

正交试验法优选淫羊藿配方颗粒的提取工艺*

□刘晖晖(深圳市三九现代中药有限公司 深圳 518029)

谭沛** 张辉(华润三九医药股份有限公司 深圳 518029)

严萍 梁小银 张敏 詹若挺

(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心
(省部共建)岭南中药资源教育部重点实验室 广州 510006)

摘要:目的:优选淫羊藿配方颗粒的提取工艺。方法:采用正交试验法,以总黄酮、淫羊藿苷的含量并结合干浸膏得率为考察指标,考察加水量、提取时间、提取次数3个因素,优选出淫羊藿配方颗粒的提取工艺。结果:淫羊藿配方颗粒的优选提取工艺为第1次加13倍量水,浸泡0.5 h,煎煮1 h,第2次加10倍量水,煎煮1 h。结论:该提取工艺能够有效地提取总黄酮、淫羊藿苷,为淫羊藿配方颗粒的标准化、规范化生产工艺提供依据。

关键词:淫羊藿 配方颗粒 提取工艺 正交试验

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.06.027

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim.、箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb.et Zucc.) Maxim.、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai.的干燥叶。具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,用于治疗肾阳虚衰,阳痿遗精,筋骨痿软,风湿痹痛,麻木拘挛^[1]。此外,还具有促进蛋白合成、抗衰老、提高免疫功能、抑制肿瘤等作用。临床上主要用于治疗冠心病、慢性气管炎、神经衰弱、小儿麻痹等病^[2,3]。淫羊藿主要有效成分是黄酮类化合物和多糖,如异槲皮素、金丝桃苷、箭叶淫羊藿苷、箭叶素等,还含有生物碱、木脂素、硬脂酸、油酸、亚麻酸、酚苷类、紫罗酮类、乙醇苷类以及微量元素 Zn、

Cu、Ca、Mn、Sr、Ni 等成分^[4,5]。其制剂临床应用广泛,配方颗粒更以疗效稳定、简便等优点备受欢迎。本实验利用正交试验法,以总黄酮、淫羊藿苷的含量并结合干浸膏得率作为主要考察指标,优选出淫羊藿配方颗粒的提取工艺条件,为淫羊藿配方颗粒的生产工艺提供依据。

一、仪器与试剂

1. 仪器

十万分之一电子天平(XR205SM-DR,瑞士 Precisa),Waters e2695 高效液相色谱仪(配有 PDA 检测器),UV1800 紫外分光光度计(日本岛津),实验室专用超纯水机(Rios-5/Milli-Q Synthesis 法国 Millipore)。

2. 试剂

乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯;淫羊藿

收稿日期:2012-02-05

修回日期:2012-10-19

* 华润三九医药股份有限公司中药配方颗粒生产工艺和质量标准研究项目(sj2010008):中药配方颗粒生产工艺研究,负责人:刘晖晖。

** 通讯作者:谭沛,高级工程师,研发中心副主任,主要研究方向:新药生产工艺和质量标准研究,Tel: 0755-83360999, E-mail: tanpei@999.com.cn。

苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110737-200415);淫羊藿:产地甘肃,购于河北安国,经广州中医药大学詹若挺研究员鉴定为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥叶。

二、方法与结果

1. 实验设计

经预试验,根据影响提取的主要因素,固定浸泡时间为 0.5 h,选择提取时间、加水量和提取次数作为考察因素,以总黄酮、淫羊藿苷的含量并结合干浸膏得作为率为主要考察指标,按 $L_9(3^4)$ 表进行

正交试验。考察因素与水平见表 1,实验安排与结果见表 2。

2. 出膏率的测定

取淫羊藿提取液,滤过,精密吸取滤液 50 mL,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105℃干燥 3 h,置干燥器中冷却 1 h,迅速称重,按下式计算

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素	A 水加入量(倍)	B 提取次数(次)	C 提取时间(小时)	D 空白
1		13,10	1	0.5	-
2		15,12	2	1	-
3		17,14	2	1.5	-

