

•制剂工艺•

正交试验法优选玉屏风总苷的提取工艺

高建^{1,2}, 李俊^{2*}, 麻兵继³, 程文明², 金涌², 吕雄文², 闫晨², 王建青², 邵旭⁴, 葛少祥⁴
(1. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽合肥 230022; 2. 安徽医科大学药学院, 安徽合肥 230032;
3. 中科院昆明植物所, 云南昆明 6502042; 4. 合肥七星医药科技有限责任公司, 安徽合肥 230088)

[摘要] 目的: 优选玉屏风散中有效部位-玉屏风总苷(TGYPF)的提取工艺。方法: 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 采用HPLC-ELSD法测定黄芪甲苷的含量作为质控指标, 考察乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)和提取次数(D)4个因素对玉屏风总苷(TGYPF)提取的影响, 优化提取工艺。结果: 最佳提取条件为: $A_2B_3C_3D_2$, 即80%乙醇, 8倍量, 提取2次, 每次3h。结论: 该提取工艺稳定性和重现性良好, 简便, 快速, 可行。

[关键词] 玉屏风总苷; 正交试验; 提取; 黄芪甲苷

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0015-03

Study on the Extraction Process for Total Glucosides of Yupingfeng with Orthogonal Design

GAO Jian^{1,2}, LI Jun^{2*}, MA Bin-ji³, CHENG Wen-ming², JIN Yong², LV Xiong-wen²,
YAN Chen², WANG Jian-qing², SHAO Xu⁴, GE Shao-xiang⁴

(1. Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Anhui Hefei 230022, China;
2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Anhui Hefei 230032, China;
3. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Yunnan Kunming 6502042, China;
4. Hefei Seven Star Medicine and Technology Co. Ltd, Anhui Hefei 230088, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimized extraction process of total glucosides of Yu Ping Feng(TGYPF), one of the effective parts of Yupingfeng. **Methods:** By use of orthogonal experimental design $L_9(3^4)$, four factors that may effect the extraction had been studied, including alcoholic concentration, alcoholic volume, extracting time and times. And the content of astragaloside IV had been developed as its quality standard, screening out the best method of extraction conditions. **Results:** The best extracting technical conditions were as follows: 8 times amount of 80% EtOH, extracting solvent to reflux for 3 hour and 2 times. **Conclusion:** The optimized process is simple, fast and feasible, with its stability and repeatability are good respectively.

[Key words] total glucosides of Yupingfeng; orthogonal test; extraction; astragaloside IV

玉屏风散出自《世医得效方》,由黄芪、白术和防风3味药组成,功能益气固表止汗,主治表虚自

汗^[1]。本方在临床上长期应用证明其疗效好、毒副作用小。但其尚存在药效成分不明确。服用剂量大,质量不稳定等不足。玉屏风总苷(Total Glucosides of Yupingfeng, TGYPF)是从中药复方玉屏风散中提取的苷类活性成分,而黄芪系该复方的君药,现代研究表明,黄芪甲苷为其主要活性成分之一。本研究通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对复方有效

[收稿日期] 2007-04-02

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(050431001)

[通讯作者] * 李俊, Tel: (0551) 5161001; E-mail: lijun@ahmu.edu.cn, gaojianayfy@163.com

成分的提取过程加以研究。

1 仪器与试剂

Waters 515 泵, ALLTECH ELSD 2000 蒸发光散射检测器, HS 色谱数据工作站 V4.0+ (杭州英普科技开发有限公司)。

黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 购自安徽医科大学第一附属医院中药房, 经安徽中医学院王德群教授鉴定。药材饮片经 60 °C 减压干燥 12 h 后, 打成粗粉置干燥器内备用。TGYPF 样品自制。

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所)。氯仿: 中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: 20051014。甲醇: 上海振兴化工一厂, 批号: 200503015。无水乙醇: 上海振兴化工一厂, 批号: 200504380。正丁醇: 上海滇峰化学试剂有限公司, 批号: 040819。氨水: 中国安徽宿州化学试剂厂, 批号: 20050410。乙腈为色谱纯, 双蒸水(自制), 其余试剂均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 样品含量测定^[3,4]

