

## 正交试验优选心衰宁合剂水提工艺

张建玲, 贺祝英, 吴红梅

(贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001)

**[摘要]** 目的: 优选心衰宁合剂的最佳水提工艺。方法: 以人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 含量和浸膏得率为考察指标, 采用正交试验优选出最佳水提工艺。结果: 心衰宁合剂最佳水提工艺为第1次加12加倍量水, 第2, 3次分别加10倍量水, 共煎煮3次, 每次1 h。结论: 该水提取工艺设计合理, 人参皂苷提取率高, 稳定可行, 方法可重复操作, 可为心衰宁合剂的研制提供理论和试验基础。

**[关键词]** 心衰宁合剂; 水提工艺; 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0030-04

## Study on Optimizing Technological Condition of Water Extraction for Xinshuaining Mixtures by Orthogonal Design

ZHANG Jian-ling, HE Zhu-ying, WU Hong-mei

(First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the water extraction process of Xinshuaining Mixtures. **Method:** Orthogonal design was used to select the water extraction process of Xinshuaining Mixtures with the content of ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Re, ginsenoside Rb<sub>1</sub> and the yield of extract as the investigating index. **Result:** The best water extraction process of Xinshuaining Mixtures was: the first time adding 12 folds water, adding 10 folds water for second and third times, decocting 1 h for 3 times. **Conclusion:** The established technology was

**[收稿日期]** 20101125(003)

**[第一作者]** 张建玲, 主任药师, 研究方向: 中药制剂及质量标准, Tel: 0581-8612596, E-mail: 249550525@qq.com

成分为指标进行工艺筛选必然会造成结论误判; 而在成分不明的情况下, 采用主要药效学来筛选工艺更能保证药效。

人及灵长类或鸟类、陆生爬行类(蛭、蚯蚓)体内没有尿酸酶, 尿酸直接排出体外; 而在其他哺乳类体内存在尿酸酶, 尿酸由尿酸酶氧化为尿素后排出体外。通过灌胃给予雄性小鼠尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾, 可以抑制小鼠体内尿酸酶的活性, 导致小鼠体内尿酸浓度升高, 从而成功制造高尿酸血症小鼠模型。

本试验只是对痛风定颗粒提取工艺的初步筛选, 并未设定高、中、低剂量组, 以后的研究中还将结合得膏量、君臣药有效成分的含量等对痛风定颗粒

的提取工艺进一步优化。

### [参考文献]

- [1] 张忠辉. 痛风与高尿酸血症的进展[J]. 重庆医学, 2007, 36(10): 985.
- [2] 袁碧和. 尿酸检测对痛风诊断的评价[J]. 现代医药卫生, 2005, 21(13): 1718.
- [3] 王丹, 张三印, 代勇, 等. 高尿酸血症及痛风动物模型研究概况[J]. 山东中医杂志, 2008, 27(8): 573.
- [4] 崔宝印, 李亚红. 改良血清尿酸微量测定法及正常参考值[J]. 中国人民解放军军医进修学院学报, 1981, 2(2): 178.

[责任编辑 全燕]

reasonable, feasible and reproducible. It can be used for the development of Xinshuaining Mixtures to provide theoretical and experimental basis.

[Key words] Xinshuaining Mixtures; water extraction process; ginsenoside Rg<sub>1</sub>; ginsenoside Re; ginsenoside Rb<sub>1</sub>; orthogonal experiment

心衰宁合剂是贵阳中医学院第一附属医院心内科诸位专家以中医药理论为基础,遵循中医辨证配伍的原则,用于治疗各种慢性心力衰竭以及辅助治疗急性心衰的经验方,本方由红参、白附片,黄芪,丹参,益母草,红花,玉竹和炙甘草等 8 味中药组成,具有温阳益气、活血利水之功效。长期以来临床以汤剂给药,疗效确切,未发生毒副作用,但由于汤剂煎煮、携带、服用不方便,将其研制成合剂,既保持了汤剂的综合疗效,又解决了汤剂带来的不变。本研究以人参皂苷的含量和浸膏得率为考察指标,采用正交试验优选心衰宁合剂最佳水提工艺条件。

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括四元泵,自动进样器,VWD 检测器,柱温箱,Agilent 1100 中文化学工作站;METLER TOLEDO AB265-S 电子分析天平等。

药材来自贵阳中医学院第一附属医院药剂科,经贵阳中医学院贺祝英教授鉴定均为正品,符合 2005 年版《中国药典》标准;人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110703-200425, 110754-200421, 110704-200420);水为自制重蒸馏水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 人参皂苷的含量测定<sup>[1-2]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Agilent SB C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相 A(乙腈)-B(水)梯度洗脱, 0~35 min(A:19%), 35~50 min(A:19%~28%), 50~80 min(A:28%), 80~100 min(A:28%~40%),柱温 25℃,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取人参皂苷对照品 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 适量,加甲醇制成含人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(1.236 5 g·L<sup>-1</sup>), Re(0.658 8 g·L<sup>-1</sup>), Rb<sub>1</sub>(1.139 2 g·L<sup>-1</sup>)的混合对照品溶液,摇匀,即可。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 从定容至 100 mL 的水提液中精密吸取 20 mL,置分液漏斗中,三氯甲烷洗

