

正交试验法优选转输颗粒提取工艺

高珊¹, 陈占科¹, 王淑美², 梁生旺^{2*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选转输颗粒的最佳提取工艺。方法: 以人参总皂苷, 甘草总黄酮及总多糖含量的加权和为定量指标, 按正交表 $L_9(3^4)$ 安排试验, 对影响提取效率的 4 个因素进行考察。结果: 优选出的提取工艺为加 10 倍量 30% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1.5 h。结论: 优选工艺设计合理、结果稳定, 可为转输颗粒的工业化生产提供理论依据。

[关键词] 转输颗粒; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0040-04

Optimization of Extraction Technology of Zhuanshu Granules by Orthogonal Experiment

GAO Shan¹, CHEN Zhan-ke¹, WANG Shu-mei², LIANG Sheng-wang^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction technology of Zhuanshu Granules. **Method:** $L_9(3^4)$ table was used to examine the effects of the 4 factors, and the weighted sum of the content of ginsenoside, total flavones in Licorice and total polysaccharides were determined by orthogonal test. **Result:** The optimal extraction process was as follows: 10 times of 30% alcohol was added and reflux extraction was performed 3 times for 1.5 h each time. **Conclusion:** The optimized extraction process was reasonable in design, stable in results and can provide theoretic support for industrialization of Zhuanshu Granules.

[Key words] Zhuanshu Granules; extracting technology; orthogonal experiment

转输颗粒是由人参、白术、甘草等 6 味中药材制成的中药复方制剂, 具有补气养血, 补脾养心, 安神等功效, 临床上用于脏躁症, 更年期抑郁症的治疗, 效果显著。本文根据方中药材的有效成分的性质, 采用正交试验法确定了该复方中药材的最佳提取方法。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(美国 Waters); ODS C_{18} 柱(迪马 Diamonsil); UV-2450 SHIMADZU 紫外-可见分光光度计(日本岛津)。

试验中所用的 6 味药材均购于广州市致信药材行, 经广东药学院中药学院刘基柱教授鉴定为正品。人参皂苷 Rg₁ (中国药品生物制品检定所, 批号 110703-200425)、人参皂苷 Re (中国药品生物制品检定所, 批号 110753-200320)、人参皂苷 Rb₁ (中国药品生物制品检定所, 批号 110704-200420)、葡萄糖(中国药品生物制品检定所, 批号 110833-200503)、甘草苷(中国药品生物制品检定所, 批号 111610-200604)。乙腈为色谱纯; 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 人参、白术、甘草等药材的提取工艺研究, 拟考察因素包括提取溶剂(A)、料液比例(B)、提取时间(C)、提取次数(D); 对人参总皂苷, 甘草总黄酮及总多糖 3 种指标性成分含量进行

[收稿日期] 20100919(004)

[第一作者] 高珊, 在读硕士生, 从事药物质控制与新药研发,
Tel: 18998490558, E-mail: 59101555@163.com

[通讯作者] * 梁生旺, 教授, 硕士生导师, 从事药物质量控制
与新药研发, E-mail: swliang371@163.com

综合加权评分,人参总皂苷权重系数为 0.6,甘草总黄酮、总多糖权重系数均为 0.2,按 $L_9(3^4)$ 表进行试验。因素和水平见表 1。

表 1 转输颗粒提取工艺因素水平表

水平	A 溶剂	B 乙醇 用量/倍	C 提取 时间/h	D 提取 次数/次
1	水	8	1	2
2	30% 乙醇	10	1.5	2
3	50% 乙醇	12	2	3

2.2 试验方法 按转输颗粒 1/8 倍处方量称取选净干燥的人参、白术、甘草等 6 味药材共计 156 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行提取,提取液合并,浓缩,过滤,定容至 200 mL 备用。正交试验结果见表 2;方差分析结果见表 3。

2.3 指标的测定方法^[1]

2.3.1 人参总皂苷含量测定^[2] 色谱条件:以 Diamonsil C_{18} 为分析柱;以 A(乙腈) B(0.1% 磷酸水) 为流动相,梯度洗脱,0 ~18 min (19% A, 81% B), 18 ~60 min (19% A ~23% A, 81% B ~77% B), 60 ~65 min (23% A, 77% B), 65 ~90 min (23% A ~40% A, 77% B ~60% B), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 检测波长 203 nm。

对照品溶液的制备:分别称取人参皂苷 R_g 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_b_1 对照品各 10 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成含人参皂苷 R_g 、人参皂苷 R_b_1 、人参皂苷 R_e 分别为 $0.402, 0.426, 0.417 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照液。

供试品溶液的制备:精密量取 10 mL 上述提取液,用三氯甲烷萃取 2 次,每次 20 mL,取水层,用水饱和正丁醇萃取 5 次(15, 15, 15, 10, 10 mL),合并正丁醇层,用 1% NaOH 溶液洗涤 2 次,每次 30 mL,正丁醇饱和的水 20 mL 洗涤 1 次,挥干正丁醇,残渣加适量甲醇溶解并移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过即得。

