

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)22-0053-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.22.012



正交试验法优选温脾降糖颗粒提取工艺*

陈雪婷, 徐文杰, 冯健英, 李智勇, 张建军

(广东省第二中医院·广东省中医药工程技术研究院·广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要:目的 优选温脾降糖颗粒提取工艺。方法 以煎煮次数、煎煮时间、加水量为考察因素,以黄芪甲苷、6-姜辣素含量、固形物质量为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选温脾降糖颗粒提取工艺并验证。结果 温脾降糖颗粒最佳提取工艺为加6倍量水煎煮2次,每次1h,固形物质量55.01g,固形物得率为24.56%;成品中黄芪甲苷及6-姜辣素含量分别为67.59,149.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 该提取工艺稳定可行,重复性好,提取效率高;可用于温脾降糖颗粒的工业化生产。

关键词:温脾降糖颗粒;正交试验;黄芪甲苷;6-姜辣素;提取工艺

Optimization of Extraction Process of Wenpi Jiangtang Granules by Orthogonal Test

CHEN Xueting, XU Wenjie, FENG Jianying, LI Zhiyong, ZHANG Jianjun

(Guangdong Second Hospital of Traditional Chinese Medicine · Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology · Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510095)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Wenpi Jiangtang Granules. **Methods** The extraction process of Wenpi Jiangtang Granules was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test, with the decoction frequency, decoction time and amount of water added as the investigation factors, and with the astragaloside IV, 6-gingerol contents and solid mass as the comprehensive evaluation indicators, and then the verification test was conducted. **Results** The optimal extraction process of Wenpi Jiangtang Granules was as follows: adding six times the amount of water, decocting twice, each time for 1 h. The mass of solid was 55.01 g with the yield of 24.56%. The contents of astragaloside IV and 6-gingerol in the finished product were 67.59, 149.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. **Conclusion** The extraction process is stable, feasible, repeatable and efficient, which can be used for the industrial production of Wenpi Jiangtang Granules.

Key words: Wenpi Jiangtang Granules; orthogonal test; astragaloside IV; 6-gingerol; extraction process

随着高脂、高糖饮食摄入的迅速增加,糖脂代谢紊乱正严重危害着人们的身体健康。糖脂代谢紊乱属中医“消渴”“痰浊”“瘀血”等范畴^[1],温脾降糖方主治消渴病脾虚湿热证,在我院临床应用多年,其由干姜、党参、肉桂等11味中药组方,有温中健脾、清热利湿功效^[1-12]。虽收效良好,但需煎服,过程烦琐,无法满足患者方便用药的需求。中药颗粒剂具有产品性状稳定,剂量准确,运输、贮存及携带方便的优点,故拟将原汤剂开发为颗粒剂。在此,以固形物质量、黄芪甲苷及6-姜辣素含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优化温脾降糖颗粒提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),配有2424型蒸发光散射检测器及2998型PDA检测器;KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHC-9203A型鼓风干燥箱(上海精宏实

验设备有限公司);HH8型数显恒温水浴锅(上海邦西力辰科技有限公司);Sartorius BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试药

黄芪甲苷对照品(批号为110781-201515,含量93%),6-姜辣素对照品(批号为111833-201504,含量98%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。干姜、党参、肉桂等药材饮片均由广东和翔制药有限公司提供,经广东省中医药工程技术研究院徐文杰副主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷与6-姜辣素含量测定

2.1.1 色谱条件

1)黄芪甲苷:色谱柱为Kromasil C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(32:68, V/V);检测器为蒸发光散射检测器;流速为1 mL/min;柱温为

*基金项目:国家中医药管理局2023年中医药部门中央补助资金(中药创新能力提升项目)[粤中医办函[2023]26号];广东省科技计划项目[2017A070701017]。

