

正交试验优选芪榔方的水提醇沉工艺

王睿¹, 赵春草¹, 吴飞¹, 徐燕丰², 车京梅², 张继全^{1*}

¹上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203;

²上海中医药大学附属上海市中医医院消化内科, 上海 200071

摘要: 优选芪榔方的水提醇沉工艺, 以黄芪甲苷的转移率为指标, 通过正交试验设计筛选出加水倍量、提取次数、提取时间对水提取工艺的影响; 以浸膏比重、含醇量、静置时间为考察因素优选醇沉淀工艺, 并对优选的最佳水提取、醇沉淀工艺进行中试放大验证。得到芪榔方最佳水提醇沉工艺为: 加 8 倍量水提取 3 次, 每次提取 1 h, 合并提取液, 浓缩液比重范围为 1.10~1.15, 加乙醇至含醇量 80%, 静置过夜。本研究优选的最佳水提醇沉工艺稳定可行, 黄芪甲苷转移率高。

关键词: 芪榔方; 正交试验; 水提醇沉; 黄芪甲苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.027

Optimization of Water Extraction and Alcohol Precipitation Process of Qilang Fang by Orthogonal Design

WANG Rui¹, ZHAO Chun-cao¹, WU Fei¹, XU Yan-feng², CHE Jing-mei², ZHANG Ji-quan^{1*}

¹Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

²Department of gastroenterology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

Abstract: To optimize water extraction and alcohol precipitation technology of Qilang mixtures. Effects of the amount of water, extraction times and time on extraction technology was investigated by orthogonal tests. With the transfer rate of astragaloside IV as indexes. The determining factors is drugs solution concentration, alcohol precipitation concentration and alcohol precipitation time. Besides, the extraction technology was further investigated by orthogonal test. Optimize water extraction and alcohol precipitation technology of Qilang formula was as following: 8 times amount of water extracted 3 times, 1 h for each time. The relative density of concentrate solution was kept in a range of 1.10-1.15 and then ethanol was added to keep the alcohol concentration 80 before Standing overnight at room temperature. The optimum extraction process condition is stable with high transfer rate of Astragaloside IV.

Key words: Qilang formula; orthogonal test; water extraction and alcohol precipitation; astragaloside; HPLC

芪榔方是上海中医药大学附属上海市中医医院的临床验方, 处方由生黄芪、槟榔、知母、玉竹、望江南、瓜蒌、枳实 7 味药材组成, 该方具有益气润下、理气导滞之功效^[1], 方中黄芪作为君药, 可补脾肺之气, 脾健则气血旺盛, 气血盛则胃肠道的平滑肌收缩力增加, 蠕动有力^[2-4]。芪榔方在临床上能明显缩短患者排便时间、排便间隔时间, 改善肛门阻塞感、排便费力感、排便不尽感, 改善便质等作用, 尤其是排

便不尽感等症状, 对慢性功能性便秘 (CFC) 有显著疗效^[5-8]。

沿袭临床用药方法, 本试验采用水提工艺, 对溶剂用量、提取时间、提取次数等因素进行考察, 为了进一步制剂和临床应用的可行性, 在药效无差异的前提下, 再以浓缩液比重、含醇量、静置时间为指标考察醇沉淀工艺。在研究过程中, 以君药黄芪的公认指标成分黄芪甲苷的转移率作为检测指标, 采用正交试验法^[9]对芪榔方的水提醇沉工艺进行优选并验证, 确定最佳提取工艺参数, 为芪榔方的制剂工艺奠定基础。

收稿日期: 2017-08-21 接收日期: 2017-10-09

基金项目: 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 (ZY3-JSFC-2-3003)

* 通信作者 Tel: 86-21-50796215; E-mail: jiquan007@139.com

1 材料

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪, VWD 检测器、蒸发光散射检测器(美国安捷伦科技有限公司), XP205 型分析天平(0.01 mg, 梅特勒-托利多仪器有限公司), TE214S 型分析天平(0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司), PTHW 型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司), LXJ-II B 型离心机(上海安亭科学仪器厂), BCD-176TD GA 型冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 试剂