标准曲线制备:精密吸取人参皂苷混合对照品 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 溶液注入高效液相色谱仪中,以峰面积积分值为纵坐标,以进样量为横坐标计算回归方程,人参皂苷 R_g : $Y = 269\,459X - 26\,770$, $r = 0.999\,9$, 在 $0.804 \sim 8.04 \mu\text{g}$ 与峰面积积分值呈良好线性关系;人参皂苷 R_e : $Y = 213\,196X - 22\,946$, $r = 0.999\,9$, 在 $0.852 \sim 8.52 \mu\text{g}$ 与峰面积积分值呈良好的线性关系;人参皂苷 R_b_1 : $Y = 164\,550X +$

$1\,019.9$, $r = 0.999\,6$, 在 $0.834 \sim 8.34 \mu\text{g}$ 与峰面积积分值呈良好线性关系。

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,每间隔 2 h 进行测定,共 6 次,结果表明,人参皂苷 R_g 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_b_1 在 12 h 内积分值基本稳定。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL 连续进样 5 次进行测定,结果人参皂苷 R_g 的 RSD 0.83%, 人参皂苷 R_e 的 RSD 0.69%, 人参皂苷 R_e 的 RSD 1.27%, 表明方法精密度良好。

重复性试验:精密吸取同一提取液,5 份,按供试品溶液方法处理后测定,结果人参皂苷 R_g 的 RSD 0.90%, 人参皂苷 R_e 的 RSD 1.19%, 人参皂苷 R_g 的 RSD 1.60% 表明本法重复性良好。

加样回收率试验:取已知浓度的提取液 5 份,精密加入人参皂苷 R_g 、 R_e 和 R_b_1 对照品适量,按供试品溶液方法制备,进样测定,计算回收率,结果得平均回收率为 99.18%, RSD 1.35%。

2.3.2 甘草总黄酮含量测定^[3] 对照品溶液的制备:精密称取甘草苷对照品 11.28 mg,置 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇适量溶解,并加蒸馏水定容至刻度,得 $0.451 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

标准曲线的制作:分别吸取甘草苷对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 及 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加蒸馏水至 1.0 mL,加入 10% KOH 溶液 0.5 mL,摇匀,显色 5 min,加蒸馏水至刻度,放置 5 min 后测定,横坐标为甘草苷含量,纵坐标为吸光度值,得标准曲线 $Y = 0.032\,8X - 0.011$, $r = 0.999\,5$ 。线性范围: $4.51 \sim 45.1 \mu\text{g}$ 。

供试品溶液的制备及测定:精密量取提取液 0.3 mL,置于 10 mL 容量瓶中,加蒸馏水至 1 mL,加入 10% KOH 溶液 0.5 mL,摇匀,显色 5 min,加蒸馏水至刻度,放置 5 min 后测定;另取等量提取液于 10 mL 量瓶中加水至刻度,作为空白对照液,于 400 nm 处测定吸光度,算得甘草总黄酮含量。

精密度试验:精密吸取 0.4 mL 甘草苷对照品溶液,依法连续 6 次测定吸光度, RSD 0.88%, 结果表明试验精密度良好。

稳定性试验:精密吸取 0.4 mL 甘草苷对照品溶液,显色后隔 0, 10, 20, 30, 40, 60 min 时测定其吸光度, RSD 1.74%, 结果表明在 1 h 内稳定性良好。

重复性试验:精密吸取同一提取液 0.3 mL, 5

份,按上述供试品方法处理并测定, RSD 1.03%, 结果表明试验精密度良好。

加样回收率试验:取已知含量的提取液 5 份,分别精密加入适量的甘草苷对照品溶液,按供试品方法处理并测定,结果得平均回收率为 97.89%, RSD 1.66%。

2.3.3 总多糖含量测定 对照品溶液的制备:精密称取葡萄糖对照品 11.06 mg,置 100 mL 量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,得 0.1106 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

标准曲线的制作:分别吸取上述葡萄糖对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 及 1.8 mL,定容至 2.0 mL,然后加入 5% 苯酚 1 mL,沿试管壁缓缓加入浓硫酸 5.0 mL,沸水中加热恒温 15 min,摇匀,冷却 30 min 后于 490 nm 处测吸光度值,以蒸馏水按同样显色操作为空白,横坐标为总糖质量浓度,纵坐标为吸光度值,得标准曲线 $Y = 0.0086X - 0.0324$, $r = 0.9992$ 。线性范围:22.12 ~ 99.54 μg。

供试品溶液的制备及测定:精密量取提取液

1.5 mL,加入 95% 乙醇,使含醇量达 80%,于冰箱中静置过夜,沉淀用无水乙醇洗涤至洗出液无色,挥干乙醇,用蒸馏水溶解,于 250 mL 量瓶中定容。精密吸取 0.3 mL 上述溶液于 10 mL 具塞试管中,加水至 1 mL,精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL,再精密加入硫酸溶液 5 mL,摇匀,置 100 °C 水浴中加热 15 min,取出室温下冷却 30 min。同法制得空白对照液。于 490 nm 处测定吸光度,算得多糖的质量浓度。

