

多指标综合评分法优选参芪复方颗粒 提取工艺及其热稳定性考察

单丽芳¹, 杨红梅¹, 曹蕾¹, 袁彩¹, 张林¹, 高天^{2*}, 宋英²

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的: 优选参芪复方颗粒的水提工艺条件, 并考察不同因素下提取液中皂苷类成分含量的变化。方法: 采用 HPLC-ELSD 测定人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷的含量, 流动相水-乙腈梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 气体流量 2.6 L·min⁻¹, 漂移管温度 102 ℃。以皂苷类含量及干膏得率的综合评分为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察料液比、提取时间、提取次数对参芪复方颗粒水提工艺的影响; 通过测定不同影响因素下参芪复方颗粒水提液及浓缩液中皂苷类含量的变化, 考察该制剂的热稳定性。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量水提取 3 次, 每次 40 min; 人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷提取量分别为 1.556, 2.155, 2.168, 0.718 mg·g⁻¹。参芪复方颗粒制剂工艺过程中受热温度和时间是影响其皂苷类成分含量变化的主要因素之一。结论: 参芪复方颗粒在制备工艺过程中应避免高温及长时间受热, 在浓缩中应采用减压浓缩法, 以降低人参皂苷类成分的降解。优选的水提工艺合理可行、重复性好, 适用于该制剂的工业化生产。

[关键词] 参芪复方颗粒; 热稳定性; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 黄芪甲苷; 干膏得率

[中图分类号] R283.6; R944.2; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)07-0024-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070024

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160215.1126.006.html>

[网络出版时间] 2016-02-15 11:26

Optimization of Extraction Process of Shenqi Compound Granules with Multi-index Comprehensive Evaluation Method and Investigation of Its Thermal Stability

SHAN Li-fang¹, YANG Hong-mei¹, CAO Lei¹, YUAN Cai¹, ZHANG Lin¹, GAO Tian^{2*}, SONG Ying²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] Objective: To optimize water extraction process of Shenqi compound granules and investigate effects of different factor on the content of saponins in water extract and concentrated solution. **Method:** HPLC-ELSD was employed to determine contents of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ and astragaloside IV at the same time. Based on single factor tests, taking solid-liquid ratio, extraction time and times as factors, orthogonal test was adopted to optimized extraction process with composite score of the content of saponins and yield of dry extract as index. Stability of Shenqi compound granules was investigated by determining the content of saponins in water extract and concentrated solution under different factor. **Result:** Optimum extraction process was as follows: extracted thrice with 10 times the amount of water, 40 min for each time. Extracting amounts of ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rb₁ and astragaloside IV were 1.556, 2.155, 2.168, 0.718 mg·g⁻¹. Heating temperature and time was main factors affecting content change of saponins in Shenqi compound granules. **Conclusion:** High temperature and long time heating should avoid in

[收稿日期] 20150814(002)

[基金项目] 四川省科技支撑项目(2014SZ0140)

[第一作者] 单丽芳, 在读硕士, 从事中药理论应用与新制剂研究, Tel:18380228289, E-mail:465352726@qq.com

[通讯作者] *高天, 教授, 硕士生导师, 从事中药理论与应用研究, Tel:028-87783735, E-mail:tutugt@163.com

preparation process of Shenqi compound granules, vacuum concentration method and vacuum drying method should be adopted to reduce degradation rate of ginsenosides. This optimized extraction process is feasible and suitable for industrial production of Shenqi compound granules.

[Key words] Shenqi compound granules; thermal stability; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; astragaloside IV; yield of dry extract

参芪复方为成都中医药大学谢春光教授的经验方,由人参、黄芪、地黄、天花粉、丹参、山茱萸、山药、制大黄 8 味药物组成,具有益气养阴、清热生津、活血化瘀的功效^[1],主要用于防治糖尿病血管病变等^[2-3]。为了充分利用处方中各药材的有效成分而更好地发挥该制剂的疗效,依据方中各药材主要活性成分的理化性质和药理作用,本实验选择水为提取溶媒,以人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷含量、干膏得率的综合评分为指标,采用正交试验优选参芪复方颗粒的提取工艺,为该制剂的研发提供实验依据。相关文献指出人参皂苷类成分在生产过程中受热不稳定^[4-5],参芪复方颗粒制备过程中经过了提取、浓缩、干燥等处理,发现人参皂苷类成分受工艺影响较大,为最大程度地保留提取液中有效成分,探讨不同影响因素对参芪复方颗粒提取液和浓缩液中人参皂苷类成分含量的影响,为解决该制剂在工业化生产中的稳定性问题提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国格雷斯科公司), BP-211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。人参、黄芪、地黄、天花粉、丹参、山茱萸、山药、制大黄 8 味药材均购自四川省新荷花中药饮片有限公司,经成都中医药大学附属医院药剂科副主任药师盛蓉鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部及地方标准的规定。人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110703-201128, 110754-201324, 110704-201424, 110781-201314),乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 皂苷类成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3 min, 81% A; 3~20 min, 81%~78% A; 20~28 min, 78%~77% A; 28~33 min, 77%~75% A; 33~40 min, 75%~65.7% A; 40~52 min, 65.7%~70% A; 52~62 min, 70% A),流速 0.8 mL·

