

· 方药研究 ·

复方培元颗粒的提取工艺研究

李宛蓉¹, 桂双英^{1,2,3}, 王举涛¹, 王 键^{1,4}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中药制剂工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012; 4. 安徽省“115”新安医药研究与开发创新团队, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 优选复方培元颗粒的提取工艺。方法 以总多糖含量、人参皂苷 Rb1 和淫羊藿苷总含量、出膏率为评价指标, 选取溶剂用量、提取时间、提取次数等为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选复方培元颗粒的最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺参数为加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次提取 1 h。结论 优选的提取工艺切实可行, 可为复方培元颗粒的质量控制提供依据。

[关键词] 复方培元颗粒; 提取工艺; 人参皂苷 Rb1; 淫羊藿苷; 正交设计

[中图分类号] R283 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2015.04.024

复方培元颗粒是由人参、黄芪、淫羊藿等多味中药组成的临床经验方, 是新安医学流派传人王键的临床经验方, 具有固本培元、温阳益气的功效, 适用于癌症患者因手术引起的虚证, 以及化学治疗后发

生骨髓抑制、头晕、乏力等不良反应。本研究通过正交试验设计对复方培元颗粒的提取工艺进行优化, 为今后研究与开发提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(含在线真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器); 万分之一分析天平: 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; KQ2200 型超声波清洗器: 昆山市仪器有限公司; UV757CRT 紫外分光光度计; 循

基金项目: 安徽省科技攻关项目(12010402084); 国家科技支撑计划项目(2012BAI26B03)

作者简介: 李宛蓉(1990-), 女, 硕士研究生

通信作者: 桂双英, guishy0520@126.com

high-, middle-, and low-dose centipede extract groups, and qi-tonifying and blood-activating prescription (QBP) group. A rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion of the middle cerebral artery was established by suture method. After modeling, these groups received respective treatments by gavage for 14 consecutive days. The histomorphology of ischemic penumbra in the frontal and parietal cortex was observed under a light microscope; the expression of NGB was measured by immunohistochemistry.

Results The model group showed remarkable cerebral edema and neuronal necrosis in the ischemic penumbra in the frontal and parietal cortex. By contrast, the high-, middle-, and low-dose centipede extract groups and QBP group had significantly reduced pathological changes in the ischemic penumbra in the frontal and parietal cortex. There were no significant differences in the positive expression area and mean optical density of NGB between the sham-operation group and model group ($P > 0.05$). The positive expression area and mean optical density of NGB showed significant differences between the model group and the high-, middle-, and low-dose centipede extract groups ($P < 0.05$), and the difference was most significant between the model group and the high-dose centipede extract group. The positive expression area and mean optical density of NGB also showed significant differences between the QBP group and the high-, middle-, and low-dose centipede extract groups ($P < 0.05$), but the two indices showed no significant differences between the QBP group and the high-dose centipede extract group ($P > 0.05$). **Conclusion** Centipede extract can reduce the focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by up-regulating the expression of NGB in the ischemic penumbra in a significant dose-dependent manner, and high-dose centipede extract has comparable efficacy to QBP.

[Key words] focal cerebral ischemia-reperfusion injury; centipede; Qi-tonifying and blood-activating prescription; histomorphology; neuroglobin

环水式多用真空泵:郑州长城科工贸有限公司; DZF-6050型真空干燥箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.2 试剂与试药 人参皂苷 Rb1 对照品(批号 110704-201223)、淫羊藿苷对照品(批号 110737-200415):均购自中国药品生物制品检定所;葡萄糖:天津市博迪化工有限公司;乙腈、甲醇均为色谱纯;水为超纯水,使用前经 0.45 μm 滤膜滤过;其他试剂均为分析纯。人参、黄芪、淫羊藿等饮片购于合肥乐家老铺中药饮片有限责任公司,经安徽中医药大学周建理教授鉴定均为合格饮片。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计^[1-3] 复方培元颗粒临床以汤剂形式应用,且方中饮片主要有效成分多为皂苷和多糖类成分,均有较好的水溶性,所以本实验采用水煎煮法。以复方中总多糖、人参皂苷 Rb1 和淫羊藿苷总含量与出膏率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表对加水量(A)、提取时间(B)及提取次数(C)进行优选。因素水平表见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素		
	A/倍	B/h	C/次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

