

•工艺研究•

正交试验法优选参桃软肝胶囊的提取工艺

李 慧¹, 贾建伟¹, 李远彬², 周岱翰^{2,3}, 赖小平^{1,2} (1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808; 3. 东莞康华医院, 广东 东莞 523808)

摘要: **目的** 研究参桃软肝胶囊的提取工艺。**方法** 采用正交试验设计的方法, 分别对胶囊的醇提和水提工艺进行研究, 以人参皂苷 Rb₁ 及大黄酚的转移率与干膏得率为指标, 进行加权评分, 优选提取工艺。**结果** 确定人参、当归、丹参药材最佳醇提条件为 75 % 乙醇, 加醇量为 7 倍, 提取时间 1 h, 提取 2 次; 生大黄、仙鹤草、桃仁等药材水提取条件为浸泡 0.5 h, 提取时间为 1.5 h, 提取 3 次, 加水量依次为 9, 7, 7 倍。**结论** 该工艺合理可行, 适用于参桃软肝胶囊的提取。

关键词: 参桃软肝胶囊; 提取工艺; 正交试验法; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0194-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.024

Optimization of Extraction Technology of Shentao Ruangan Capsule by Orthogonal Test

LI Hui¹, JIA Jianwei¹, LI Yuanbin², ZHOU Daihan^{2,3}, LAI Xiaoping^{1,2} (1. Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Research Institute of Mathematical Engineering of Guangzhou University of Chinese Medicine in Dongguan, Dongguan 523808 Guangdong, China; 3. Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan 5238082 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the extraction technology of Shentao Ruangan Capsule. **Methods** An orthogonal test was used to optimize the extraction condition. The contents of ginsenoside Rb₁ and chrysophanol, and the yield of dry paste were adopted as the indices for optimizing the ethanol extraction technology and water extraction technology. **Results** The optimal ethanol extraction technology for Radix Genseng, Radix Angelicae Sinensis, and Radix Salviae Miltiorrhizae was extracting for 1 h each time and for two times with 7 times of 75 % ethanol. The optimal water extraction technology for raw Radix et Rhizoma Rhei, Herba Agrimoniae, Semen Persicae was soaking for 0.5 h and extracting for 1.5 h each time and for 3 times with 9, 7, 7 times of water in order. **Conclusion** The optimal extraction technologies are reasonable and suitable for the extraction process of Shentao Ruangan Capsule.

Keywords: Shentao Ruangan Capsule; Extraction technology; Orthogonal test; HPLC

参桃软肝胶囊是由人参、当归、大黄、桃仁、冬虫夏草等中药组成, 具有健脾养肝、软坚散结的作用。人参为方中君药, 皂苷类成分是其活性成分^[1], 具有抗肿瘤、提高免疫力、降低血糖等药理作用^[2-4]。大黄蒽醌类化合物具有抗炎、抗肿瘤及保肝利胆的作用, 其中, 大黄酚具有明显的抗菌、保肝等活性。为了最大限度地提取其有效成分, 本试验以人参皂苷 Rb₁ 和大黄酚为定量指标, 采用正交

设计对其醇提和水提相关条件进行考察, 优选提取工艺, 为本制剂的制备提供依据。

1 材料与仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津), SPD-20A_{VP}(UV-VIS)检测器; BSA224S-CW 电子天平(上海奕宇电子仪器有限公司); 人参皂苷 Rb₁ 对照品、大黄酚对照品, 均购自中国食品药品检定研究

收稿日期: 2012-10-19

作者简介: 李慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 新药的研究与开发。Email: lihuihubei@126.com。通讯作者: 赖小平, 男, 教授, 研究方向: 新药的研究与开发。Email: vip.lxp88@gzhtcm.edu.cn。

基金项目: 东莞市高等院校科研机构科技计划(2011108101009)。

院，批号分别为 110704-201122，110796-200716；甲醇、乙腈为色谱纯，其余试剂均为分析纯；所用中药材均购自广州市药材公司中药饮片厂。

2 方法与结果

2.1 醇提部分的提取工艺研究

2.1.1 正交试验设计 选择乙醇浓度、提取时间、提取次数、溶剂用量作为考察的 4 个因素，各取 3 个水平，制定因素水平表^[6]，见表 1，以干膏得率 and 人参皂苷 Rb₁ 转移率为综合考察指标，采用 L₉(3⁴) 正交试验表进行试验。

