

· 工艺研究 ·

正交试验法优选三黄桃葛胶囊提取工艺

段园园¹, 黄月纯², 申卫红¹, 黄樱华², 刘东辉¹, 魏 刚¹ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 采用正交试验法优选三黄桃葛胶囊的提取工艺。**方法** 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以葛根素、总蒽醌和毛蕊异黄酮苷为评价指标, 通过综合评分优选三黄桃葛胶囊的提取工艺。**结果** 提取次数对试验结果有显著意义 ($P < 0.05$), 加水倍数和提取时间则无显著意义, 综合考察各因素的影响, 确定最佳提取工艺为加 6 倍量水, 回流提取 3 次, 每次 1 h。**结论** 本试验方法简单稳定, 对三黄桃葛胶囊的生产工艺具有一定的指导和参考意义。

关键词: 三黄桃葛胶囊; 提取工艺; 正交试验法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0097-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.026

Optimization of Extraction Technology for *Sanhuang Taoge* Capsules with Orthogonal Design

DUAN Yuanyuan¹, HUANG Yuechun², SHEN Weihong¹, HUANG Yinghua², LIU Donghui¹, WEI Gang¹ (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of *Sanhuang Taoge* capsules by orthogonal experiment. **Methods** The orthogonal test $L_9(3^4)$ was performed with the index of puerarin, total anthraquinones, and calycosin-7-O- β -D-glucoside contents as the evaluation indexes. The extraction process of *Sanhuang Taoge* capsules was optimized by multi-index comprehensive evaluation method. **Results** Extraction times had significant influence on the process ($P < 0.05$), while the volume of water added and time for extraction had no effect. The optimal extraction conditions were as follows: 6-fold water volume, extraction for 3 times and 1.0 h for each time. **Conclusion** The method is simple and steady, which will supply instruction and reference to the production of *Sanhuang Taoge* capsules.

Keywords: *Sanhuang Taoge* capsules; Extraction technology; Orthogonal design

三黄桃葛胶囊由黄芪、葛根、制大黄和地黄等中药组成, 具有清热生津、益气滋阴和活血化痰的作用, 适用于 2 型糖尿病气阴两虚夹瘀型患者的治疗。研究证明葛根素^[1]、大黄多糖和蒽醌类^[2-3]、黄芪多糖、皂苷和黄酮类^[4]、地黄多糖^[5]等成分均有不同程度的降低糖尿病模型大鼠血糖、升高血清胰岛素水平, 提高胰岛素敏感性、改善胰岛素抵抗等药理作用。

全方有效成分主要为多糖类、皂苷和黄酮类, 多易溶于热水, 工艺路线采用全方水提, 通过正交试验设计, 对葛根素、大黄总蒽醌和毛蕊异黄酮苷进行多指标综合评分, 确定最佳水提工艺条件, 以提高制剂的临床疗效。

1 仪器与试药

HP1100 高效液相色谱仪、DAD 二极管阵列检测

收稿日期: 2012-09-10

作者简介: 段园园, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药研究与指纹图谱分析。Email: 805127438@qq.com。通讯作者: 黄月纯, 女, 主任药师, 研究方向: 中药新药研究与指纹图谱分析。Email: huangyuechun@163.com。

器(美国安捷伦公司); BP 211D 电子天平($d=0.01\text{mg}$, 德国赛多利斯); SK7200LHC 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司); HH-4 恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司); TG16-WS 台式高速离心机(湖南赛特湘仪离心机有限公司)。芦荟大黄素(批号: 110795-200806), 大黄酸(批号: 110757-200206)、大黄素(批号: 0756-9908)、大黄酚(批号: 110796-200716)、大黄素甲醚(批号: 110758-200610)、葛根素(批号: 110752-200511)、毛蕊异黄酮苷(批号: 110907), 均购于中国药品生物制品检定所, 供含量测定用。所用药材购自广州至信中药饮片有限公司, 经鉴定均符合 2010 年版《中国药典》一部各药材项下有关规定。甲醇为色谱纯(美国 Merck 公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素含量测定^[6]

