

多指标正交试验优选双黄二仙颗粒的提取工艺

杨红梅¹, 曹蕾¹, 单丽芳¹, 宋英², 涂翔², 钟森^{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: 优选双黄二仙颗粒的提取工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 采用 HPLC 测定黄芪甲苷、沙苑子苷含量, 流动相分别为乙腈-水(35:65)和流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(21:79)。以黄芪甲苷、沙苑子苷提取量和浸膏得率为综合评价指标, 通过正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对双黄二仙颗粒提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加8倍量水提取2次, 每次1h; 黄芪甲苷、沙苑子苷平均提取量分别为1.084, 1.343 mg·g⁻¹, 浸膏得率平均值28.48%, 提取次数对提取工艺具有显著性影响。结论: 优选的提取工艺提取率高、稳定性好, 可为双黄二仙颗粒的工业化生产工艺提供指导。

[关键词] 黄芪甲苷; 沙苑子苷; 浸膏得率; 双黄二仙颗粒; 综合评分

[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)07-0028-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016070028

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160215.1128.008.html>

[网络出版时间] 2016-02-15 11:28

Optimization of Extraction Technology of Shuanghuang Erxian Granules by Orthogonal Test

YANG Hong-mei¹, CAO Lei¹, SHAN Li-fang¹, SONG Ying², TU Xiang², ZHONG Sen^{2*}

(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 extraction technology of Shuanghuang Erxian granules. **Method:** HPLC was employed to determine contents of astragaloside IV and complanatuside in Shuanghuang Erxian granules with mobile phases of acetonitrile-water (35:65) and acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (21:79), respectively. Taking contents of astragaloside IV and complanatuside, yield of dry extract as comprehensive evaluation index, orthogonal test was used to investigate effects of water amount, extracting time and times on extraction process of Shuanghuang Erxian granules. **Result:** Optimum extraction condition was as follows: extracted twice with 8 times the amount of water, 1 hour for per time. Extracting amounts of astragaloside IV and complanatuside were 1.084, 1.343 mg·g⁻¹, yield of dry extract was 28.48%, extraction time had a significant effect on extraction technology of Shuanghuang Erxian granules. **Conclusion:** This optimized extraction condition is stable and feasible, it can provide guidance for industrial production of Shuanghuang Erxian granules.

[Key words] astragaloside IV; complanatuside; yield of dry extract; Shuanghuang Erxian granules; composite score

肾病综合征是临床常见的一种疾病^[1-2], 发病率呈现逐年上升的趋势^[3]。目前对于该病尚无特效治疗方法, 西药治疗效果不佳, 且易复发^[4]。双黄二仙方为成都中医药大学附属医院的临床经验

[收稿日期] 20150626(004)

[基金项目] 四川省中医药管理局青年基金项目(2014K108); 成都市科技局科技惠民应用示范项目(2014-HM02-00014-SF); 成都中医药大学附属医院科技发展基金项目(2013-D-YY-14)

[第一作者] 杨红梅, 在读硕士, 从事中药新药与新剂型研究, Tel:15713962850, E-mail:384478342@qq.com

[通讯作者] * 钟森, 教授, 博士生导师, 从事中西医临床研究, Tel:18980086606, E-mail:zhongsen6606@163.com

方,由黄芪、沙苑子、芡实、青风藤等 7 味药材组成,具有益气涩精、活血化瘀、补肾降蛋白的功效,对糖尿病肾病或急性肾小球肾炎所致的蛋白尿有明显的治疗效果。方中黄芪、沙苑子为君药,黄芪总皂苷具有较强的抗氧化作用,能降低蛋白尿,改善肾小球结构异常^[5];沙苑子具有温补肝肾、固经、缩尿、明目等功效,有保肝降血脂的作用^[6]。沙苑子总黄酮对血液流变学有影响,能减少机体的尿蛋白^[7]。本实验以黄芪甲苷、沙苑子苷 2 个指标性成分提取量及浸膏得率为综合评价指标,采用正交试验优选双黄二仙颗粒的提取工艺,为该制剂的开发利用提供参考。

