

正交试验法优选益阴消渴滴丸提取工艺*

宋国红¹, 李卿¹, 尹小玲^{2△}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 重庆三峡中心医院, 重庆 404000)

摘要:目的 优化益阴消渴方提取工艺。方法 采用正交试验法,以葛根素为指标,考察乙醇浓度、乙醇用量、提取时间和提取次数对提取工艺的影响。结果 最佳提取工艺为乙醇用量为药材量的6倍,70%乙醇回流提取3次,第1次1.5 h,第2次及第3次1 h;验证试验结果表明,葛根素含量分别为0.846%,0.851%,0.848%,RSD为0.30%(n=3)。结论 该优化的提取工艺条件稳定可行,重复性好,适用于该制剂的工业化生产。

关键词:益阴消渴滴丸;正交试验;葛根素;工艺优化

中图分类号:R932;R284.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)03-0022-03

Optimum Extraction Process of Yiyin Xiaoke Dropping Pills by Orthogonal Test

SONG Guohong¹, LI Qing¹, YIN Xiaoling²

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing, China 400065; 2. Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Yiyin Xiaoke Recipe. **Methods** With puerarin as the index, the effects of ethanol concentration, ethanol dosage, extraction time, extraction times on the extraction process were optimized by the orthogonal test.

Results The optimized extraction process was as follows: the amount of ethanol was 6 times as much as that of medicinal herbs, 70% ethanol was refluxed for 3 times, the first time was 1.5 h, the second time was 1 h, and the third time was 1 h. The results of the verification test showed that the content of puerarin was 0.846%, 0.851%, 0.848%, and RSD was 0.30% (n=3). **Conclusion** The optimized extraction conditions are stable, feasible and reproducible, which are suitable for the industrial production of the preparation.

Key words: Yiyin Xiaoke Dropping Pills; orthogonal test; puerarin; process optimization

益阴消渴原剂型为胶囊剂,功能主治为益气养阴、清热生津,用于气阴不足所致消渴及2型糖尿病见上述证候者。由于原制剂中有效成分葛根素在水中溶解度较差,口服后吸收缓慢,选用的普通胶囊制剂采用部分药物粉碎后直接入药的方式,影响其临床疗效的发挥和患者的顺应性。本研究中采用先进提取纯化技术,提取分离益阴消渴处方中有效成分,提高有效成分含量,采用固体分散技术研制成现代速释制剂,既能降低血糖,又能改善糖尿病症状,减少糖尿病并发症,保护糖尿病受损靶器官,剂型先进,释药速度快,生物利用度高。本研究中采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以处方中君药葛根的主要成分葛根素为测评指标,优化益阴消渴方的提取工艺,为其工业化生产提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:LC-2010A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);SB-5200D型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HH-S型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);AE240型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

试药:葛根、野苦瓜、荔枝核、山药药材均购自重庆

市菜园坝中药材市场,经重庆市中药研究院肖铭玉副研究员分别鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,葫芦科植物野苦瓜 *Momordica charantia* L. 的成熟果,无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子,薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎;葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号为752-200108);甲醇为色谱纯,水为一级水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验^[1]

色谱柱:Diamonsil C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(28:72);流速:1 mL/min;柱温:30℃;检测波长:250 nm。在此条件下的色谱图见图1。葛根素色谱峰与相邻峰分离度良好。

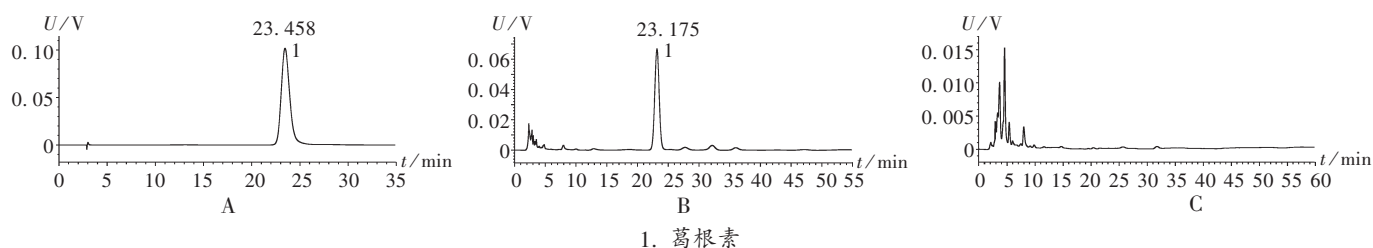
2.1.2 溶液制备

取葛根素对照品18.64 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液。照样品处方比例,取野苦瓜2.5 g,葛根15.5 g,荔枝核1.0 g,山药1.0 g,共9份,按正交试验方案回流

