

## 正交试验法优选健肾片的提取工艺

郭传宝, 曹光环, 邵杰, 尚强, 徐连明, 萧伟\*

(江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001)

**[摘要]** 目的: 优选健肾片的提取工艺。方法: 考察黄芪的形状对黄芪甲苷提取率的影响, 并采用正交试验法, 以提取液中黄芪甲苷、淫羊藿苷的得率和干膏率为考察指标, 考察加水量、提取时间和提取次数 3 个因素对提取结果的影响。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 黄芪药材炮制的形状为段长(5~10 mm)。结论: 该工艺合理可行, 含量测定方法稳定可靠。

**[关键词]** 健肾片; 提取工艺; 正交试验; 淫羊藿苷; 黄芪甲苷

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0013-03

## Study on Extraction Process for Jianshen Tablet by Orthogonal Test

GUO Chuan-bao, CAO Guang-huan, SHAO Jie, SHANG Qiang, XU Lian-ming, XIAO Wei\*

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction technology for Jianshen tablet. **Method:** The shape of Radix Astragalus was studied on the content of astragaloside IV and orthogonal test was used for studying the effect of water volume, extraction time and times on the content of icariin, astragaloside IV and solid. **Result:** The optimal extraction process was as follows: with 8 times of water extracted twice, each time for 1.5 h. The processing method of Radix Astragali was cutting for about 5-10 mm. **Conclusion:** The extraction process is reasonable and feasible. The method of content determination is accurate and reliable.

**[Key words]** Jianshen tablet; extraction technology; orthogonal test; icariin; astragaloside IV

健肾片是由黄芪、淫羊藿、茯苓、僵蚕、全蝎、泽泻、石韦、青风藤 8 味中药提取精制而成的中药复方制剂, 具有健脾益肾、补气清利、祛风通络的功效, 用于慢性肾小球肾炎, 临床上诊断为脾肾气虚兼有湿邪证候的患者。黄芪和淫羊藿为方中君药, 黄芪甲苷和淫羊藿苷为其主要活性物质, 具有多方面的药理作用<sup>[1,2]</sup>。作者根据黄芪、淫羊藿和茯苓的主

要化学成分的理化性质, 为提高有效成分的提取效率, 将上述 3 味药物进行水提取, 以黄芪甲苷和淫羊藿苷的提取率及干浸膏得率为指标, 用正交试验法优选最佳提取工艺, 为工业化生产提供依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Chemstation 色谱工作站, Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2420 ELSD 蒸发光散射检测器。

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110781-200613), 淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检验所, 批号 0737-200611)。药材黄芪、淫羊藿、茯苓均由连云港市康缘大药房工程师吴舟鉴定, 分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bag. var. *mongholicus* (Beg.) Hsiao. 的干燥根、小檗科植物淫羊藿 *Epimedium grandiflorum* Morr. 的地上部分、多孔菌科茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf

**[收稿日期]** 20100810(009)

**[基金项目]** 重大新药创制——创新中药中试放大研究技术平台(2009ZX09313-032)

**[第一作者]** 郭传宝, 工程师, 学士, 中药制剂和创新中药的开发与研究, Tel: 0518-85521933, E-mail: ghcaol@sohu.com

**[通讯作者]** \* 萧伟, 研究员级高级工程师, 博士学位, 从事中药制剂和创新中药的开发与研究, Tel: 0518-85521956

的菌核。乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 干浸膏得率的测定** 分别准确称取处方量的黄芪、淫羊藿、茯苓,按设定的方案进行提取,滤过,滤液合并,冷藏静置,离心除杂,精密量取离心后药液 100 mL 置已干燥恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 °C 干燥 3 h。置干燥器中冷却 30 min,迅速称重,计算药液的总固量,作为每次实验的干浸膏得率。

### 2.2 黄芪甲苷含量的 HPLC 测定<sup>[3]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相乙腈-水(31:69),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,ELSD 漂移管温度 49 °C,喷雾加热级别 60%,气体流速 20 L·min<sup>-1</sup>,进样量 20 μL。色谱图见图 1。