表 1 醇提工艺正交设计的因素和水平

Table 1 Factors and the levels for alcohol extraction process orthogonal design

水平	A	B	C	D
	乙醇浓度 /%	提取时间 /h	提取次数 /次	溶剂用量 /倍
1	65	0.5	1	7
2	75	1	2	8
3	85	1.5	3	9

2.1.2 干膏得率的测定 按处方量的 1/10 称取生晒参、当归、丹参，按正交因素表中的各因素水平进行试验，药材回流提取，滤过，滤液回收乙醇浓缩至适量，置于已干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，于 105 ℃干燥 4 h，置干燥器中冷却 30 min，迅速精密称定质量，计算干膏得率。

2.1.3 人参皂苷 Rb₁ 含量测定

2.1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Atlantis C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈 - 水；梯度洗脱，见表 2；流速为 1 mL · min⁻¹；检测波长为 203 nm；进样量 10 μL；理论塔板数以人参皂苷 Rb₁ 峰计算不应低于 20000。

表 2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution procedure

时间 /min	水 /%	乙腈 /%
0~20	78→60	12→40
20~21	60→78	40→12
21~30	78	12

2.1.3.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品适量，加入甲醇制成每毫升含人参皂苷 Rb₁ 为 0.4 mg 的对照品溶液，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.1.3.3 供试品溶液的制备^[6] 取各正交试验项下的干浸膏适量，研细，各取 5 g，精密称定，置索氏提取

器中，加入三氯甲烷加热回流 3 h，弃去三氯甲烷液，药渣挥干溶剂，连同滤纸筒移入 100 mL 锥形瓶中，精密加入饱和正丁醇 50 mL，密塞，放置过夜，超声处理（功率 250 W，频率 50 kHz）30 min，滤过，弃去初滤液，精密量取续滤液 25 mL 置蒸发皿中蒸干，残渣加甲醇转移至 10 mL 容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3.4 线性关系考察 精密吸取人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液 1，2，3，5，7，9 mL 置于 10 mL 容量瓶中，加甲醇定容，进样 10 μL，按照上述色谱条件测定峰面积，以进样浓度为横坐标，相应色谱峰面积为纵坐标，得回归方程 $Y = 2655100X + 68926$ ， $r = 0.9995$ ，表明人参皂苷 Rb₁ 的进样量在 0.4059~3.6536 μg 之间与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.3.5 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，测定含量，计算转移率。采用综合加权评分法，将干膏得率和转移率最高项各定为 100，均衡系数分别为 0.2，0.8，结果为其综合评分，对综合评分的数据进行方差分析，结果见表 3 和表 4。

表 3 醇提工艺正交试验结果

Table 3 Alcohol extraction process orthogonal experiment results

试验号	A	B	C	D	干膏得率 /%	人参皂苷 Rb ₁ 转移率 /%	综合评价
1	1	1	1	1	14.82	13.77	22.82
2	1	2	2	2	27.69	70.01	85.52
3	1	3	3	3	31.13	73.43	91.03
4	2	1	2	3	28.07	63.85	79.80
5	2	2	3	1	31.28	82.58	100.00
6	2	3	1	2	19.00	14.62	26.31
7	3	1	3	2	26.82	70.89	85.82
8	3	2	1	3	10.60	11.66	18.08
9	3	3	2	1	21.91	50.56	62.98
K ₁	199.37	188.43	67.21	185.80			
K ₂	206.11	203.60	228.80	197.64			
K ₃	166.87	180.32	276.84	188.91			
R	13.08	7.76	69.88	3.95			

表 4 醇提工艺方差分析

Table 4 Analysis of variance for alcohol extraction process

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	293.50	2	146.748	11.7	
B	93.10	2	46.548	3.71	
C	8027.87	2	4013.936	319.59	P < 0.05
D	25.12	2	12.559	1.00	
误差 E	25.12	2	12.559		

注：F_{0.05}(2,2)=19.00。

由方差分析结果可知各因素对试验结果影响大

小顺序为：提取次数(C)>乙醇浓度(A)>加醇倍数(D)>提取时间(B)，A、B、D均无显著性差异，C有显著性影响。为节约成本，缩短生产周期，保证提取率，结合方差分析结果，醇提工艺拟采取最佳提取工艺A₂B₂C₃D₁，即7倍量75%乙醇，提取3次，每次1h。

