

# 多指标正交试验法优选坎离颗粒提取工艺

文小燕, 刘力\*, 徐德生

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

**[摘要]** 目的: 优选坎离颗粒的提取工艺条件。方法: 采用正交设计试验法, 以提取液中黄芪甲苷、芍药苷、总皂苷和总生物碱含量为综合评分指标, 多指标成分优选坎离颗粒提取工艺。结果: 优选的工艺条件为坎离颗粒处方量加水 10 倍, 提取 3 次, 每次 45 min, 提取前浸泡 45 min。结论: 该提取工艺条件稳定, 重现性好。

**[关键词]** 坎离颗粒; 提取工艺; 正交实验; 多指标成分; 综合评价

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0020-03

## Optimization Study on Extraction Technology of Kanli Granules by Orthogonal Design with Multi-target

WEN Xiao-yan, LIU Li\*, XU De-sheng

(Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extracting technology conditions of Kanli Granules. **Method:** Orthogonal design was used to optimize the extraction conditions, with the content of multi-target ingredients such as astragaloside, paeoniflorin, total saponins and total alkaloids as comprehensive evaluation indexes. **Result:** The optimum extraction conditions were as follows: extracted 3 times with 10 fold water, 45 minutes each time. **Conclusion:** The optimum extraction conditions was stable and reproducible.

**[Key words]** Kanli granules; extraction technology; orthogonal design; multi-targets ingredients; comprehensive evaluation

坎离颗粒是曙光医院心内科临床验方, 由黄芪、制附子、白术、白芍、三棱、麦冬、莪术等 10 味药组成的复方制剂, 具有温振心肾阳气、泻肺利水之功效, 主治伴有不同程度体液潴留的慢性心力衰竭。为保证制剂的疗效, 试验采用正交设计试验法, 以黄芪甲苷、芍药苷、总皂苷、总生物碱的含量为综合评分指标, 多指标优选坎离颗粒的提取工艺。

### 1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪、化学工作站(美国

Agilent 公司), LC-20AT 高效液相色谱仪, 化学工作站(日本岛津), SEDEX-75 型蒸发光散射检测器(ELSD), UV-2450PC 型紫外分光光度仪(日本岛津), Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

黄芪甲苷(批号 110781-200613, 含量测定用)、芍药苷(批号 0736-9407, 含量测定用)、乌头碱对照品(批号 110720-200410, 含量测定用)均购自中国药品生物制品检定所, 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为自制双蒸水。

### 2 方法与结果

**2.1 指标成分的测定** 坎离颗粒中君药黄芪的主要成分为黄芪甲苷, 且此成分也是本方的主要活性成分。白芍的主要有效成分是芍药苷, 与本方的功能主治有一定相关性, 故将黄芪甲苷、芍药苷作为坎离颗粒提取工艺筛选时含量测定的指标性成分。为更好更全面地控制坎离颗粒的质量, 另将与本方功能主治相关的两大类成分总皂苷、总生物碱也同时

**[收稿日期]** 20110503(004)

**[基金项目]** 上海市科委中药现代化专项基金项目(08DZ1972200)

**[第一作者]** 文小燕, 硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel: 021-53827660, E-mail: wenxy\_work@sina.com

**[通讯作者]** \* 刘力, 主任药师, 博士生导师, 从事中药新药开发, Tel: 021-53827660, E-mail: liuli2750@hotmail.com

作为工艺筛选的指标。通过4个指标含量的综合评分,对提取工艺条件进行优化筛选。各指标成分检测方法见表1。

表1 4个检测方法

被测指标	检测方法	检测波长		线性范围
		ELSD	/nm	
黄芪甲苷	HPLC	230	0.556 25 ~ 16.687 5 $\mu\text{g}$	
芍药苷	HPLC	536	0.102 ~ 10.2 $\mu\text{g}$	
总皂苷	分光光度法 <sup>[1]</sup>	410	0.042 6 ~ 0.255 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
总生物碱	分光光度法 <sup>[2]</sup>		0.15 ~ 0.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	

**2.2 提取工艺正交试验** 由于临床用药为水煎,且方中大部分有效物质均有一定水溶性,为保持与临床药效的一致性,本实验以水为提取溶媒。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法试验,对全方进行提取次数(A)、加水量(B)、提取时间(C)的考察,优选水提取工艺条件。正交试验因素水平表见表2。