脱 2 次,每次 30 mL,弃去三氯甲烷层,药液加水饱和的正丁醇提取 5 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,氨试液(正丁醇饱和的水配制)洗脱 2 次,每次 80 mL,正丁醇液水浴挥干,残渣甲醇溶解,定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,滤过(0.45 μm),续滤液作为供试品溶液。

**2.1.4 标准曲线的制备** 精密吸取上述对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0 μL,进样,按上述色谱条件测定峰面积。以色谱峰面积积分值(Y)为纵坐标,人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 对照品进样量(X)为横坐标,进行线性回归,得回归方程  $Y_g = 263.23X + 11.456$  ( $r = 0.9999$ );  $Y_e = 228.46X + 20.28$  ( $r = 0.9995$ );  $Y_b = 190.17X + 30.327$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 在 2.473 0~14.838 μg、人参皂苷 Re 在 1.317 6~7.905 6 μg、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 在 2.278 4~13.670 4 μg 呈良好的线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液 10.0 μL,按 2.1.1 色谱条件连续进样 5 次,分别测定峰面积。结果人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 的 RSD 分别为 0.33%, 0.52%, 1.89%,表明仪器的精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 供试品溶液在室温下放置,分别在 0, 5, 10, 15, 20, 25 h,进样 10.0 μL,按 2.1.1 色谱条件,测定人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 峰面积, RSD 分别为 1.37%, 1.73%, 2.20%。表明供试品溶液在 25 h 内稳定。

**2.1.7 加样回收率试验** 取已知人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 含量的供试品溶液 5 份,每份约 5 mL,精密量取,分别精密加入一定量的人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对照品溶液,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1.1 色谱条件测定。结果人参皂苷 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 平均回收率分别为 96.96%, 97.74%, 98.60%, RSD 分别为 1.33%, 1.74%, 2.81% ( $n=5$ ),见表 1-3。

**2.1.8 含量测定** 精密吸供试品溶液,按 2.1.1 色谱条件测定,测定人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 的含量。结果见表 5。

### 3.1 水提工艺研究

表 1 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 加样回收率

样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
2.733 0	1.236 5	3.931 1	96.89
2.733 0	1.236 5	3.938 6	97.50
2.733 0	1.236 5	3.927 1	96.57
2.733 0	2.473 0	5.086 6	95.17
2.733 0	3.709 5	6.394 0	98.69

表 2 人参皂苷 R<sub>e</sub> 加样回收率

样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%
0.605 0	0.658 8	1.249 6	97.84
0.605 0	0.658 8	1.241 0	96.54
0.605 0	0.658 8	1.267 7	100.59
0.605 0	1.317 6	1.887 3	97.32
0.605 0	1.976 4	2.510 5	96.41

表 3 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 加样回收率

样品中含量 /mg	加入含量 /mg	测得含量 /mg	回收率 /%
1.828 5	1.139 2	2.914 4	95.32
1.828 5	1.139 2	2.930 8	96.76
1.828 5	1.139 2	2.948 6	98.32
1.828 5	2.278 4	4.158 3	102.25
1.828 5	3.417 6	5.258 9	100.37

表 4 水提工艺因素和水平

水平	A 加水量/倍	B 煎煮时间/h	C 提取次数/次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

3.1.1 正交试验及结果 所用药材均为饮片,选择加水量、煎煮时间、提取次数,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)进行正交设计试验,以人参皂苷的含量和浸膏得率为考察指标,优选心衰宁合剂最佳水提工艺。因素和水平见表 4;正交实验结果见表 5;方差分析结果见表 6。

由表 5,6 可知:影响心衰宁合剂水提工艺的因素顺序为 C(提取次数) > A(加水量) > B(提取时

间),因素 A 以 3 水平时最佳,因素 B 以 2 水平时最佳,因素 C 以 3 水平时最佳。各因素对试验影响提示,因素 C 对试验结果有极显著影响,因素 A 对试验结果有显著影响。由此得到最佳组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即加水量 12 倍,1.5 h,3 次。因素 B 为不显著因素,考虑到节约能源,降低生产成本,拟采用提取工艺为 A<sub>3.2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3.0</sub>。

