

## 正交试验优选复方肠泰颗粒提取工艺

石慧慧<sup>1,2</sup>, 李萍<sup>1,2</sup>, 戴运好<sup>2</sup>, 鞠建明<sup>1,2\*</sup>, 王璐璐<sup>1</sup>, 霍介格<sup>1</sup>

(1. 江苏省中医药研究院, 南京 210028; 2. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230031)

**[摘要]** 目的: 优选复方肠泰颗粒的提取工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 以浸出物、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 及常春藤皂苷元得率为综合评价指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验考察加水量、提取时间和煎煮次数对提取效果的影响。采用 HPLC 测定人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和常春藤皂苷元含量, 流动相分别为流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min, 10%~30% A; 5~20 min, 30%~45% A; 20~22 min, 45%~10% A) 和乙腈-0.1% 甲酸水溶液(70:30)。结果: 最佳提取工艺为分别加 10, 8, 8 倍量水提取 3 次, 每次 1 h。人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 和常春藤皂苷元质量分数分别为 2.48, 10.50 mg·g<sup>-1</sup>, 浸出物得率 16.72%。结论: 优选的提取工艺重复性好、稳定可行, 适用于复方肠泰颗粒的工业化生产。

**[关键词]** 复方肠泰颗粒; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 常春藤皂苷元; 浸膏得率

**[中图分类号]** R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0023-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040023

## Optimization of Extraction Process of Compound Changtai Granules by Orthogonal Design

SHI Hui-hui<sup>1,2</sup>, LI Ping<sup>1,2</sup>, DAI Yun-hao<sup>2</sup>, JU Jian-ming<sup>1,2\*</sup>, WANG Lu-lu<sup>1</sup>, HUO Jie-ge<sup>1</sup> (1. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of compound Changtai granules for industrial production of this preparation. **Method:** Orthogonal test was employed to investigate influences of the amount of water, extracting time and decoction times on extraction process by taking contents of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, hederagenin and extract as comprehensive evaluation indexes. Contents of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and hederagenin were determined by HPLC, mobile phases were consisted of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-5 min, 10%-30% A; 5-20 min, 30%-45% A; 20-22 min, 45%-10% A) and acetonitrile-0.1% aqueous formic acid (70:30). **Result:** Optimum extraction technology was: refluxing extracted 3 times with 10, 8, 8 times the amount of water with 1 h per time. Under these conditions, contents of ginsenoside Rb<sub>1</sub> and hederagenin were 2.48, 10.50 mg·g<sup>-1</sup>, respectively; yield of extract was 16.72%. **Conclusion:** This optimized extraction technology is feasible, stable and suitable for industrial production of compound Changtai granules.

**[Key words]** compound Changtai granules; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; hederagenin; yield of extract

肿瘤的预防、治疗及预后是肿瘤研究领域的热点和难点, 目前西医西药治疗毒副作用大, 病人难以接受。中医药治疗具有标本兼治的优势, 且病人受的痛苦较少<sup>[1-2]</sup>。复方肠泰是江苏省中西医结合医院肿瘤科根据中医辨证施治、扶正固本、活血解毒的治疗原则组方, 由人参、预知子、藤梨根等 7 味中药组成, 具有健脾益气、清热解毒、消积散结之功效, 主

要用于治疗 and 预防大肠癌及其术后转移和复发。该方临床疗效较好<sup>[3]</sup>, 联合 folfox 4(5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸和奥沙利铂) 方案治疗大肠癌能有效改善中医证候, 提高患者体力状况、生活质量及免疫状态, 还可降低白细胞减少发生率, 起到减毒增效作用。现代药理学研究表明复方肠泰可在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期及 G<sub>2</sub>/M 期阻滞人结肠癌细胞 SW480 的增殖, 使 S

