中图分类号] R283.6; R289.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200027

Optimization of Extraction Technology for Wenyang Huoxue Granules by Orthogonal Test

MA Ming-yue¹, ZHANG Ming-xue², TIAN Yuan², YU Yan², ZHOU Xu¹, ZHAI Yan-jun^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Wenyang Huoxue granules. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of paeoniflorin with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (14:86) and detection wavelength at 230 nm; HPLC-ELSD was employed to determine the content of ginsenoside R_{g1}, Re, Rb₁ with mobile phase of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-35 min,

[收稿日期] 20140304(018)

[基金项目] 沈阳市科技计划项目(F12-155-9-00)

[第一作者] 马明悦, 在读硕士, 从事中药质量评价研究, Tel:13704025341, E-mail:mmy0623@126.com

[通讯作者] * 翟延君, 博士, 教授, 从事中药质量评价研究, Tel:13019499386, E-mail:lnzyzyj@sohu.com

[6] Yan G L, Sun H, Sun W J, et al. Rapid and global detection and characterization of aconitum alkaloids in Yin Chen Si Ni Tang, a traditional Chinese medical formula, by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and automated data analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(3):421.

[7] 卢君蓉, 王世宇, 傅超美, 等. 香附醋制工艺的优化研究[J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(1):70.

[8] 王世宇, 卢君蓉, 陈秋薇, 等. 香附炮制的历史沿革及现代研究进展[J]. 中药与临床, 2012, 2(6):62.

[9] 侯立静, 吴丽丽, 李英霞. 不同产地香附和醋炙香附中 α -香附酮含量测定[J]. 陕西中医, 2011, 32(4):480.

[10] 李英霞, 陆永辉, 冯文, 等. HPLC 测定不同产地香附和醋炙香附中木犀草素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):56.

[11] 李英霞, 侯立静. HPLC 测定不同产地香附中阿魏酸[J]. 中成药, 2013, 35(11):2548.

[12] 陈胜璜, 蒋孟良, 袁干军, 等. 香附不同炮制品中 α -香附酮的含量测定[J]. 中成药, 1999, 21(7):349.

[责任编辑 刘德文]

19% A; 35-55 min, 19% -29% A; 55-70 min, 29% A; 70-100 min, 29% -40% A)。With yield of dry extract and total contents of paeoniflorin, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ as comprehensive evaluation index, orthogonal design was taken for investigating effects of the amount of water, extraction times and time on extraction technology. **Result:** Optimal extraction conditions were as followings: reflux extracted thrice with 8 times the amount of water for 1.5 hours each time; yield of dry extract was 39.64%, contents of ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁ and paeoniflorin were 3.49, 2.79, 6.64, 218.60 mg. **Conclusion:** This optimized technology is reasonable, simple and suitable for industrial production of Wenyang Huoxue granules.

[**Key words**] Wenyang Huoxue granules; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; paeoniflorin

温阳活血颗粒为辽宁中医药大学附属医院临床常用方,由红参、赤芍、桂枝、薤白等 5 味药材组成,具有温阳益心、活血通脉的功效。临床用于治疗阳虚血瘀的冠心病心绞痛,该方原为汤剂,患者服用及携带不方便,故拟将其研制成颗粒剂。根据处方中各药味中有效成分的理化性质,本实验以人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁, 芍药苷总含量和干膏率为综合评价指标,采用 L₉(3⁴) 正交试验考察加水量、提取时间及提取次数对温阳活血颗粒提取工艺的影响,为该复方的临床用药安全性提供技术保证。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AE-240 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。红参、赤芍、桂枝、薤白等药材均购自河北安国,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求;人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110703-200726, 110754-201123, 110704-200420, 110736-201136),乙腈、甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯。

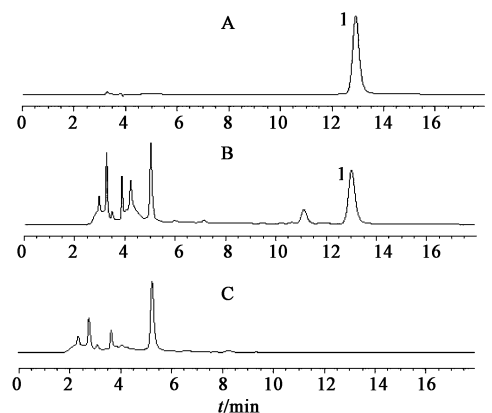
2 方法与结果

2.1 干膏率的测定 按处方比例称取红参 6 g, 赤芍 12 g, 桂枝 6 g, 薤白 9 g, 按一定条件进行加热回流提取,滤过,浓缩,加水定容至 250 mL 量瓶中,精密量取 100 mL 置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,70 °C 干燥至恒重,称定质量,计算干膏率。