表2 坎离颗粒提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取次数/次	B 加水量/倍	C 提取时间/min
1	1	6	30
2	2	8	45
3	3	10	60

各指标综合评分的权重系数根据其与本方功能主治相关性大小来确定,分别为黄芪甲苷20%、芍药苷15%、总皂苷35%、总生物碱30%。

按处方各饮片组成比例称取各饮片,每份75 g,共9份,分别取表3试验组样品,煎煮前每份均加入设计量的水浸泡45 min。按设计的提取时间、提取次数进行提取,得到提取液,滤过,滤液减压浓缩并定容于100 mL量瓶中。

## 2.3 供试品溶液的制备与测定

**2.3.1 供测黄芪甲苷样品的制备** 精密量取按各提取工艺制备的浓缩液10 mL,置250 mL分液漏斗

中,加水饱和正丁醇提取3次,每次40 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次40 mL,弃氨液,正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解,定容于5 mL量瓶中,滤过,取续滤液过0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液10  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定并采用外标两点法计算黄芪甲苷的提取率。

**2.3.2 供测芍药苷样品的制备** 精密吸取按各提取工艺制备的浓缩液10 mL,置50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液过0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液10  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定并采用外标一点法计算芍药苷提取率。

**2.3.3 供测总皂苷样品的制备** 供试液为2.3.1项下的样品。精密吸取各供试品溶液0.1 mL于10 mL具塞试管中,置水浴上蒸干,分别加入新配制的5%香草醛乙酸溶液0.2 mL、高氯酸0.8 mL,摇匀,置70  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热15 min,立即置冰水浴中2 min,加入乙酸10 mL,摇匀,置分光光度计中测定,试剂作为空白,以黄芪甲苷为对照,计算总皂苷的含量。

**2.3.4 供测总生物碱样品的制备** 精密吸取按各提取工艺制备的浓缩液5 mL,用三氯甲烷萃取5次,每次10 mL,合并三氯甲烷液,减压浓缩至干,残渣用三氯甲烷溶解并定容于10 mL量瓶中,即得供试品溶液。精密吸取供试品溶液2 mL,加三氯甲烷稀释2.5倍,置分液漏斗中,加入2.5 mL pH 6.1  $\pm$  0.1的溴甲酚绿酸性染料溶液,充分振摇,静置1 h后,取三氯甲烷层溶液用分光光度计测定,试剂作为空白,以乌头碱为对照,计算总生物碱的含量。测定结果见表3,4。

表3 坎离颗粒提取工艺正交试验及结果

No.	A	B	C	D	W	X	Y	Z	I 综合评分
					黄芪甲苷 提取率/%	芍药苷 提取率/%	总皂苷 含量/%	总生物 碱含量/%	
1	1	1	1	1	0.054 7	0.468 5	0.096 7	0.010 1	1.000 0
2	1	2	2	2	0.066 6	0.720 6	0.104 7	0.010 6	1.168 0
3	1	3	3	3	0.092 7	0.792 8	0.159 3	0.010 9	1.493 1
4	2	1	2	3	0.087 0	0.719 8	0.157 3	0.011 8	1.468 4
5	2	2	3	1	0.103 6	1.185 0	0.163 3	0.012 8	1.729 4
6	2	3	1	2	0.107 3	1.048 8	0.164 7	0.014 2	1.746 0
7	3	1	3	2	0.087 3	1.384 4	0.188 0	0.010 1	1.742 8
8	3	2	1	3	0.133 5	0.942 1	0.188 7	0.012 3	1.838 1
9	3	3	2	1	0.141 7	1.008 3	0.214 0	0.010 9	1.939 2
$K_1$	3.661 1	4.211 2	4.584 1	4.668 6					
$K_2$	4.943 8	4.735 5	4.575 6	4.656 8					
$K_3$	5.520 1	5.178 3	4.965 3	4.799 6					
R	1.859 0	0.967 1	0.389 7	0.142 8					

注:  $I = (W_i/W_1) \times 20\% + (X_i/X_1) \times 15\% + (Y_i/Y_1) \times 35\% + (Z_i/Z_1) \times 30\%$ 。

表 4 方差分析

误差来源	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A	2	0.301 9	144	<0.01
B	2	0.078 1	37	<0.05
C	2	0.016 5	8	>0.05
误差	2	0.002 1		

