

# 正交试验法优选加味四君子汤提取工艺

许闪闪<sup>1</sup>, 欧晓阳<sup>1</sup>, 袁强<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第二医院, 杭州 310005)

**[摘要]** **目的:** 优选加味四君子汤的提取工艺。**方法:** 以人参皂苷总提取量为指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验考察乙醇体积分数及用量、提取次数、提取时间对醇提工艺的影响; 以总多糖得率为指标, 通过正交试验考察料液比、提取次数、提取时间对水提工艺的影响。采用 HPLC 测定人参皂苷含量, 流动相乙腈-水 (13:87), 检测波长 203 nm; 利用 UV 测定总多糖含量, 检测波长 489 nm。**结果:** 最佳醇提工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h; 人参皂苷提取量达  $7.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。最佳水提工艺为加 8 倍量水提取 3 次, 每次 2 h; 总多糖得率达 2.18%。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 可充分提取加味四君子汤中醇溶性和水溶性有效成分。

**[关键词]** 加味四君子汤; 提取工艺; 正交试验; 人参皂苷; 总多糖

**[中图分类号]** R284.2; R284.1; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0033-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014020033

## Optimization of Extraction Technology for Modified Sijunzi Decoction by Orthogonal Design

XU Shan-shan<sup>1</sup>, OU Xiao-yang<sup>1</sup>, YUAN Qiang<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;  
2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of modified Sijunzi decoction. **Method:** Taking total extraction amounts of ginsenoside as index,  $L_9(3^4)$  orthogonal design was adopted to optimize alcohol extraction technology of Ginseng Radix et Rhizoma, Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and Paeoniae Radix Alba with ethanol amount and concentration, extraction time and times as factors; With yield of total polysaccharides as index,  $L_9(3^4)$  orthogonal design was used to optimize water extraction technology of Poriae Cutis, Hedyotidis Herba and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma by taking solid-liquid ratio, extraction time and times as factors. The content of ginsenoside was determined by HPLC, mobile phase of acetonitrile-water (13:87), detection wavelength 203 nm; UV was adopted to measure the content of polysaccharides with detection wavelength at 489 nm. **Result:** Optimum alcohol extraction process was as following: extracted twice with 6 times the amount of 70% ethanol for 1.5 h per time; Extraction amount of ginsenoside was up to  $7.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Optimum water extraction process was: extracted three times with 8 times the amount of water for 2 h each time; Yield of total polysaccharides reached 2.18%. **Conclusion:** This optimized extraction technology was stable and feasible, it could full extract alcohol-soluble and water-soluble active ingredients from modified Sijunzi decoction.

**[Key words]** modified Sijunzi decoction; extraction technology; orthogonal test; ginsenoside; total polysaccharides

**[收稿日期]** 20130618(016)

**[基金项目]** 浙江省中药现代化专项资金项目(浙财建字[2010]421号)

**[第一作者]** 许闪闪, 在读硕士, 从事中药质量评价及新药开发研究, Tel:18042321366, E-mail:ssxushan@163.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:0571-86613778, E-mail:yuanqiang0825@sina.com

四君子汤出自宋代《太平惠民和剂局方》，由人参(去芦)、白术、茯苓(去皮)、炙甘草组成，具有益气健脾之功效，主治脾胃气虚症<sup>[1]</sup>。加味四君子汤中加入白芍平肝止痛、养血调经、敛阴止汗，白花蛇舌草清热解毒、消痈抗癌，以益气、健脾、清热为主，在一定程度上能抑制胃癌及癌前病变的发生<sup>[2]</sup>。研究表明人参、白术、白芍等药材的有效成分在乙醇中溶解度较高，故采用乙醇提取；茯苓、白花蛇舌草、甘草等药材多糖含量丰富，故采用水提<sup>[3-6]</sup>。本实验以有效成分人参皂苷及有效部位总多糖为考察指标，采用正交试验优选加味四君子汤的提取工艺。