2.2 饮片吸水率考察 称取按处方比例混合的饮片 52 g,共 3 份,分别加入 10 倍量水(520 mL)浸泡至透心,滤过,量取剩余水的容积,计算吸水率,结果平均吸水率为 115%。因此,第 1 次煎煮时加水量应增加至 1.15 倍。

2.3 干膏得率测定 精密吸取正交试验水煎液适量,置已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至质量,迅速称质量,计算干膏得率。

2.4 紫外分光光度法测定总多糖含量^[4-5]

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 48 h 的葡萄糖对照品 50 mg,用蒸馏水定容至 50 mL,摇匀,精密量取 10 mL,用蒸馏水稀释至 100 mL,即得 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备 按处方精密称取饮片,制成 0.086 7 g/mL 的提取液,量取适量,经 Sevag 法(三氯甲烷:正丁醇=4:1)脱蛋白,样品液与三氯甲烷-正丁醇的体积比为 4:1,分取上清液,加无水乙醇至含醇量达 80%,冷藏 24 h,5 000 r/min 离心 30 min,取沉淀,用 10 mL 丙酮洗涤 3 次,挥干,沉淀加

水溶解,定容至 100 mL,即得。

2.4.3 检测波长的确定 吸取一定量的供试品溶液,显色后在 200~800 nm 波长范围内扫描。结果表明,供试品的最大吸收峰位于 488 nm 波长处,故本试验选用 488 nm 作为检测波长。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葡萄糖对照品溶液 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 6 只试管中,分别加入蒸馏水补至 2 mL,然后分别加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸,混匀后再将 6 只试管置于沸水中 15 min,取出后冷却至室温。在 488 nm 波长测定吸光度。以吸光度(A)对葡萄糖浓度(c)进行线性回归,得回归方程为 $c=0.0149A-0.0375$ ($r=0.9956$)。结果表明,葡萄糖浓度在 20.0~60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 精密量取葡萄糖对照品溶液 1.0 mL,依法显色后连续 6 次测定吸光度。结果,吸光度的 RSD=1.70%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一批次供试品溶液,依法显色后,在 60 min 内每间隔 10 min 测定吸光度。结果,吸光度的 RSD=1.84%,表明供试品溶液在 60 min 内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 分别吸取正交试验提取液 6 份,按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,依法显色后测定吸光度。结果,吸光度的 RSD=1.12%,表明该方法重现性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密称取已知多糖含量的提取液 6 份,加入葡萄糖对照品溶液适量,按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液,依法显色,测定吸光度,计算多糖含量。结果表明,多糖含量的平均回收率为 97.88%,RSD=1.33%,表明该方法准确可行。

2.5 高效液相色谱法测定人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的含量^[6-7]

2.5.1 对照品溶液制备 精密称取人参皂苷 Rb1 对照品与淫羊藿苷对照品适量,加甲醇溶解,制成含人参皂苷 Rb1、淫羊藿苷分别为 0.125、0.115 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液制备 取提取液 50 mL,以 150 mL 水饱和正丁醇萃取 3 次(每次 50 mL),合并正丁醇液,再以 100 mL 氨试液洗涤 2 次(每次 50 mL)。正丁醇液蒸干,用甲醇定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,置于冰箱备用。临用前过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.5.3 阴性样品溶液制备 分别取缺人参药材与缺淫羊藿药材的提取液,按“2.5.2”项下供试品溶液

的制备方法制备阴性样品溶液。

2.5.4 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱 (洗脱程序见表 2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。

表 2 流动相梯度洗脱程序

时间/min	乙腈/%	水/%
0~20	19	81
20~30	19→22	81→78
30~40	22	78
40~65	22→29	78→71
65~70	29	71
70~100	29→40	71→60