min⁻¹,柱温 25 ℃,气体流量 2.6 L·min⁻¹,漂移管温度 102 ℃,进样量 10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷各 3 mg,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备^[6-8] 精密量取水提液 25 mL,加水定容至 50 mL,用水饱和正丁醇振摇提取 5 次,每次 60 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 3 次,每次 60 mL,弃去氨液,正丁醇液减压回收至干,残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 0.5, 1, 3, 5, 10 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1.1 项下条件测定,以进样量的对数值为横坐标,峰面积的对数值为纵坐标,得人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 和黄芪甲苷的回归方程依次为 $Y = 1.200X + 3.162$ ($r = 0.9998$), $Y = 1.070X + 3.297$ ($r = 0.9991$), $Y = 1.085X + 3.570$ ($r = 0.9999$), $Y = 1.491X + 3.150$ ($r = 0.9991$),线性范围分别为 0.150~2.998, 0.156~3.115, 0.145~2.895, 0.144~2.879 μg。

2.2 干膏得率测定 精密量取水提液 25 mL,分别置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 ℃干燥至恒重,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算干膏得率。

2.3 单因素试验考察^[9-12] 以料液比、提取时间、提取次数为考察因素。按 2 倍临床处方量称取各药材,以 4 种皂苷类成分含量及干膏得率的综合评分为评价指标。根据复方中君、臣、佐、使的关系划分人参皂苷类成分、黄芪甲苷的含量及干膏得率权重系数分别为 0.4, 0.4, 0.2, 人参皂苷类成分的含量以人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的总和计算。

2.3.1 煎煮时间 按处方比例称取药材,加 10 倍量水煎煮 1 次,煎煮时间分别为 20, 40, 60, 80, 100 min。结果综合评分依次为 43.80, 93.48, 96.60, 98.48, 99.92。表明随着煎煮时间的延长,综合评分升高,20~40 min 时增加较为明显,以后趋于平缓,为缩短工时且保证提取效果,宜控制间在 40~

80 min。

2.3.2 料液比 按处方比例称取药材,煎煮 1 次,时间 40 min,料液比依次为 1:4,1:6,1:8,1:10,1:12,1:16。结果综合评分依次为 57.32,96.55,97.93,99.15,99.95,99.19。表明随着加水量的增加,综合评分升高,1:10 以后逐渐趋于平缓,考虑到提取率及成本,选择溶剂用量以 6~10 倍为宜。

2.3.3 煎煮次数 按处方比例称取药材,加 10 倍量水煎煮 40 min,煎煮数依次为 1,2,3,4,5 次。计算综合评分依次为 64.52,88.27,99.90,99.83,99.30。表明煎煮 1~3 次时,综合评分呈上升趋势且变化较为明显,煎煮数 >3 次后无明显变化,为节

约成本且保证提取效果,宜控制提取数 ≤3 次。

2.4 正交试验设计 以提取次数、提取时间、加水量为考察因素,称取 4 倍处方量药材(1 个处方量共 39.5 g),共 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 和黄芪甲苷含量、干膏得率综合评分为指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对综合评分的影响顺序为 $A > B > C$,最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3$ 。方差分析表明因素 A 对水提效果有显著性影响,因素 B, C 则无显著性影响。在保证提取效果下,为缩短受热时间,综合考虑,最终确定最佳工艺组合为 $A_3B_1C_3$,即加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 40 min。

表 1 参芪复方颗粒提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction process of Shenqi compound granules