第一作者:陈雪婷,女,硕士,助理研究员,研究方向为中药制剂研发,(电子信箱)397095007@qq.com。

25 ℃;进样量为4 μL。

2)6-姜辣素:色谱柱、流速同黄芪甲苷;流动相为乙腈-甲醇-水(40:5:55, V/V/V);检测波长为280 nm;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液:取黄芪甲苷、6-姜辣素对照品各适量,精密称定,加甲醇溶液分别制成质量浓度为491.97 μg/mL、54.90 μg/mL的单一对照品溶液,分别记为对照品溶液 I、对照品溶液 II。

供试品溶液:按处方比例及工艺,称取11味药材饮片样品各224 g,加入8倍量水,煎煮2次,每次2 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩并用水定容至200 mL,即得供试品溶液贮备液。精密吸取10 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入含4%浓氨水的80%甲醇50 mL,超声(功率300 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,放冷,滤过,精密量取续滤液25 mL,蒸干,残渣用80%甲醇溶解,转移至5 mL容量瓶中,加80%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液 I(用于黄芪甲苷含量测定);另精密量取贮备液5 mL,置25 mL容量瓶中,加入75%甲醇适量,超声处理40 min,放冷,加75%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液 II(用于6-姜辣素含量测定)。

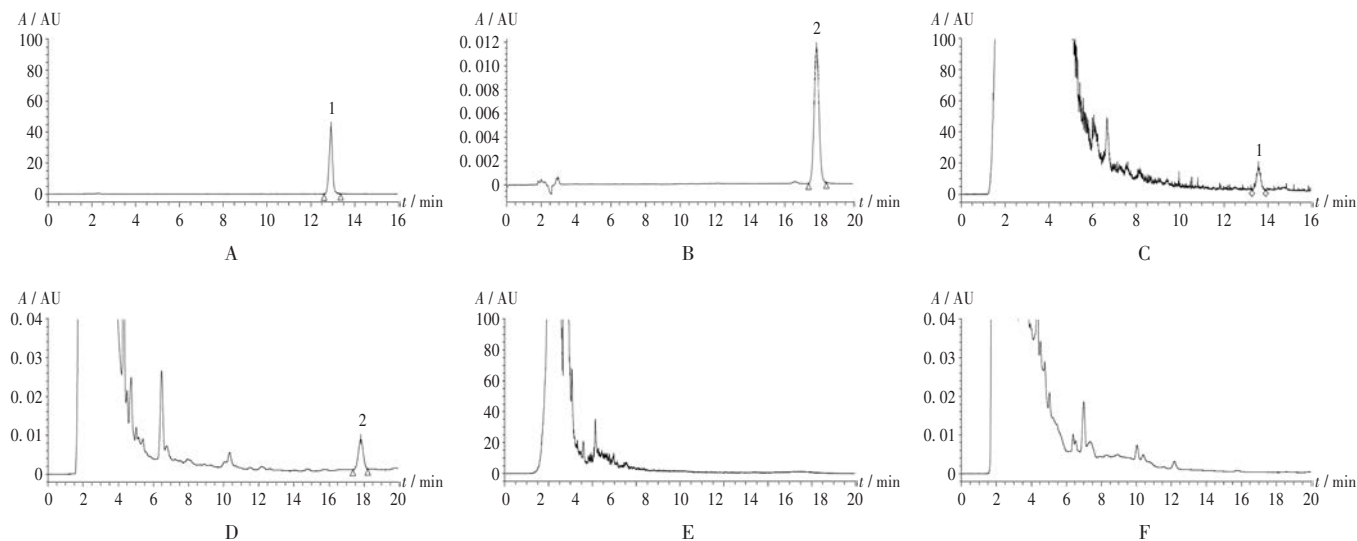
阴性对照品溶液:分别按温脾降糖方处方比例称取缺黄芪、干姜的药材饮片,按供试品溶液制备方法分别制备缺黄芪、缺干姜的阴性对照品溶液 I、阴性对照品溶液 II。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.1.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,2种供试品溶液色谱图在相应对照品溶液相同保留时间处均有色谱峰,且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察:取对照品溶液 I 适量,加甲醇分别制成黄芪甲苷质量浓度为98.394,196.788,295.182,393.576,491.97 μg/mL的系列对照品溶液,分别精密量取4 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。再以进样量的对数[取自然对数(ln),下文同]为横坐标(X)、峰面积的对数为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 1.6345X_1 + 1.0116$ ($r = 0.9997, n = 5$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在393.576~1967.88 ng范围内的对数值与峰面积对数值线性关系良好。取对照品溶液 II 适量,加甲醇分别制成6-姜辣素质量浓度为10.98,21.96,32.94,43.92,54.9 μg/mL的系列对照品溶液,分别精密量取10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(X, ng)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_2 = 5.84 \times 10^3 X_2 - 3.14 \times 10^4$ ($r = 0.9993, n = 5$)。结果表明,6-姜辣素进样量在109.8~549 ng范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察:取2种对照品溶液各适量,倍比稀释,以信噪比(S/N)为3,10时待测成分的质量浓度分别记作检测限和定量限。结果黄芪甲苷、6-姜