2.2 芍药苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 下同),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86),检测波长 230 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 5 μL,见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成 0.348 g·L⁻¹ 的溶液,即得。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 芍药苷

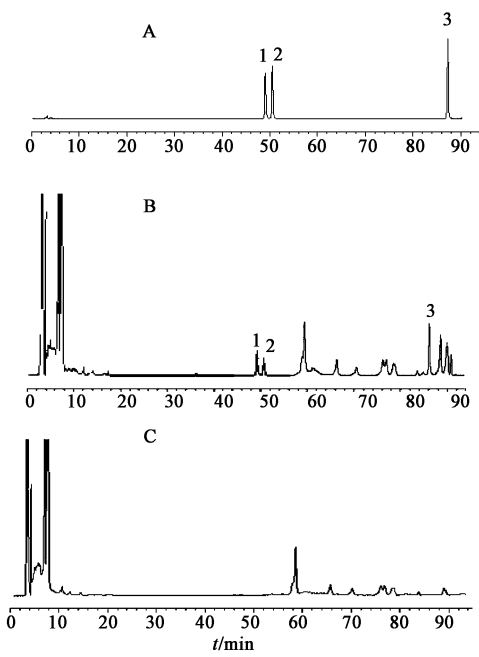
图 1 温阳活血颗粒提取液中芍药苷 HPLC

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 5 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 方法学考察 精密量取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按 2.2.1 项下方法进样,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 1117.6X + 155.13$ ($r = 0.9997$),线性范围 0.348 ~ 3.48 μg。精密度试验计算芍药苷峰面积值的 RSD 1.67%,表明仪器精密度良好;稳定性试验 8 h 内芍药苷峰面积值的 RSD 1.05%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性较好;重复性试验测得芍药苷含量的 RSD 1.16%,表明本方法重复性较好;吸取提取液 6 份,各加入对照品 4.35 mg,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,计算平均回收率 98.15%,RSD 2.07%。

2.3 人参皂苷的含量测定^[1]

2.3.1 色谱条件 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 35 min, 19% A; 35 ~ 55 min, 19% ~ 29% A; 55 ~ 70 min, 29% A; 70 ~ 100 min, 29% ~ 40% A),蒸发光散射检测器,漂移管温度 60 °C,雾化气体为高纯氮气,氮气压力 3.0 MPa,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL,见图 2。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;

1. 人参皂苷 R_{g1};2. 人参皂苷 Re;3. 人参皂苷 R_{b1}

图2 温阳活血颗粒提取液中人参皂苷 HPLC

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.450,0.454,0.650 g·L⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 取提取液适量,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,精密吸取上清液 50 mL 置分液漏斗中,加水饱和正丁醇振摇提取 4 次(50,50,30,20 mL),合并正丁醇液,用氨试液洗涤 3 次(50,

50,30 mL),弃去氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得。

2.3.4 方法学考察 精密量取对照品溶液 1,2,4,6,8,10 μL,按 2.3.1 项下方法进样,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 回归方程分别为 $Y = 1.2479X + 5.4679$ ($r = 0.9997$), $Y = 1.3123X + 5.6634$ ($r = 0.9996$), $Y = 1.4618X + 5.9056$ ($r = 0.9998$),线性范围依次为 0.45 ~ 4.5,0.454 ~ 4.54,0.65 ~ 6.5 μg。精密度试验计算人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 峰面积值的 RSD 分别为 1.55%,1.47%,1.62%,表明仪器精密度良好;稳定性试验表明 8 h 内 3 种成分峰面积值的 RSD 分别为 1.53%,1.45%,1.56%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性较好;重复性试验测得 3 种成分含量的 RSD 分别为 1.23%,1.35%,1.41%,表明本方法重复性较好;精密吸取提取液 6 份,每份 50 mL,各加入人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 对照品 0.72,0.58,1.34 mg,按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,计算平均回收率分别为 98.23%,97.36%,97.58%,RSD 分别为 2.21%,2.17%,2.09%。