黄芪甲苷对照品(110782-200613), 购自中国食品药品检定研究所。

黄芪饮片(批号 DH2015050902, 甘肃), 槟榔饮片(批号 HP2014121206, 海南), 知母饮片(批号 DH2015071004, 河北), 枳实饮片(批号 YT2015031103, 江西), 瓜蒌皮饮片(批号 LY1503102, 山东), 玉竹饮片(批号 LP1501067, 湖南), 瓜蒌子饮片(批号 LY1503057, 山东), 望江南饮片(批号 HP2014102902, 四川)均购自上海万仕诚药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的含量测定

2.1.1 色谱条件

Phenomenex Luna C18 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(32:68), 柱温为 35 °C, 蒸发光散射检测器, 氮气流速为 1.60 SLM, 蒸发光散射器蒸发温度 75 °C, 雾化温度 30 °C, 对照品进样 10 μL 和 20 μL, 供试品进样 10 μL。黄芪甲苷对照品和供试品的色谱图见图 1。

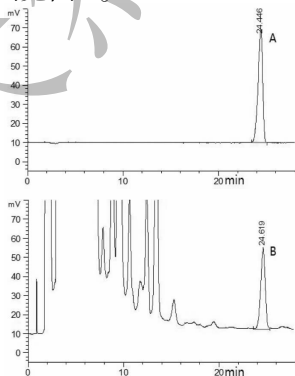


图 1 芪榔方提取液中黄芪甲苷测定的 HPLC 图谱

Fig. 1 The HPLC chromatograms of Astragaloside IV

A: 黄芪甲苷对照品 B: 供试品

2.1.2 对照品溶液的制备

取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 配制成浓度为 0.5130 mg/mL 的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

根据处方比例分别称取黄芪、槟榔、知母、玉竹、望江南、全瓜蒌、枳实, 置于圆底烧瓶中, 按照实验分组设计的参数加水提取, 合并提取液, 75 °C 减压浓缩, 定容备用。浓缩液加等体积水饱和的正丁醇液提取 4 次, 合并正丁醇液, 加等体积的氨试液洗涤 2 次, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 并用甲醇复溶, 过滤即得^[10-12]。

2.1.4 精密度试验

取黄芪甲苷对照品溶液, 重复进样 6 次, 每次进样 10 μL, 记录峰面积, 该进样体积下的峰面积 RSD 为 0.5%, 表明精密度良好。

2.1.5 线性关系考察

将浓度为 0.5130 mg · mL⁻¹ 的黄芪甲苷对照品溶液分别精密进样 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 和 30 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 根据进样质量(μg) 相应峰面积进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1.5019X + 1.5999$ ($r = 0.9992$), 显示进样质量在 0.513-15.696 μg 范围内黄芪甲苷的峰面积与进样量呈良好线性^[13,14]。

2.2 水提取工艺考察

2.2.1 正交试验设计

按 2.1.3 项下操作, 采用 L₉(3⁴) 正交试验法筛选芪榔方的提取工艺, 分别测定。以对提取工艺中的加水倍量(A), 提取次数(B), 提取时间(C)为考察因素, 每个因素设置 3 个水平, 以黄芪甲苷转移率为考察指标。因素水平见表 1。

2.2.2 正交试验及结果

正交试验结果及分析见表 2-3。

由表 2、表 3 可知, 对黄芪甲苷转移率的影响程度依次为加水倍量(A) > 提取次数(B) > 提取时间(C)。正交试验方差分析结果表明加水倍量对结果具有显著性的影响, 提取次数和提取时间对结果的影响无显著性差异。黄芪甲苷提取工艺最佳组合为 A₃B₃C₃, 即加 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 2 h。

