

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.05.007

正交试验优化逆菱康的水提工艺*

曹淑君¹, 王辉明², 刘洪玲², 张翠萍², 凌勇², 孙向红^{1,2Δ}

(1. 青岛大学药学院, 山东 青岛 266021; 2. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266555)

摘要:目的 优选逆菱康的最佳提取工艺。方法 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验方法, 以雪胆总皂苷、黄芪甲苷含量为指标, 考察提取次数、提取时间及固液比因素对逆菱康提取效果的影响, 优选提取工艺。结果 逆菱康的最佳工艺条件为提取2次, 提取1 h, 固液比12倍。结论 该提取工艺操作简便、准确, 可为逆菱康颗粒剂的制备提供参考。

关键词:逆菱康; 雪胆总皂苷; 黄芪甲苷; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R932; R284.1; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)05-0021-04

Optimization of Water Extraction Process of Niweikang by Orthogonal Test

CAO Shujun¹, WANG Huiming², LIU Hongling², ZHANG Cuiping², LING Yong², SUN Xianghong^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao, Shandong, China 266021; 2. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, China 266555)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of Niweikang. **Methods** $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted, the effects of extraction times, extraction time and solid-liquid ratio on the extraction efficiency of Niweikang were investigated with the contents of total saponins from *Hemsleya amabilis* and astragaloside IV as indexes, and the extraction process was optimized. **Results** The conditions of the optimum process was as follows: extracting 1 h for 2 times with the solid-liquid ratio of 12 times. **Conclusion** The extraction process is simple and accurate, which can provide a reference for the preparation of Niweikang Granules.

Key words: Niweikang; total saponins from *Hemsleya amabilis*; astragaloside IV; orthogonal test; extraction process

近年来,慢性萎缩性胃炎发病率逐渐升高,且有发展成为癌症的可能^[1-2]。逆菱康为医院制剂,用于治疗慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生、不典型增生等癌前病变用药,是具有明确作用的协定处方^[3],具有补脾益气、健胃止痛、清热解毒的疗效,临床应用多年,疗效显著^[4]。方中雪胆为君药,功能清热解毒、消肿止痛,可用于治疗胃十二指肠溃疡、胃痛,因此选择雪胆总皂苷为指标^[5];黄芪为臣药,具有补脾益气功能,同时现代药理研究表明其主要的活性成分为黄芪甲苷,故选择黄芪甲苷为指标^[6-7]。本研究通过正交试验,并以雪胆总皂苷、黄芪甲苷为指标,优选出逆菱康的最佳水提工艺,为医院申报颗粒剂提供可行性的研究资料。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); Sartorius BP 211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司); TU-190 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 试药

齐墩果酸对照品(批号为 110709-200505,纯度 100%),黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201616,纯度为 97.4%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈

(色谱纯,德国默克公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯;雪胆 *Hemsleya amabilis* Diels, 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge, 老龙皮 *Lobaria retigera* Trevis, 朱砂七 *Antenoron filiforme*, 半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don, 海螵蛸 *Sepia esculenta* Hoyle, 陈皮 *Citrus reticulata* Blanco, 生姜 *Zingiber officinale* Roscoe, 均购于青岛善大天源中药饮片有限公司,并由青岛大学附属医院药剂科孙向红教授鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 雪胆总皂苷含量测定^[2-3]

2.1.1 溶液制备

按处方量称取药材,加水浸泡、煎煮,浓缩至 200 mL,得提取液,备用。精密吸取 1 mL 样品提取液,置 100 mL 容量瓶中,依次加入石油醚脱脂、正丁醇萃取后,待正丁醇萃取液挥干溶剂后,加适量甲醇溶解,定容,作为供试品溶液。取齐墩果酸对照品 46.625 mg,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加入 10 mL 甲醇溶解,超声处理,在用甲醇稀释至刻度,作为对照品贮备液(质量浓度为 1.865 g/L),精密吸取该溶液 1.0 mL,置 25 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,作为对照品溶液(质量浓度为 0.074 6 g/L)。按处方量称取药材(雪胆除外),加水浸泡、煎煮,浓缩至 200 mL,备用。精密吸取 1 mL 提取液,

*基金项目:山东省自然科学基金[ZR2014HM094]。

第一作者:曹淑君,女,硕士研究生,研究方向为药剂学,(电子信箱)532099035@qq.com。

Δ通信作者:孙向红,女,博士研究生,教授,硕士研究生导师,研究方向为中药药理学,(电子信箱)sunxiangh007@163.com。

依次加入石油醚脱脂、正丁醇萃取后,待正丁醇萃取液挥干溶剂后,加适量甲醇溶解,定容于 100 mL 容量瓶中,作为阴性对照品溶液。

2.1.2 测定波长确定

取对照品、供试品、阴性对照品溶液在 200~600 nm 波长范围内进行紫外吸收光谱扫描。结果显示,对照品、供试品溶液均在 549 nm 波长处有最大吸收峰且峰形一致,而阴性对照品在此波长处无吸收,故选择 549 nm 作为样品测定的波长。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取对照品溶液 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mL, 置具塞试管中,水浴中挥干甲醇,精密加入新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.4 mL、高氯酸 1.0 mL,加塞摇匀,于 60 ℃ 水浴中加热 15 min 后,冷却至室温,向试管中精密加入 10 mL 冰醋酸,摇匀于 549 nm 波长处测定吸光度。以吸光度 (Y) 为纵坐标、齐墩果酸质量浓度 (X , $\mu\text{g/mL}$) 为横坐标绘制标准曲线,计算得线性回归方程 $Y=0.041\ 03X-0.012\ 92$, $r=0.999\ 0$ ($n=6$)。结果表明,齐墩果酸质量浓度在 1.286~11.134 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

