

# 正交试验法优选芪胶膏水提取工艺

张燕<sup>1</sup>, 曹阳<sup>2\*</sup>, 黄彬<sup>2</sup>, 向薇<sup>1</sup>, 胡敏<sup>1</sup>, 雷果平<sup>2</sup>, 韩平<sup>1</sup>

(1. 四川省南充市中心医院, 四川 南充 637000; 2. 四川省南充市食品药品检验所, 四川 南充 637000)

**[摘要]** 目的: 优选芪胶膏水提取工艺。方法: 以黄芪甲苷和水浸出物提出量为考察指标, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定黄芪甲苷含量, 选取提取次数、提取时间及加水量为考察因素, 正交设计法优选芪胶膏水提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h。结论: 该优选工艺提取芪胶膏中黄芪甲苷时, 收率较高且稳定可行。

**[关键词]** 正交设计; 黄芪甲苷; 高效液相色谱-蒸发光散射检测法; 芪胶膏

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0033-03

## Optimization of Water Extraction Technology for Qijiao Ointment by Orthogonal Test

ZHANG Yan<sup>1</sup>, CAO Yang<sup>2\*</sup>, HUANG Bin<sup>2</sup>, XIANG Wei<sup>1</sup>, HU Min<sup>1</sup>, LEI Guo-ping<sup>2</sup>, HAN Ping<sup>1</sup>

(1. Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China;

2. Nanchong Institute for Food and Drug Control, Nanchong 637000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize water extraction technology of Qijiao ointment. **Method:** With astragaloside and water extracts as indexes, HPLC-ELSD was used to determined the content of them, water extraction technology was optimized by orthogonal design, extraction times, extraction time and the amount of water were investigated as factors. **Result:** Optimal water extraction process of Qijiao ointment was: added 8 times the amount of water, decocting for three times, 1 h each time. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, it showed high yield of astragaloside in Qijiao ointment.

**[Key words]** orthogonal design; astragaloside; HPLC-ELSD; Qijiao ointment

芪胶膏是我院何进主任中医师的一个经验方, 由黄芪、阿胶、当归等组成, 具有补气血、调阴阳之功效。用于治疗气短、面色淡白或萎黄、自汗等症及气血两虚、阴阳失调慢性疲劳综合征<sup>[1]</sup>。处方中含有皂苷、氨基酸类及黄酮类有效成分。君药黄芪含有三萜皂苷、黄酮类、多糖类、氨基酸和微量元素等多种成分, 其主要成分黄芪甲苷活性较强, 易溶于水、甲醇、乙醇及丙醇<sup>[2]</sup>。在考证了水煮提取工艺合理性的基础上, 本文以黄芪甲苷含量及水浸出物为指

标, 采用正交试验法优选芪胶膏的提取工艺条件。本试验以芪胶膏处方为提取单元, 在模拟条件下进行工艺选择, 对芪胶膏生产工艺具有一定指导意义。

### 1 材料

CP225D 型电子天平 (麦多利斯电子天平), 2695-2420 型高效液相色谱仪 (美国 Waters), 黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110781-200613), 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 正交试验设计** 选取加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 同时结合生产实际, 每个因素选择 3 个水平, 用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验, 以水浸出物、黄芪甲苷收率为评价指标, 筛选最佳工艺条件, 因素水平见表 1。

**[收稿日期]** 20111213(003)

**[基金项目]** 四川省中医药管理局科技立项课题(2010-76)

**[第一作者]** 张燕, 学士, 副主任中药师, 从事医院中药学研究, Tel: 0817-2258694, E-mail: zhangyanyongdi @ 163.com

**[通讯作者]** \* 曹阳, 学士, 副主任中药师, 从事中药检验研究, Tel: 15298206683, E-mail: 896377643@ qq.com

表 1 芪胶膏水提工艺正交试验因素水平

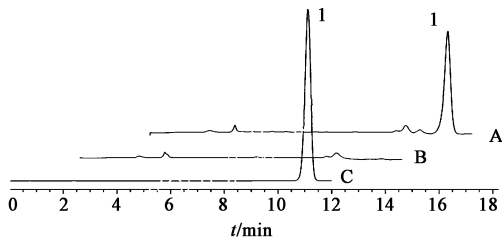
水平	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次
1	6	1	1
2	8	1.5	2
3	10	2	3