### 1 材料

510 系列高效液相色谱仪(美国 Waters 科技有限公司), UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), FA2004AN 型电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司)。人参、白术等药材(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《中国药典》2010 年版一部有关各项规定),人参皂苷 R<sub>g1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 及 D-无水葡萄糖对照品(均由中国食品药品检定研究院提供,批号分别为 110703-200726, 110754-200822, 110704-200921, 110833-200503),乙腈、甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 人参皂苷的含量测定

**2.1.1 色谱条件** Hypersil BDS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(13:87),检测波长 203 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的人参皂苷 R<sub>g1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 对照品适量,用甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.578, 0.466, 0.614 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密移取乙醇提取液 10 mL,分别用水饱和的正丁醇 15, 10, 10 mL 萃取 3 次,合并正丁醇层萃取液,蒸干,用甲醇定容至 25 mL,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.1.4 标准曲线的制备** 精密吸取一定体积的混合对照品溶液,配制一系列质量浓度的对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得人参皂苷 R<sub>g1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 回归方程分别为  $Y = 4.075 \times 10^6 X - 7128.3$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 3.452 \times 10^6 X - 10936.1$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 3.014 \times 10^6 X + 6862.7$  ( $r = 0.9997$ ),线性范围分别

为 0.289 ~ 5.78, 0.233 ~ 4.66, 0.307 ~ 6.14 μg。

**2.2 醇提取工艺优选** 以人参皂苷总提取量为考察指标,选择乙醇体积分数及用量、提取次数、提取时间为考察因素,每个因素选择 3 个水平,因素水平见表 1。按处方比例称取人参、白术、白芍各 9 份,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,实验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 加味四君子汤乙醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取次数/次	D 提取时间/h
1	60	6	1	1.0
2	70	8	2	1.5
3	80	10	3	2.0

表 2 加味四君子汤乙醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	人参皂苷提取量/mg·g <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	5.094
2	1	2	2	2	7.796
3	1	3	3	3	7.654
4	2	1	2	3	7.950
5	2	2	3	1	6.442
6	2	3	1	2	6.167
7	3	1	3	2	7.194
8	3	2	1	3	5.398
9	3	3	2	1	5.656
K <sub>1</sub>	6.848	6.746	5.553	5.731	
K <sub>2</sub>	6.853	6.545	7.134	7.052	
K <sub>3</sub>	6.083	6.492	7.097	7.001	
R	0.770	0.254	1.581	1.321	

表 3 醇提工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1.179	2	11.019	>0.05
B(误差)	0.107	2	1.000	
C	4.885	2	45.654	<0.05
D	3.362	2	31.421	<0.05

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.0(表 6 同)。

直观分析显示各因素对乙醇提取工艺的影响顺序为 C > D > A > B。以极值最小的因素 B 为误差项进行方差分析,结果表明因素 C, D 对提取工艺的影响具有显著性差异,结合生产实际考虑,确定最佳提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即加 6 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。准确称取处方量药材 3 份,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果人参皂苷提取量分别为 7.60, 7.62, 7.86 mg·g<sup>-1</sup>,表明该工艺稳定可行。

## 2.3 总多糖的含量测定

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的D-无水葡萄糖对照品适量,用水溶解制成  $408.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,即得。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密称取粗多糖样品约  $10 \text{ mg}$ ,置  $100 \text{ mL}$  量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,即得。

**2.3.3 检测波长的选择** 精密吸取对照品溶液和供试品溶液并稀释至适量,以水作为空白对照,于  $300 \sim 600 \text{ nm}$  进行全波长扫描,得对照品和供试品溶液最大吸收波长分别为  $490.20, 487.60 \text{ nm}$ ,故确定选择  $489.00 \text{ nm}$ 。