2.4 正交试验 选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,以干膏率和有效成分(人参皂苷 R_{g1}, Re, R_{b1} 和芍药苷)总提取量的综合评分为指标,权重系数分别为 0.4,0.6。按处方比例称取红参、赤芍、桂枝和薤白,共 9 份,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表1 温阳活血颗粒水提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D(空白)	干膏率 /%	芍药苷 /mg	人参皂苷 R _{g1} /mg	人参皂苷 Re/mg	人参皂苷 R _{b1} /mg	总提取量 /mg	综合评分 /%
1	6	1.0	1	1	18.46	132.50	2.30	2.10	3.75	140.65	53.40
2	6	1.5	2	2	32.93	202.50	3.38	2.70	6.35	214.93	86.28
3	6	2.0	3	3	40.36	162.50	3.13	2.60	6.05	174.28	83.50
4	8	1.0	2	3	31.32	215	2.63	2.35	4.70	224.68	87.12
5	8	1.5	3	1	39.69	217.50	3.60	2.90	6.70	230.70	96.92
6	8	2.0	1	2	26.02	190	2.45	2.18	4.30	198.93	75.44
7	10	1.0	3	2	36.41	227.50	3.33	2.80	6.78	240.40	96.09
8	10	1.5	1	3	26.47	190	2.65	2.38	4.10	199.13	75.93
9	10	2.0	2	1	38.66	212.50	2.95	2.65	4.85	222.95	93.96
K ₁	74.39	78.87	68.26	81.43							
K ₂	86.49	86.38	89.12	85.94							
K ₃	88.66	84.30	92.17	82.18							
R	14.27	7.51	23.91	4.51							

表2 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	354.64	177.32	10.13	>0.05
B	90.15	45.07	2.58	>0.05
C	1016.43	508.21	29.04	<0.05
D(误差)	35.00	17.50		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B$,以 $A_3B_2C_3$ 组合方案为佳。方差分析表明因素 C 具有显著性影响,其他因素则均无显著性差异,结合实际生产和经济角度考虑,确定最佳提取工艺为 $A_2B_2C_3$,即加 8 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h。

2.5 验证试验 按处方比例称取红参、赤芍、桂枝、薤白,共 3 份,按最佳提取工艺进行验证试验,结果干膏率依次为 39.62%,39.74%,39.58%,人参皂苷 Rg_1 提取量分别为 3.48,3.41,3.57 mg,人参皂苷 Re 提取量分别为 2.72,2.76,2.88 mg,人参皂苷 Rb_1 提取量分别为 6.55,6.65,6.73 mg,芍药苷提取量分别为 214.93,221.21,219.65 mg,有效成分总含量分别为 227.68,234.03,232.83 mg,表明该提取工艺稳定可行。

3 讨论

温阳活血颗粒源于张明雪教授经验方,临床常用水煎剂,疗效较好,为了与原工艺相符,故选择水为提取溶媒。中药复方由多种药味组成,干膏率与有效成分浸出量不一定成正比关系^[2],以单一成分作为评价指标存在局限性,故本文选用干膏率和芍

药苷、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 总含量为综合评价指标进行考察,根据各指标对提取工艺影响程度的不同分配适当的权重系数^[3],既保证了数据指标的全面性,又使关键影响因素给予了相应侧重,使分析结果更客观准确。

预试验参照《中国药典》2010 年版一部“人参”项下方法^[1],运用 HPLC-UV 测定人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 含量,检测波长 203 nm,但由于受紫外末端吸收和梯度洗脱的影响,造成基线漂移,而且该复方中杂质对色谱峰的干扰亦较大。ELSD 检测器可检测挥发性低于流动相的任何样品,响应值不受样品的光学性质影响^[4-5],不存在紫外末端吸收的问题,即使梯度洗脱,基线也比较平稳,故本文采用 HPLC-ELSD 测定红参中皂苷类成分含量。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 陶菊春,吴建民. 综合加权评分法的综合权重确定新探[J]. 系统工程理论与实践,2001,21(8):43.
- [3] 修丽丽,于艳,于世杰,等. 正交试验法优选祛瘀清胰颗粒的乙醇提取工艺[J]. 中药材,2012,35(10):1686.
- [4] 赵宇新,李曼玲. 蒸发光散射检测器在中药成分分析中的应用[J]. 中国中药杂志,2003,28(10):913.
- [5] 徐鹏,冯素香,赵迪,等. HPLC-ELSD 法测定血塞通注射液三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、Re、 Rb_1 、Rd[J]. 中成药,2013,35(3):521.

[责任编辑 刘德文]

欢迎投稿

欢迎订阅