2.2.3 正交验证试验及结果

为产业化的可行性和成本考虑, 选择最大加水倍量的情况下, 同时减少提取次数, 缩短提取时间进行验证试验, 验证试验结果见表 4。

表 1 芪榔方水提工艺因素水平表

Table 1 Factors and levels of decoction technology

水平 Levels	加水倍量 The amount of water (A)	提取次数 Extraction times (B)	提取时间 Time on extraction (h,C)	空白 Blank (D)
1	6	1	1.0	-
2	8	2	1.5	-
3	10	3	2.0	-

表 2 芪榔方水提取正交试验直观分析结果表

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment of decoction technology

试验组 Groups	加水倍量 The amount of water(A)	提取次数 Extraction times(B)	提取时间 Time on extraction (h,C)	空白 Blank(D)	黄芪甲苷转移率 Transfe rate of Astragaloside IV (%)
1	6	1	1	1	46.29
2	6	2	1.5	2	46.09
3	6	3	2	3	74.62
4	8	1	1.5	3	53.24
5	8	2	2	1	85.22
6	8	3	1	2	98.74
7	10	1	1.5	2	88.37
8	10	2	2	3	97.17
9	10	3	1.5	1	101.84
均值 1	55.67	62.63	80.73	77.79	
均值 2	79.07	76.16	67.06	77.73	
均值 3	95.79	91.73	82.74	75.01	
极差	40.13	29.10	15.68	2.77	

注:(A、B、C 和 D)4 个因素中 1、2 和 3 对应的是各个因素的 3 个水平。

Note: Among the 4 factors (A, B, C and D), 1, 2 and 3 correspond to 3 levels of each factor.

表 3 芪榔方水提正交试验方差分析结果表

Table 3 Analysis of variance of decoction technology

因素 Factors	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degrees of freedom	F 比	F 临界值	显著性 Statistical significance
加水倍量	2437.54	2	161.60	99.00	*
提取次数	1272.19	2	84.34	99.00	
提取时间	437.04	2	28.97	99.00	
误差	15.08	2			

表 4 芪榔方水提正交验证试验设计

Table 4 Experimental design of decoction orthogonal verification

试验组 Groups	提取工艺 Extraction process	加水倍量 The amount of water(A)	提取次数 Extraction times (B)	提取时间 Time on extraction (h,C)	黄芪甲苷转移率 Transfe rate of Astragaloside IV (%)
1	$A_3B_3C_2$	10	3	1.5	96.70
2	$A_3B_3C_1$	10	3	1	98.98
3	$A_2B_3C_1$	8	3	1	96.05
4	$A_2B_2C_1$	8	2	1	78.37

在正交验证试验中对比表 4 中的 1、2 组,当提取时间为 1 h 时黄芪甲苷的转移率比提取时间为 1.5 h 时更为可观,考虑试验可行性,故选择提取时间 1 h;对比 2、3 组,当加水倍量减少时,黄芪甲苷转移率无明显下降,为节约资源,故将加水倍量定 8 倍量;对比 3、4 组,减少提取次数,其结果的有较为明显差别,因此提取次数定为 3 次合适。根据正交试验验证试验的结果,初步确定芪榔方的最佳水提工艺为:加水 8 倍量,提取 3 次,每次 1 h。

2.3 醇沉淀工艺考察

2.3.1 正交试验设计

将上述方法提取得到的水煎液于 75 ℃ 浓缩至不同比重。按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,对影响醇沉的因素分别设立相应的水平进行优选。设置因素水平为:浸膏比重(A)、含醇量(B)、静置时间(C),每个因素设置三个水平,以黄芪甲苷转移率为检测指标,因素水平表 5。