1 材料

HP-1260 型高效液相色谱仪(美国惠普公司)。黄芪、沙苑子等药材饮片均购自四川新荷花中药饮片有限公司,经成都中医药大学附属医院盛蓉副主任中药师检验均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定;黄芪甲苷、沙苑子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110781-201314, 111803-201102),乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(35:65),进样量 10 μL,流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,气体流速 2.6 L·min⁻¹,检测器漂移管温度 102 °C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 3.76 mg,置 20 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取双黄二仙方水提液 25 mL,加水稀释定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,置于 500 mL 梨型分液漏斗中,用水饱和正丁醇萃取 5 次,每次 60 mL,合并正丁醇液,加氨试液洗 3 次,每次 60 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液 2, 6, 8, 10, 12 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量的对数为横坐标,峰面积的对数值为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.775X + 3.062$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.376 ~ 2.256 μg。

2.2 沙苑子苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Global Chromatography C₁₈ 色谱

柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液(21:79),进样量 10 μL,检测波长 266 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取沙苑子苷对照品 4.50 mg,置 25 mL 量瓶中,加 60% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取水提液 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液,稀释成系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 11413X - 2.008$ ($r = 1.000$),线性范围 0.036 ~ 0.72 μg。

2.3 正交试验优选水提工艺 根据预试验结果,选择提取次数、加水量、提取时间为考察因素,以黄芪甲苷、沙苑子苷提取量和浸膏得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.4, 0.4, 0.2。按处方比例取双黄二仙颗粒药材饮片 9 份,每份 138 g,其中黄芪、沙苑子各 30 g,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,各因素作用主次顺序为 A > C > B。方差分析表明因素 A 为主要影响因素,具有显著性差异,因素 B, C 则无显著性影响,确定最佳提取工艺条件选择 A₂B₁C₂,即加 8 倍量水提取 2 次,每次 1 h。

2.4 浸膏得率测定 精密移取提取液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后于 105 °C 干燥 5 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。

2.5 验证试验 按处方比例称取双黄二仙颗粒中各药材饮片 3 份,每份 414 g,按最佳提取条件进行 3 次验证试验,计算黄芪甲苷、沙苑子苷平均提取量分别为 1.084, 1.343 mg·g⁻¹,浸膏得率平均值 28.48%,RSD 依次为 2.5%, 0.8%, 0.3%,表明该工艺稳定可行,适合工业化生产。

3 讨论

预试验考察了不同溶剂(水、甲醇、乙醇及 60% 乙醇)制样对沙苑子苷色谱峰峰形效果的影响,结果显示以水为溶剂时,水提液中沙苑子苷的出峰效果最好,而以甲醇、乙醇为溶剂时沙苑子苷的分离度较差。处方中金樱子、芡实、红花中均含有黄酮类成分,主要包括二氢黄酮类、黄酮醇类及查尔酮等^[8-13],上述黄酮类成分均为平面型分子,分子间引力大,故难溶于水而易溶于甲醇、乙醇^[14],因此在选

表 1 双黄二仙颗粒水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of extraction technology of Shuanghuang Erxian granules

No.	A 提取数/次	B 加水量/倍	C 提取时间/h	D(空白)	浸膏得率/%	黄芪甲苷/mg·g ⁻¹	沙苑子苷/mg·g ⁻¹	综合评分
1	1	8	0.5	1	22.61	0.87	1.20	81.51
2	1	10	1.0	2	27.92	0.89	1.15	84.12
3	1	12	1.5	3	27.91	0.87	1.35	89.31
4	2	8	1.0	3	30.11	1.03	1.32	95.63
5	2	10	1.5	1	31.58	1.10	1.34	99.70
6	2	12	0.5	2	30.76	0.95	1.35	94.03
7	3	8	1.5	2	31.23	1.04	1.25	94.63
8	3	10	0.5	3	29.38	0.88	1.30	89.13
9	3	12	1.0	1	31.43	1.07	1.35	98.81

