

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.13.004

正交试验优选藤龙补中方水提工艺*

许聪聪^{1,2}, 王晓晗², 梁惠芬², 林 鹭², 安红梅³, 胡 兵³, 浦益琼^{1,△}, 张 彤^{1,2}

(1. 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203;
3. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 201203)

摘要:目的 优选藤龙补中方的水提工艺。方法 选择浸泡时间、加水量和提取时间为考察因素,以野黄芩苷、对羟基桂皮酸、多糖含量及干膏得率的综合评分为考察指标,通过正交试验优选水提工艺。结果 最佳水提工艺处方药材不浸泡,加(10+8)倍量水提取2次,每次1 h;野黄芩苷、对羟基桂皮酸和多糖含量分别为1.39%,0.027 9%,15.25%,浸膏得率为15.89%。结论 优选的提取工艺稳定可行,水溶性有效成分提取率高,可为藤龙补中方的水提工艺研究提供试验依据,为后续制剂研究提供原料。

关键词:藤龙补中方;野黄芩苷;对羟基桂皮酸;多糖;正交试验;水提工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)13-0015-04

Optimization of Water Extraction Process for Tenglongbuzhong Recipe by Orthogonal Test

XU Congcong^{1,2}, WANG Xiaohan², LIANG Hui fen², LIN Lu², AN Hongmei³, HU Bing³, PU Yiqiong¹, ZHANG Tong^{1,2}

(1. Experiment Center of Teaching and Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 201203; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 201203; 3. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 201203)

Abstract: **Objective** To optimize water extraction process of Tenglongbuzhong recipe. **Methods** Taking soaking time, the amount of water and extraction time as factors, the orthogonal test was adopted to optimize water extraction process with the composite score of the scutellarin content, *p*-hydroxycinnamic acid content, polysaccharide content and the dry extract yield as indexes. **Results** The optimum water extraction process was as follows: the medicinal materials were extracted twice with (10+8) times water for 1 h of each time, with non-soaking. The contents of scutellarin, *p*-hydroxycinnamic acid and polysaccharide were 1.39%, 0.027 9% and 15.25%, and the dry extract yield was 15.89%. **Conclusion** The optimized extraction process is stable and feasible, and the extraction rate of water-soluble active ingredients is high. It can provide the experimental basis for the study of the water extraction process of Fujingbuzhong recipe and raw materials for the follow-up preparations.

Key words: Tenglongbuzhong recipe; scutellarin; *p*-hydroxycinnamic acid; polysaccharide; orthogonal test; water extraction process

藤龙补中方系上海中医药大学附属龙华医院的临床验方,主要用于治疗大肠癌、胃癌、胰腺癌等恶性肿瘤,由藤梨根、龙葵、蛇莓、白术、茯苓、薏苡仁、槲寄生、半枝莲等中药组方^[1]。目前,藤龙补中汤配合手术、化学治疗(简称化疗)等方式联合治疗大肠癌,疗效明显^[2-4]。藤龙补中汤可促进结肠癌细胞的衰老,抑制大肠癌细胞的转移,降低化疗不良反应,促进大肠癌患者胃肠道功能的恢复^[5-7]。在确保原方疗效的同时,通过优化提取工艺可制备成固体制剂。本研究中以中医药理论为指导原则,在不改变提取溶剂的基础上,以浸膏得率、野黄芩苷、对羟基桂皮酸和多糖含量为考察指标,对藤龙补中方的水提工艺进行优选,为复方颗粒剂的研究提供样品和技术积累。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);BS-124S型电子天平(德国赛多利斯公司);101-2-5型