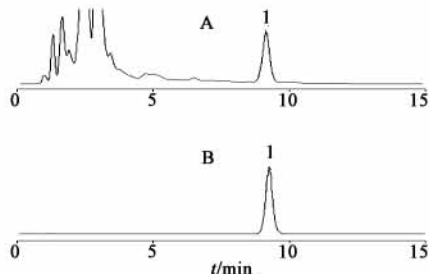


图 1 黄芪、淫羊藿和茯苓水提取液黄芪甲苷 HPLC  
A. 对照品;B. 供试品;1. 黄芪甲苷

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪甲苷对照品 30.0 mg 置于 50 mL 量瓶中,加入无水甲醇定容至 50 mL,配制为 0.6 g·L<sup>-1</sup> 的黄芪甲苷对照品储备溶液。

**2.2.3 供试品溶液制备** 准确量取 2.1 项下离心后药液体积,精密量取 100 mL,于旋转蒸发仪浓缩至干,残渣加水 20 mL 超声溶解后,转移至分液漏斗,以水饱和的正丁醇萃取 4 次(30 mL/次),合并正丁醇萃取液,用氨试液充分洗涤 2 次(30 mL/次),弃去氨液,正丁醇层蒸干,残渣加水 5 mL 微热使溶解,放冷,过 D101 型大孔吸附树脂(内径 1.5 cm,长 12 cm),用 50 mL 水洗脱,弃去水液,再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去,继用 70% 乙醇 150 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得供试品溶液。

**2.2.4 标准曲线的制备** 精密取芪甲苷对照品储备溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,分别得到 0.06, 0.12, 0.18,

0.24, 0.30, 0.36 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,滤过进样,20 μL,在给定色谱条件下进行测定。以进样量的常用对数值(X)为横坐标,蒸发光峰面积的常用对数值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为  $Y = 0.986 + 1.835X$  ( $r = 0.9994$ ),黄芪甲苷在 1.2 ~ 7.2 μg 呈良好的线性关系。

**2.2.5 含量测定** 精密吸取供试品溶液,按上述方法测定样品中的黄芪甲苷含量,计算黄芪甲苷的提取率。

### 2.3 淫羊藿苷含量的 HPLC 测定<sup>[4]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 采用 ODS-C<sub>18</sub>(6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水(30:70)为流动相,检测波长 270 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。色谱图见图 2。

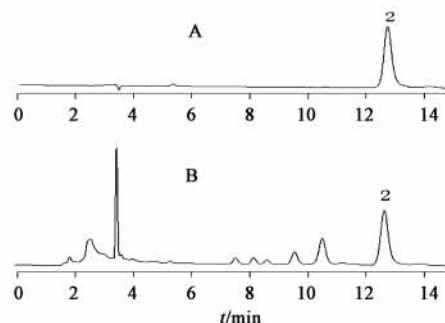


图 2 黄芪、淫羊藿和茯苓水提取液淫羊藿苷 HPLC  
A. 对照品;B. 供试品;1. 淫羊藿苷

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 113.6 μg 的溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的测定** 准确量取 2.1 项下离心后药液体积,精密量取 5 mL,加无水乙醇定容至 10 mL,静置,取上清液适量过 0.45 μm 微孔滤膜过滤液作为供试品溶液。

**2.3.4 标准曲线的制备** 精密移取淫羊藿苷对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加流动相配置成一系列浓度的溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,在给定的色谱条件下,分别进样 10 μL,测得峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程  $Y = 21.133X + 17.767$  ( $r = 0.9999$ ),表明淫羊藿苷在 22.72 ~ 113.6 mg·L<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系。

**2.3.5 含量测定** 精密吸取供试品溶液,按上述方法测定样品中淫羊藿苷含量,计算淫羊藿苷的提取率。

**2.4 药材粒度对黄芪甲苷提取率的影响** 以黄芪甲苷的提取率为指标,对提取前的黄芪的粒度进行考察,取黄芪净药材4等份,分别粉碎成粗粉、切厚片(2~4 mm)、切段Ⅰ(10~15 mm)和切段Ⅱ(5~10 mm),各加10倍量水提取2次,每次2 h。测定提取液中黄芪甲苷的提取率依次为68.98%,68.37%,55.43%,67.79%。结果表明,随着黄芪形状的减小,黄芪甲苷的提取率相应的增加,但粗粉,切厚片与切小段相差较小,结合生产实际,选择黄芪切5~10 mm段较为适宜。