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 流动相是在《中国药典》葛根项下色谱条件的基础上优化。色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~5 min: 20 %A→25 %A; 5~10 min: 25 %A→30 %A; 10~18 min: 30 %A; 18~22 min: 30 %A→20 %A; 检测波长为 250 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 室温。理论板数按葛根素峰计算应不低于 4000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取葛根素对照品适量, 精密称定, 加 60 % 甲醇制成每 1 mL 含葛根素 77.2 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取 1 mL 浓缩液至 25 mL 容量瓶中, 加 60 % 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 阴性对照液的制备 精密吸取缺葛根阴性样品溶液, 按 2.1.3 项下供试品溶液的制备方法同法制备。

2.1.5 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液 10 μL、供试品溶液 5 μL、阴性对照液 5 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1, 结果阴性对照无干扰。

2.1.6 测定方法 分别精密吸取对照品溶液 10 μL 与供试品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪测定, 按外标法计算含量。

2.2 大黄总蒽醌含量测定^[7]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-0.1 % 磷酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~13 min: 82 %A; 13~24 min: 82 %A→90 %A; 24~30 min: 90 %A→82 %A; 检测波长为 254 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 室温。理论板数按大黄素峰计算应不低于 3000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含芦荟大黄素 14.8 μg、大黄酸 18.6 μg、大黄素 16.7 μg、大黄酚 15.9 μg、大黄素甲醚 21.5 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 5 mL 浓缩液置烧瓶中, 蒸干, 加 8 % 盐酸溶液 10 mL, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

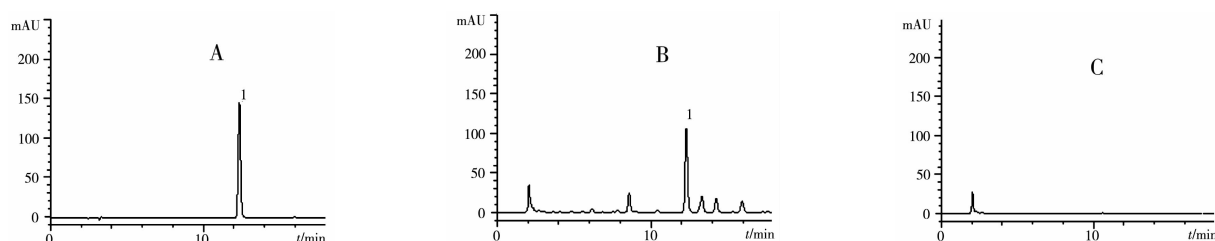
2.2.4 阴性对照溶液的制备 精密吸取缺大黄的阴性样品溶液, 按 2.2.3 项下供试品溶液的制备方法同法制备。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 2, 结果阴性对照无干扰。

2.2.6 测定方法 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.3 毛蕊异黄酮苷含量测定^[8]

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Zorbax

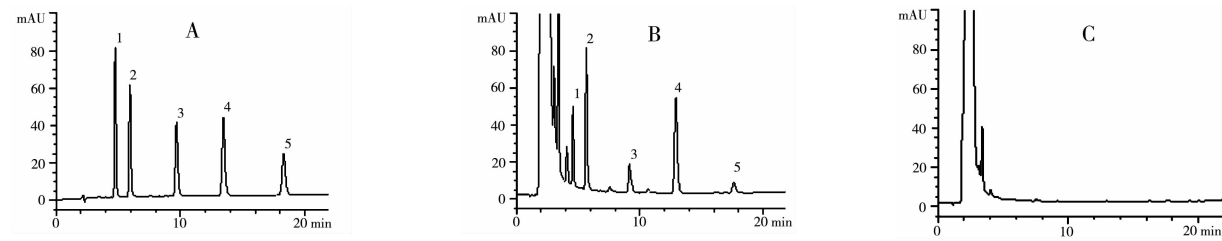


1. 葛根素

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 缺葛根阴性对照液

图1 提取液中葛根素含量测定 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC results of puerarin in the extraction solution



1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚
A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 缺大黄阴性对照液

图2 提取液中总蒽醌含量测定 HPLC 图谱

Figure 2 HPLC results of total anthraquinones in the extraction solution

SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-0.5 %甲酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~15 min: 25 %A; 15~30 min: 25 %A→40 %A; 30~35 min: 40 %A→70 %A; 35~45 min: 70 %A; 45~55 min: A 为 70 %A→25 %A; 检测波长为 260 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 室温。理论板数按毛蕊异黄酮苷峰计算应不低于 4000。

