

多指标优选芪葵颗粒提取工艺

贾媛¹, 恽菲¹, 常星洁¹, 刘志辉^{2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210036)

[摘要] 目的: 优选芪葵颗粒提取工艺。方法: 以黄芪甲苷、金丝桃苷及二苯乙烯苷含量为指标, 采用正交试验优选芪葵颗粒提取工艺。结果: 优选的工艺条件为加 10 倍量水提取 3 次, 每次 60 min。结论: 优选的工艺可行, 适合工业化生产。

[关键词] 黄芪甲苷; 金丝桃苷; 二苯乙烯苷; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0027-03

Optimization of Extraction Process for Qikui Granules with Multi-index

JIA Yuan¹, YUN Fei¹, CHANG Xing-jie¹, LIU Zhi-hui^{2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210036, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Qikui granules. **Method:** Orthogonal design was used to optimize extraction process of Qikui granules. The content of astragaloside IV, hyperoside, and stilbene glycoside were as indexes. **Result:** The optimum extraction process was as follows: extracted with 10times amount of water, extracted three times, 60 minutes per time. **Conclusion:** The optimized extraction process is feasible and suitable for industrial production.

[Key words] astragaloside IV; hyperoside; stilbene glycoside; extraction process

芪葵颗粒来源于江苏省中医院临床经验方, 由黄芪、黄蜀葵花、制何首乌等多味中药组成, 具有补气升阳、补肝肾, 健脾胃的功能, 临床上用于治疗糖尿病肾病, 疗效显著。黄芪为方中君药, 黄芪甲苷是其特有的生物活性成分, 具有增强机体免疫功能, 肾脏保护等作用^[1]。黄蜀葵花具有治疗肾炎作用^[2], 金丝桃苷是黄蜀葵植物药中具有较强生物活性的成分。制何首乌具有补益肝肾的作用, 同时具有较好的肝保护作用^[3], 其主要活性成分为二苯乙烯苷。制何首乌与黄蜀葵在本方中共为臣药。所以试验以黄芪甲苷、金丝桃苷以及二苯乙烯苷含量为指标, 采用正交试验筛选芪葵颗粒提取工艺。

1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪、2998 PAD 检测器(美国 Waters 公司), Alltech ELSD2000ES 型检测器(美国 Alltech 公司), BP-211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

黄芪甲苷对照品、金丝桃苷对照品、二苯乙烯苷对照品(含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110781-200613, 111521-200303, 110844-200606)。乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。黄芪、黄蜀葵花、制何首乌等中药饮片均购于江苏省医药公司, 经江苏省中医院周琴妹主任中药师鉴定符合《中国药典》2010 年版相关要求。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷含量测定^[4]

2.1.1 对照品溶液配制 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液配制 精密量取提取液 100 mL, 用水饱和的正丁醇振荡萃取 4 次, 合并正丁醇

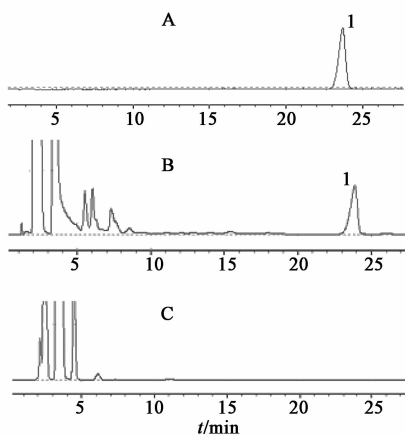
[收稿日期] 20110217(001)

[第一作者] 贾媛, 在读硕士, 从事中药制剂研究, Tel: 025-86529291, E-mail: jnjny@126.com

[通讯作者] * 刘志辉, 硕士生导师, 主任中药师, 从事中药制剂开发及中药质量标准研究, Tel: 025-86529291, E-mail: liuzh1008@126.com

液,用氨试液充分洗涤 2 次,弃去氨液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,摇匀,定容,静置,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件^[4] Hederac₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(32:68),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 30 μL。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性; 1. 黄芪甲苷

图 1 芪黄颗粒 HPLC-ELSD

2.1.4 线性关系考察 取 2.1.1 项下对照品溶液,分别进样 3, 6, 10, 15, 20, 30, 40 μL, 按 2.1.3 项下方法测定。进样量对数为横坐标,峰面积对数为纵坐标,进行回归,得对数方程 $Y = 1.6366X + 5.3334$ ($r = 0.9997$),进样量在 1.599 ~ 21.320 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.2 金丝桃苷及二苯乙烯苷含量测定

2.2.1 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷、二苯乙烯苷对照品适量,加稀乙醇(50%乙醇)溶解,配制成含金丝桃苷 0.162 g·L⁻¹和二苯乙烯苷 0.018 g·L⁻¹的混合溶液,备用。

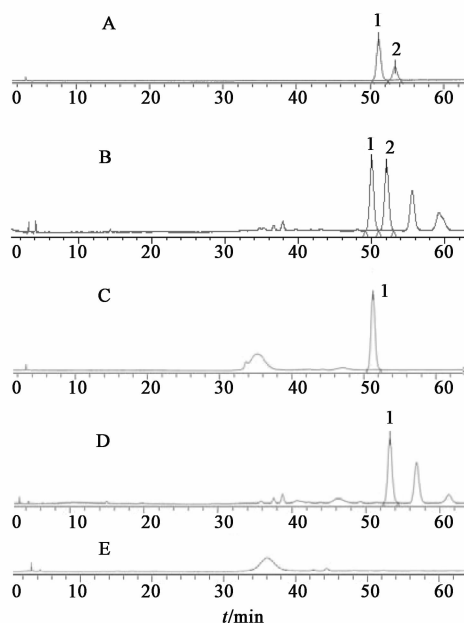
2.2.2 供试品溶液制备 精密量取提取液 50 mL,用乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 Hederac₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),按表 1 规定进行梯度洗脱,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 320 nm。

