

正交试验法优选补肾祛瘀颗粒的提取工艺

陈佳丽, 楼婷婷, 田文慧, 袁强*
(浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 优选补肾祛瘀颗粒的提取工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 采用UV测定总多糖和总黄酮含量, 检测波长分别为489, 510 nm; 采用HPLC测定二苯乙烯苷含量, 流动相乙腈-水(22:78), 检测波长320 nm。以总多糖得率为指标, 通过正交试验考察料液比、提取时间、提取次数、醇沉浓度对水提工艺的影响; 以总黄酮、二苯乙烯苷提取量和浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验考察提取时间、提取次数、乙醇用量及体积分数对醇提工艺的影响。结果: 最佳水提工艺为加12倍量水浸泡1 h, 回流提取3次, 每次1.5 h, 醇沉浓度80%; 总多糖得率8.682%。最佳醇提工艺为加10倍量80%乙醇回流3次, 每次1.5 h; 总黄酮和二苯乙烯苷提取量分别为660.19 mg·g⁻¹和145.91 μg·g⁻¹, 浸膏得率11.81%。结论: 优选的提取工艺合理可行, 为补肾祛瘀方的临床推广与应用提供实验依据。

[关键词] 补肾祛瘀颗粒; 总多糖; 总黄酮; 二苯乙烯苷

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0020-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130020

Optimization of Extracting Technology for Bushen Quyu Granules by Orthogonal Test CHEN Jia-li, LOU Ting-ting, TIAN Wen-hui, YUAN Qiang* (College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Bushen Quyu granules. **Method:** UV was adopted to determine contents of total polysaccharides and total flavonoids with detection wavelength at 489 nm and 510 nm. HPLC was used to determine the content of stilbene glycoside with mobile phase of acetonitrile-water (22:78) and detection wavelength at 320 nm. Taking total polysaccharides yield as index, orthogonal test was adopted to investigate effects of solid-liquid ratio, extraction time and times, alcohol precipitation concentration on water extraction process; taking comprehensive score of yields of total flavonoids, stilbene glycoside and extract as index, effects of ethanol concentration, ethanol amount, extraction time and times on alcohol extraction process were optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum water extraction process was as follows: soaked 1 h and refluxing extracted thrice with 12 times the amount of water for 1.5 h each time, alcohol precipitation concentration of 80%; yield of total polysaccharides reached 8.682%. Optimum ethanol extraction process was: refluxing extracted thrice with 10 times the amount of 80% ethanol for 1.5 h each time; yields of total flavonoids, stilbene glycoside and extract reached 660.19 mg·g⁻¹, 145.91 μg·g⁻¹, 11.81%, respectively. **Conclusion:** These optimized extraction processes are repeatable and feasible to provide basis for industry production of Bushen Quyu granules.

[Key words] Bushen Quyu granules; total polysaccharides; total flavonoids; stilbene glycoside

中医对免疫球蛋白A (immunoglobulin A, IgA) 肾病患者进行辨证论治时, 分为6类证候, 其中气阴两虚证所占比例最大^[1]。根据这个特点, 本实验选

取浙江省中医院临床运用30多年的经验方补肾祛瘀汤为研究对象, 该方由金樱子、菟丝子、芡实、制何首乌、紫草、三七共6味药材组成, 具有活血化瘀、清

[收稿日期] 20141015(021)

[基金项目] 浙江省中药现代化专项(浙经信医化[2010]421号)

[第一作者] 陈佳丽, 在读硕士, 从事中药质量评价及新药开发研究, Tel:15158059661, E-mail: tayin1991@126.com

[通讯作者] *袁强, 博士, 教授, 从事中药质量评价及新药开发研究, Tel:0571-86633188, E-mail: yuanqiang0825@sina.com

热凉血止血、益肾固摄等功效。现代临床研究发现该方能有效控制稳定期 IgA 肾病的发展,对伴有血尿、轻度蛋白尿患者的疗效确切,与现有的治疗药物——糖皮质激素、细胞毒素等相比,具有提高疗效、减轻毒副作用、改善不良预后等优势。方中金樱子、菟丝子、芡实的药效成分为多糖类,故这 3 味药进行水提^[2-4];紫草、制何首乌的药效成分为黄酮类和二苯乙烯苷类,故采用醇提^[5-6]。本实验以总多糖、总黄酮、二苯乙烯苷含量及浸膏得率为指标,采用正交试验法优选补肾祛瘀汤的提取工艺,为该方的临床应用与推广提供参考。

