

## 正交试验优选丽安康片提取工艺

谭丽容<sup>1,2</sup>, 梁海春<sup>1,2</sup>, 吴典伟<sup>1,2</sup>, 苏冀彦<sup>1</sup>, 刘玮锦<sup>1</sup>, 苏子仁<sup>1,2\*</sup>

(1. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808;  
2. 广州中医药大学中药学院新药开发研究中心, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选丽安康片提取工艺。方法: 水提取部分以黄芪甲苷为指标, 乙醇提取部分以淫羊藿苷为指标, 分别采用正交试验优化提取工艺条件。结果: 最佳提取工艺为黄芪、当归水提共煎, 加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 1.5 h, 70 ℃ 减压干燥; 淫羊藿加 14 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h。结论: 优选的提取工艺合理、稳定、可行, 可作为丽安康片的提取工艺。

**[关键词]** 丽安康片; 正交试验; 提取工艺; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0020-03

## Optimization of Extraction Process for Li'ankang Tablet by Orthogonal Test

TAN Li-rong<sup>1,2</sup>, LIANG Hai-chun<sup>1,2</sup>, WU Dian-wei<sup>1,2</sup>, SU Ji-yan<sup>1</sup>, LIU Wei-jin<sup>1</sup>, SU Zi-ren<sup>1,2\*</sup>

(1. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine,  
Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China;

2. New Drug Research and Development Center, Guangzhou University of Chinese Medicine,  
Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Li'ankang tablet. **Method:** Extraction process of Li'ankang tablet was optimized by orthogonal design with multiple indexes. Astragaloside was used as index in water extract part, but with icariin as index in ethanol extract part. **Result:** Optimal extraction process of Li'ankang tablet was as follows: ratio of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* 5:1, added 8 times the amount of water to boil together, decocted 3 times with 1.5 h each time, vacuum drying under 70 ℃; *Epimedium brevicornu* was added 14 times the amount of 70% ethanol to extract 2 times, one h per time. **Conclusion:** Optimized extraction process of Li'ankang tablet was reasonable, stable and feasible, and could be extraction technology of Li'ankang tablet.

**[Key words]** Li'ankang tablet; orthogonal test; extraction process; HPLC

丽安康片是在金元四大家之一李东垣所创立的气血双补名方“当归补血汤”基础上, 加味淫羊藿衍生而来。其中黄芪补气, 当归生血, 淫羊藿壮阳, 三

药相伍, 能使阴生阳长、气旺血生, 可有效防治更年期综合征和骨质疏松症。本课题组前期对丽安康片药效物质系统的生物活性进行筛选<sup>[1,2]</sup>, 发现丽安康片中总多糖(黄芪多糖和当归多糖)、黄酮类(主要有芒柄花素、毛蕊异黄酮等异黄酮类成分)及皂苷类(黄芪甲苷及淫羊藿苷为代表)为治疗骨质疏松症的活性物质。根据有效物质的化学性质, 本试验采用正交试验对丽安康片处方药材的提取工艺进行研究, 以保证该制剂的有效性。

### 1 材料

Summit 型高效液相色谱仪(Dionex), BP110S 型 1/万电子天平(德国 Sartorius 公司), CP225D 型

**[收稿日期]** 20110816(009)

**[基金项目]** 广东省 2009 年度国际合作项目(2009B050200004); 广东省科技计划项目(2009A030100014)

**[第一作者]** 谭丽容, 在读研究生, 从事中药新产品开发研究, Tel: 020-39358517, E-mail: elena\_tam@foxmail.com

**[通讯作者]** \* 苏子仁, 研究员, 博士生导师, 从事中药新产品开发研究, Tel: 020-39358517, E-mail: suziren@gzhtem.edu.cn

1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司)。

药材经广州中医药大学新药开发研究中心苏子仁研究员鉴定,淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥地上部分,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diel 的干燥根,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。黄芪甲苷(批号 110781-200613)、淫羊藿苷(批号 110737-200414)对照品均购自中国药品生物制品检定所,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 提取工艺路线的选择** 根据丽安康片各药材有效成分的溶解性质,选择适宜溶媒提取。前期研究表明,黄芪-当归 5:1 水提共煎,所得阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮及总多糖的含量最高,且燥性成分藜本内酯的含量均明显低于其他比例;淫羊藿中主要药效成分为黄酮类成分,采用醇提可最大程度保留上述成分。因此确定黄芪、当归按 5:1 比例水提共煎,淫羊藿药材用乙醇进行提取。