2.2 水提部分提取工艺研究

2.2.1 正交试验设计 根据工艺要求，选定浸泡时间、提取时间、提取次数、加水量作为考察的4个因素，各取3个水平，制定因素水平表^[9]，见表5，以干膏得率和大黄酚转移率为综合考察指标，采用L₉(3⁴)正交试验表进行实验。

表5 水提工艺正交设计的因素和水平

Table 5 Factors and the levels for water extraction process orthogonal design

水平	A	B	C	D
	浸泡时间/h	提取时间/h	提取次数/次	加水量/倍
1	0.5	0.5	1	7
2	1	1	2	8
3	1.5	1.5	3	9

2.2.2 干膏得率的测定 按处方量的1/10称取生大黄、仙鹤草、桃仁，按正交因素表中的各条件试验，进行回流提取，滤过，滤液置于已干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，于105℃干燥4h，置干燥器中冷却30min，迅速精密称定重量，计算干膏得率。

2.2.3 大黄酚含量测定

2.2.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent C₁₈(250mm×4.6mm，5μm)；流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)；流速1mL·min⁻¹；柱温30℃；检测波长254nm；进样量10μL。

2.2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄酚对照品适量，加甲醇制成每1mL含大黄酚16μg的溶液，作为对照品溶液。

2.2.3.3 供试品溶液的制备 取各正交试验项下的干浸膏适量，分别研细，各取3g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇50mL，密塞，称定重量，超声处理(功率250W，频率33kHz)30min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液1，2，3，5，7，9mL到10mL的容量瓶中，加甲醇定容，各进样10μL，测定其色谱峰面积积分值。以相应色谱峰面积积分值为纵坐标，大黄酚对照品进

样量(μg)为横坐标，进行线性回归，得回归方程为Y=4863.6X-11.431，r=0.9997，表明大黄酚的进样量在0.016~0.144μg之间与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.3.5 测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各10μL注入液相色谱仪，测定，计算。结果见表6，方差分析见表7。

表6 水提工艺正交试验结果

Table 6 Water extraction orthogonal experiment results

试验号	A	B	C	D	干膏得率/%	大黄酚转移率/%	综合评价
1	1	1	1	1	3.68	7.8981	13.40
2	1	2	2	2	3.68	35.1886	59.16
3	1	3	3	3	14.94	60.3282	100.00
4	2	1	2	3	21.87	29.5454	49.41
5	2	2	3	1	11.85	47.6485	89.44
6	2	3	1	2	18.47	23.0689	38.43
7	3	1	3	2	8.87	37.6184	62.84
8	3	2	1	3	14.91	25.7737	42.37
9	3	3	2	1	8.42	32.7243	60.06
K ₁	172.56	125.65	94.20	162.90	14.00		
K ₂	177.28	190.97	168.63	160.43			
K ₃	165.27	198.49	252.28	191.78			
R	4.00	24.28	52.69	10.45			

表7 水提取正交设计方差分析表

Table 7 Analysis of variance for water extraction orthogonal design

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	24.41	2	12.203	0.1	
B	1069.88	2	534.940	5.28	
C	4169.60	2	2084.802	20.59	P<0.05
D	202.55	2	101.277	1.00	
误差E	202.55	2	101.277		

注：F_{0.05}(2,2)=19.00。

由方差分析结果可知各因素对试验结果影响大小顺序为提取次数(C)>提取时间(B)>加水倍数(D)>浸泡时间(A)，A、B、D均无显著性差异，只有C有显著性意义。结合实际情况和生产成本，优选水提最佳工艺为A₁B₃C₃D₃，选择用浸泡0.5h，煎煮3次，每次1.5h，加水倍数为第1次9倍，第2，3次各7倍。

2.3 工艺验证 取处方比例的药材3份，按优选工艺进行重复性验证试验，结果见表8。

3 讨论

测定人参皂苷Rb₁含量时，参照文献方法^[7-8]采用正丁醇或甲醇超声提取制备供试品，测定发现色谱峰无法辨别，干扰的物质比较多，考虑到其脂溶性成分在提取过程中可能保留多，无法去除完全；参