1 材料

1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), AB135 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), TD5102 型电子分析天平(余姚市金诺天平仪器有限公司)。金樱子、菟丝子、芡实等药材均购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学药学院宋捷民教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关规定;D-无水葡萄糖、芦丁、二苯乙烯苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110833-200503, 100080-200707, 110844-201109), 乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总多糖的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的 D-无水葡萄糖 25 mg,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 按处方比例[金樱子-菟丝子-芡实(3:3:2)]称取半倍处方量药材,共 40 g,加一定量水浸泡后回流提取,合并滤液并浓缩至 1 g·mL⁻¹,加入乙醇,冰箱放置 24 h 后抽滤,沉淀烘干粉碎,得粗多糖。精密称取粗多糖 20 mg,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释到刻度,精密量取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 检测波长的选择 采用苯酚-浓硫酸比色法测定^[7]。精密量取对照品溶液适量,以水为空白对照,在 400~600 nm 扫描,结果在 489 nm 处有最大吸收峰。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取系列葡萄糖对照品溶液,在 489 nm 处测定,以吸光度 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 15.529C - 0.197 (r = 0.9991)$,线性范围 0.02~0.07 g·L⁻¹。

2.2 水提工艺优选 以总多糖得率为指标,选择料

液比、提取时间、提取次数、醇沉浓度为考察因素,每个因素取 3 个水平,按处方比例称取半倍处方量的金樱子、菟丝子、芡实,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。由直观分析可知,各因素对水提工艺的影响顺序为 C>B>A>D。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 C 具有显著性差异,其他因素则均无显著性影响,结合文献及生产成本等综合考虑,选择最佳水提工艺为 A₃B₂C₃D₂,即加 12 倍量水浸泡 1 h,回流 3 次,每次 1.5 h,醇沉至乙醇体积分数 80%。称取处方量药材,按最佳工艺条件提取 3 份,结果总多糖得率分别为 8.657%, 8.603%, 8.785%,表明该工艺重复性良好。

表 1 补肾祛瘀颗粒剂水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of water extraction process of Bushen Quyu granules

No.	A 料液比	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D 醇沉浓度 /%	总多糖得率 /%
1	1:8	1.0	1	70	3.35
2	1:8	1.5	2	80	5.95
3	1:8	2.0	3	90	6.69
4	1:10	1.0	2	90	6.64
5	1:10	1.5	3	70	4.13
6	1:10	2.0	1	80	6.12
7	1:12	1.0	3	80	5.76
8	1:12	1.5	1	90	8.01
9	1:12	2.0	2	70	4.53

表 2 总多糖得率方差分析

Table 2 Variance analysis of total polysaccharides yield

方差来源	SS	F	P
A	0.75	5.90	>0.05
B	0.98	7.74	>0.05
C	13.36	105.20	<0.01
D(误差)	0.13	1.00	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ (表 4 同)。

2.3 总黄酮的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 20 mg 至 100 mL 量瓶中,加 75% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取总多糖提取后的药渣,挥干溶剂,按处方比例[紫草-制何首乌(1:1)]称取半倍处方量药材 20 g,加一定量乙醇浸泡,提取后合并滤液,浓缩至 1 g·mL⁻¹,取浓缩液 0.5 mL 至

25 mL 量瓶中,加 75% 乙醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 检测波长的选择 采用紫外-分光光度法^[8]测定。精密吸取对照品溶液适量,以水为空白对照,在 400 ~ 600 nm 扫描,结果在 510 nm 处有最大吸收峰。

2.3.4 标准曲线的制备 精密吸取系列芦丁对照品溶液适量,于 510 nm 处测定吸光度 A ,以 A 为纵坐标,质量浓度 (C) 为横坐标,得回归方程 $A = 12.129C - 0.0226 (r = 0.9994)$,线性范围 0.008 ~ 0.048 $g \cdot L^{-1}$ 。

2.4 二苯乙烯苷的含量测定^[9]

2.4.1 色谱条件 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水 (22:78),柱温 30 $^{\circ}C$,检测波长 320 nm,流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$,进样量 10 μL 。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密取醇提浓缩液 0.5 mL 至 25 mL 量瓶中,加 50% 乙醇定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4.3 线性关系考察 精密称取二苯乙烯苷对照品 3.36 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 50% 乙醇定容至刻度,混匀,精密吸取该对照品溶液适量,配成质量浓度为 1.313, 2.625, 5.250, 10.50, 84.00, 168.0, 336.0 $mg \cdot L^{-1}$ 的系列对照品溶液。按 2.4.1 项下色

谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 27590X - 47667 (r = 0.9999)$,线性范围 0.013 13 ~ 3.360 μg 。