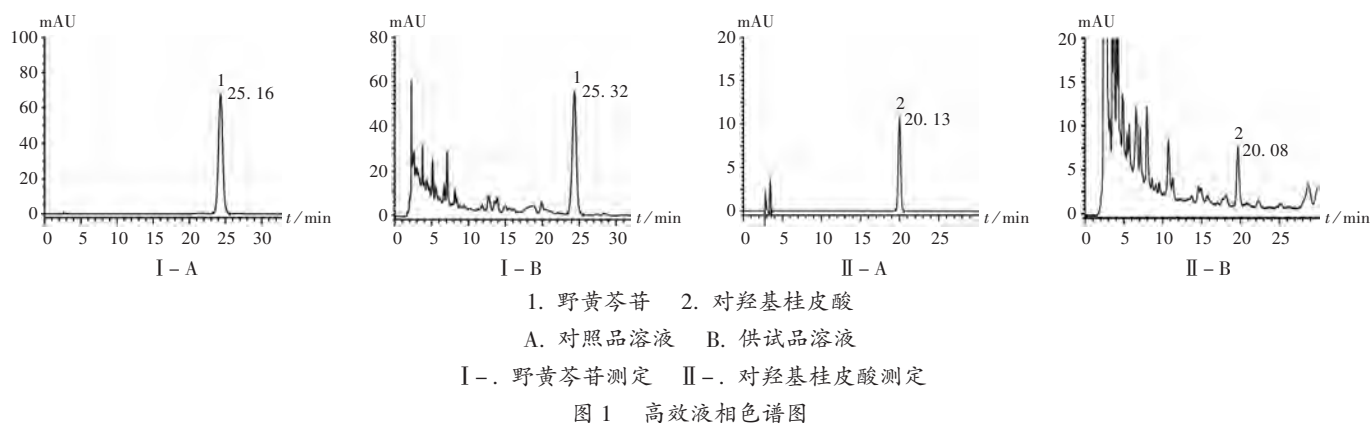
电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);XS105DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);HHS型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

试剂:藤梨根、龙葵、蛇莓、白术、茯苓、薏苡仁、槲寄生、半枝莲(上海康桥中药饮片有限公司,批号分别为161011,161223,160111,160818,160823,170117,160624,161223),经上海中医药大学中药学院张红梅博士鉴定为正品,均符合2015年版《中国药典(一部)》相关要求;*D*-无水葡萄糖对照品(批号为110833-201506),野黄芩苷对照品(批号为110842-201709),均购自中国食品药品检定研究院;对羟基桂皮酸对照品(上海誉恩生物科技有限公司,批号为7400-08-0);甲醇(批号为R6AG1H)、乙腈(批号为S8HA1H)均为色谱纯(Honeywell公司),其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

*基金项目:上海市科技支撑项目[16401902500]。

第一作者:许聪聪,女,在读硕士研究生,主要从事中药新药学研究,(电子信箱)xucong325@126.com。

△通信作者:浦益琼,女,讲师,博士研究生,主要从事中药新药学研究,(电子信箱)puyiq@163.com。



2 方法与结果

2.1 野黄芩苷含量测定^[8]

2.1.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Diamondsil™ Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸溶液(39:61);流速:1.0 mL/min;检测波长:335 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图1。

2.1.2 溶液制备

取野黄芩苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为1.028 g/L的对照品贮备液。取浸膏粉约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入50%甲醇溶液100 mL,超声10 min,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:取对照品贮备液适量,加甲醇制得质量浓度分别为8.224,20.56,51.4,128.5,257,514,1 028 μg/mL的系列对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=30.919X-0.61336$, $r=0.9995$ ($n=7$)。结果表明,野黄芩苷质量浓度在8.224~1 028 g/L范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别精密吸取质量浓度为20.56,128.5,514 μg/mL对照品溶液,各10 μL,注入液相色谱

仪,连续测定6次。结果的RSD分别为1.31%,0.69%,0.23%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取浸膏,平行测定6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果的RSD为1.44%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

重复性试验:取浸膏,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果平均含量为1.42%,RSD为1.53%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的浸膏9份,分别加入相当于样品含量50%,100%,150%的对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果见表1。

2.2 对羟基桂皮酸含量测定^[9-10]

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%醋酸溶液(14:86);流速:1.0 mL/min;检测波长:300 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图1。

2.2.2 溶液制备

取对羟基桂皮酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为1.04 g/L的对照品贮备液。取浸膏粉约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入50%甲醇溶液25 mL,超声20 min,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