**2.3.4 标准曲线的制备** 精密吸取适量对照品溶液,采用UV测定,检测波长  $489.00 \text{ nm}$ ,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 0.0086X - 0.026 (r = 0.9998)$ ,线性范围  $32.66 \sim 81.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.4 水提取工艺优选** 以总多糖得率为指标,选取料液比、提取次数、提取时间为考察因素,每个因素选择3个水平,按处方比例称取茯苓、甘草、白花蛇舌草各9份,按  $L_9(3^4)$  正交表进行水提取工艺优选,因素水平见表4,试验安排及结果见表5,方差分析见表6。

表4 加味四君子汤水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 提取数/次	C 提取时间/h
1	1:8	1	1
2	1:10	2	2
3	1:12	3	3

表5 加味四君子汤水提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总多糖得率/%
1	1	1	1	1	0.58
2	1	2	2	2	1.42
3	1	3	3	3	2.19
4	2	1	2	3	0.92
5	2	2	3	1	1.70
6	2	3	1	2	1.92
7	3	1	3	2	1.08
8	3	2	1	3	1.65
9	3	3	2	1	2.24
$K_1$	1.397	0.806	1.383	1.507	
$K_2$	1.513	1.590	1.527	1.473	
$K_3$	1.657	2.117	1.657	1.587	
R	0.260	1.257	0.274	0.114	

由直观分析可知,各因素对水提取工艺的影响顺序为  $B > C > A > D$ 。方差分析显示因素B对总多糖得率具有显著性影响,综合考虑,确定最佳提取工

表6 水提工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.102	2	5.100	$>0.05$
B	2.389	2	119.450	$<0.05$
C	0.112	2	5.600	$>0.05$
D(误差)	0.020	2		

艺为  $A_1B_3C_2$ ,即加8倍量水回流提取3次,每次2h。准确称取处方量药材3份,按优选的水提取工艺进行3次验证试验,结果总多糖得率分别为2.12%,2.18%,2.23%,表明该工艺稳定可行。

## 3 讨论

根据加味四君子汤中各药味性质及药效成分特点,人参、白术、白芍主要含有苷类成分,在乙醇中溶解度较大,故采用乙醇回流提取法;而茯苓、白花蛇舌草、甘草在复方中发挥药效的主要有效部位为多糖类水溶性成分,故采用水提工艺;2种提取方式结合使得水溶性和醇溶性成分均能充分溶出,测得的有效成分含量比单用醇提或水提工艺高。

人参为方中君药,2010年版《中国药典》<sup>[12]</sup>以人参皂苷  $Rg_1, Re, Rb_1$  总含量作为评价人参质量的重要指标,故选用人参皂苷作为醇提工艺的考察指标;多糖类是处方中有效成分,采用苯酚-硫酸显色法测定总多糖含量的方法简单易行,但显色剂显色时应注意控制时间和温度<sup>[8]</sup>。

## [参考文献]

- [1] 彭成,雷载权.四君子汤抗脾虚动物胃肠细胞损伤的研究[J].中药药理与临床,1995,11(6):7.
- [2] 林一帆,王承利,王阳,等.加味四君子汤对MNNG诱导大鼠胃癌与癌前病变的预防作用[J].沈阳部队医药,2006,19(4):219.
- [3] 王巍,孟宪生,包永睿,等.正交试验优选HPLC法测定人参中4种皂苷含量的方法研究[J].中药材,2011,34(12):1900.
- [4] 黄灿,王玉明,赵骏.抗肿瘤活性茯苓多糖的提取、纯化与结构分析[J].中草药,2012,43(11):2146.
- [5] 刘晔玮,宋海,马振远,等.甘草多糖提取工艺的研究[J].中成药,2006,28(5):729.
- [6] 樊民广,李娟,杜艳,等.苯酚-硫酸法测定白花蛇舌草中多糖的含量[J].中国药物与临床,2008,8(4):306.
- [7] 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.
- [8] 陈惠红,冯艳玲,苏艳妮.正交试验优选神光源颗粒剂的提取工艺[J].现代中药研究与实践,2007,21(5):46.

[责任编辑 全燕]