1. 黄芪甲苷 2. 6-姜辣素

A. 对照品溶液 I B. 对照品溶液 II C. 供试品溶液 I D. 供试品溶液 II E. 阴性对照品溶液 I F. 阴性对照品溶液 II

图1 高效液相色谱图

1. Astragaloside IV 2. 6-Gingerol

A. Reference solution I B. Reference solution II C. Test solution I D. Test solution II E. Negative reference solution I F. Negative reference solution II

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果(n=6)
Tab.1 Results of the recovery test (n=6)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		\bar{X} (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
347.1	395.875	344.379	384.3	675.052	774.910	95.23	98.63				
347.1	395.875	344.379	384.3	684.970	778.330	98.11	99.52				
347.1	395.875	344.379	384.3	679.495	789.052	96.52	102.31	96.90	100.37	1.00	1.26
347.1	395.875	344.379	384.3	682.422	782.673	97.37	100.65				
347.1	395.875	344.379	384.3	681.664	780.751	97.15	100.15				
347.1	395.875	344.379	384.3	681.148	783.903	97.00	100.97				

注:A为黄芪甲苷,B为6-姜辣素。

Note:A refers to astragaloside IV, and B refers to 6-gingerol.

辣素的定量限分别为7.380 μg/mL和1.648 μg/mL, 检测限分别为2.216 μg/mL和0.495 μg/mL。

精密密度试验:取黄芪甲苷(质量浓度为196.788 μg/mL)及6-姜辣素(质量浓度为21.96 μg/mL)对照品溶液各适量,1 d内分别连续进样测定6次,日内精密密度试验结果的RSD分别为0.23%和0.26%(n=6);再连续测定6 d,日间精密密度试验结果的RSD分别为0.52%和0.61%(n=6)。结果表明,仪器精密密度良好。

稳定性试验:取2种供试品溶液各适量,室温下分别于0,2,4,6,8,12 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果黄芪甲苷、6-姜辣素峰面积的RSD分别为0.46%和0.33%(n=6),表明供试品溶液室温下放置12 h内稳定性良好。

重复性试验:取2种供试品溶液各6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果黄芪甲苷、6-姜辣素的平均含量分别为69.42 μg/mL和158.35 μg/mL,RSD分别为1.23%和1.08%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量(黄芪甲苷、6-姜辣素质量浓度分别为69.42 μg/mL和158.35 μg/mL)的供试品贮备液适量,分别加入对照品溶液I,II各适量,按2.1.2项下方法制备相应供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

2.2 固形物质量测定

精密量取浓缩液25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,按2020年版《中国药典(四部)》通则0831干燥失重测定法测定固形物的质量。固形物质量(g) = $W \times V / 25$ 。式中,W为25 mL浓缩液中干固形物的质量,V为定容体积。

2.3 正交试验设计与结果^[13-14]

按处方比例称取干姜、黄芪等11味药材饮片样品9份,每份224 g。以煎煮次数(因素A)、煎煮时间(因素B)、加水量(因素C)为考察因素,以固形物质量(a)、黄芪甲