表1 加样回收试验结果($n=3$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.1253	0.0996	0.0498	1.7667	0.02628	6.72	0.8704	0.013554	3.28	2.613	0.04082	9.96	97.23	107.27	98.78						
0.1255	0.1002	0.0497	1.7696	0.02644	6.70	0.8704	0.013554	3.37	2.634	0.04082	9.99	99.31	106.09	97.63						
0.1251	0.0999	0.0497	1.7639	0.02636	6.70	0.8704	0.013554	3.27	2.639	0.04075	9.82	100.54	106.17	95.41						
0.1254	0.1002	0.0502	1.7681	0.02644	6.77	1.81	0.026606	6.74	3.599	0.05347	13.48	101.15	101.59	99.55						
0.1253	0.1000	0.0504	1.7667	0.02639	6.80	1.81	0.026606	6.85	3.617	0.05428	13.87	102.23	104.83	103.21	99.27	102.24	100.76	1.99	4.30	3.02
0.1256	0.0999	0.0502	1.7710	0.02636	6.77	1.81	0.026606	6.79	3.594	0.05375	13.69	100.72	102.95	101.91						
0.1251	0.0995	0.0504	1.7639	0.02626	6.80	2.63	0.040160	10.25	4.312	0.06636	17.45	96.89	99.85	103.90						
0.1247	0.0996	0.0503	1.7583	0.02628	6.79	2.63	0.040160	10.23	4.336	0.06477	17.42	98.01	95.84	103.91						
0.1255	0.1003	0.0501	1.7696	0.02647	6.76	2.63	0.040160	10.18	4.329	0.06484	17.20	97.32	95.54	102.55						

注:A为野黄芩苷,B为对羟基桂皮酸,C为多糖。

2.2.3 方法学考察

线性关系考察:取对羟基桂皮酸对照品贮备液适量,加甲醇制成质量浓度分别为 0.784 375, 1.568 75, 3.137 5, 6.275, 12.55, 25.1, 50.2 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 70.579X - 17.853$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 7$)。结果表明,对羟基桂皮酸质量浓度在 0.784 375 ~ 50.2 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别精密吸取质量浓度为 1.568 75, 6.275, 25.1 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,各 10 μL ,注入液相色谱仪,连续测定 6 次。结果的 RSD 分别为 1.18%, 1.17%, 0.42% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,按拟订色谱条件于 24 h 内间隔一定时间进样 6 次。结果的 RSD 为 2.00% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取浸膏,平行 6 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果平均含量为 0.026 4%, RSD 为 1.52% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的浸膏 9 份,分别加入相当于样品含量 50%, 100%, 150% 的对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果见表 1。

2.3 多糖含量测定^[6,11-12]

2.3.1 溶液制备

取干燥至恒定质量的 D -无水葡萄糖对照品 8.77 mg,置 10 mL 容量瓶中,以蒸馏水定容至刻度,配制成质量浓度为 877 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品贮备液。取浸膏粉约 0.1 g,精密称定,加 5 mL 水使其完全溶解,加入 95% 乙醇,搅拌均匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置过夜,过滤,沉淀用 95% 乙醇洗涤 3 次,干燥。将干燥后的沉淀全部溶解于 100 mL 容量瓶中,加水至刻度,摇匀,过滤,即得供试品溶液。

2.3.2 测定方法

取供试品溶液 1.0 mL,置试管中,加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,混匀,沸水浴中加热 15 min 后,迅速冷却至室温,于 487 nm 波长处测定吸光度,计算多糖含量。

2.3.3 方法学考察

线性关系考察:取葡萄糖对照品贮备液适量,加水制备成质量浓度分别为 19.294, 29.818, 38.588, 49.989, 70.16, 79.83 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,精密吸取 1.0 mL,加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速加入浓硫酸 5.0 mL,混匀,沸水浴中加热 15 min 后,迅速冷却至室温,以相应试剂为空白,于 487 nm 波长处测定吸光度(A)值,以 A (Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 9.9X + 12.9$, $r =$

0.999 7 ($n = 6$)。结果表明, D -无水葡萄糖质量浓度在 19.294 ~ 79.83 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别称取质量浓度为 29.818, 49.989, 79.83 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液适量,按拟订色谱条件测定吸光度,连续测定 6 次。结果的 RSD 分别为 0.11%, 0.15%, 0.03% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,按拟订色谱条件于 24 h 内间隔一定时间测定 6 次。结果的 RSD 为 2.70% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取浸膏,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定吸光度。结果平均含量为 13.49%, RSD 为 2.47% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的浸膏 9 份,分别加入相当于样品含量 50%, 100%, 150% 的对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果见表 1。