### 2.2 黄芪、当归的提取工艺

#### 2.2.1 黄芪甲苷含量测定<sup>[3]</sup>

**2.2.1.1 色谱条件** Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 三乙胺溶液(98:2)等度洗脱 30 min,检测波长 230 nm,柱温 20 °C,进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,理论塔板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 5 000。

**2.2.1.2 对照品溶液制备** 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度 0.37 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,即得。精密吸取上述对照品储备液 1 mL,加吡啶 1 mL、三氯甲烷 2 mL,冰浴下加入苯甲酰氯 0.4 mL,摇匀后于冰箱中 4 °C 放置 24 h,使反应完全。挥干溶剂,残渣用甲醇稀释并定容至 10 mL 量瓶中,微孔滤膜过滤,即得对照品溶液。

**2.2.1.3 供试品溶液制备** 分别称取黄芪 500 g,当归 100 g,按正交试验设计进行提取,提取液减压浓缩干燥成干膏。称取黄芪-当归共煎干膏约 0.3 g,精密称定,加甲醇 100 mL 索氏提取 4 h,蒸干,残渣加水饱和正丁醇 20 mL 溶解,1% NaOH 振摇提取 3 次(每次 6 mL),弃去碱液,正丁醇液用正丁醇饱和水洗 2 次(每次 6 mL),弃去水层,正丁醇蒸干,残渣加吡啶 1 mL 溶解,加三氯甲烷 2 mL,冰浴下加入苯甲酰氯 0.4 mL,摇匀后于冰箱中 4 °C 放置 24 h,使反应完全。挥干溶剂,残渣用甲醇稀释并定容至

10 mL 量瓶中,微孔滤膜过滤,即得。

**2.2.1.4 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,按照外标一点法计算黄芪-当归共煎物中黄芪甲苷的含量。

**2.2.2 正交试验** 选取提取时间(A)、提取次数(B)、加水量(C)、干燥温度(D)等 4 个因素进行试验,每个因素取 3 个水平,因素水平见表 1。分别称取黄芪 500 g,当归 100 g,共 9 份,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验进行优化,测定各次试验所得的总固形物量和总固形物中黄芪甲苷质量分数,计算提出量,结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 黄芪和当归水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取时间/h	B 提取数/次	C 加水量/倍	D 干燥温度/°C
1	0.5	1	6	70
2	1.0	2	8	80
3	1.5	3	10	90

表 2 黄芪和当归水提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	总芪甲苷总量/mg
1	1	1	1	1	207.07
2	1	2	2	2	260.90
3	1	3	3	3	283.68
4	2	1	2	3	252.50
5	2	2	3	1	294.93
6	2	3	1	2	275.28
7	3	1	3	2	352.97
8	3	2	1	3	376.68
9	3	3	2	1	418.86
K <sub>1</sub>	752	813	859	921	
K <sub>2</sub>	823	933	932	889	
K <sub>3</sub>	1 149	978	932	913	
R	397	165	73	32	

表 3 黄芪和当归水提工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	29 855	2	14 927	164.69	<0.01
B	4 863	2	2 431	26.82	<0.05
C	1 181	2	590	6.51	>0.05
D(误差)	181	2	91	1.00	

注:  $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ ,  $F_{0.01(2,2)} = 99.00$  (表 6 同)。

结果表明,以黄芪甲苷得量为考察指标,其极差大小显示影响因素的主次关系为  $A > B > C > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,其中提取时间对黄芪甲苷得量的影响有极显著统计学意义;提取次数对黄芪甲苷得量的影响有显著统计学意义;加水量对黄芪甲苷得量的影响无统计学意义。选取  $A_3B_3C_2D_1$  为最佳水提工艺,即加 8 倍水量煎煮 3 次,每次 1.5 h,70 °C 下减压干燥。

## 2.3 淫羊藿提取工艺

### 2.3.1 淫羊藿苷含量测定

**2.3.1.1 色谱条件** Diamon Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(70:30)等度洗脱, 检测波长 270 nm, 理论塔板数按淫羊藿苷峰计算不低于 1 500。