**2.2 样品溶液的制备** 按芪胶膏处方称取药材,共 125 g,按正交表设计安排方案加水煎煮,得煎液,浓缩至 100 mL,即得。

**2.3 水浸出物测定** 精密吸取样品液 20 mL,按《中国药典》2010 年版一部附录 XA 项下方法测定<sup>[3]</sup>。

**2.4 黄芪甲苷含量测定**

**2.4.1 色谱条件与系统适用性试验** Waters Symmetry Shield<sup>TM</sup> RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(34:66),柱温 40 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,漂移管温度 60 °C,载气压力 0.18 MPa,进样量 10 μL,见图 1。



A. 样品; B. 黄芪阴性对照溶液; C. 对照品; 1. 黄芪甲苷

图 1 黄芪甲苷 HPLC-ELSD

**2.4.2 供试品溶液的制备** 将煎煮液浓缩并定容至 100 mL,精密量取 25 mL,置分液漏斗中,用水饱和正丁醇提取 4 次,第 1 次 40 mL,第 2,3,4 次各 30 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 2 次,每次 30 mL,弃去氨液,回收正丁醇液蒸干,残渣加 5 mL 水溶解,通过 D101 型大孔吸附树脂,用水 50 mL 洗脱,弃去水液,用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得。照《中国药典》2010 年版一部附录 VID 项下方法测定。

**2.4.3 对照品溶液的制备** 精密称取 105 °C 干燥至恒重的黄芪甲苷对照品 19.84 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 0.793 6 g·L<sup>-1</sup> 黄芪甲苷对照品溶液。

**2.4.4 标准曲线绘制** 精密称取对照品 19.84 mg 置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,超声 10 min,摇匀,分别吸取上述溶液 1.2,1.8,3.1,3.8,

5.0,8.8 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 0.238 1,0.285 7,0.492 0,0.603 1,0.793 6,1.396 8 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,分别吸取 10 μL 进样测定。以进样量对数值为横坐标、相应峰面积的对数值为纵坐标,得回归方程  $Y = 1.545 5X + 5.370 6 (r = 0.999 1)$ 。结果表明,黄芪甲苷进样量在 1.904 64 ~ 13.967 4 μg 线性关系良好。

**2.4.5 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液 10 μL 连续进样 6 次,结果黄芪甲苷峰面积 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

**2.4.6 稳定性试验** 取 4 号试验的煎煮液,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,8,12,24 h 各进样 10 μL,结果黄芪甲苷峰面积 RSD 1.95%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.7 重复性试验** 取 4 号试验的煎煮液,按 2.4.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,进样 10 μL,测定黄芪甲苷收率。结果 6 份样品中黄芪甲苷平均含量 0.075 7 g·L<sup>-1</sup>,RSD 1.95%,表明方法重复性较好。

**2.4.8 加样回收试验** 取 4 号试验的煎煮液 6 份,每份约 25 mL,精密称定,分别置于 100 mL 锥形瓶中,依次精密加入适量对照品,按供试品溶液制备方法制备,进行测定,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 黄芪甲苷加样回收试验

样品中 含量/mg	加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
1.885 1	1.468 3	1.433 3	96.33	99.14	3.7
1.885 1	1.468 3	1.417 3	95.24		
1.885 1	1.887 8	1.857 4	97.39		
1.885 1	1.887 8	1.969 5	103.33		
1.885 1	2.254 9	2.366 4	104.11		
1.885 1	2.254 9	2.239 0	98.46		

**2.5 正交试验安排** 试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

由表 3 结果可知,各因素对提取工艺的影响大小顺序为  $C > A > B$ ,初步确定最佳提取工艺为  $A_2B_3C_3$ 。经方差分析,提取时间对提取效果无显著性影响,其余 2 个因素均有极显著影响,结果成本考虑,故最终确定最佳提取工艺条件为  $A_2B_1C_3$ ,即 8 倍量水提取 3 次,每次 1 h。