表 5 水提工艺正交实验

No.	A	B	C	D	干膏量/%	R <sub>g<sub>1</sub></sub> /%	R <sub>e</sub> /%	R <sub>b<sub>1</sub></sub> /%	综合评价
1	1	1	1	1	17.5	0.085 1	0.051 4	0.061 6	43.2
2	1	2	2	2	28.1	0.132 8	0.054 0	0.113 5	66.1
3	1	3	3	3	32.9	0.118 1	0.068 4	0.112 3	70.1
4	2	1	2	3	28.5	0.135 0	0.061 4	0.125 3	69.5
5	2	2	3	1	36.5	0.161 0	0.081 9	0.167 2	91.6
6	2	3	1	2	19.7	0.066 3	0.037 7	0.061 6	39.6
7	3	1	3	2	35.7	0.193 2	0.080 7	0.182 7	97.6
8	3	2	1	3	24.0	0.125 4	0.051 7	0.096 5	58.8
9	3	3	2	1	30.8	0.163 2	0.089 5	0.167 6	90.5
K <sub>1</sub>	59.8	70.1	47.2	75.1					
K <sub>2</sub>	66.9	72.2	75.4	67.8					
K <sub>3</sub>	82.3	66.7	86.4	66.1					
R	22.5	5.5	39.2	9.0					

注:干浸膏得率评分 = 干膏率 × (20/最大得膏率) × 100%;人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 含量评分 = 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 含量 × (20/最大人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 含量) × 100%;人参皂苷 R<sub>e</sub> 含量评分 = 人参皂苷 R<sub>e</sub> 含量 × (20/最大人参皂苷 R<sub>e</sub> 含量) × 100%;人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 含量评分 = 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 含量 × (40/最大人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 含量) × 100%;综合评分 = 干浸膏得率评分 + 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 含量评分 + 人参皂苷 R<sub>e</sub> 含量评分 + 人参皂苷 R<sub>b<sub>1</sub></sub> 含量评分。

表6 水提工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	793.82	2	396.91	5.80	<0.05
B	45.13	2	22.57	0.33	
C	2455.09	2	1227.55	17.94	<0.01
D(误差)	136.85	2	68.42		

$$F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.01}(2,2) = 99.0。$$

**3.1.2 对比试验** 取处方量 2/1 的药材 6 份,工艺  $A_3B_2C_3$  与  $A_{3,2}B_1C_3$  各 3 份,对比试验,以人参皂苷的含量和浸膏得率的平均值进行对比,结果见表 7。

表7 工艺  $A_3B_2C_3$  与  $A_{3,2}B_1C_3$  的对比试验

样品	干浸膏量 /%	人参皂苷 $R_{g_1}$ /%	人参皂苷 $R_e$ /%	人参皂苷 $R_{b_1}$ /%
$A_3B_2C_3$	34.37	0.1903	0.0789	0.1815
$A_{3,2}B_1C_3$	33.92	0.1882	0.0760	0.1837

结果显示:工艺  $A_3B_2C_3$  与  $A_{3,2}B_1C_3$  人参皂苷的含量和浸膏得率无显著性差异。

**3.1.3 水提工艺的验证试验** 按处方比例称取药材,对上述正交试验所得水提工艺进行验证,重复 3 次提取验证试验。结果见表 8。

表8 水提工艺的验证试验 %

No.	干浸膏量	人参皂苷 $R_{g_1}$	人参皂苷 $R_e$	人参皂苷 $R_{b_1}$
1	33.75	0.1904	0.0795	0.1795
2	34.06	0.1873	0.0772	0.1824
3	34.05	0.1925	0.0811	0.1806

结果表明  $A_{3,2}B_1C_3$  水提取工艺条件合理,具有可操作性,为最佳水提工艺。由此心衰宁合剂水提

工艺为第 1 次加 12 加倍量水,第 2、第 3 次加 10 倍量水,煎煮 3 次,每次 1 h。

### 3 讨论

心衰宁合剂方中红参为君药,现代药理学研究表明<sup>[3]</sup>人参的主要药理活性物质之一为人参皂苷,它们均能有效地改善血流动力学,尤其是人参皂苷  $R_e$  作用最强,具有胺碘酮样作用,因此在考虑工艺指标时,以人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$  作为工艺研究的优化指标。从试验数据可见,并非水平数越高,干浸膏量和人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_e$ ,  $R_{b_1}$  就越高。中药成分的提取是一个综合过程,需考虑多方面的因素综合作用。

应用多指标评分法时设置指标的权重,需要根据具体情况具体分析。本试验中人参皂苷为有效成分将其权重系数均设为 0.6,而浸膏得率的大小对临床疗效的影响没有人参皂苷重要,故将其权重系数设为 0.4。

心衰宁合剂水提工艺研究结果表明,提取次数对指标成分具有显著影响,是提取工艺中重要影响因素。经重复试验验证,表明该方法用于心衰宁合剂提取工艺简单,重复性好,具有可操作性。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2005:105.
- [2] 杜佳新,顾玉红,李萌. HPLC 法同时测定益新舒胶囊中人参皂苷  $R_{g_1}$ 、 $R_e$ 、 $R_b$  的含量的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):88.
- [3] 马春. 抗心律失常中药及活性成分研究[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(6):957.

[责任编辑 仝燕]