**2.3.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取淫羊藿苷对照品适量, 加甲醇制成 0.11 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 即得。

**2.3.1.3 供试品溶液的制备** 称取淫羊藿 500 g, 按正交试验设计进行回流提取, 提取液减压浓缩干燥成干膏。取淫羊藿醇提干膏约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 20 mL, 称定质量, 超声处理 1 h, 称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3.1.4 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按照外标一点法计算淫羊藿苷的含量。

**2.3.2 正交试验** 选取乙醇体积分数(A), 加乙醇量(B), 提取时间(C), 提取次数(D)等 4 个因素进行试验设计, 每个因素取 3 个水平, 因素水平见表 4。称取淫羊藿 500 g, 共 9 份, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验进行优化, 测定各次试验所得的总固形物量和总固形物中淫羊藿苷质量分数, 计算提出总量, 结果见表 5, 方差分析见表 6。

表 4 淫羊藿乙醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 加乙醇量/倍	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	60	10	1	1
2	70	12	2	2
3	80	14	3	3

表 5 淫羊藿乙醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	淫羊藿苷总量/mg
1	1	1	1	1	1 447.72
2	1	2	2	2	1 819.29
3	1	3	3	3	2 039.91
4	2	1	2	3	1 959.09
5	2	2	3	1	2 001.93
6	2	3	1	2	2 295.99
7	3	1	3	2	1 785.56
8	3	2	1	3	1 863.75
9	3	3	2	1	1 934.43
K <sub>1</sub>	5 307	5 192	5 607	5 384	
K <sub>2</sub>	6 257	5 685	5 713	5 901	
K <sub>3</sub>	5 584	6 270	5 827	5 863	
R	950	1 078	220	517	

表 6 淫羊藿乙醇提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	159 176	2	79 588	19.73	<0.05
B	194 150	2	97 075	24.07	<0.05
C(误差)	8 066	2	4 033	1.00	
D	55 290	2	27 645	6.85	>0.05

以淫羊藿苷得量为考察指标, 各因素的主次关系为 B > A > D > C。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析, 结果显示乙醇体积分数和加乙醇量对淫羊藿苷得量的影响有显著统计学意义; 提取次数无统计学意义。A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>2</sub> 为最佳工艺, 即加 14 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1 h。

**2.4 验证试验** 按最佳优化工艺条件进行 2 次验证试验, 分别测得黄芪甲苷提取转移率 81.08%, 80.30%; 淫羊藿苷提取转移率 82.84%, 82.37%。说明工艺稳定、可行。

## 3 讨论

中药提取工艺的合理性与产品疗效有关, 且直接影响生产成本及后续加工。因此, 优化中药浸提工艺对于实现中药现代化与国际化是非常重要的<sup>[4]</sup>。本研究采用黄芪、当归按照 5:1 比例水提共煎和醇提淫羊藿, 使各药材的有效活性成分的提取率达到最优, 且保证了丽安康片的疗效。黄芪为方中君药, 药效作用显著, 《中国药典》中规定黄芪甲苷的含量测定方法为 HPLC-ELSD, 但此方法采用质量型器, 仪器设备不通用。故本研究采用柱前衍生化法对提取物中黄芪甲苷进行含量测定, 建立成药中黄芪甲苷的柱前衍生化高效液相色谱含量测定方法, 为成药有效性提供试验数据支持, 同时为含黄芪、当归和淫羊藿药材的复方中药研究提供可参考思路与方法。

## [参考文献]

- [1] 赵奎君, 李卓明, 陈小莺, 等. 从当归补血汤的研究探讨和分析中药复方共煎的合理性[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 11(2): 294.
- [2] 赵奎君, 钟萌, 董婷霞, 等. 当归和黄芪的比例变化对当归补血汤活性成分含量的影响[J]. 中国药师, 2006, 9(11): 1032.
- [3] 崔颖, 李灵芝, 周欣, 等. 柱前衍生化法测定糖脂消胶囊中黄芪甲苷含量[J]. 武警医学院学报, 2007, 16(3): 269.
- [4] 刘晓棠, 史泳, 王云秀, 等. 中药提取工艺研究进展[J]. 中国医学研究与临床, 2006, 4(5): 48.

[责任编辑 仝燕]