2.5 醇提工艺优选 精密吸取醇提液 25 mL 置于已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 $^{\circ}C$ 烘干 3 h,置于干燥气中冷却 30 min,迅速精密称重,计算浸膏得率。以总黄酮、二苯乙烯苷提取量及浸膏得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.7, 0.2, 0.1。选择料液比、提取时间、溶剂浓度、提取次数为考察因素。取总多糖提取后的药渣,挥干溶剂后按处方比例加入半倍处方量紫草、制何首乌,每份 20 g,共 9 份,每个因素取 3 个水平,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,各因素对醇提工艺的影响主次为 $D > A > C > B$ 。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析,结果表明 D 因素具有显著性差异,其他因素则均无显著性差异,确定最佳提取工艺为 $A_1B_1C_3D_3$,加 10 倍量 80% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。取总多糖提取后药渣,加入处方量紫草和制何首乌,按最佳醇提工艺进行 3 次验证试验,结果总黄酮提取量分别为 671.11, 660.19, 649.26 $mg \cdot g^{-1}$,二苯乙烯苷提取量分别为 147.63, 143.70, 146.39 $\mu g \cdot g^{-1}$,浸膏得率分别为 11.44%, 11.99%, 11.99%,表明该工艺稳定可行。

表 3 补肾祛瘀颗粒醇提工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of ethanol extraction process of Bushen Quyu granules

No.	A 乙醇用量 /倍	B 提取时间 /h	C 乙醇体积 分数/%	D 提取数 /次	总黄酮 / $mg \cdot g^{-1}$	二苯乙烯苷 / $\mu g \cdot g^{-1}$	浸膏得率 /%	综合评分 /分
1	10	1.5	70	1	490.06	92.94	8.66	65.58
2	10	2.0	75	2	517.37	128.66	10.75	73.65
3	10	2.5	80	3	643.00	134.35	13.77	89.11
4	12	1.5	75	3	682.04	164.54	13.23	95.86
5	12	2.0	80	1	446.36	114.93	8.33	63.28
6	12	2.5	70	2	638.49	149.38	12.10	89.05
7	14	1.5	80	2	643.08	185.27	10.56	92.22
8	14	2.0	70	3	694.78	187.52	12.61	99.15
9	14	2.5	75	1	470.40	88.05	12.58	65.92

3 讨论

补肾祛瘀汤的传统应用以汤剂为主,由于 IgA 肾病病程较长,患者服用中药汤剂存在携带不方便、依从性差、保质期短、剂量不精确等缺点。在保持本方原有疗效的基础上,本文结合现代化药物制剂技

术将汤剂研制成携带和服用方便、生物利用度高的颗粒剂,具有极大的工业化生产意义。文献报道对 IgA 肾病有治疗作用的有效成分为多糖类、黄酮类及苷类,为能充分提取药效成分并减少损失,本文采用多指标综合评价法优选工艺,与单一指标评价相

表4 综合评分方差分析

Table 4 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	146.08	2.83	>0.05
B(误差)	51.59	1.00	
C	56.08	1.01	>0.05
D	1 383.92	26.83	<0.05

比更具科学性^[10-12]。但各指标的影响程度不同,为保证指标的全面性,指标间做了相应的侧重并进行权重分配。此外,方中种子类药材含油量较多,给干燥带来了一定难度,故醇提液拟采用减压干燥法得浸膏,并以浸膏作为其中一项指标进行考察。

[参考文献]

[1] 聂莉芳,于大君,余仁欢,等. 308例IgA肾病中医证候分布多中心前瞻性研究[N]. 北京中医药大学学报,2005,28(4):66-68.

[2] 周日宝,陈胜璜,陈希平,等. 金樱子中多糖含量动态变化的研究[J]. 中药研究与信息,2005,7(9):16-18.

[3] 张培全,谭茵,张超. 菟丝子提取物清除自由基作用的研究[J]. 中南药学,2012,10(3):171-174.

[4] 赵翮,李红良,叶倩雯. 芡实多糖的粗提取及其对羟自由基的清除效果[J]. 食品与发酵工业,2010,36

(11):177-182.

[5] 赵雪梅,王桂玲,费洪荣. 紫草药效成分的提取及其抗炎作用的研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(4):36-38.

[6] 李淑辉,夏新华,彭买姣,等. 复方制首乌颗粒剂提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(9):30-31.

[7] 牛晓红,柏冬,宋剑南. 桂枝汤水提液中总多糖含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):66-68.

[8] 王曙,贾运涛,孙毅毅. 复方制剂水煎液中总黄酮含量测定方法[J]. 华西药学杂志,1996,11(2):95-96.

[9] 刘振丽,宋志前. 不同地区制何首乌中二苯乙烯苷含量测定及稳定性考察[J]. 中成药,2002,24(9):684-685.

[10] 冷斌. 白茅根多糖对IgA肾病大鼠免疫调节及肾纤维化的干预[D]. 桂林:桂林医学院,2013.

[11] 陈萍,万毅刚,王朝俊,等. 黄蜀葵花制剂治疗慢性肾脏病的机制和疗效[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2252-2256.

[12] 李彩蓉,蔡飞,黎荣,等. 二苯乙烯苷对糖尿病大鼠肾小球系膜细胞增殖及分泌炎症因子的影响[J]. 中药药理与临床,2010,26(2):13-15.

[责任编辑 刘德文]