2.4 水提工艺优选

选择浸泡时间(因素 A)、加水量(因素 B)和提取时间(因素 C)为考察因素^[13],以浸膏得率(指标 I)、野黄芩苷(指标 II)、对羟基桂皮酸(指标 III)及多糖(指标 IV)含量的综合评分为考察指标,权重系数设为 0.25。称取处方量药材,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 藤龙补中方水提工艺正交试验分析

序号	因素				评价指标(%)				综合评分
	A	B	C	D(空白)	I	II	III	IV	
1	1	12+10	2	1	17.87	1.07	0.019	15.26	0.60
2	1	12+10	2	2	16.54	1.12	0.020	13.71	0.60
3	1	12+10	2	3	14.36	1.10	0.017	12.38	0.54
4	0.5	10+8	1.5	3	17.15	1.25	0.014	14.58	0.57
5	0.5	10+8	1.5	1	15.04	1.40	0.017	13.50	0.61
6	0.5	10+8	1.5	2	16.77	1.34	0.020	16.14	0.67
7	0	8+6	1	2	15.53	1.43	0.025	16.18	0.74
8	0	8+6	1	3	17.48	1.52	0.021	16.29	0.71
9	0	8+6	1	1	15.63	1.38	0.021	15.17	0.67
K_1	0.580	0.637	0.660	0.627					
K_2	0.617	0.640	0.613	0.670					
K_3	0.707	0.627	0.630	0.607					
R	0.127	0.013	0.047	0.063					

表 3 水提工艺方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 比	P
A	0.025	2	0.012 5	4.167	>0.05
B	0.000	2	0.000 0	0.000	>0.05
C	0.003	2	0.001 5	0.500	>0.05
误差项	0.01	2	0.005 0		

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

由方差分析可知,因素 A(温度)、因素 B(溶剂用

量)和因素C(提取时间)均对结果的影响无显著性,因此采用直观分析结果。各因素的最佳搭配为 $A_3B_2C_1$,即采用浸泡0 h,溶剂用量(10+8)倍,提取时间2 h;为节约能源,溶剂用量不变,提取时间调整为1 h。

按优选的水提工艺提取,经3批验证试验,所得浸膏中野黄芩苷、对羟基桂皮酸和多糖含量分别为1.39%,0.027 9%和15.25%,RSD分别为2.79%,0.67%和2.82%,浸膏得率为15.89%,RSD为1.78%($n=3$),表明该水提工艺稳定、可行。

3 讨论

测定野黄芩苷含量时,曾分别考察了提取溶剂(50%,70%,100%甲醇)、溶剂用量(10,25,50,100 mL)及超声时间(10,20,30 min)对野黄芩苷提取率的影响。结果表明,当取样量为0.25 g,提取溶剂为50%甲醇100 mL,超声提取10 min,野黄芩苷提取率较高。

测定对羟基桂皮酸含量时,也曾分别考察了提取溶剂(50%,70%,100%甲醇)、溶剂用量(10,25,50 mL)及超声时间(10,20,30 min)对对羟基桂皮酸提取率的影响。当取样量为0.2 g,提取溶剂为50%甲醇50 mL,超声提取20 min,对羟基桂皮酸的提取率较高。

野黄芩苷为半枝莲的主要成分,在该成分的测定过程中,先采用与2015年版《中国药典(一部)》半枝莲药材项下含量测定方法一致的甲醇-水-醋酸(35:61:4,V:V:V)流动相进行测定,由于野黄芩苷色谱峰与相邻峰未分开,未达到要求。初步考虑该复方成分较复杂,可能是某类黄酮类化合物对其造成了影响,需重新调整流动相。现行药典中灯盏细辛含有野黄芩苷,以甲醇-0.1%磷酸溶液(40:60,V:V)为流动相,并根据具体情况将流动相调整为甲醇-0.1%磷酸溶液(39:61,V:V),可获得较好的色谱峰分离效果。