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	221.58	110.79	22.29	<0.05
B	21.53	10.77	2.17	>0.05
C	64.29	32.14	6.47	>0.05
D(误差)	9.94	4.97		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

用甲醇、乙醇稀释制样时会与沙苑子苷有包合,故而分离度较差。

考察不同流动相对黄芪甲苷含量测定的影响按照 2010 年版《中国药典》,测定黄芪甲苷的流动相为乙腈-水(32:68),保留时间约 15.5 min,基线较平,但连用蒸发光散射检测器时,对照品峰面积波动非常大,不适合用来计算样品含量,故将流动相调整为乙腈-水(35:65),效果良好,同时考察漂移管温度、载气流速对本品的影响。结果显示漂移管温度为 102 ℃ 时,基线较好,峰分离好;载气流速为 2.6 L·min⁻¹时,峰状态较好。

参考 2010 年版《中国药典》中含黄芪的不同成方制剂及黄芪药材的制备方法,同时也查阅了相关文献,采用过大孔树脂法、水饱和和正丁醇-氨试液法和氨试液超声法分别制样,在同一条件下测得水饱和和正丁醇-氨试液制得的黄芪甲苷含量高,且对此制备方法做了方法学考察,结果显示饱和和正丁醇-氨试液工艺稳定可靠,故选其为本制剂提取工艺中黄芪甲苷的制备方法。

[参考文献]

[1] Suh J H, Jarad G, Vandevoorde R G, et al. Forced expression of laminin β_1 in podocytes prevents nephrotic syndrome in mice lacking laminin β_2 , a model for Pierson syndrome[J]. PNAS, 2011, 108(37): 15348-15353.

[2] 范德塘,徐成刚.雷公藤多苷联合糖皮质激素治疗难治性肾病综合征疗效观察[J].中华中医药学刊, 2014, 32(4): 958-960.

[3] Hirose M, Nishino T, Uramatsu T, et al. A case of minimal change nephrotic syndrome with immunoglobulin A nephropathy transitioned to focal segmental glomerulosclerosis [J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(3): 473-479.

[4] 魏卓红,何剑荣.益肾固元汤加减治疗肾病综合征 30 例[J].广东医学, 2013, 34(5): 784-786.

[5] 刘宝义,李英.黄芪对糖尿病肾脏保护作用[J].医学综述, 2003, 9(3): 163-164.

[6] Liu C Y, Gu Z L, Zhang K P, et al. Effect of flavonoids of *Astragali camplanali* on liver fibrosis induced by DMN in rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 2004, 20(1): 110-114.

[7] 许青媛.沙苑子总黄酮对实验性高血脂血症血液流变学的影响[J].陕西药学杂志, 1987, 16(5): 61-62.

[8] 范莉,赵海誉,濮润,等.红花的黄酮类化学成分研究[J].中国药学杂志, 2011, 46(5): 333-336.

[9] 陈乃富,陈科,张莉,等.大孔树脂柱层析法纯化金樱子总黄酮的初步研究[J].中药材, 2007, 30(8): 1013-1016.

[10] 陈海云,陈新华,高言明,等.花溪高坡惠水两地不同采收期金樱子总黄酮含量分析[J].微量元素与健康研究, 2005, 22(4): 23-24.

[11] 沈蓓,吴启南,陈蓉,等.芡实的现代研究进展[J].西北药学杂志, 2012, 27(2): 185-187.

[12] 扈晓佳,殷莎,袁婷婷,等.红花的化学成分及其药理活性研究进展[J].药学实践杂志, 2013, 31(3): 161-168.

[13] 尹智慧,盛振华,丁红梅,等.ICP-MS 测定红花和藏红花中 22 种微量元素[J].中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 96-98.

[14] 匡海学.中药化学[M].15 版.北京:中国中医药出版社, 2003: 144-145.

[责任编辑 刘德文]