2.3.2 正交试验及结果

正交试验结果及分析见表 6 和表 7。

表 5 芪榔方醇沉工艺因素水平表

Table 5 Factors and levels of alcohol precipitation technology

水平 Level	浸膏比重 Drugs solution concentration (A)	含醇量 Alcohol precipitation concentration (B)	静置时间 Alcohol precipitation time (C)	空白 Blank (D)
1	1.08	60	8	-
2	1.10	70	12	-
3	1.12	80	24	-

表 6 正交试验直观分析结果表

Table 6 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment of alcohol precipitation technology

试验组 Groups	浸膏比重 Drugs solution concentration (A)	含醇量 Alcohol precipitation concentration (B)	静置时间 Alcohol precipitation time (C)	空白 Blank (D)	黄芪甲苷转移率 Transfe rate of Astragaloside IV (%)
1	1.08	60	8	1	51.23
2	1.08	70	12	2	67.14
3	1.08	80	24	3	105.84
4	1.10	60	12	3	74.30
5	1.10	70	24	1	101.37
6	1.10	80	8	2	97.40
7	1.12	60	12	2	78.98
8	1.12	70	24	3	102.21
9	1.12	80	8	1	104.07
均值 1	74.74	68.17	84.12	86.22	
均值 2	91.69	91.42	81.83	81.17	
均值 3	95.60	102.44	96.06	94.623	
极差	20.86	34.27	14.23	13.46	

注:(A、B、C 和 D)4 个因素中 1、2 和 3 对应的是各个因素的 3 个水平。

Note: Among the 4 factors (A, B, C and D), 1, 2 and 3 correspond to 3 levels of each factor.

表 7 正交试验方差分析结果表

Table 7 Analysis of variance of decoction technology

因素 Level	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degrees of freedom	F 比	F 临界值	显著性 Statistical significance
浸膏比重	737.74	2	2.66	19.00	
含醇量	1836.12	2	6.62	19.00	*
静置时间	350.16	2	1.26	19.00	
误差	277.34	2			

由表7可知,浸膏比重和静置时间对结果无显著性影响,但含醇量对醇沉结果具有显著性的影响,表6中可知影响程度依次为含醇量(B) > 浸膏比重(A) > 静置时间(C)。黄芪甲苷提取工艺最佳组合为A₃B₃C₃,即浓缩液比重1.12,含醇量80%,静置过夜。

2.3.3 正交验证试验及结果

在确定因素水平最大的情况下,设计验证试验对最佳提取工艺组合进行验证。设置3组验证试验,因素水平分别为浓缩液比重1.12,含醇量80%,静置过夜,平行三组试验。

三组平行试验得到的黄芪甲苷转移率分别为98.10%、98.17%、100.03%,表明醇沉对黄芪甲苷的转移率几乎无影响,石航等^[15]在芪归银方的水提

醇沉研究中所得结果与本结果类似。因此,初步确定醇沉工艺为:水提液浓缩至比重1.12,加乙醇至含醇量80%,静置过夜。

2.4 水提取醇沉淀中试放大工艺验证

按照上述正交试验优选的最佳水提取醇沉淀工艺,进行3批中试规模的提取工艺验证试验,测定中试样品的黄芪甲苷转移率、出膏率和水提液浓缩比重,结果表明中试放大试验数据与小试试验接近,黄芪甲苷转移率并无明显差异,说明上述试验考察所得的最优水提取醇沉淀工艺对芪榔方的提取转移可靠稳定,见表8。

由于浓缩工艺在小试中和中试规模的情况下,浓缩终点不易控制,所以根据3批中试浓缩液的实际比重情况制定浓缩液的比重范围为1.10~1.15。

表8 芪榔方3批中试试验提取样品黄芪甲苷转移率

Table 8 Three batches of pilot test samples were extracted from Astragaloside IV transfer rate

批号 Batch number	浓缩比重 Drugs solution concentration	出膏率 The amount of paste (%)	黄芪甲苷转移率 Transfe rate of Astragaloside IV (%)
160615	1.108	10.98	99.80
160619	1.132	11.03	100.14
160624	1.148	11.12	101.30

