

气血双补口服液的提取工艺优选

唐安福, 崔恩忠, 汤湜*

(南京军区南京总医院制剂科, 南京 210002)

[摘要] 目的: 优选气血双补口服液的提取工艺。方法: 采用醇水双提法, 以黄芪甲苷提取量为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、提取次数及乙醇用量对醇提取工艺的影响; 以芍药苷和淫羊藿苷提取率为指标, 选取提取时间、提取次数及加水量为考察因素, 通过正交试验优选水提取工艺条件。结果: 气血双补口服液的最佳提取工艺条件为取黄芪和当归加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h; 取黄芪和当归药材残渣及剩余药味, 加 9 倍量水回流提取 3 次, 每次 2 h。结论: 优选的提取工艺科学合理、稳定可行。

[关键词] 气血双补口服液; 醇水双提; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0051-04

[doi] 10.11653/syfy2013080051

Optimization of Extraction Technology of Qixue Shuangbu Oral Liquid

TANG An-fu, CUI En-zhong, TANG Hao*

(Department of Pharmaceutical Preparation, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Qixue Shuangbu oral liquid. **Method:** Alcohol and water dual extraction method was adopted, with extraction amount of astragaloside IV as index, effects of extraction time, the concentration of ethanol, the amount of ethanol and extraction times on alcohol extraction technology was investigated by orthogonal test; With extraction ratio of peoniflorin and icariin as indicators, extraction time, extraction times and the amount water as factors, water extraction technology was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology conditions were as follows: *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* were extracted twice with 8 times the amount of 70% ethanol by 1.5 h per time; Then the gruffs and else prescription drugs were reflux extracted 3 times with 9 the amount of water by two hours every time. **Conclusion:** This optimized extraction technology was scientific, reasonable, stable and feasible.

[Key words] Qixue Shuangbu oral liquid; alcohol and water dual extraction; orthogonal test

气血双补口服液为南京军区总医院院内制剂, 具有益气养血、温肾填精之功效, 主要用于头晕目眩、少气懒言、倦怠乏力等气血两虚症, 临床应用多年, 疗效确切。该方由黄芪、当归、党参、白芍、淫羊藿、枸杞子、熟地黄、仙茅、白术、茯苓共 10 味中药组成, 方中各药味所发挥的功用既相互独立又相互协

作, 所含成分, 既有水溶性部位, 也有脂溶性部位, 如只选定一种指标成分进行提取工艺优选, 难以保证制剂整体疗效的发挥。为将各药味中主要有效部位尽可能提取充分, 本实验采用醇水双提法, 其中黄芪和当归 2 味药加乙醇回流提取, 残渣与其他 8 味药混合加水提取, 通过正交试验优选醇提取和水提取工艺条件, 为气血双补口服液的临床应用提供实验依据。

1 材料

1515 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), XS105 型 1/10 万电子天平(梅特勒尔-托利多公司), DW-2 型调温电热器(南通市通州申通电热器

[收稿日期] 20121101(018)

[第一作者] 唐安福, 药师, 从事中药制剂工艺研究, Tel: 025-80860343, E-mail: ahi5499@sina.com

[通讯作者] * 汤湜, 主管药师, 硕士, 从事中药制剂工艺研究, Tel: 025-80860343, E-mail: tang_hao0518@sina.com

厂),GM-0.5B 型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司)。

处方中 10 味药均购自南京医药股份有限公司,经南京军区总医院王曙东主任药师鉴定,符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。芍药苷、淫羊藿苷、黄芪甲苷对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 110736-200934,110737-200312,110781-200613),D101 型大孔吸附树脂(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20110829),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Hanbon ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(79:21),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温为室温,漂移管温度 70 ℃,气体流速 25 psi,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.502 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品溶液 2,4,6,8,12 μL,以峰面积积分值的对数值为横坐标,对照品进样量的对数值为纵坐标,得回归方程为 $\lg Y = 0.691gX - 3.6176 (r = 0.9991)$,表明黄芪甲苷在 1.004 ~ 6.024 μg 与峰面积积分值的对数值呈良好的线性关系。

2.1.4 供试品溶液的制备 取样品溶液适量,加 10% 氨水溶液 10 mL,充分振摇提取 10 min,用水饱和正丁醇萃取 3 次,每次 15 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加稀乙醇使溶解,挥至无醇味,过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),用水 20 mL 洗脱,弃去水液,加 40% 乙醇 15 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 30 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 芍药苷的标准曲线及线性范围的建立:

2.2.1 色谱条件 Hanbon ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(29:71),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温为室温,检测波长 230 nm,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成 0.2004 g·L⁻¹的对照品储备液。

2.2.3 标准曲线的绘制 取对照品储备液适量,用甲醇稀释得质量浓度分别为 200.40,150.30,

100.20,50.10,25.05 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。以峰面积积分为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得线性回归方程 $Y = 15184X - 51107 (r = 0.9999)$,表明芍药苷质量浓度在 25.05 ~ 200.40 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.4 供试品溶液的制备 取样品溶液适量,用乙醚萃取 3 次,每次 10 mL,合并萃取后水层;加正丁醇萃取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,置于蒸发皿内,置水浴锅上挥干。残留物用稀乙醇溶解,置于 25 mL 量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 淫羊藿苷的标准曲线及线性范围的建立:

2.3.1 色谱条件 Hanbon ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(27:73),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温为室温,检测波长 270 nm,进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成 50 mg·L⁻¹的对照品贮备液。

2.3.3 标准曲线的绘制 吸取上述对照品贮备液 5,10,15,20,25 μL 注入液相色谱仪,各进样 2 次测得平均峰面积积分值。以峰面积积分为纵坐标,对照品进样量为横坐标,得线性回归方程 $Y = 22480X + 200433 (r = 0.9997)$,表明淫羊藿苷进样量在 25 ~ 125 mg·L⁻¹ 与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3.4 供试品溶液的制备 同 2.2.4 项。

2.4 提取工艺优选

2.4.1 醇提取工艺^[1-3] 处方中黄芪和当归采用乙醇提取,以黄芪甲苷含量为指标,通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、次数和时间对提取效率的影响^[4],因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 气血双补口服液醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数 /%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取次数 /次
1	60	8	1	1
2	70	10	1.5	2
3	80	12	2	3

由直观分析可知,各因素对醇提取工艺的影响顺序为 $A > D > B > C$,最佳提取工艺为 $A_2B_1C_2D_2$,即加 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。按最佳提取工艺条件进行 3 次验证试验,结果黄芪甲苷提取量分别为 0.652,0.674,0.669 mg·g⁻¹,说明优选

表2 气血双补口服液醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	黄芪甲苷提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.501
2	1	2	2	2	0.535
3	1	3	3	3	0.516
4	2	1	2	3	0.669
5	2	2	3	1	0.623
6	2	3	1	2	0.624
7	3	1	3	2	0.490
8	3	2	1	3	0.452
9	3	3	2	1	0.436
K_1	1.551	1.659	1.578	1.560	
K_2	1.971	1.611	1.641	1.650	
K_3	1.377	1.575	1.629	1.638	
R	0.540	0.084	0.063	0.090	

的提取工艺稳定可行、重复性好。

2.4.2 水提取工艺 选定提取时间、提取次数和加水量为考察因素,以芍药苷和淫羊藿苷含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选气血双补口服液的水提取工艺。称取处方量黄芪和当归,按 2.4.1 项下优选的提取工艺进行提取,取药渣,称取处方中其他药味共 58 g,合并后加水提取。按正交设计表进行试验,因素水平见表 3,试验安排及结果见表 4,方差分析见表 5,6。

表3 气血双补口服液水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取次数/ 次	B 提取时间/ h	C 加水量/ 倍
1	1	1	6
2	2	1.5	9
3	3	2	12

由表 4~6 结果可知,以芍药苷提取率为指标,直观分析表明三因素作用大小为 $A > B > C$,方差分析表明三因素影响均无显著意义,最佳提取工艺为 $A_3B_3C_2$;以淫羊藿苷提取率为指标,直观分析表明三因素影响大小为 $A > B > C$,方差分析表明 A 因素具有极显著影响,B 因素影响显著,而 C 因素则无显著意义,最佳提取方案为 $A_3B_3C_2$ 。综合考虑,确定最佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_2$,即加 9 倍量水连续回流提取 3 次,每次 2 h。按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,结果芍药苷提取率分别为 1.84%,1.78%,1.82%;淫羊藿苷提取率分别为 0.83%,0.79%,

表4 气血双补口服液水提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	芍药苷提取率/ %	淫羊藿苷提取率/ %
1	1	1	1	1	0.82	0.44
2	1	2	2	2	1.14	0.51
3	1	3	3	3	0.99	0.53
4	2	1	2	3	0.97	0.67
5	2	2	3	1	1.26	0.68
6	2	3	1	2	1.08	0.71
7	3	1	3	2	1.04	0.66
8	3	2	1	3	1.22	0.71
9	3	3	2	1	1.81	0.82
芍药 K_1	2.949	2.829	3.120	3.891		
药 K_2	3.309	3.621	3.921	3.261		
苷 K_3	4.071	3.879	3.291	3.180		
R	1.122	1.050	0.801	0.711		
淫羊 K_1	1.479	1.770	1.860	1.941		
藿 K_2	2.061	1.899	2.001	1.881		
苷 K_3	2.190	2.061	1.869	1.911		
R	0.711	0.291	0.141	0.060		

表5 芍药苷提取率方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.218	2	0.109	2.162	>0.05
B	0.199	2	0.100	1.977	>0.05
C	0.118	2	0.059	1.175	>0.05
D(误差)	0.101	2	0.050		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$; $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 6 同)。

表6 淫羊藿苷提取率方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.095	2	0.048	158.778	<0.01
B	0.014	2	0.007	23.444	<0.05
C	0.004	2	0.002	6.778	>0.05
D(误差)	0.001	2	0.000		