精密度试验:精密吸取 1.0 mL 葡萄糖对照品液,依法连续 6 次测定吸光度, RSD 1.27%。

稳定性试验:精密吸取 1.0 mL 葡萄糖对照品液,水解显色后隔 0, 10, 20, 30, 60, 120 min 时测定其吸光度, RSD 1.56%,结果表明在 2 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一提取液 5 份,按上述供试品方法处理并测定, RSD 1.87%。

加样回收率试验:取已知含量的提取液 5 份,分别精密加入适量的葡萄糖对照品溶液,按供试品方法处理并测定,结果得平均回收率为 98.96%, RSD 1.16%。

表 2 转输颗粒提取工艺正交试验安排及结果

No	A	B	C	D	a 人参总皂苷 /mg·g ⁻¹	b 甘草总黄酮 /mg·g ⁻¹	c 总多糖 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	1	1	1	1	0.552	0.402	59.231	67.32
2	1	2	2	2	0.566	0.447	99.719	77.50
3	1	3	3	3	0.704	0.465	102.735	89.95
4	2	1	2	3	0.719	0.713	92.837	95.57
5	2	2	3	1	0.621	0.694	75.375	83.56
6	2	3	1	2	0.598	0.671	88.904	83.73
7	3	1	3	2	0.685	0.752	41.805	84.40
8	3	2	1	3	0.727	0.786	45.677	88.89
9	3	3	2	1	0.671	0.723	37.434	81.06
K ₁	78.257	82.430	79.980	77.314				
K ₂	87.621	83.320	84.713	81.879				
K ₃	84.786	84.914	85.971	91.470				
R	9.363	2.48	5.991	14.156				

注: a、b、c 最大值相对于 100, 按比例折算其他数值, 按公式 $X = 0.6a + 0.2b + 0.2c$ 得试验结果 X 值

2.4 结果 经方差分析和直观分析, 各因素影响人参总皂苷、甘草总黄酮及总多糖质量浓度的程度大小为 $D > A > C > B$, 最佳工艺为 $A_2 B_3 C_3 D_3$ 。但结合实际生产, 从节省能源、缩短生产周期等角度综合考虑, 选择工艺条件为 $A_2 B_2 C_2 D_3$, 即加 10 倍量 30% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1.5 h。

表 3 综合评分方差分析结果

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	138.316	2	69.158	14.557	
B(误差)	9.502	2	4.751	1.000	
C	59.841	2	29.92	6.298	
D	313.267	2	156.634	32.969	< 0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$

2.5 验证试验 按上述确定的工艺条件,进行验证试验,测得人参总皂苷,甘草总黄酮,总多糖的含量,详见表4,经3次验证试验表明,此工艺稳定、重现性和可操作性好。

表4 提取验证试验结果

批次	人参总皂苷 /mg·g ⁻¹	甘草总黄酮 /mg·g ⁻¹	总多糖 /mg·g ⁻¹	综合 评分	RSD /%
1	0.704	0.706	92.042	93.98	
2	0.722	0.712	92.255	95.66	0.90
3	0.710	0.718	93.533	95.07	

3 讨论

处方中人参中的人参皂苷及甘草中的黄酮类成分具有抗抑郁的作用^[5];处方药物含大量多糖类成分,具有调节免疫,清除自由基,抗氧化,抗老等活性,以上活性作用可辅助治疗抑郁症^[6]。因此本研究选用人参总皂苷、甘草总黄酮及总多糖作为本方提取工艺的考察指标,科学合理。

本研究曾经对人参单煎及人参与其他处方药物混合回流提取2种方法进行比较,结果显示,单煎液及混合提取液中人参总皂苷的转移率分别为92.55%,90.89%,无显著差异,且采用人参与其他药物混合回流提取的方法,工艺简便,节省能源、人力,更适用于实际生产。

采用紫外-可见分光光度法测定甘草苷含量来控制提取液中甘草总黄酮含量,经方法学考察,稳定性,重复性等均较理想,且操作简单,适用于本处方的质量控制。

在甘草总黄酮含量测定操作过程中,样品及对照品停止显色,即加蒸馏水定容至10 mL后,5 min内溶液吸光度逐渐增大,5 min后趋于稳定。因此,本实验采用溶液停止显色后放置5 min测定,有别于其他文献报道的停止显色后立即测定。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:附录VA,附录VID.
- [2] 杨红艳,夏新华.RP-HPLC测定脑得生片中4种皂苷的含量[J].亚太传统医药,2008,4(5):38.
- [3] 陈丽华,徐德生,冯怡,等.UV法测甘草黄酮微丸含量[J].药物分析杂志,2009,29(1):128.
- [4] 余凌英,吴俊梅.抗焦虑颗粒提取工艺研究[J].成都中医药大学学报,2009,32(2):78.
- [5] 姚李吉,沈洪.抗抑郁中医方药的实验研究进展[J].光明中医,2008,23(5):696.
- [6] 毛庆秋,黄真.中药治疗抑郁症的作用机制研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(10):877.

[责任编辑 全燕]