No.	A 提取数 /次	B 提取时间 /min	C 加水量 /倍	D(空白)	人参皂苷 Rg_1 /mg·g ⁻¹	人参皂苷 Re /mg·g ⁻¹	人参皂苷 Rb_1 /mg·g ⁻¹	黄芪甲苷 /mg·g ⁻¹	干膏得率 /%	综合 评分
1	1	40	6	1	1.064 1	1.471 9	1.483 1	0.492 8	20.00	61.41
2	1	60	8	2	1.245 1	1.722 3	1.735 4	0.576 7	43.98	80.85
3	1	80	10	3	1.347 2	1.863 4	1.877 6	0.623 9	43.83	85.84
4	2	40	8	3	1.331 6	1.841 9	1.855 9	0.616 7	40.33	83.54
5	2	60	10	1	1.616 0	2.235 2	2.252 2	0.748 4	45.17	99.73
6	2	80	6	2	1.289 7	1.783 9	1.797 5	0.597 3	44.17	83.13
7	3	40	10	2	1.368 1	1.892 4	1.906 8	0.633 6	44.20	87.03
8	3	60	6	3	1.477 4	2.043 5	2.059 0	0.684 2	45.02	92.80
9	3	80	8	1	1.552 1	2.146 8	2.163 2	0.718 8	45.79	96.84

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	436.63	218.32	20.57	<0.05
B	323.80	161.90	15.25	>0.05
C	215.79	107.89	10.17	>0.05
D(误差)	21.23	10.61	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.5 验证试验 称取 10 倍处方量的药材,共 3 份,按最佳工艺条件进行验证试验,结果人参皂苷 Rg_1 , Re, Rb_1 和黄芪甲苷提取量平均值分别为 1.556, 2.155, 2.168, 0.718 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1.5%, 1.2%, 1.4%, 1.9%, 干膏得率平均值 47.44%, RSD 1.4%。表明优选的工艺稳定、可行,重复性好。

2.6 水提液中皂苷类成分热稳定性考察

2.6.1 水提液受热处理考察 合并 3 次验证试验的水提液 6.2 L(分别含人参、黄芪药材 89,167 g),量取混合液 3.0 L,等分为 6 份,每 2 份为 1 组,共 3

组,分别置于 60,80,100 ℃ 恒温水浴锅中回流,在不同时间点(0,0.5,1,2,3,4,5,6 h)精密量取 50 mL(约含人参 0.72 g,黄芪 1.35 g),按 2.1 项下条件测定,见图 1。结果 3 种人参皂苷类成分在加热 6 h 内发生了不同程度的降解反应,随着加热时间延长,含量呈下降趋势,且温度越高变化越明显。人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 属三醇类,在加热的前 3 h 内降解速率较快,3 h 后趋于平缓;二醇类人参皂苷 Rb_1 ,当加热时间在 2~3 h 时降解速率加快,3~6 h 降解较为缓慢;黄芪甲苷在加热 6 h 内,含量无显著影响,热稳定性较好。提示参芪复方颗粒水提液在浓缩过程中应避免高温且应缩短受热时间(<3 h)。

2.6.2 减压浓缩对皂苷类成分含量的影响

2.6.1 项下混合液 3.0 L(分别约含人参、黄芪药材 43,81 g),分别按生药质量浓度 0.20,0.25,0.33,0.50,1.00 g·mL⁻¹ 进行减压浓缩(真空度 0.08 MPa,温度 60 ℃),得不同浓缩液,按 2.1 项下条件测定,见表 3。结果显示减压浓缩后皂苷类成分含

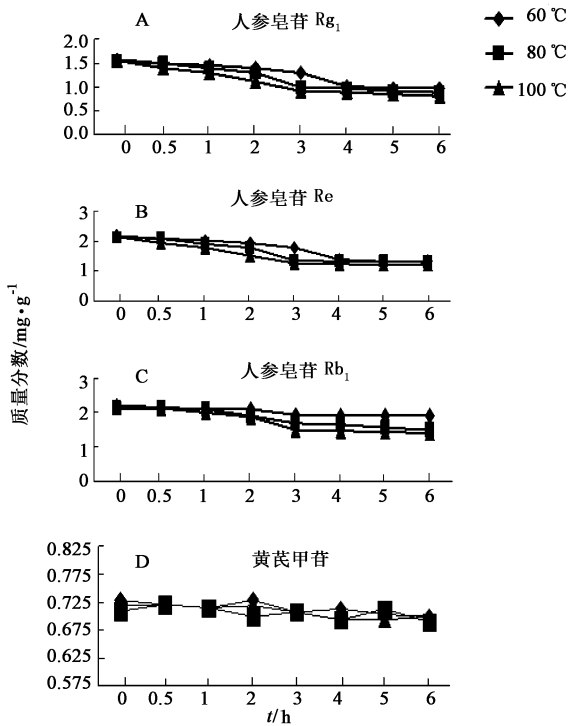


图 1 水浴温度对参芪复方颗粒中皂苷类成分含量的影响
Fig. 1 Effects of different heating time on saponins content in Shenqi compound granules under constant temperature