2.5.5 阴性样品干扰考察 精密吸取阴性对照溶

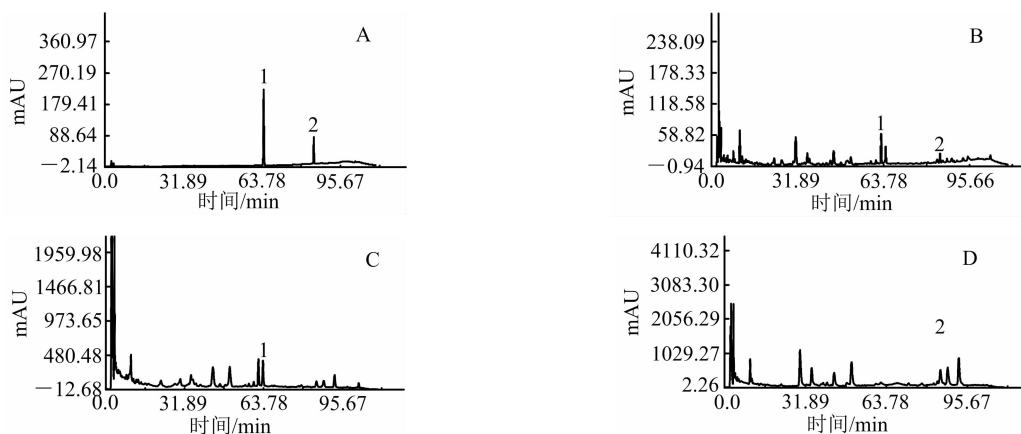


图 1 对照品(A)、供试品(B)、缺人参阴性样品(C)和缺淫羊藿阴性样品(D)高效液相色谱图(1. 淫羊藿苷; 2. 人参皂苷 Rb1)

2.5.7 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 按“2.5.4”项下色谱条件测定, 记录峰面积。结果显示, 人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的 RSD 分别为 1.5% 和 1.4%, 表明该方法精密度良好。

2.5.8 重复性试验 取同一批提取物 6 份, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 依法测定。结果显示, 人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的 RSD 分别为 1.9% 和 1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.5.9 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液适量, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样, 依法测定。结果显示, 人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的 RSD 分别为 1.3% 和 1.9%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.5.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一样品 6 份, 加入人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷对照品溶液适量, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算人参皂苷 Rb1 的含量和淫羊藿苷的加样回收率。结果显示, 人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的平均回收率分别为 97.6%、96.8%, RSD 分别为 1.8%、1.4%, 表明该方法准确可行。

2.6 正交试验方法与结果 分别按处方称取两倍

液 20 μL, 注入液相色谱仪, 发现在人参皂苷 Rb1 对照品与淫羊藿苷对照品出峰的相应位置上, 阴性供试品无相应色谱峰出现, 表明样品中的其他成分不干扰人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的测定。见图 1。

2.5.6 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、10、16 μL, 注入液相色谱仪中, 按“2.5.4”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以进样量(x)为横坐标, 以峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷的回归方程分别为 $y_1 = 619.24x_1 - 2.0365$ ($r = 0.9999$) 和 $y_2 = 2825.8x_2 + 26.723$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 人参皂苷 Rb1 和淫羊藿苷分别在 0.125~2 μg、0.115~1.84 μg 范围内与峰面积的线性关系良好。

量的饮片 52 g, 按照 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验, 每组试验平行 3 次。按照“2.4.2”和“2.5.2”项下方法制备样品溶液, 分别测定总多糖含量, 人参皂苷 Rb1 与淫羊藿苷总含量与出膏率, 并按照以下评分方程计算其综合评分: 综合评分 = 干膏得率/最大干膏得率 × 30 + (人参皂苷 Rb1 含量 + 淫羊藿苷总含量)/最高含量 × 35 + 总多糖含量/总多糖最高含量 × 35。正交试验结果见表 3、表 4。采用一般线性模型进行方差分析, 考察因素 A、B、C 对综合评分的主效应。结果(表 5)显示, 因素 A 和 C 的主效应具有统计学意义 ($P < 0.01$), 因素 B 的主效应无统计学意义 ($P > 0.05$)。各因素的影响大小依次为 $C > A > B$, 且 $C_3 > C_2 > C_1$, $A_3 > A_2 > A_1$, $B_2 > B_1 > B_3$, 而 B_1 与 B_3 相差不大。综合比较后, 确定 A₃B₁C₃ 为复方培元颗粒的最佳提取工艺, 即 12 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.7 验证试验 分别按处方称取饮片共 104 g, 3 份, 按照最佳提取条件进行验证试验, 分别测定干膏得率、总多糖含量、人参皂苷 Rb1 含量与淫羊藿苷含量。验证试验结果表明, 优选的复方培元颗粒的