0.80%;与正交试验结果一致,说明该工艺条件稳定可行。

取所用药材饮片适量,进行 HPLC 测定,结果黄芪甲苷、芍药苷、淫羊藿苷质量分数分别为 0.082%,2.07%,1.01%;按优选的工艺条件进行提取,结果黄芪甲苷、芍药苷、淫羊藿苷转移率分别为 81.13%,87.60%,80.20%,说明该提取工艺科学合理、稳定可行。

3 讨论

根据不同药物所含成分的化学性质,采用醇水双提法,对方药进行提取,相比原方直接加水提取,大大提高了方中有效成分的浸出率,能更好地体现中医治疗的整体观念,充分发挥方中药物的功效,同时通过 HPLC 对有效成分进行定量分析,有利于提高制剂的内在质量和临床疗效。

由于气血双补口服液为液体制剂^[5],且处方组成较为复杂,干扰成分较多,因此先用乙醚萃取法去除极性较小的亲脂性化合物,再用正丁醇萃取芍药苷,以降低干扰性化合物对芍药苷测定的影响;同时发现此方法同样适用于淫羊藿苷的检测。参阅 2010 年版《中国药典》及相关文献资料^[6-7],确定黄芪甲苷的测定方法为用 10% 氨水溶液振摇提取 10 min,用水饱和正丁醇连续萃取 3 次。

芍药苷含量测定时,2010 年版《中国药典》及相关文献^[8-9]中选用乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86)为流动相。本实验改用甲醇-0.1% 磷酸水溶液,并通过调整其配比(15:85,20:80,25:75,30:70,29:71),发现在甲醇-0.1% 磷酸水溶液 29:71 时芍药苷峰型较好,保留时间相对较短。2010 年版《中国药典》及相关文献^[10-12]中均采用乙腈-水(30:70)为流动相测定淫羊藿苷含量。本实验将乙腈-水调整为 27:73 后,淫羊藿苷能与杂质有效分离,且保留时间相对较短。2010 年版《中国药典》以乙腈-水(32:68)为流动相测定黄芪甲苷含量,但乙腈用量过低,黄芪甲苷峰保留时间较长,乙腈用量高则有严重拖尾现象^[13-15],改用甲醇-水(79:21),黄芪甲苷的峰型和保留时间均较好;流动相流速为 1.0 mL·min⁻¹时,噪音信号较大,可能是因为流量较大导致雾化不完全,调整流速为 0.8 mL·min⁻¹后效果明显改善。

方中黄芪、熟地黄、枸杞子等药味均含大量多糖类等药效成分,目前多采用苯酚-浓硫酸或蒽酮-硫酸分光光度显色法测定。但由于该口服液中含大量色素类物质,经预试验考察发现,色素类物质对多糖成分的测定影响较大,为提高操作效率,缩短时间,本实验提取工艺优选时,暂未考察多糖含量的变化。

[参考文献]

- [1] 管日增,胡万杨,余跃,等. 黄芪中主药活性成分提取工艺的研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12):2570.
- [2] 杨明,赵强强,熊永爱,等. 黄芪皂苷提取纯化工艺研究[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(3):44.
- [3] 孙芸,葛亮,刘俊昌,等. 膝痹膏方中当归的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 9(32):686.
- [4] 康阿龙,马金强,汤迎爽. 多指标正交试验优选祖师麻有效部位群的提取工艺[J]. 解放军药学学报, 2012, 28(2):110.
- [5] 汤溟,崔恩忠,唐安福,等. HPLC 法测定气血双补口服液中芍药苷的含量[J]. 中国医药导报, 2012, 9(14):127.
- [6] 刘浩文,刘嘉仪,杨妙荣,等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6):659.
- [7] 潘细贵,汪洋,雷湘,等. 大孔吸附树脂纯化黄芪总皂苷的提取工艺研究[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(11):1029.
- [8] 韩秀兰. HPLC 法测定暖宫孕子丸中芍药苷的含量[J]. 中国药品标准, 2009, 10(6):467.
- [9] 刘玉峰,王程程,刘宇,等. 正交试验法优化赤芍总苷闪式提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):12.
- [10] 王臣存,冯鑫,赵薇,等. HPLC 法测定壮骨止痛颗粒中淫羊藿苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4):742.
- [11] 高红利,张京平,段金菊,等. HPLC 测定益气宁神滴丸中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药房, 2011, 22(15):1396.
- [12] 宋霞,宋三孔,焦海胜. HPLC 测定乳病消片中淫羊藿苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(2):282.
- [13] 高建,夏泉,黄赵刚,等. HPLC-ELSD 同时测定当归补血总苷中黄芪甲苷和黄芪皂苷 II[J]. 中成药, 2012, 34(2):268.
- [14] 马睿,代龙,孙明江,等. 白芪龙胶囊的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):52.
- [15] 程合理. 黄芪根茎叶中黄芪甲苷的含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):57.

[责任编辑 仝燕]