**2.5 黄芪、淫羊藿等药材提取工艺优选** 处方中黄芪(生)、淫羊藿、茯苓3味药材主要含有黄酮类、多糖类化学成分,易溶于水,故对其进行水煎煮提取工艺的考察。

**2.5.1 正交试验** 用 $L_9(3^4)$ 正交表,以提取液中黄芪甲苷和淫羊藿苷的得率及干膏收率为指标,对影响水煮工艺的主要因素即加水量、提取次数、提取时间进行考察。根据前期预实验的结果,拟定因素水平见表1。

表1 黄芪、淫羊藿和茯苓水提取正交因素水平

水平	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 加水量/倍
1	2	1.5	6
2	3	2.0	8
3	4	2.5	10

按处方比例平行称取各味药材,共称取9份,每份332.5 g,按表2安排试验,药材加水煎煮,合并提取液,冷藏静置,5 000  $r \cdot \min^{-1}$ 离心,得药液备用。

**2.5.2 数据处理与工艺优选** 用综合加权评分法,评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化,再权衡3个指标的轻重,采取加权的方式,综合评价提取效率。以综合评分值进行正交试验结果和方差分析,正交试验结果见表2,方差分析结果见表3。

**2.5.3 优选提取工艺确定** 由表2中的直观分析可知,按综合评分标准进行评判时, $A_1 > A_3 > A_2$ , $B_1 > B_2 > B_3$ , $C_2 > C_1 > C_3$ 。由表3可知各因素影响主次关系为 $C > B > A$ ,并且可知C因素对提取工艺有显著性影响( $P < 0.05$ ),所以从生产实际和经济因素综合考虑,我们选用最佳提取工艺为 $A_1B_1C_2$ ,即用8倍量水提取2次,每次1.5 h。

**2.5.4 工艺验证** 为验证优选工艺的可靠性和重复性,取黄芪切段(5~10 mm),按最佳工艺平行制

表2 黄芪、淫羊藿和茯苓水提取 $L_9(3^4)$ 正交试验

No.	A	B	C	D	出膏率/%	淫羊藿苷提取率/%	黄芪甲苷提取率/%	综合评分
1	1	1	1	1	26.65	73.29	63.22	95.17
2	1	2	2	2	28.53	76.01	66.17	99.68
3	1	3	3	3	28.99	66.85	53.56	87.56
4	2	1	2	3	28.74	75.94	65.45	99.36
5	2	2	3	1	24.10	64.36	54.84	83.65
6	2	3	1	2	23.52	60.90	53.12	80.39
7	3	1	3	2	26.46	67.88	60.91	90.80
8	3	2	1	3	23.82	67.10	64.75	90.89
9	3	3	2	1	25.98	70.88	66.12	95.19
$K_1$	282.41	285.33	266.45	274.01				
$K_2$	263.40	274.22	294.23	270.87				
$K_3$	276.88	263.14	262.01	277.81				
R	6.34	7.40	10.74	2.31				

注:综合评分 =  $X/\text{干浸膏最大得率} \times 0.2 \times 100 + Y/\text{淫羊藿苷最大提取率} \times 0.4 \times 100 + Z/\text{黄芪甲苷最大提取率} \times 0.4 \times 100$ 。

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	63.74	2	31.87	7.92	
B	82.07	2	41.03	10.19	
C	203.29	2	101.64	25.25	<0.05
误差 D	8.05	2	4.03	1.00	

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

备3份中试样品,测定淫羊藿苷得率分别为73.86%,74.05%,75.38%;黄芪甲苷率分别为65.75%,66.40%,66.81%;干膏率分别为25.58%,26.42%,26.06%。可见按最佳工艺进行提取,淫羊藿苷和黄芪甲苷提取率均处于较高水平,表明该工艺合理可行,具可操作性和重复性。

### 3 讨论

本试验在正交设计中以淫羊藿苷、黄芪甲苷含量和干浸膏得率作为评价健肾片的提取工艺的客观指标。结果表明,加水量对提取工艺有显著影响,煎煮次数、煎煮时间对提取效果影响不大。通过方差分析和K值的综合考虑,根据生产实际情况,优选的最佳提取工艺为8倍量水煎煮2次,每次1.5 h。试验中还考察了黄芪炮制的形状对黄芪甲苷含量的影响,选择黄芪的形状为段Ⅱ(5~10 mm)为宜。优选