*基金项目:重庆市科研院所绩效激励引导专项资金项目[cstc2017jxjl-jbky120008]。

第一作者:宋国红,女,大学本科,主管药师,研究方向为药物调剂和药事管理,(电话)023-89029141(电子信箱)22912245@qq.com。

△通信作者:尹小玲,女,大学本科,主管药师,研究方向为医院药学和药事管理,(电话)15870435188(电子信箱)1311002729@qq.com。



1. 葛根素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

提取,滤过,浓缩至适量,用乙醇定容至250 mL,摇匀;精密量取2.0 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声提取(功率为200 W,频率为50 kHz)15 min,冷至室温,用甲醇定容至刻度,摇匀,取续滤液,即得供试品溶液。照样品处方比例,称取缺葛根的其余3味药材,照供试品溶液制备方法制备缺葛根阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取葛根素对照品贮备溶液0.5,1.0,2.0,4.0,5.0 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。精密量取10 μ L,进样,按拟订色谱条件测定,以葛根素进样量(X ,g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=7131295X-34632$, $r=0.9999$ ($n=5$)。结果表明,葛根素进样量在0.3728~3.7280 g范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取对照品溶液10 μ L,在拟订色谱条件下连续进样6次,测定。结果的RSD为0.78%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,1,4,8,16 h时进样测定,结果峰面积值的RSD为0.94%($n=6$),表明供试品溶液在16 h内较稳定。

重复性试验:取制备的同一样品6份,照2.1.2项下供试品溶液制备方法中“精密量取2.0 mL”起,制备供试品溶液,按拟订色谱条件,测定峰面积,计算含量。结果的RSD为1.06%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一样品6份,精密加入葛根素对照品适量,照2.1.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定含量,计算回收率。结果见表1。

表1 葛根素加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(μ g)	加入量(μ g)	测得量(μ g)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.078 0	0.884 0	1.956 3	99.36	98.71	0.57
1.078 0	0.884 0	1.945 7	98.16		
1.078 0	1.105 0	2.174 2	99.20		
1.078 0	1.105 0	2.164 3	98.31		
1.078 0	1.326 0	2.379 3	98.14		
1.078 0	1.326 0	2.392 1	99.10		

2.2 提取试验单因素考察

以乙醇为提取溶剂,采用回流法进行提取,以葛根

素的含量为考察指标,设置单因素试验分别考察料液比、提取时间和提取次数对葛根素的影响。

料液比:按处方比例,称取5份样品,分别加入4,6,8,10,12倍量65%乙醇,提取2次,每次60 min,滤过,合并滤液,加乙醇定容至250 mL,摇匀。照2.1.2项下供试品溶液制备方法中“精密量取2.0 mL”起,制备供试品溶液,进样测定。

提取时间:按处方比例,称取5份样品,分别加入10倍量65%乙醇,提取2次,时间为30,40,60,70,80 min,滤过,合并滤液,加乙醇定容至250 mL,摇匀。照2.1.2项下供试品溶液制备“精密量取2.0 mL”起,制备供试品溶液,进样测定。

提取次数:称取5份样品,加入10倍量65%乙醇,分别提取1,2,3,4次,时间为60 min,滤过,滤液加乙醇定容至250 mL,摇匀。照2.1.2项下供试品溶液制备“精密量取2.0 mL”起,制备供试品溶液,进样测定。

试验结果:随着料液比的增加,葛根素含量增加,在8倍量时达最大值,再增大提取溶剂用量,含量不再增加。因此提取溶剂的用量以6,8,10倍量作为正交试验料液比的3个水平;回流提取时间试验结果表明,试验前段随着提取时间的增加,葛根素含量增加,60 min后葛根素含量趋于稳定,故选择回流50,60,90 min作为正交试验提取时间的3个水平;提取次数试验结果表明,葛根素含量在提取2次后维持在相对平稳状态,故选择1,2,3次作为正交试验提取次数的3个水平。

2.3 提取工艺优化

正交试验:以提取液中的葛根素为考察指标,因素A为乙醇浓度,因素B为溶剂用量,因素C为提取时间,因素D为提取次数,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行试验。结果见表2和表3。可见,影响提取效果的因素顺序为 $D>A>C>B$,以 $D_3A_3C_3B_2$ 组合最佳。因素A与因素D影响较大,因素C与因素B影响较小,故从节能、低成本考虑,生产中采用70%乙醇提取3次,乙醇用量为药材量的6倍,第1次回1.5 h,第2,3次回1 h。

2.4 验证试验

为验证优选工艺的合理性,根据拟订提取方法,称取野苦瓜20 g,葛根124 g,荔枝核8 g,山药8 g,共3份,

表2 正交试验因素水平及结果($n=9$)

序号	因素 A(%)	因素 B(倍)	因素 C(h)	因素 D(次)	葛根素含量(%)
1	50	4	0.5	1	0.246 6
2	50	6	1.0	2	0.536 9
3	50	8	1.5	3	0.677 2
4	60	4	1.0	3	0.781 9
5	60	6	1.5	1	0.530 1
6	60	8	0.5	2	0.535 9
7	70	4	1.5	2	0.771 5
8	70	6	0.5	3	0.854 4
9	70	8	1.0	1	0.494 8
$\bar{k}_1$	0.486 9	0.600 0	0.545 6	0.423 8	
$\bar{k}_2$	0.615 9	0.640 6	0.604 5	0.614 8	
$\bar{k}_3$	0.706 9	0.569 3	0.656 9	0.771 1	
R	0.220 0	0.071 2	0.114 0	0.347 3	