2.1.1 色谱条件 Kromail C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (37.5: 62.5); 流速 1 mL·min⁻¹; 理论板数 11 000; 进样量 20 μL; 漂移管温度 100 °C; N₂ 气流流速 2.80 L·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 16.26 mg 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成 1.626 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取 TGYPF 样品约 50 mg, 精密称定, 置分液漏斗中用水饱和的正丁醇 200 mL 溶解后, 用氨试液(40 → 100 mL) 提取 2 次, 每次 100 mL, 弃去氨液, 正丁醇液减压蒸干, 残渣加水 30 mL 使溶解, 放冷, 通过 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂柱(内径 2.4 cm, 长 25 cm), 以水 300 mL 洗脱, 弃去水液; 再用 300 mL 40% 乙醇洗脱, 弃去 40% 乙醇洗脱液; 继用 70% 乙醇 300 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过微孔滤膜(0.45 μm), 即得 TGYPF 样品溶液。

2.1.4 空白实验 取自制不含黄芪的空白样品, 照供试品制备方法制备, 并依法测定, 分离结果在 HPLC 图谱黄芪甲苷相应位置上没有吸收, 表明其他组分对分离结果无干扰。

2.1.5 黄芪药材样品溶液的制备 干燥黄芪粗粉, 精密称取 9.0 g, 置圆底烧瓶中加入 200 mL 正丁醇超声提取两次, 每次 45 min, 合并提取液减压回收至干, 残渣加水 50 mL 使溶解, 照供试品制备方法制备项下“置分液漏斗”操作, 即得黄芪样品溶液。

2.1.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释制成 0.813 0 g·L⁻¹ 对照品溶液——按此法依次制成 0.406 5, 0.203 3, 0.101 6 g·L⁻¹ 对照品溶液。分别进样 20 μL, 以对照品峰面积为纵坐标, 以溶液含量为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 4E + 6X - 284\ 328$, $r = 0.999$, 黄芪甲苷进样量在 (2.0~ 32.5) μg 呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度考察 精密吸取高、中、低 3 个浓度的黄芪甲苷对照品溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 以黄芪甲苷峰面积计算 RSD, 分别为 0.72%, 0.53%, 0.63%。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取 TGYPF 样品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 16 h 进样 20 μL, 记录色谱图, 以黄芪甲苷的峰面积计算 RSD, 结果为 2.2%, 表明供试品在 16 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 精密称量 TGYPF 样品 5 份, 每份样品约 50 mg。照供试品制备项下“置分液漏斗”操作测定, 结果该样品中黄芪甲苷的平均含量为 5.38%, RSD 为 1.2%, 表明重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称量已知黄芪甲苷含量的 TGYPF 样品 6 份, 每份约 50 mg。每份样品中准确加入已知量的黄芪甲苷对照品, 按供试品制备项下“置分液漏斗”操作方法制备样品并测定, 计算黄芪甲苷的平均回收率为 95.3%, RSD 为 1.6%。

2.1.11 样品含量测定 取本样品 3 批, 每批 3 份, 分别精密称定, 同供试品制备办法制备, 并依法测定, 结果见表 4。

2.2 正交实验方案设计^[5] 玉屏风散的提取工艺大多采用水提醇沉法、超声提取法、乙醇回流法。本实验结合生产实际, 以黄芪甲苷为质控指标, 以正交试验法优选乙醇回流提取的工艺条件, 并采用大孔吸附树脂分离纯化玉屏风总苷, 以求质量和得率稳定的药品。根据预实验, 对乙醇浓度(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)和提取次数(D) 4 个影响因素, 分别在 3 个水平上进行正交优选。按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 因素水平安排见表 1。取药材饮片低温烘

干后,精确称量黄芪、白术、防风(3:1:1) 120 g,按表 2 加乙酸浸泡过夜,回流提取,测定黄芪甲苷含量。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表