提取工艺切实可行。见表6。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验原始数据

试验号	A	B	C	干膏得率/%	总苷含量/(mg/g)	总多糖含量/(mg/g)	综合评分
1	1	1	1	31.05	0.10	21.33	48.52
2	1	2	2	43.84	0.10	30.29	60.37
3	1	3	3	46.28	0.10	51.23	73.90
4	2	1	2	38.81	0.18	33.88	72.45
5	2	2	3	45.10	0.16	57.67	85.90
6	2	3	1	32.73	0.10	34.11	56.30
7	3	1	3	40.28	0.24	56.88	95.70
8	3	2	1	31.88	0.18	39.39	71.95
9	3	3	2	39.86	0.18	44.88	78.96

注:总苷=人参皂苷 Rb_1 + 淫羊藿苷。

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验结果的描述性统计

因素	综合评分			
	1水平之和	2水平之和	3水平之和	全距
A	182.79	214.66	246.61	63.82
B	216.67	218.22	209.16	9.06
C	176.77	211.79	255.50	78.72

表5 正交试验方差分析表

差异来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	678.83	2	339.42	101.16	0.010
B	15.65	2	7.83	2.33	0.300
C	1037.28	2	518.62	154.58	0.006
误差	6.71	2	3.36		

表6 验证试验结果

批次	生药量/g	总多糖含量/(mg/g)	总苷含量/(mg/g)	干膏得率/%
1	104	57.62	0.2579	44.81
2	104	58.33	0.2515	45.66
3	104	55.82	0.2529	43.02

注:总苷=人参皂苷 Rb_1 + 淫羊藿苷。

3 讨论

实验结果表明,复方培元颗粒最佳提取工艺为加12倍量水、提取3次、每次提取1h。在实际生产中,提取3次的成本较高,但方中含有人参等名贵中药材,本着充分利用名贵中药材和尊重实验结果的原则,选择提取3次。

紫外-可见分光光度法是根据物质分子对波长为200~760nm的电磁波的吸收特性所建立起来的一种定性、定量和结构分析方法。该方法操作简单、准确度高、重现性好。在利用紫外可见分光光度法测总多糖含量时,应保证操作的规范性和一致性,以减少测量误差。

参考文献:

- [1] 郑礼娟,秦昆明,蔡皓,等.多指标正交试验优选白术芍药散提取工艺[J].中国中药杂志,2013,38(10):1504-1509.
- [2] 王开林,张绍枫.人参黄芪有效成份提取的最佳工艺[J].黑龙江医药,2003,16(4):280-281.
- [3] 赵远,张凡,曲胜军.人参主要成分药理研究进展[J].亚太传统医药,2012,8(11):171-174.
- [4] 白雪媛,孙立霞,常桂娟,等.参维软胶囊中皂苷类成分和总多糖的含量测定[J].中国药房,2013,24(23):2155-2158.
- [5] 梁学政,陈惠红,唐勇琛,等.正交试验优选弱视明目口服液的提取工艺[J].中国药房,2011,22(31):2914-2916.
- [6] 赵亮,吕磊,纪松岗,等.高效液相色谱法快速测定人参中8种主要皂苷类成分的含量[J].第二军医大学学报,2008,29(12):1507-1510.
- [7] 韩丽萍,陈行愉,邓伟民.HPLC法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量[J].中成药,2011,33(1):184-186.

(收稿日期:2014-08-28;编辑:张倩)

Study on Extraction Process for Compound Pei-yuan Granule

LI Wan-rong¹, GUI Shuang-ying^{1,2,3}, WANG Ju-tao¹, WANG Jian^{1,4}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Anhui Engineering Research Center for Chinese Medicine Preparation, Anhui Hefei 230012, China; 3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 4. Anhui "115" Xin'an Traditional Chinese Medicine Research & Development Innovation Team, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process for Compound Pei-yuan Granule. **Methods** Using the content of total polysaccharides, the total content of ginsenoside Rb_1 and icariin, and extract yield as evaluation indices, an $L_9(3^4)$ orthogonal design was adopted to determine the optimal water amount, extraction time, and times of extraction in the extraction process for Compound Pei-yuan Granule. **Results** The optimal extraction process was as follows: raw material was mixed with water at a ratio of 1:12; extraction was performed three times (for 1 h each time). **Conclusion** This optimized extraction process is feasible and can provide a basis for the quality control of Compound Pei-yuan Granule.

[Key words] compound Pei-yuan Granule; extraction process; ginsenoside Rb_1 ; icariin; orthogonal design