在建立了3种活性成分含量测定方法的基础上,以综合评分法优选该方的水提工艺。选定的3个指标成分中,野黄芩苷和多糖成分的抗肿瘤作用显著。半枝莲中的黄酮类化合物在体内外都有显著的消除自由基的作用^[14],对人结肠癌细胞株SM480有抑制作用^[15];此外,该复方水提物中含有大量多糖成分,也具有较好的抗肿瘤作用。其中,半枝莲多糖能抑制HepA小鼠肿瘤生长,降低H₂₂肝癌小鼠瘤重^[16],提高C26结肠癌小鼠的肿瘤组织凋亡蛋白Caspase-3和Caspase-9的活性发挥抗肿瘤作用^[17];茯苓多糖对胃癌、乳腺癌、肝癌均能起到一定的抑制作用^[18];藤梨根中的有效成分猕猴桃根多糖可通过抑制PCNA蛋白的过速增殖而抑制结肠癌和肝癌的增殖^[19];龙葵多糖能显著抑制小鼠U14细胞的增殖,延长荷瘤小鼠的生存时间,是治疗宫颈癌的有效物质,龙葵中分离得到的糖蛋白类成分能抑制结肠癌细胞HT-29和HCT-116细胞株的增殖,提示该药中糖

蛋白类成分可能是抗结肠癌的药效物质^[20]。

参考文献:

- [1] SYGGELOU A, IACOVIDOU N, ATZORI L, et al. Metabolomics in the developing human being[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2012, 59(5):1039-1058.
- [2] 胡兵, 安红梅, 沈克平, 等. 藤龙补中汤促结肠癌LS-174-T细胞衰老及其机制[J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(11):1048-1052.
- [3] 董红兵, 石变. 藤龙补中汤联合新辅助化疗治疗低位直肠癌临床研究[J]. *中医学报*, 2017, 32(4):507-509.
- [4] 胡兵, 李刚, 安红梅, 等. 藤龙补中汤联合化疗治疗晚期大肠癌临床研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(1):37-39.
- [5] 胡兵, 安红梅, 李刚, 等. 藤龙补中汤对晚期大肠癌患者调节性T细胞作用临床研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2014, 9(3):294-296.
- [6] 胡兵, 安红梅, 郑佳露, 等. 藤龙补中汤对大肠癌RKO细胞转移相关基因表达影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(5):416-419.
- [7] 邓珊, 安红梅, 胡兵. 藤龙补中汤对大肠癌肺转移及肿瘤相关巨噬细胞作用[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2016, 24(7):515-519.
- [8] 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, 2015:118-119, 147-148, 249.
- [9] 蔡鹰, 赵宁志, 陆瑜, 等. HPLC测定回心草中对羟基桂皮酸的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17):75-77.
- [10] 谭道鹏, 俞桂新, 王峰涛. HPLC测定千柏鼻炎片中对羟基桂皮酸和金丝桃苷的含量[J]. *中国现代应用药学*, 2010, 27(6):532-534.
- [11] 谭敏, 邱细敏. 白术多糖含量两种测定方法的比较[J]. *现代中药研究与实践*, 2012, 26(2):73-75.
- [12] 姜叶青. 中华猕猴桃多糖的提取及泡腾片的工艺研究[J]. *海峡药学*, 2008, 20(7):27-29.
- [13] 郝翠, 穆岩, 赵恒强, 等. 正交试验法优选黄芩配方颗粒的水提工艺[J]. *山东科学*, 2017, 30(6):22-28.
- [14] 王翊豪, 许晓义, 杨斯琪, 等. 半枝莲药理作用及化学成分提取的研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*, 2017, 38(6):116-118.
- [15] 曾秋红. 半枝莲黄酮类化合物体外抗肿瘤活性的研究[J]. *海峡药学*, 2011, 23(1):137-139.
- [16] 宋高臣, 于英君, 王喜军. 半枝莲多糖的抗肿瘤作用及其调节免疫的实验研究[J]. *世界科学技术:中医药现代化*, 2011, 13(4):641-643.
- [17] 叶华, 郭蒙, 吴琼, 等. 半枝莲多糖对C26荷瘤小鼠caspase-3, 8, 9活性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 23(32):5152-5153.
- [18] 游昕, 熊大国, 郭志斌, 等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(2):106-109.
- [19] 张光霁, 韩江余. 猕猴桃根多糖对S180荷瘤小鼠PCNA表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8):1659-1660.
- [20] 赫军, 周畅, 马秉智, 等. 龙葵的化学成分及抗肿瘤药理活性研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(31):4433-4436.

(收稿日期:2018-11-02)