**[收稿日期]** 20140430(007)

**[基金项目]** 江苏省中医药研究院医院制剂开发专项(Y1201)

**[第一作者]** 石慧慧, 在读硕士, 从事中药制剂工艺及药材质量控制研究, Tel:025-85639640, E-mail:jingmeng2006321@126.com

**[通讯作者]** \* 鞠建明, 博士, 研究员, 从事中药新剂型、新工艺及质量控制研究, Tel:025-85639640, E-mail:jjm405@sina.com

期细胞比率降低,在  $3.51 \sim 7.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  呈现明显的量效关系,证明了该方的有效性<sup>[4]</sup>。为了让该方造福更多患者,拟将其研发成工艺可行、质量可控、服用方便的医院制剂。由于该方来源于传统水煎煮提取法,故选择水为提取溶剂,以保证该制剂的安全性、有效性及药效物质基础的完整性,根据《医疗机构制剂注册管理办法》规定,可免做药效、毒理和临床研究,节约了开发成本。为了确保复方肠泰颗粒提取工艺的合理性,本实验以浸出物、常春藤皂苷元及人参皂苷  $\text{Rb}_1$  含量为综合评价指标,采用正交试验优选提取工艺条件,为该制剂的临床应用与推广提供参考。

### 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), AT201 型 1/10 万和 MT5 型 1/100 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。常春藤皂苷元、人参皂苷  $\text{Rb}_1$  对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111733-201205, 110714-200911), 甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。人参、预知子等药材均由江苏省中西医结合医院药材科提供,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定。

### 2 方法与结果

#### 2.1 常春藤皂苷元的含量测定

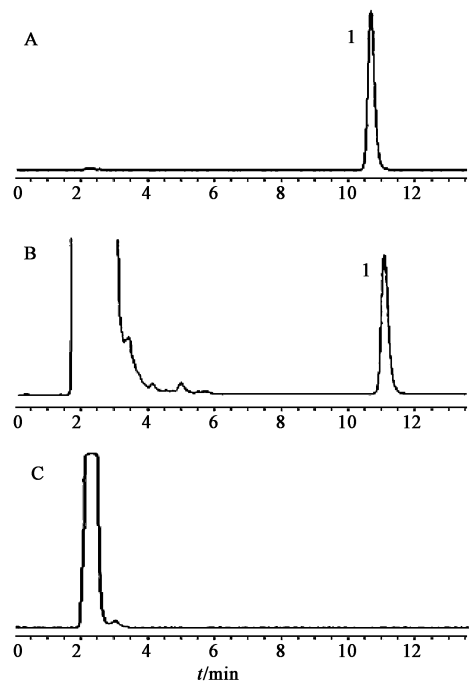
**2.1.1 色谱条件** Alltima  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液(70:30), 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。蒸发光散射检测器的漂移管温度  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 载气流速  $2.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 见图 1。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取常春藤皂苷元对照品适量,加甲醇溶解并制成  $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  避光储藏,备用。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密量取水提浓缩液 10 mL,浓缩至干,精密加入水解液[20% 盐酸-甲醇溶液(1:4)] 25 mL, 密塞,称定质量,沸水浴回流 1 h,冷却后补足损失的质量,经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.1.4 线性关系考察** 精密量取常春藤皂苷元对照品溶液 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{L}$ , 按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量的常用对数为横坐标,峰面积的常用对数为纵坐标,得回归方程  $Y = 1.57X + 6.14$  ( $r = 0.9993$ ), 线性范围  $0.40 \sim 6.4 \mu\text{g}$ 。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取常春藤皂苷元对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 常春藤皂苷元

图 1 复方肠泰颗粒水提液中常春藤皂苷元 HPLC

Fig. 1 HPLC of hederagenin in water extract of compound Changtai granules

次, 计算常春藤皂苷元峰面积的 RSD 1.1%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 按 2.1.1 项下色谱条件进样 10  $\mu\text{L}$ , 计算常春藤皂苷元峰面积的 RSD 1.7%, 表明供试品溶液室温放置 8 h 内稳定性良好。

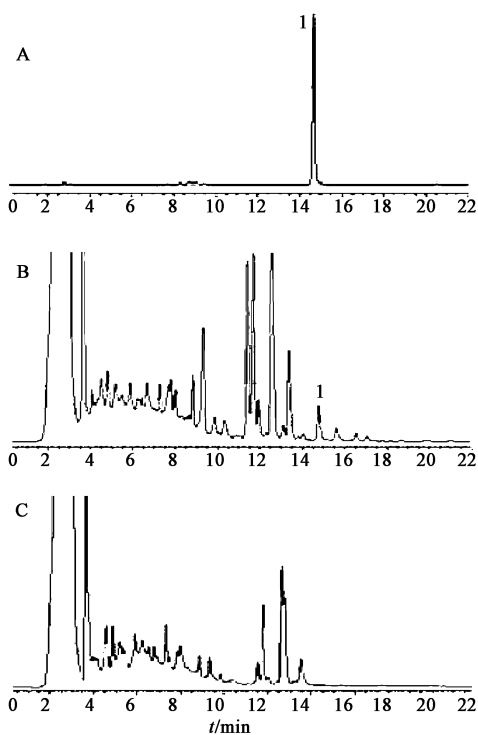
**2.1.7 重复性试验** 取同一复方肠泰颗粒水提液, 按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算常春藤皂苷元含量的 RSD 1.3%, 表明该方法重复性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 取已知常春藤皂苷元含量的 6 份水提浓缩液, 各精密加入常春藤皂苷元对照品适量, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 结果常春藤皂苷元的平均回收率 102.4%, RSD 3.0%, 表明该方法准确可靠。