苷含量(b)和6-姜辣素含量(c)为评价指标,以综合加权评分法计算综合评分。综合评分 = $a / a_{\max} \times 40 + b / b_{\max} \times 30 + c / c_{\max} \times 30$ 。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选制剂提取工艺。因素与水平见表2,试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。可见,3个因素对提取效果的影响强度大小为A > B > C,综合评分最高的工艺组合为 $A_2B_3C_3$ 。三因素中仅因素A对提取工艺的影响有统计学意义,同时因素B、因素C3个水平之间极差较小,故考虑到生产成本,包括加热时长、用水量等,确定最优提取工艺为 $A_2B_1C_1$,即加6倍量水,煎煮2次,每次1 h。

表2 因素与水平

Tab.2 Factors and their levels

水平	因素A(次)	因素B(h)	因素C(倍)
1	1	1	6
2	2	2	8
3	3	3	10

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab.3 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素				黄芪甲苷含 量(μg/mL)	6-姜辣素含 量(μg/mL)	固形物 质量(g)	综合评 分(分)
	A	B	C	D(空白)				
1	1	1	1	1	51.68	117.70	38.371	71.29
2	1	2	2	2	56.20	135.67	40.970	77.01
3	1	3	3	3	57.79	137.60	45.136	81.25
4	2	1	2	3	68.51	144.16	51.789	95.14
5	2	2	3	1	69.02	153.06	54.320	97.32
6	2	3	1	2	65.77	151.50	54.790	94.82
7	3	1	3	2	65.17	144.50	54.947	94.40
8	3	2	1	3	60.24	148.56	56.941	91.49
9	3	3	2	1	64.82	140.93	58.218	96.34
K_1	234.16	259.91	262.25	265.01				
K_2	286.86	270.92	268.58	269.49				
K_3	284.62	274.82	274.82	271.14				
R	52.70	14.91	12.58	6.13				

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	592.07	2	296.03	88.18	< 0.05
B	39.87	2	19.93	5.94	> 0.05
C	26.36	2	13.18	3.93	> 0.05
误差	6.71	2	3.36	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.4 验证试验

按温脾降糖方临床处方比例,称取各药材饮片样品3份,每份224 g,依上述最佳工艺提取,再分别测定样品中黄芪甲苷、6-姜辣素含量和固形物质量,计算固形物得率,结果见表5,可见,优选的工艺稳定可行。

表5 验证试验结果($n=3$)

Tab. 5 Results of the verification test ($n=3$)

指标	1	2	3	\bar{X}
黄芪甲苷含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	69.28	65.99	67.51	67.59
6-姜辣素含量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	144.23	154.23	151.05	149.84
固形物质量(g)	53.54	56.69	54.79	55.01
固形物得率(%)	23.90	25.31	24.46	24.56

3 讨论

温脾降糖方中,干姜温助脾阳、驱散寒邪,黄芪益气养阴、补脾固肾,二者共为君药。姜辣素是干姜辣味物质的总称,是该方的主要成分,文献研究显示,6-姜辣素通过对脂质分布的调控,调节胰岛素、瘦素、淀粉酶、脂肪酶的含量,从而减轻高脂饮食诱导的肥胖^[15-19];皂苷类化合物是黄芪中重要的有效成分,其中黄芪甲苷含量最高,研究显示,黄芪甲苷可抑制糖异生,调节糖脂代谢^[20-22]。

为进一步提高患者使用温脾降糖方的便利性及依从性,本研究中采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法对其提取工艺进行了优化。根据预试验结果,选择对制剂质量影响较大的煎煮次数、煎煮时间、加水量3个因素进行考察。通过建立高效液相色谱联用蒸发光散射器法检测方中君药的指标性成分黄芪甲苷和6-姜辣素的含量,并测定了对中药固体制剂成型有重要意义的固形物质量,并对3个指标按重要性分别赋权计算综合评分,以此综合评价各提取工艺参数组合的优劣。