分别吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,测定,样品与对照品在相同位置有吸收,分离度 > 1.5,阴性供试品无干扰,见图 2。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 16	13	87
16 ~ 21	5	95
21 ~ 26	5	95
26 ~ 29	85	15
29 ~ 65	85	15



A. 对照品; B. 样品; C. 黄蜀葵花阴性; D. 制何首乌阴性; E. 双阴性; 1. 二苯乙烯苷; 2. 金丝桃苷

图 2 芪黄颗粒 HPLC

2.2.4 线性关系考察 取上述混合对照品溶液,分别进样 3, 6, 10, 15, 20, 25, 35 μL 按上述色谱条件测定。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行回归,得金丝桃苷线性方程 $Y = 1 \times 10^6 X - 1062.3$ ($r = 0.9999$);二苯乙烯苷线性方程 $Y = 3 \times 10^6 X - 13679$ ($r = 1.0000$),结果表明,金丝桃苷进样量在 0.048 ~ 0.567 μg,二苯乙烯苷在 0.054 ~ 0.625 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 正交试验设计筛选最佳提取工艺

2.3.1 提取因素及水平的确定 拟以加水量、提取次数、提取时间为主要考察因素,选用 L₉(3⁴) 正交表设计试验,各因素的相关水平见表 2。

2.3.2 提取方法及结果 分别称取黄蜀葵花 45 g, 黄芪 45 g, 制何首乌 15 g, 共 9 份,加水按照正交设计条件提取,处理方法同 2.1.2 和 2.2.2。以综合评分为指标(综合评分 = 金丝桃苷测得转移率值/测得

最大转移率值 $\times 3/7 +$ 二苯乙烯苷测得转移率值/测得最大转移率值 $\times 1/7 +$ 黄芪甲苷测得转移值/测得最大转移值 $\times 3/7$)。见表 2~4。

直观分析表 3,各因素对黄芪甲苷、二苯乙烯苷以及金丝桃苷含量的影响程度依次为 $C > A > B$,即提取次数对各指标影响最大,其次为加水量和提

表 2 芪黄颗粒提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量	B 煎煮时间	C 提取次数
	/倍	/min	/次
1	8	30	1
2	10	60	2
3	12	90	3

表 3 芪黄颗粒提取工艺正交试验安排及结果

No.	A	B	C	空白	二苯乙烯苷	金丝桃苷	黄芪甲苷	综合评分
					转移率/%	转移率/%	转移率/%	
1	1	1	1	1	9.02	11.01	4.03	0.08
2	1	2	2	2	38.59	45.01	24.99	0.39
3	1	3	3	3	87.12	95.01	17.50	0.66
4	2	1	2	3	43.93	67.58	29.48	0.53
5	2	2	3	1	46.32	68.72	55.89	0.67
6	2	3	1	2	16.59	17.39	15.38	0.18
7	3	1	3	2	17.21	31.87	84.11	0.60
8	3	2	1	3	25.22	26.61	15.71	0.24
9	3	3	2	1	35.11	51.33	34.44	0.46
K_1	1.12	1.21	0.50	1.21				
K_2	1.39	1.30	1.38	1.17				
K_3	1.29	1.29	1.92	1.43				
R	0.09	0.03	0.47	0.09				

表 4 芪黄颗粒提取工艺正交试验方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.01	2	0.01	0.88	>0.05
B	0.00	2	0.00	0.12	>0.05
C	0.34	2	0.17	25.09	<0.05
误差	0.01	2	0.01		

取时间,由表 4 可知因素 C 有显著性影响,其他因素则无显著性影响。综合直观分析和方差分析,可得提取工艺为 $A_2B_2C_3$,即加 10 倍量水提取 3 次,每次 60 min。

2.4 验证试验 分别称取黄蜀葵花 150 g,黄芪 150 g,制何首乌 50 g,共 3 份。按上述筛选出的提取工艺进行试验,测定黄芪甲苷平均转移率为 57.01%,RSD 2.9%;二苯乙烯苷平均转移率为 48.42%,RSD 2.6%;金丝桃苷平均转移率为 70.24%,RSD 1.7%。结果表明筛选的提取工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

根据处方功效和各药味有效成分相关性质,选取测定黄芪甲苷、金丝桃苷以及二苯乙烯苷含量为多指标更能体现中药复方多成分作用的优点,从而优选芪葵颗粒提取工艺。

黄芪甲苷紫外末端吸收较差,参考《中国药典》选择蒸发光散射器,在制备其供试品溶液过程中,曾考虑用正丁醇萃取后不经过碱处理,发现含量有所降低;氨水用量对黄芪甲苷含量测定也有影响,需充分洗涤。用 HPLC 同时测定金丝桃苷和二苯乙烯苷含量,预试验直接进样杂峰干扰很大,故选择乙酸乙酯为萃取剂进一步纯化,由于二苯乙烯苷与金丝桃苷出峰时间比较一致,并且二苯乙烯苷对流动相的变化比金丝桃苷的敏感度略高,故考虑用梯度洗脱,经反复试验,分离度大于 1.5,峰形好,理论塔板数达到要求。

[参考文献]

- [1] 吴发宝,陈希元. 黄芪药理作用研究综述[J]. 中药材, 2004, 27(3): 232.
- [2] 刘克辉,王玲,张英,等. 黄葵治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. 吉林医学, 2005, 26(10): 1022.
- [3] 顾慧,吕圭源. 何首乌“补肝肾、益精血、强筋骨”功效相关的药理研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(2): 58.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 283.

[责任编辑 全燕]