表 2 正交试验结果

组别	加水量	提取次数	提取时间(h)	空白	出膏率(%)	总黄酮含量(%)	淫羊藿苷含量(%)	综合结果(%)
1	13,10	1	0.5	1	11.75	2.89	0.285	58.2
2	13,10	2	1.0	2	18.02	4.16	0.605	96.8
3	13,10	2	1.5	3	19.34	3.88	0.504	90.7
4	15,12	1	1.0	3	13.59	3.13	0.281	62.8
5	15,12	2	1.5	1	16.38	4.05	0.516	88.2
6	15,12	2	0.5	2	15.29	3.48	0.431	77.0
7	17,14	1	1.5	2	13.58	2.84	0.313	62.3
8	17,14	2	0.5	3	18.79	4.21	0.446	89.2
9	17,14	2	1.0	1	17.49	4.30	0.547	93.8
K1	16.37	12.973	15.277	15.207				
K2	15.087	17.73	16.367	15.63				
K3	16.62	17.373	16.433	17.24			出膏率	
R	16.37	12.973	15.277	15.207				
K1	3.643	2.953	3.527	3.747				
K2	3.553	4.14	3.863	3.493				
K3	3.783	3.887	3.59	3.74			总黄酮含量	
R	0.23	1.187	0.336	0.254				
K1	0.465	0.293	0.387	0.449				
K2	0.409	0.522	0.478	0.45				
K3	0.435	0.494	0.444	0.41			淫羊藿苷含量	
R	0.056	0.229	0.091	0.04				
K1	0.819	0.611	0.748	0.801				
K2	0.76	0.914	0.845	0.787				
K3	0.818	0.872	0.804	0.809				
R	0.059	0.303	0.097	0.022			综合评价	

出膏率(W_1 为蒸发皿恒重与干膏重之和, W_2 为蒸发皿恒重, M 为药材质量, V_1 为样品溶液总体积, V_2 为量取的药液体积)。

$$\text{出膏率}(\%) = \frac{(W_1 - W_2) \times V_1}{V_2 \times M} \times 100\%$$

3. 总黄酮含量测定

精密移取淫羊藿提取液 0.1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。另取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 10 μg 的溶液,作为对照品溶液。分别取供试品溶液和对照品溶液,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法(2010 版《中国药典》附录 VA),在 270 nm 波长处测定吸光度,计算总黄酮含量。

4. 淫羊藿苷含量测定

(1) 色谱条件与系统适用性试验。

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-水(30:70)为流动相,检测波长为 270 nm。理论板数按淫羊藿苷峰计算应不低于 1500。

(2) 对照品溶液的制备。

取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。

(3) 供试品溶液的制备。

精密移取煎液 2 mL 置 5 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

(4) 测定法。

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪,测定,并计算淫羊藿苷含量。

5. 数据处理与分析

考虑到淫羊藿检测两个指标为总黄酮和淫羊藿苷,并兼顾到出膏率,因此分别对总黄酮含量、淫羊藿苷含量、出膏率进行方差分析(见表 3~5),并采用综合评价进行分析比较(见表 6)。综合评价的计算方法为:以得率最大者为 100%,将其它组别结果换算为最高值的百分比,再以出膏率、总黄酮含量和淫羊藿苷含量权重分别占 30%、35%和 35%的比例进行相加后所得的值。

以出膏率为考察指标,方差分析结果表明,各个因素均无显著性差异,最佳工艺为 $A_3B_2C_3$;以总黄酮含量为考察指标,方差分析结果表明,因素 B 有显著差异,其他因素均无显著性差异,最佳工艺为 $A_3B_2C_2$;以淫羊藿苷含量为考察指标,方差分析结果表明,因素 B 有显著差异,其他因素均无显著性差

异,最佳工艺为 $A_1B_2C_2$;以综合分析为考察指标,方差分析结果表明,因素 B 有显著差异,其他因素均无显著性差异,最佳工艺为 $A_1B_2C_2$ 。煎煮次数对总黄酮、淫羊藿苷含量以及综合评价结果均有显著影响,对出膏率含量影响不明显,而加水量和煎煮时间对各项指标影响均不显著。考虑到大生产过程中方便、节省成本等方面的因素,最终选择优选工艺为 $A_1B_2C_2$,即第 1 次加入 13 倍量水,浸泡 0.5 h,煎煮 1 h,第 2 次加入 10 倍量水,煎煮 1 h。