水平	醇浓度(%)	溶剂用量(倍)	提取时间(h)	提取次数
	/A	/B	/C	/D
1	95	4	1	1
2	80	6	2	2
3	65	8	3	3

2.3 正交试验结果分析 根据正交试验表,测定出黄芪甲苷含量,按下式计算黄芪甲苷提取率。

提取率(%) = 提取物中黄芪甲苷含量/生药中黄芪甲苷含量 × 100,结果见表 2。

表 2 正交试验结果分析表

试验号	A	B	C	D	黄芪甲苷提取率(%)
1	1	1	1	1	64.20
2	1	2	2	2	72.89
3	1	3	3	3	75.29
4	2	1	2	3	90.23
5	2	2	3	1	89.62
6	2	3	1	2	82.90
7	3	1	3	2	78.72
8	3	2	1	3	67.70
9	3	3	2	1	77.30
I	212.38	233.15	214.80	231.12	
II	262.75	230.21	240.42	234.51	
III	223.72	235.49	243.63	233.22	

对有关数据进行方差分析,结果见表 3。

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	465.452 6	2	232.726 3	283.473 6	$P < 0.005$
B	4.664	2	2.332	2.389 6	$P > 0.05$
C	166.428 6	2	83.214 3	85.269 3	$P < 0.05$
D	1.951 8	2	0.975 9	1	$P > 0.05$

$F_{0.05}(2, 2) = 19.0$; $F_{0.01}(2, 2) = 99.0$; $F_{0.005}(2, 2) = 199.0$

结果表明,玉屏风乙醇回流提取时,乙醇浓度有极显著影响。而提取次数有显著影响,乙醇用量和提取时间影响不大。各因素对测定结果的影响次序为:A> C> B> D。优选最佳提取条件为:A₂B₂C₃D₂

即 80% 乙醇,8 倍量,每次 3 h,提取 2 次。

2.4 优选提取工艺的验证实验 为进一步考察上述优选工艺的稳定性,按各种最佳条件进行重复提取 3 份玉屏风药材,每份 120 g,8 倍量 80% 乙醇浸泡过夜,回流提取 2 次(每次 3 h),分别按 2.1 项下方法制备,然后依 2.2.3 项制备方法制成供试品溶液,同上述检测方法分析黄芪甲苷提取量,结果见表 4。结果表明:黄芪甲苷平均提取率达 90.7%,RSD 为 1.8%,稳定性好。

表 4 样品含量测定及黄芪甲苷的提取量验证试验(n=3,%)

样品含量	RSD	黄芪甲苷提取率	RSD
0.41		91.1	
0.42	2.4	92.0	1.8
0.40		88.9	

3 讨论

玉屏风散为中医益气固表的经典名方,黄芪为复方的君药。本课题以传统处方为基础,通过对复方提取过程的研究,采用中药化学提取分离、精制纯化的技术和手段,首次从中分离得到复方中总的有效部位——玉屏风总苷。采用正交试验设计优选玉屏风散醇提的工艺条件,考察乙醇浓度、醇提次数、提取时间和乙醇用量对提取效果的影响。并以黄芪甲苷的含量为质控指标,经 $L_9(3^4)$ 正交试验设计筛选出复方的最佳提取条件:A₂B₃C₃D₂,8 倍量 80% 乙醇,回流提取 2 次,每次 3 h。结果表明:该提取工艺稳定性和重现性良好,科学、合理、可行。

[参考文献]

- [1] 许济群,王锦之.方剂学[M].上海:上海科技出版社,1995.128.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部,北京:化学工业出版社,2005.249-250.
- [3] 高建,李俊,童成亮,等.玉屏风散中总苷的制备及含量测定[J].中国中药杂志,2006,31(6):515-516.
- [4] 赵灵芝,朱丹妮,严永清.HPLC-ELSD 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J].药物分析杂志,1999,19(6):403-405.
- [5] 谢秀琼.中药新制剂开发与应用[M].北京:人民卫生出版社,2002.130-142.