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

由表 3 可看出,综合评分数据的极差大小显示各因素作用主次为  $A > B > C$  (提取次数 > 加水量 > 提取时间)。表 4 方差分析结果表明,因素 A (提取次数)对提取效果的影响具有极显著意义,因素 B (加水量)对提取效果的影响具有显著意义。综合直观分析与方差分析的结果确定最佳提取工艺条件为  $A_3B_3C_2$ ,即全方饮片加 10 倍量的水,提取 3 次,每次提取 45 min,提取前先浸泡 45 min。

**2.4 优选工艺验证实验** 为考察上述优选工艺的重现性,对提取工艺条件  $A_3B_3C_2$  进行工艺验证试验。按处方比例称取各饮片 75 g,共 3 份,提取,所得提取液浓缩至 100 mL,分别依法测定,结果见表 5。

表 5 优选工艺验证试验

No	提取率/%			
	黄芪甲苷	芍药苷	总皂苷	总生物碱
1	0.141 4	0.989 2	0.216 0	0.011 7
2	0.140 4	1.056 2	0.232 7	0.010 8
3	0.142 8	0.977 1	0.230 7	0.011 4
平均值	0.141 5	1.007 5	0.226 5	0.011 3

由表 5 可见,按优选工艺进行提取,指标性成分黄芪甲苷、芍药苷、总皂苷、总生物碱的含量均取得较理想的结果。表明该工艺合理、稳定可行。

### 3 讨论

多指标成分定量分析优选中药复方提取工艺是提高中药复方制剂质量一个重要方法,但要得出一个合理的评价标准,就必须考虑到提取条件的设计和指标间的一致性以及各指标之间的协调问题,这就必须针对指标间的重要性差异给出权重,综合评分后再进行分析。设置各指标的权重,需根据具体情况具体分析。本方为 10 味药组成的大复方,成分复杂,为使其工艺可控、稳定,采用多指标综合评分来优化提取工艺路线。指标的选择和综合评分的权

重比例是根据其药理作用与抗心衰的相关性大小以及其在制剂中含量多少来决定的。君药黄芪中的黄芪甲苷可能为抗心衰的有效成分<sup>[3-5]</sup>,且有一定量时效关系,同时该成分为 2010 年版《中国药典》中黄芪药材的含测指标,专属性强,且药效具有代表性,故其占综合评分的权重为 20%。芍药苷是白芍中的主要药效成分。药理研究发现,芍药苷可通过增加冠脉流量,增加氧的供应,降低心肌耗氧量,改善心脏血流动力学状态,保护心肌缺血<sup>[6]</sup>,故其占综合评分的权重为 15%。方中黄芪、三棱、白芍、麦冬均含皂苷,且有相关的药理作用,总皂苷含量在制剂中的量也较大,相应对制剂的治疗作用贡献较大,故其占综合评分的权重为 35%。总生物碱,方中附子、莪术等均含生物碱,且文献报道生物碱具有强心作用<sup>[7]</sup>,故其占综合评分的权重为 30%。通过采用综合评分的方差分析,优选出的提取工艺更具有科学性和合理性,对提取工艺的研究有着积极的指导意义,也是进行工艺筛选评价的一个可行模式。

### [参考文献]

- [1] 江燕,晁若冰. 黄芪药材中黄芪甲苷和总皂苷含量的比较[J]. 华西药学杂志,2007,22(3):322.
- [2] 李孝栋,李程勇,杨志琦,等. 酸性染料比色法测定附子理中片中总生物碱含量[J]. 福建中医学院学报,2007,17(6):25.
- [3] Li Z P, Cao Q. Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002,23(10):898.
- [4] 李自普,曹倩,庞秀英. 缺血大鼠心肌胶原和心功能改变与黄芪皂甙 IV 的量效和时效关系[J]. 中国临床康复,2005,9(23):207.
- [5] 林毅,宁险峰,于文,等. 黄芪皂苷 IV 对急性心肌梗死大鼠心肌胶原含量的影响[J]. 中国药理学杂志,2008,43(11):833.
- [6] 刘玉娥,冯巧巧,张岫美,等. 芍药苷对正常麻醉开胸犬血流动力学及心肌耗氧量的影响[J]. 药物分析杂志,2007,27(9):1390.
- [7] 张卫东,韩公羽,梁华清,等. 国内外对中药附子成分与活性的研究[J]. 药学实践杂志,1996,14(2):91.

[责任编辑 全燕]