精密度试验:取对照品溶液连续进样 6 次,每次 0.8 mL。结果吸光度的 RSD 为 1.45% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一逆萎康汤贮备液 6 份,依法制备供试品溶液,测定吸光度。结果雪胆总皂苷的平均含量为 0.262 g/L, RSD 为 2.31% ($n=6$),表明方法重复性好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 时测定吸光度。结果的 RSD 为 3.31% ($n=6$),表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的供试品溶液(雪胆总皂苷质量浓度为 0.262 g/L),共取 9 份,每份 25 mL,分别加对照品溶液(质量浓度为 1.865 g/L)1, 2, 3 mL,各 3 份,依法制备供试品溶液,在 549 nm 波长处测定吸光度。结果见表 1。

2.2 黄芪甲苷含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Sapphire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-水(32:68, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:28 ℃;氮气压力:360 kPa,蒸发温度:40 ℃,增益 6。理论板数以黄芪甲苷峰计算不低于 6000。色谱图见图 1。

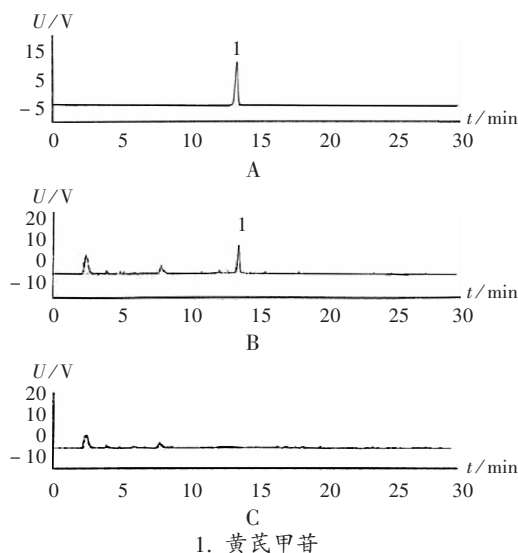
2.2.2 溶液制备

按处方量称取黄芪药材,加水浸泡、煎煮,浓缩至 200 mL,备用。精密吸取提取液 5 mL,加水稀释至 10 mL,用水饱和的正丁醇提取 5 次(每次 60 mL),合并正丁醇,用氨试液充分洗涤 3 次(每次 60 mL),弃去氨液,正

表 1 加样回收试验结果 ($n=9$)

取样量(mg)		加样量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
6.550	0.839	1.865	0.302	8.158	1.089	86.22	82.71				
6.550	0.839	1.865	0.302	8.212	1.091	89.12	83.44				
6.550	0.839	1.865	0.302	8.183	1.103	87.56	87.45				
6.550	0.839	3.730	0.604	9.843	1.352	88.28	84.93				
6.550	0.839	3.730	0.604	9.594	1.324	81.61	80.38	85.70	84.92	2.94	2.83
6.550	0.839	3.730	0.604	9.812	1.333	87.45	81.75				
6.550	0.839	5.595	0.906	11.182	1.613	82.79	85.37				
6.550	0.839	5.595	0.906	11.314	1.596	85.15	83.55				
6.550	0.839	5.595	0.906	11.201	1.629	83.13	87.22				

注:A 为雪胆总皂苷,B 为黄芪甲苷。



1. 黄芪甲苷
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

丁醇饱和水溶液洗涤 2 次(每次 60 mL),分取正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。取黄芪甲苷对照品 3.02 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度线,即得对照品贮备液(质量浓度为 0.302 g/L)。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:取黄芪甲苷对照品贮备液,分别精密进样 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 20.0 μL ,按拟订色谱条件测定黄芪甲苷峰面积,以峰面积积分值自然对数为纵坐标(Y)、进样量的自然对数为横坐标(X)绘制标准曲线,得回归方程 $Y=0.9905X+11.189$, $r=0.9963$ ($n=6$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在 0.755~6.04 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取黄芪甲苷对照品溶液连续进样 6 次,每次 10 μL ,测定峰面积。结果的 RSD 为 1.063% ($n=6$),表明仪器精密度好。

重复性试验:取同一逆萎康汤贮备溶液 6 份,依法

制备供试品溶液,连续进样6次,每次10 μ L,按拟订色谱条件测定黄芪甲苷含量。结果贮备药液中黄芪甲苷平均含量0.370 g/L, *RSD* 为2.06% ($n=6$),表明方法重复性好。