量变化不大,表明受热温度是影响皂苷类含量变化的因素之一,因此在浓缩工艺中宜采用减压浓缩法,以避免人参皂苷类成分受热后的大幅度降解。

表 3 不同浓缩状态下参芪复方颗粒中皂苷类成分含量的变化
Table 3 Content change of saponins in Shenqi compound granules under different concentrated state

生药质量浓度 /g·mL ⁻¹	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	黄芪甲苷 mg·g ⁻¹
0.20	1.553 4	2.169 9	2.165 0	0.727 9
0.25	1.531 1	2.117 8	2.133 9	0.726 1
0.33	1.525 3	2.109 8	2.125 8	0.715 5
0.50	1.493 6	2.065 9	2.081 6	0.728 8
1.00	1.498 5	2.072 8	2.088 5	0.706 0

3 讨论

参芪复方颗粒中人参、黄芪均为君药,有效成分为皂苷类,其中浸出物量的变化会影响有效成分的量,是中药复方的药效物质基础^[13],故作为该制剂提取工艺的重要评价指标之一。本文以方中君药的主要药效成分含量及干膏得率的综合评分为指标,按君、臣、佐、使关系对所选指标成分进行权重系数分配^[13],既能反映提取物有效成分的信息,为提取工艺的优化增加合理性,更符合中医用药的整体观。

参芪复方颗粒主要基于临床用药基础进行相关

研究,为最大程度地保留提取液中有效成分,有必要对其进行热稳定性考察,从水提液热稳定性结果发现,人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 在不同温度和不同受热时间下,均会发生不同程度的降解反应,而减压浓缩变化较小,相对稳定,表明提取液在常压加热过程中,人参皂苷类成分热稳定性差,故含人参皂苷类成分的提取液在浓缩过程中,若要保留大部分的原型皂苷,应缩短提取液的受热时间。在本品实际生产过程中,浓缩工艺可采用减压浓缩,以降低受热温度和缩短受热时间,在尽可能短的时间内完成样品的浓缩、干燥等制备工序,避免 3 种人参皂苷类成分含量的变化。

[参考文献]

- [1] 杨启悦,张帅,谢春光,等. 参芪复方防治糖尿病大血管病变机制研究[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1179-1183.
- [2] 朱海燕,高泓,郭保根,等. 参芪复方对 2 型糖尿病大血管病变小鼠糖脂代谢及骨骼肌病变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 124-128.
- [3] 张惠,胡敏. 中药配方颗粒剂的临床应用评价[J]. 西部医学, 2011, 23(7): 1355-1358.
- [4] 余潇苓,苗青,方翠芬,等. 人参皂苷水溶液热稳定性研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(12): 1109-1112.
- [5] 党晓芳,曹飒丽,林龙飞,等. 三七提取液中皂苷类成分的热稳定性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 31-34.
- [6] 季宇彬,崔荣田,于蕾. 中药皂苷类成分的提取及其抗肿瘤机制的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(增刊): 37-40.
- [7] 崔宇宏. 人参制剂中皂苷类成分的含量测定研究[D]. 太原:山西医科大学, 2007.
- [8] 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, 283-284.
- [9] 毛祖林,李晓波,龚文明,等. 人参皂苷提取工艺优选[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2762-2763.
- [10] 钟开位,张潮林. 正交试验法优选复方参术健脾口服液中药材的提取工艺研究[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(15): 2273-2275.
- [11] 孙乐,李春梅,郭迎迎,等. 人参花中总皂苷的提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 21-23.
- [12] 张峻. 正交试验法优选黄芪水提工艺的试验研究[J]. 基层中药杂志, 1999, 13(3): 13-15.
- [13] 许维桐,刘丹,郑陆梅,等. 多指标综合评价法优化小儿止虚汗颗粒的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 21-23.

[责任编辑 刘德文]