**2.6 验证试验** 按处方比例称取各药材适量,共 125 g,根据  $A_2B_1C_3$  工艺条件进行 3 次验证试验,结

表3 芪胶膏水提工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	水浸出物/%	黄芪甲苷/%	综合评分
1	1	1	1	1	28.3	9.60	49.28
2	1	2	2	2	40.6	17.31	77.53
3	1	3	3	3	45.8	18.96	86.20
4	2	1	2	3	38.3	25.97	91.0
5	2	2	3	1	43.6	19.01	84.00
6	2	3	1	2	35.9	16.41	70.50
7	3	1	3	2	42.7	12.36	70.19
8	3	2	1	3	26.5	10.71	49.43
9	3	3	2	1	46.0	9.62	68.52
$K_1$	213.01	211.14	169.31	201.80			
$K_2$	246.30	210.96	237.75	218.32			
$K_3$	188.14	225.32	240.39	227.33			
R	58.16	14.15	71.08	25.53			

注:采用综合评分法进行数据分析,水浸出物,黄芪甲苷权重系数分别为0.5,0.5。水浸出物评分=水浸出物量/最大水浸出物量 $\times 0.5 \times 100$ 。黄芪甲苷评分=黄芪甲苷量/最大黄芪甲苷量 $\times 0.5 \times 100$ 。综合评分=水浸出物评分+黄芪甲苷评分。

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	568	2	284	27.89	<0.01
B	45	2	22.5	2.21	>0.05
C	1 083	2	541.5	53.18	<0.01
D(误差)	112	11	10.19		

注: $F_{0.05}(2,11) = 3.98$ ,  $F_{0.01}(2,11) = 7.21$ 。

果水浸出物平均质量分数为40.35%,黄芪甲苷平均质量分数为22.67%。根据 $A_2B_3C_3$ 工艺条件提取3批进行验证试验,结果水浸出物平均质量分数40.04%,黄芪甲苷平均质量分数22.43%。说明提取工艺条件基本稳定,故确定芪胶膏水煎提取工艺为8倍量水煎煮3次,每次1h。

### 3 讨论

采用正交试验优选提取工艺时,评价标准的选定是难点。固体物是汤剂中其他提取液中药物发挥疗效的物质基础,用其来衡量、比较提取工作的优劣,既直观又简便,但杂质浸出物会影响固体物收率<sup>[4]</sup>,故本试验选择浸出物收率、黄芪甲苷含量按权重作为综合考核指标。

由于黄芪甲苷类成分在水饱和正丁醇中溶解度较大,因此应选用水饱和正丁醇进行提取。有报道采用未经氨试液处理的供试品溶液进行测定,结果含量大大偏低<sup>[5]</sup>,故选择用水饱和正丁醇提取后用氨试液处理,但会有太多杂质。参考2010年版《中国药典》中药材黄芪项下,选择D101型大孔吸附树脂除杂,经40%乙醇去杂后收集70%乙醇洗脱液,才能进行含量测定。

黄芪甲苷仅在200 nm波长附近有弱末端吸收,用高效液相色谱-紫外光谱法测定的条件非常严格,噪音对其结果影响较大。因此,本试验采用HPLC-ELSD进行测定<sup>[6]</sup>。由ELSD的工作原理可知,进样量和ELSD检测响应值(峰面积)一般不呈现良好的线性,但进样量和峰面积分别取常用对数后,两者呈现良好的线性关系,但其是一条不经过原点的直线,故在含量测定时宜采用外标两点法绘制标准曲线。

#### [参考文献]

- [1] 何进,罗志敏,张燕.芪胶生血汤治疗慢性疲劳综合征的临床观察[J].西部医学,2010,22(7):1201.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖.中药现代研究与应用[M].北京:学苑出版社,1998:3886.
- [3] 中国药典.一部[S].2010:附录62.
- [4] 黄舒丽,黄舒娅.正交试验法优选银翘解毒软胶囊的水煮提取工艺[J].广东药学院学报,2000,16(3):184.
- [5] 肖佳尚,朱涛.HPLC-ELSD法测定芪红胶囊中黄芪甲苷的含量[J].广东药学院学报,2007,15(2):138.
- [6] 赵剑,杨思进,蒲清荣,等.蛭龙活血通瘀胶囊提取工艺研究[J].中国药业,2010,23(12):42.

[责任编辑 全燕]