6. 验证实验

分别称取 400 g 淫羊藿饮片,按优选工艺条件进行 3 次验证实验,结果见表 7。

从实验结果可知,正交试验的最优工艺的放大实验与最优工艺结果相近,出膏率相差 0.1%,总黄酮含量相差 0.46%,淫羊藿苷含量 0.02%。

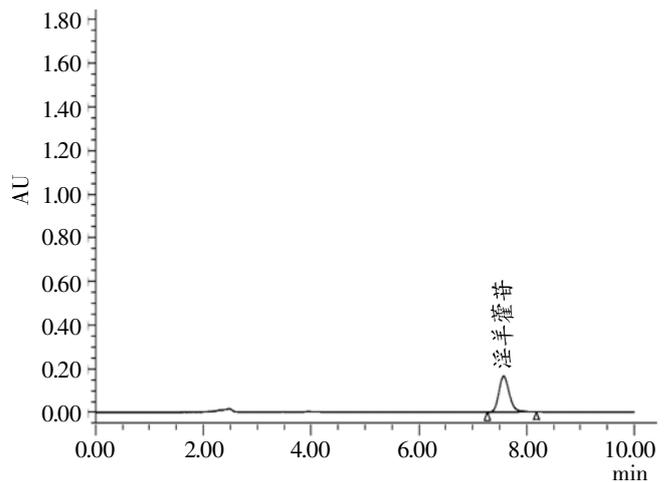


图 1 标准品色谱图

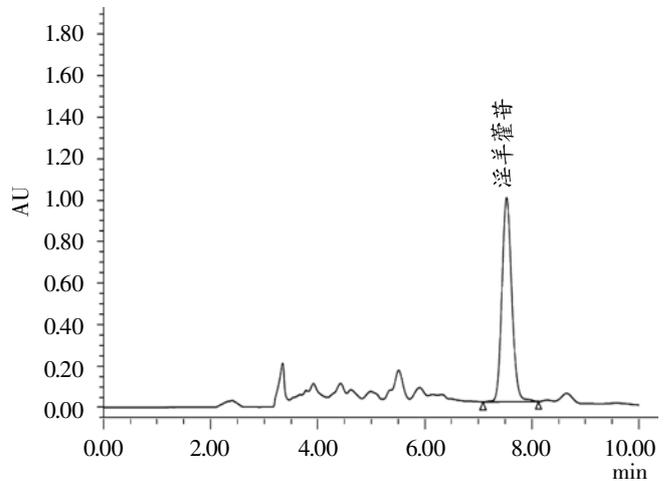


图 2 样品色谱图

表3 出膏率方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
加水量	4.061	2	0.292	3.11	
煎煮次数	42.113	2	3.029	3.11	
煎煮时间	2.53	2	0.182	3.11	
误差	55.61	8			

注: * $P \leq 0.1$,下同。

表4 总黄酮含量方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
加水量	0.081	2	0.118	3.110	
煎煮次数	2.343	2	3.419	3.110	*
煎煮时间	0.192	2	0.28	3.110	
误差	2.74	8			

表5 淫羊藿苷含量方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
加水量	0.005	2	0.174	3.110	
煎煮次数	0.094	2	3.27	3.110	*
煎煮时间	0.013	2	0.452	3.110	
误差	0.12	8			

表6 综合分析方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
加水量	0.007	2	0.153	3.110	
煎煮次数	0.161	2	3.519	3.110	*
煎煮时间	0.014	2	0.306	3.110	
误差	0.18	8			

表7 验证实验数据

试验次数	出膏率 (%)	总黄酮含量 (%)	淫羊藿苷含量 (%)
1	18.4	4.87	0.66
2	17.8	4.25	0.62
3	18.1	4.73	0.61
平均	18.1	4.62	0.63
正交试验最优工艺	18.0	4.16	0.61

三、讨论

中药配方颗粒主要采用水煎煮法,提取中药中的主要有效部位,制粒成品。但中药配方颗粒不等

同于中药的提取物,中药的提取物主要针对活性成分明确的药材,采用特定的提取手段,而获得的化合物或化合物群^[6]。中药配方颗粒可以实现工业化生产,执行同一的标准和工艺,质量稳定,并因其是单味药的深加工,可实现最优化生产。每种药材需要的提取工艺和提取条件各不相同,在规定的工艺条件下,可实现大批量生产^[7]。