#### 2.2 人参皂苷 $\text{Rb}_1$ 的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Thermo  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min, 10%~30% A; 5~20 min, 30%~45% A; 20~22 min, 45%~10% A), 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。蒸发光散射检测器的漂移管温度  $115 \text{ }^\circ\text{C}$ , 载气流速  $3.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 见图 2。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

图2 复方肠泰颗粒水提液中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> HPLC

Fig. 2 HPLC of ginsenoside Rb<sub>1</sub> in water extract of compound Changtai granules

Rb<sub>1</sub> 对照品适量,加甲醇溶解,制成 0.23 g·L<sup>-1</sup>对照品溶液,于 4 ℃ 避光储藏,备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取水提浓缩液 25 mL,置圆底烧瓶,减压浓缩至干,精密加入 80% 甲醇 10 mL,密塞,称定质量,超声使溶解,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.2.4 线性关系考察** 取人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品溶液 6, 8, 12, 16, 20 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量的常用对数为横坐标,峰面积的常用对数为纵坐标,得回归方程  $Y = 1.72X + 5.64$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 1.38 ~ 4.60 μg。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 峰面积的 RSD 1.7%,表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液室温放置,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 按 2.2.1 项下色谱条件进样 10 μL,计算人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 峰面积的 RSD 2.6%,表明供试品溶液室温放置 8 h 内稳定。

**2.2.7 重复性试验** 取同一水提液,按 2.2.3 项下

方法制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 含量的 RSD 2.2%,表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 取已知人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 含量的 6 份浓缩液,各精密加入人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品适量,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的平均加样回收率 100.2%,RSD 1.2%。

**2.3 浸出物的测定** 精密量取各浓缩液 20 mL,置于已干燥至恒重的蒸发皿中,沸水浴蒸干,于 105 ℃ 烘箱中干燥 3 h,取出置于干燥器内冷却 30 min,立即精密称定质量,计算浸出物得率。

**2.4 正交试验** 影响水提取工艺的因素主要有加水量、提取时间、提取次数、浸泡时间等。预试验研究表明本处方药材浸泡 2 h 基本浸透,故在提取前将药材浸透,再考察其他因素对提取效果的影响。参考文献[5-6]并结合实际生产过程中节能增效的要求确定了各因素的水平。在遵循传统水提工艺的基础上,以常春藤皂苷元、浸出物及人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.35, 0.2, 0.45,各数值取值越大越好。选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,每个因素选取 3 个水平,按处方比例称取药材 9 份,每份 96 g,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验优选提取工艺,合并提取液并浓缩至 500 mL,备用。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,影响复方肠康颗粒提取效果的因素重要性依次为 C > B > A,最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>。方差分析表明 C 因素具有显著性差异,因素 A, B 则差异不显著,结合工业生产的合理性考虑,确定最佳提取工艺 A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即加 10, 8, 8 倍量水提取 3 次,每次 1 h。

**2.5 验证试验** 称取处方量同一批次药材共 3 份,每份 96 g,按优选的提取工艺进行验证试验,结果人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 质量分数平均值 2.48 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 2.3%;常春藤皂苷元质量分数平均值 10.50 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 1.2%;浸出物得率平均值 16.72%,RSD 2.7%。结果所得数值均比正交试验最高值略高,说明优选的提取工艺稳定可行。

### 3 讨论

复方肠泰颗粒处方中人参为君药,亦属贵重药材,故选择人参中活性成分为评价指标。人参中含有多种人参皂苷类成分,其中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 含量较高<sup>[7]</sup>,现代药理研究表明人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 具有抗肿瘤、调节人体生理机能、调节机体免疫力等功效<sup>[8-9]</sup>,故选