2.3.2 对照品溶液的制备 取毛蕊异黄酮苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含毛蕊异黄酮苷 51.7 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密吸取 2 mL 浓缩液至 10 mL 离心管中, 加入 3 mL 甲醇, 边加边振荡, 静置, 离心, 吸取上清液至 5 mL 容量瓶中, 加 60 %的甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 精密吸取缺黄芩的阴性样品溶液, 按 2.3.3 项下供试品溶液的制备方法同法制备。

2.3.5 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 3, 结果阴性对照无干扰。

2.3.6 测定方法 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

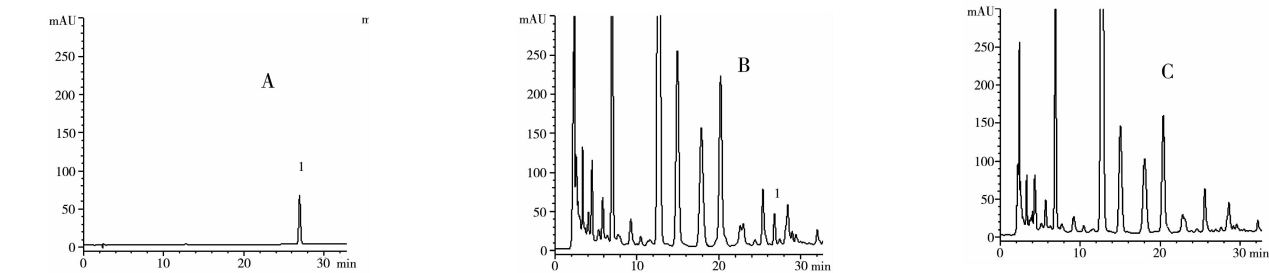
2.4 正交试验设计方法优选水提取工艺条件 采用 L₉(3⁴)正交试验设计, 以葛根素、大黄总蒽醌、毛蕊异黄酮苷提取率为指标对加水倍数、提取时间、提取次数几个因素进行考察, 因素水平见表 1。按照处方比例称取黄芪、地黄、制大黄等药材各 9 份, 每份总生药量 102 g, 按照 L₉(3⁴)正交试验表设计试验, 药液浓缩至 250 mL, 测定其中葛根素、毛蕊异黄酮苷和大黄总蒽醌的含量。采用综合加权评分进行分析, 权重系数分别为 0.4, 0.3, 0.3。试验安排和结果见表 2 和表 3。

表 1 水提工艺因素水平表

Table 1 Factors and levels of water extraction process

水平	因素			
	A 提取时间/h	B 提取次数/次	C 加水量/倍	D 空白
1	1.0	1	6	1
2	1.5	2	8	2
3	2.0	3	10	3

综合评分=葛根素提取量/葛根素最大提取量×



1. 毛蕊异黄酮苷
A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 缺黄芩阴性对照液

图3 提取液中毛蕊异黄酮苷含量测定 HPLC 图谱

Figure 3 HPLC results of campanulin in the extraction solution

表2 正交试验设计表及结果($n=2$)

Table 2 Orthogonal experimental design and results

实验号	因素				评价指标			综合评分
	A	B	C	D	葛根素 提取量/mg	毛蕊异黄酮苷 提取量/mg	大黄总蒽醌 提取量/mg	
1	1	1	1	1	357.34	6.25	23.95	43.10
2	1	2	2	2	673.52	13.45	41.18	82.96
3	1	3	3	3	751.48	14.23	65.87	100.00
4	2	1	2	3	510.68	8.12	20.14	53.47
5	2	2	3	1	711.51	12.83	40.75	83.48
6	2	3	1	2	700.12	13.88	56.87	92.43
7	3	1	3	2	569.59	11.67	36.59	71.59
8	3	2	1	3	643.57	12.98	43.48	81.42
9	3	3	2	1	749.91	13.20	49.00	90.06
K1	75.35	56.05	72.32	72.21				
K2	76.46	82.62	75.50	82.33				
K3	81.02	94.16	85.02	78.30				
R	5.67	38.11	12.71	10.11				