本实验采用正交优化试验的方法,以总黄酮含量、淫羊藿苷和出膏率进行综合评价,以加水量、煎煮次数和提取时间为因素优选淫羊藿配方颗粒的提取工艺。参照传统煎煮法,饮片一般煎煮两次,为提高药材的利用率,本实验对煎煮2次和煎煮3次的比较,发现煎煮第3次煎煮的出膏率、总黄酮含量及淫羊藿苷的含量远低于前两次的煎煮,所以煎煮次数选用了2次煎煮。传统煎煮的第1次加水量在轻轻按住饮片时,让水面高出药物2~3 cm,因为淫羊藿饮片主要是叶子,加水量比一般的根茎类药材要多,所以2次煎煮的加水量分别选用了13倍、10倍、15倍、12倍、17倍、14倍量。提取时间则选用了0.5 h、1.0 h及1.5 h。正交试验结果的方差分析表明煎煮次数对总黄酮、淫羊藿苷含量以及综合评价结果均有显著影响,对出膏率含量影响不明显,而加水量和煎煮时间对各项指标影响均不显著。考虑到大生产过程中方便、节省成本等方面的因素,确定了淫羊藿的提取最佳工艺参数为第1次加入13倍量水,浸泡0.5 h,煎煮1 h,第2次加入10倍量水,煎煮1 h,合并两次滤液。

总黄酮是淫羊藿药材中的主要活性成分,具有治疗肾阳虚衰、阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛等作用。淫羊藿苷是淫羊藿黄酮类物质的代表性成分之一,因此在淫羊藿配方颗粒的提取工艺研究中,以淫羊藿苷和总黄酮作为质量控制指标是合理可行的。淫羊藿为叶类药材,加水量较其他根茎类的药材大,增加了放大实验结果的不稳定性,但本放大实验结果表明该优选工艺合理、稳定、重现性较好,提高了药材的利用率。同时为淫羊藿配方颗粒的标准化、规范化生产工艺提供依据。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:中国医药科技出版社, 2010:306.

- 2 张曜武, 牛晓丽, 王超. 淫羊藿属木脂素类化学成分研究进展. 天津化工, 2010, 24(6):8~10.
- 3 邹萍. 淫羊藿免疫药理学研究进展. 中国中医药科技, 2010, 7(3):279~280.
- 4 李遇伯, 孟繁浩, 鹿秀梅, 等. 淫羊藿化学成分的研究. 中国中药杂志, 2005, 30(8):586~588.
- 5 程岩, 王乃利, 王新杰, 等. 朝鲜淫羊藿的化学成分. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(10):644~647.
- 6 王玉玺. 中药配方颗粒与成分中药提取物的区别. 江苏中医药, 2002, 23(1):42.
- 7 张海燕. 免煎中药配方颗粒的临床应用. 华北煤炭医学院学报, 2010, 12(4):496~498.

Optimization of Extraction Technology of *Herba Epimedii* Dispensing Granules by Orthogonal Experiment

Liu Huihui¹, Tan Pei², Zhang Hui², Yan Ping³, Liang Xiaoyin³, Zhang Min³, Zhan Ruoting³

(1. Shenzhen Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518029, China;

2. Huarun Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518029, China;

3. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine) Ministry of Education, Guangzhou 510006, China)

Abstract: This study was aimed to optimize the extraction process of *Herba Epimedii* dispensing granules. The extraction process of *Herba Epimedii* dispensing granules was optimized through orthogonal experiment while the content of general flavone and icariin. And the yield of dry extract was adopted as marks. And influences of solvent dosage, extraction time and extraction times were studies. The results showed that optimized extraction conditions of *Herba Epimedii* dispensing granules were determined as follows. The material was added 13 times amount of water, soaked for 0.5 h and extracted for 1 h at the first time. And for the second time, 10 times amount of water were added, and extracted for 1 h. It was concluded that the extraction process is efficacious for general flavone and icariin extraction. The method is suitable for the standardized production technology of *Herba Epimedii* dispensing granules.

Keywords: *Herba Epimedii*, dispensing granules, extraction process, orthogonal test

(责任编辑 李沙沙 张志华 责任译审 汪 晶)