表3 方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值
因素 A	0.073 3	2	9.64
因素 B	0.007 6	2	—
因素 C	0.019 5	2	2.56
因素 D	0.181 6	2	23.89

注: $F_{0.1}(1,2) = 8.53$ 。

采用 70% 乙醇提取 3 次,乙醇用量为药材量的 6 倍,第 1 次回流 1.5 h,第 2 次、第 3 次回流 1 h,滤过,合并滤液,回收乙醇,并用乙醇定容至适量,测得葛根素含量分别为 0.846%、0.851%、0.848%, RSD 为 0.30% ($n=3$)。表明益阴消渴滴丸新的提取工艺能达到提取要求,符合实际生产需要,提取工艺条件稳定可行。

3 讨论

本试验中通过影响提取效率的单因素考察与正交试验相结合的方式,优化了益阴消渴方的初步提取工艺,为后续分离纯化提供了数据分析基础。筛选优化工艺参数时,不仅考虑了葛根素的提取率,且充分注重提取方法在工业化大生产中的实际应用,即生产成本,人力、物力消耗,溶剂损耗,提取周期的设置等,节省各项生产中消耗支出,极大地增强了企业的产品竞争力。

参考文献[2-10],葛根含多种化学成分,包括黄酮类、三萜类、甾体类、香豆素类,其提取方法有乙醇回流提取法、乙醇超声提取法、微波法、超临界提取法、水煎煮提取法等;野苦瓜主要化学成分包括三萜、甾类、生物碱;荔枝核含皂苷;山药含游离氨基酸,尿囊素,胆碱,麦角甾醇等,以上各药所含主要有效成分在水和乙醇中均能较好地溶解。前期预试中,对方中药材的提取方法进行了初步筛选,结果发现,以葛根素为代表的检测指标采用水煎煮法进行制备,其含量为 0.65%;采用乙醇回流法进行提取,葛根素含量为 0.82%。2 种提取方法差异明

显,故本研究选用乙醇回流法进行制备工艺优化。

采用正交试验优化中药类产品提取工艺时,多采用含量检测结合浸膏收率的多指标试验优选工艺参数,由于浸膏收率不但不能突出表明该工艺的优越性,各项影响因素及水平对浸膏收率的影响不尽相同,反而可能阻碍其含量检测指标对试验结果的分析判断。而本试验中制备高效富集处方的有效部位群要为下一步纯化提供数据基础,故未选择浸膏收率作为该优化提取工艺参数的指标。益阴消渴原制剂为部分葛根药材粉碎入药,葛根中主要成分葛根素溶出较慢^[11-14],在人体内吸收和利用较差。本试验中选用乙醇回流提取法进行制备,野苦瓜、葛根等有效成分相当部分都能从药材中提取,再经大孔树脂富集、纯化,中间固形物收率减少,日服用量降低,利用固体分散技术制成滴丸剂,药物中有效成分溶出速度加快,生物利用度提高。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:333.
- [2] 王艳艳,王团结,丁琳琳. 响应面分析法优化葛根中异黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):45-48.
- [3] 陈岩岩,吴清,李辉. 多药效学指标结合 HPLC 优选鉴定方中天麻、葛根提取工艺[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(10):705-711.
- [4] 李瑛,范璐,孙秀华. 葛根提取工艺的考察[J]. 北京中医药大学学报,2001,24(4):26-27.
- [5] 杨雄健,汪亚飞,阮晓枫. 复方葛根桂枝口服液的水提工艺研究[J]. 海峡药学,2015,27(9):15-17.
- [6] 张志超,王敏,曹青云. 正交试验优选参葛抗衰复方的提取工艺研究[J]. 中国药业,2017,26(7):5-8.
- [7] 温海成,杨颖欣,叶信. 正交试验优选壮药三裂叶葛藤中葛根素的提取工艺研究[J]. 中国民族医药杂志,2016,22(9):57-59.
- [8] 王牛氏,尤海生,吕军. 解表清热片的提取工艺研究[J]. 中国药业,2014,23(23):64-66.
- [9] 谢炜,于林,赵伟宏. 葛根素两种提取工艺的比较研究[J]. 安徽中医学院学报,2008,27(2):44-46.
- [10] 程璐,刘勇,饶俊珍. 根痛合剂中葛根素提取工艺研究[J]. 今日药学,2015,25(12):837-839.
- [11] 沙跃,李玄,张宇燕. 益气通络解毒方中葛根素渗漉提取工艺的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2010,28(5):1050-1051.
- [12] 王军,何立环,陈金泉. 正交试验优选独活葛根汤提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(7):60-62.
- [13] 王瑛兰,刘元昆,崔翠翠. 葛根虎杖丸的提取工艺研究[J]. 中国执业药师,2016,13(10):25-28.
- [14] 张守平,李广华,张杰. 关于中药提取正交试验设计的疑问与探讨[J]. 齐鲁药事,2011,30(9):546-547.

(收稿日期:2018-06-23)