表3 综合评分方差分析表

Table 3 Variance analysis results of comprehensive score

因素	SS	f	F	P
A	54.20	2	1.00	$P > 0.05$
B	2291.40	2	42.28	$P < 0.05$
C	262.33	2	4.84	$P > 0.05$
误差	54.20	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19, P < 0.05$ 。

$0.4 \times 100 + \text{毛蕊异黄酮苷提取量} / \text{毛蕊异黄酮苷最大提取量} \times 0.3 \times 100 + \text{大黄总蒽醌提取量} / \text{大黄总蒽醌最大提取量} \times 0.3 \times 100$ 。

2.5 试验结果分析 由直观分析结果可以看出, 综合评分数据的极差大小显示各因素主次为 $B > A > C$, 最佳提取条件为 $A_3B_3C_3$; 以 C 因素为误差项的方差分析结果表明, 提取次数对提取效果有显著意义, 提取时间和加水量对提取效果无显著意义。考虑各因素影响主次, 结合能效, 最终确定最佳工艺条件为 $A_1B_3C_1$, 即加 6 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.6 优选工艺验证试验 为验证上述最佳工艺条件的稳定性, 取 3 倍处方量药材 3 份, 按优选工艺进行验证试验, 得出葛根素提取量平均值 1.12 g, RSD 为 0.34 %; 毛蕊异黄酮苷提取量平均值 21.50 mg, RSD 为 1.17 %; 大黄总蒽醌提取量平均值 76.06 mg, RSD 为 3.52 %, 与正交实验结果基本一致, 表明该工艺合理, 稳定可行。

3 讨论

预实验比较水提工艺与醇提工艺对葛根中葛根素和黄芪中毛蕊异黄酮苷的提取率差别不大, 且多糖类、皂苷和黄酮类成分易溶于水, 所以采用全方水提, 同时水提更适用于工业化生产。由正交验证试验结果与正交试验结果一致性表明, 试验确定三黄桃葛胶囊的最佳水提工艺合理, 稳定可行, 即 6 倍量水, 加热回流提取 3 次, 每次 1 h。

中药复方成分复杂, 不易于分离测定, 本实验在测定黄芪中毛蕊异黄酮苷时分别对色谱柱 Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Nucleodur C₁₈ Gravity(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和流动相乙腈-0.2 %甲酸、甲醇-0.2 %甲酸、甲醇-0.5 %甲酸及不同梯度进行了筛选, 最终确定色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.5 %甲酸时进行梯度洗脱, 毛蕊异黄酮苷的峰型及分离效果较好, 阴性干扰在 5 %以内, 方法可行。

参考文献:

- [1] 王建超, 雷婷, 王聪. 葛根素在治疗糖尿病中的药理作用[J]. 医学综述, 2009, 15(20): 3171-3172.
- [2] 孙瑜, 周永传, 陈德熙. 超滤法纯化大黄多糖的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(2): 165-168.
- [3] 张海凤, 董亚琳, 胡萨萨, 等. 5 种中药对两种不同来源 α-葡萄糖苷酶活性的抑制作用比较[J]. 中药材, 2008, 31(7): 1124-1127.
- [4] 李楠, 范颖, 贾旭鸣, 等. 黄芪不同有效部位配伍干预糖尿病模型大鼠的药效研究[J]. 中国实验方剂杂志, 2011, 17(6): 150-152.
- [5] Kiho T, Watanabe T, Nagai K, et al. Hypoglycemic activity of polysaccharides fraction from Rhizome of Rehmannia glutinosa Libosch. f. hueichingensis Hsiao and the effect of on carbohydrate metabolism in normal mouse liver [J]. Yakugaku Zasshi, 1992, 112(6): 393.
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 312-313.
- [7] 陈慕媛, 黄月纯, 刘东辉, 等. 双柏散中蒽醌、没食子酸与生物碱的含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 452-455.
- [8] 陈有根, 辛敏通, 杨滨, 等. 野生与栽培黄芪中毛蕊异黄酮苷的测定[J]. 中国实验方剂杂志, 2009, 40(9): 1484-1486.

(编辑: 宋威)