稳定性试验:取供试品适量,依法配制,分别放置0,1,2,4,6,8 h时测定峰面积。结果的 *RSD* 为2.85% ($n=6$),表明供试品溶液8 h内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品贮备液(黄芪甲苷质量浓度为0.034 963 g/L),共取9份,每份2.5 mL,分别加对照品溶液(质量浓度为0.302 g/L)1,2,3 mL各3份,依法制备供试品溶液,进样10 μ L,测定峰面积。结果见表1。

2.3 水提工艺优选

2.3.1 因素水平表

采用正交设计试验优化逆萎康的水提工艺,并以雪胆总皂苷、黄芪甲苷为指标,考察煎煮次数(因素A)、提取时间(因素B)和固液比(因素C)3个因素对提取效果的影响,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计进行试验。因素水平见表2。

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

水平	因素 A(次)	因素 B(h)	因素 C(倍)
1	1	1	8
2	2	2	10
3	3	3	12

2.3.2 正交试验设计与结果

按处方量精密称定各药材,按正交设计下9组试验条件进行煎煮,过滤、浓缩、离心,制得9份正交试验样品,依法测定雪胆总皂苷和黄芪甲苷的含量。结果见表3。

表3 正交试验结果

试验号	因素				含量(mg/g)	
	A	B	C	D(空白)	黄芪甲苷	雪胆总皂苷
1	1	1	1	1	1.351	4.408
2	1	2	2	2	0.824	3.123
3	1	3	3	3	1.219	3.652
4	2	1	2	3	1.454	4.098
5	2	2	3	1	1.480	3.448
6	2	3	1	2	1.399	3.490
7	3	1	3	2	1.375	3.310
8	3	2	1	3	0.923	2.840
9	3	3	2	1	0.960	2.190
黄芪 K_1	3.39	4.18	3.67	3.78		
K_2	4.33	3.23	3.23	3.60		
K_3	3.25	3.57	4.07	3.60		
R	0.36	0.32	0.28	0.06		
雪胆 K_1	11.18	11.82	10.74	10.05		
K_2	11.04	9.41	9.41	9.92		
K_3	8.34	9.33	10.41	10.59		
R	0.95	0.83	0.44	0.22		

2.3.3 方差分析

黄芪甲苷、雪胆总皂苷方差分析结果见表4。从水提工艺黄芪甲苷方差分析结果可见,因素A和B的差异具有显著性,而C因素不具有显著性。从水提工艺的直观分析表可见,极差大小顺序为 $A > B > C$,所得影响因素的大小顺序为 $A > B > C$ 。雪胆总皂苷方差分析表可见,因素A的差异是具有显著性的,而其余两个因素B和C因素的差异不具有显著性。从水提工艺的直观分析表可见,极差大小顺序为 $B > C > A$,所得影响因素的大小顺序为 $B > C > A$ 。故确定最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3$,即提取2次,提取1 h,固液比为12倍。

表4 方差分析结果

因素	黄芪甲苷总量				雪胆总皂苷总量			
	偏差平方和	自由度	F 值 [*]	P	偏差平方和	自由度	F 值 [*]	P
A	0.23	2.000	30.00	<0.05	1.71	2.000	20.37	
B	0.16	2.000	20.20	<0.05	1.33	2.000	15.85	<0.05
C	0.12	2.000	15.47	>0.05	0.32	2.000	3.70	>0.05
误差	0.01	2.000			0.08	2.000		>0.05

注: * $F_{0.05}(1,2) = 19$, * $F_{0.01}(1,2) = 99$; # $F_{0.05}(1,2) = 19$, # $F_{0.01}(1,2) = 99$ 。

2.3.4 最佳工艺验证试验

为验证该工艺的准确性,按处方剂量3份,分别按最佳工艺条件进行操作、测定。结果样品中雪胆总皂苷为1.425 mg/g, *RSD* 为2.63% ($n=3$);黄芪甲苷的含量为4.112 mg/g, *RSD* 为1.83% ($n=3$)。

3 讨论

目前,中医治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究取得了较好的成果,中医治疗慢性萎缩性胃炎具有优势^[8-9]。逆萎康汤由8味中药组方,成分复杂,各药材有其独立而协作的作用。由于临床长期以来采用汤剂给药方式,遵循传统中医用药的习惯和有效降低生产成本。在保持本方原有疗效的基础上,本研究中结合现代化药物制剂技术将汤剂研制成携带和服用方便、生物利用度高的颗粒剂,具有较好的实际意义。

现代药理研究表明,雪胆水煎液及总皂苷具有镇痛、抗炎及抗内毒素作用,使其祛瘀止痛的功效得到了证实^[10-11];黄芪中的黄芪甲苷具有抗病毒、降血糖、增强人体免疫等活性,广泛用于临床^[12]。因此,选择这2种主要药效成分的含量用作为优选化逆萎康口服制剂提取工艺的指标。

本研究中根据药材性质来选择以水提方式,同时采用正交试验优化其提取工艺,进一步提高药材中的有效含量。由于正交试验可合理安排,减少次数,因此是一种高效、经济的方法^[13-14]。既保留了原方的特点和优势,又能高效、充分地提取药材的有效成分,符合医院制剂