表 8 验证试验结果

Table 8 The validation experimental results

试验号	醇提法		水提法	
	人参皂苷 Rb ₁ 转移率/%	干膏得率/%	大黄酚转移率/%	干膏得率/%
1	80.23	28.07	60.12	20.16
2	82.94	27.98	60.64	19.08
3	81.25	27.77	62.80	19.47
平均值	81.47	27.94	61.19	19.57

考2010 年版《中国药典》人参含量测定项下方法，用三氯甲烷提取，先除去大部分脂溶性成分的干扰，再用正丁醇进一步提取，此方法下人参皂苷 Rb₁ 峰与其他峰分离良好，测定人参皂苷 Rb₁ 的含量更可靠，且保留时间适中，节约了溶剂用量。

本试验针对处方中各药味有效成分的化学性质，分别采用醇提法和水提法，通过正交试验优化了提取工艺。从正交试验结论可以看出提取次数是影响提取工艺的主要因素，这也验证了中医临床方剂制备时煎煮多次的合理性；优选工艺与正交设计最佳

工艺的结果基本一致，说明所选用的提取条件重复性好，可操作性强，稳定可行，适用于工业化生产。

参考文献：

[1] 高爽，汤淳，刘乃侨. 论人参的成分及人参皂甙的药用价值[J]. 辽宁经济职业技术学院学报，2008，（1）：63-65.
[2] 石楸鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展[J]. 中国药房，2010，21（31）：2967-2968.
[3] 张丽媛. 人参皂苷 Rb₂ 的抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 安徽农业科学，2008，36(4)：1467-1468.
[4] 张前. 人参的化学成分和药理活性[J]. 光明中医，2011，26(2)：369.
[5] 于立芬. 数理统计方法[M]. 上海：上海科技出版社，1984：91.
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：8.
[7] 张宁，张丽. HPLC 法测定颈康胶囊中人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 与三七皂苷 R1 的含量[J]. 中成药，2008，30(2)：241.
[8] 李淑贤，梁生旺. 肝癥消胶囊中人参皂苷的含量测定[J]. 亚太传统医药，2011，7(7)：22.

(编辑：宋威)

高速逆流色谱分离制备钩吻素子

刘 浩^{1,2}，沈 洁¹，刘 铭¹，许 盈¹，俞昌喜¹(1. 福建医科大学药学院药理学系，福建 福州 350004；2. 武警福建总队医院药剂科，福建 福州 350003)

摘要：目的 建立应用高速逆流色谱技术分离纯化中国钩吻中钩吻素子的方法。**方法** 从中国钩吻中提取得到的钩吻总碱以氯仿-甲醇-0.1 mol/L HCl(4：4：2，V/V/V)为溶剂体系，通过高速逆流色谱进行分离，得到的目标单体采用高效液相色谱分析纯度，核磁共振谱氢谱、质谱分析确证化学结构。**结果** 进样 300 mg 钩吻总碱，分离得到生物碱单体为 75 mg，经结构鉴定确证为钩吻素子，高效液相色谱分析得到质量分数为 99.2 %。**结论** 高速逆流色谱技术可高效分离纯化钩吻素子。

关键词：钩吻；钩吻素子；高速逆流色谱；分离纯化

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1003-9783(2013)02-0197-04

doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.025

Separation and Purification of Koumine from *Gelsemium elegans* by High-speed Counter-current Chromatography

LIU Hao^{1,2}，SHEN Jie¹，LIU Ming¹，XU Ying¹，YU Changxi¹(1. Department of Pharmacology，School of Pharmacy，Fujian Medical University，Fuzhou 350004 Fujian，China；2. Pharmacy Department，Armed Police Hospital of Fujian，Fuzhou 350003 Fujian，China)

Abstract：Objective To develop a new method of high-speed counter-current chromatography(HSCCC) for separation and purification of koumine from *Gelsemium elegans*. **Methods** The crude extract of *Gelsemium elegans* was sep-

收稿日期：2012-10-18

作者简介：刘浩，男，主管药师，研究方向：神经精神药物药理学。Email：guanghaol@163.com。通讯作者：俞昌喜，教授，博士生导师，研究方向：神经精神药物药理学。Email：changxiyu@mail.fjmu.edu.cn。

基金项目：福建医科大学重大科研项目(ZD009)；福建省发展和改革委员会产业技术开发项目(闽发改投资[2009]958 号)。