表 1 复方肠泰颗粒水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of water extraction process of compound Changtai granules

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D(空白)	人参皂苷 Rb <sub>1</sub> /mg·g <sup>-1</sup>	常春藤皂苷元 /mg·g <sup>-1</sup>	浸出物 /%	综合评分 /分
1	8	0.5	1	1	0.61	1.16	7.01	25.69
2	8	1.0	2	2	1.77	4.32	12.71	69.01
3	8	1.5	3	3	1.83	9.13	16.50	93.38
4	10	0.5	2	3	1.22	4.62	11.52	57.25
5	10	1.0	3	1	2.15	8.25	16.45	96.66
6	10	1.5	1	2	1.25	2.24	10.19	47.01
7	12	0.5	3	2	1.70	3.62	13.26	65.53
8	12	1.0	1	3	0.91	2.04	9.86	38.73
9	12	1.5	2	1	1.66	7.32	15.80	82.05

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	42.46	21.23	0.47	>0.05
B	991.88	495.94	11.03	>0.05
C	3 599.67	1 799.84	40.02	<0.05
D(误差)	89.95	44.98	1.00	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

择人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 为指标之一。预知子是处方中另一重要药味,主要成分包括  $\alpha$ -常春藤皂苷、常春藤皂苷 A-D 等 14 种以常春藤皂苷元为母核的化合物<sup>[10]</sup>,这些皂苷类化合物具有较强的抗肿瘤活性<sup>[11]</sup>,因此将其水解,以常春藤皂苷元含量代表提取的总皂苷量,并选择其作为正交试验的另一评价指标。同时全方的浸出物作为指标能全面反映整个处方的提取效果。根据这 3 个指标的重要性,在对其进行综合评分时,确定人参皂苷 Rb<sub>1</sub>,常春藤皂苷元及浸出物得率的权重系数分别为 0.45,0.35,0.2。

由于提取液中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 浓度较低,在制备供试液时需要将提取液进行适当浓缩。预试验将水提浓缩液 25 mL 直接蒸干,加甲醇溶解并定容至 10 mL,结果发现由于提取物中含有较多的多糖类等水溶性成分,甲醇对其溶解性不好,提取物对检测成分容易包裹,且量瓶里有较多沉淀物,影响了供试液体积的准确性。后改为 2.2.3 项下方法制备,提取物能较好地分散在 80% 甲醇中,这样既克服了提取物对检测成分的包裹,也能准确地定量供试液的体积。

[参考文献]

[1] 贾守薇,刘韬,黄红兵. 分子靶向抗肿瘤药物的不良

反应及其处理对策[J]. 肿瘤药学,2014,4(1):2-9.

[2] 曲慧,曲颖,刘丽娟. 恶性肿瘤化疗患者消化系统不良反应的饮食护理[J]. 中国肿瘤临床与康复,2014,21(5):623-625.

[3] 李灵常,方明治,王小宁,等. 复方肠泰联合 FOLFOX4 方案治疗大肠癌的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志,2010,15(10):919-921.

[4] 张舒,沈明勤,王小宁,等. 复方肠泰抑制人结肠癌 SW480 细胞增殖的实验研究[J]. 中成药,2010,32(3):374-378.

[5] 李圆圆,宋英,方芳,等. 正交设计优选益心通脉合剂提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(4):32-34.

[6] 姜雷,郭玉岩,李永吉,等. 多指标综合评分法优选青防痛瘀散提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):26-28.

[7] 李向高. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的药理作用研究[J]. 吉林农业大学学报,2004,26(6):649-652.

[8] 杨秋娅,李晓宇,刘皋林. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志,2013,48(15):1233-1237.

[9] 杨艳平. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 药理作用的研究概述[J]. 中国药师,2010,13(2):280-281.

[10] 孟月华,黄何松,余黄鹏,等. 液质联用技术鉴定预知子提取物中的主要化学成分[J]. 中草药,2013,44(12):1562-1567.

[11] Jin Z L, Gao N, Zhou D, et al. The extracts of Fructus Akebiae, a preparation containing 90% of the active ingredient hederagenin; serotonin, norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor [J]. Pharmacol Biochem Behav,2012,100(3):431-439.

[责任编辑 刘德文]