根据正交试验结果,并结合生产实际考虑,最终确定最优提取工艺为加6倍量水,煎煮2次,每次1 h,验证试验证实该方法稳定可行,可为温脾降糖颗粒的工业化生产提供参考。但大批量生产的过程较长,有效成分可能会有损失,出现临床效果不稳定的情况,后续课题组还将继续对该品种进行监测,收集更多批次的化学数据和临床治疗效果反馈数据,提高原料药的入选标

准,进一步明确温脾降糖颗粒的提取工艺。

参考文献

- [1] 聂娟,谢丽华,马港圆,等. 中药黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志,2018,34(7):228-231.
- [2] 李尧,李伟,张颖颖,等. 白术及麸炒白术拆分组分配伍对脾虚模型大鼠胃肠功能的影响[J]. 时珍国医国药,2018,29(11):2626-2628.
- [3] 刘美霞,戚进,余伯阳. 党参药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2018,30(11):36-39.
- [4] 孙奕,邓雁如,王颖,等. 翻白草的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2016,38(3):639-645.
- [5] 孙华,李春燕,薛金涛. 葛根的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报,2019,36(11):1097-1101.
- [6] 沈明,黄小强,阮美江. 鸡内金对功能性消化不良模型大鼠胃肠功能改善作用[J]. 福建中医药,2019,50(4):35-37.
- [7] 张永,陈旭,刘畅,等. 肉桂的化学成分、药理作用及综合应用研究进展[J]. 中国药房,2018,19(18):2581-2584.
- [8] 邵礼梅,许世伟. 山药化学成分及现代药理研究进展[J]. 中医药学报,2017,45(2):125-127.
- [9] 吴金滢,王春梅. 五味子多糖对NAFLD大鼠肝脏SREBP2/HMGCR表达的影响[J]. 吉林医药学院学报,2020,41(6):401-404.
- [10] 白文字,王厚恩,王冰瑶,等. 五味子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中成药,2019,41(9):2177-2183.
- [11] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2015,29(3):99-102.
- [12] 张耀堂,吴伟红,周福佳,等. 中药翻白草化学成分的研究[J]. 广州化工,2018,46(14):72-73.
- [13] 钱芳,陈煜. 正交试验法优选抗早颗粒提取及成型工艺[J]. 中国药业,2022,31(13):62-66.
- [14] 陈森,李曙光,杨淡梅. 正交试验优选通癥颗粒提取工艺[J]. 中国药业,2022,31(11):51-55.
- [15] 周静,杨卫平. 干姜的临床应用及药理研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2011,32(2):70-72.
- [16] 徐桐,丛竹凤,贺梦媛,等. 干姜的研究进展及质量标志物分析[J]. 山东中医杂志,2022,41(5):569-575.
- [17] 惠陈敏,唐金婧,唐金涛,等. 干姜及其提取物抗消化性溃疡的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2019,40(3):218-221.
- [18] 曾颜,田珈瑜,詹权操,等. 基于网络药理学研究6-姜辣素改善L6成肌细胞糖脂代谢紊乱的作用机制[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(6):1057-1066.
- [19] 曾颜. 6-姜辣素改善L6成肌细胞糖脂代谢紊乱的作用及机制[D]. 重庆:重庆医科大学,2022.
- [20] 王海花,李德成,孙靓. 黄芪的药效成分及药理作用研究[J]. 中国处方药,2018,16(11):22.
- [21] 白宏,别蓓蓓,常翠翠,等. 黄芪甲苷的药理活性研究进展[J]. 西北药学杂志,2022,37(3):198-202.
- [22] 秦依然,申程,尉希清,等. 黄芪甲苷通过调控AMPK/ULK1信号通路减轻高糖诱导的大鼠H9c2细胞损伤[J]. 中国病理生理杂志,2022,38(7):1304-1310.

(收稿日期:2023-01-29;修回日期:2023-05-10)