3 讨论

有研究表明慢性功能性便秘小鼠结肠的水通道蛋白4(AQP4)和水通道蛋白8(AQP8)的表达明显升高,而芪榔方对便秘小鼠的两种蛋白表达具有一定的下调作用;该方还对小鼠结肠的Cajal间质细胞c-kit的表达阳性率和mRNA转录具有明显的促进作用,从而使Cajal间质细胞的再生和修复加快,使结肠内的含水量增加、粪便软化、肠蠕动有力,从而达到润肠通便的作用^[1,7],芪榔方的通便机制可能与以上两种作用相关。

芪榔方是上海市名老中医临床验方,临床采用传统的水煎服,且该方中含有较多的药效活性相关的皂苷和生物碱类成分,易溶于水,所以制剂工艺研究中沿袭临床用法,采用水作为提取溶剂。水提取时药材中所含的其他物质会与药效活性相关物质被同时转移至提取液中,导致出膏率高达42%。同时芪榔方日服用生药量过大(每日129g),为避免严重影响患者对制剂的服药依从性,因此结合处方中所含成分的特点,前期研究对比了水提液和水提取醇沉淀组分的药效活性,实验结果表明两种工艺提

取物药效无差异,而醇沉工艺可有效去除部分糖类、淀粉、鞣质等成分^[16],在经过醇沉工艺之后,芪榔方水提液的出膏率也从之前的42%降至10.10%左右,因此最终选择水提取、醇沉淀的提取工艺。

在芪榔方的水提醇沉工艺中,设置多因素多水平进行筛选,在水提工艺中加水倍量是影响其提取的关键因素,其次为提取次数和提取时间;在醇沉工艺中含醇量为其主要因素,其次是浸膏比重和静置时间。最终确定芪榔方的最佳水提醇沉工艺为:加水8倍量,提取3次,每次1h,将水煎液浓缩比重至1.12,加乙醇至含醇量80%,静置过夜。对该工艺进行验证试验,结果表明该正交试验优化所得工艺稳健可靠,指标性成分转移率高,重现性好,符合产业化要求,本研究内容为该处方进一步申请医疗机构制剂注册奠定了良好的基础。

参考文献

- 1 Wang J(王健),Jiang RM(姜入铭),Li Y(李勇), et al. 芪榔合剂对便秘模型小鼠结肠水通道蛋白4、8表达的影响. *Jiangsu J Tradit Chin Med*(江苏中医药),2013(7):72-74.

- 2 Hu YD(胡晔东), Lin L(林琳). Cajal 间质细胞与慢传输型便秘. *Inter J Inter Med* (国际内科学杂志), 2004, 31: 503-506.
- 3 Lu YQ(卢彦琦), He XL(贺学礼). 黄芪化学成分及药理作用综述. *J Baoding Teachers Colle* (保定学院学报), 2004, 17(4): 40-42.
- 4 Zou BC(邹百仓), Wei LF(魏兰福), Wei MX(魏睦新). 槟榔对试验大鼠胃平滑肌运动影响的研究. *Hunan J Tradit Chin Med* (湖南中医杂志), 2003(2): 66-67.
- 5 Wang J(王健), Liu YA(刘义安), Tang J(汤健), et al. “芪榔合剂”治疗气阴两虚型慢性功能性便秘 100 例临床研究. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2012, 44(7): 24-25.
- 6 Li YP(李毅平), Li Y(李勇), Wang J(王健), et al. Effects of “Qilang Decoction” on colon interstitial cells of Cajal in rats with slow transit constipation. *SH J TCM Ja* (上海中医药杂志), 2011: 68-71.
- 7 Tang J(汤健), Wang J(王健), Li YP(李毅平), et al. 芪榔合剂结合胃肠起搏仪治疗慢性功能性便秘疗效观察. *Modern J Integrated Tradit Chin Wes Med* (现代中西医结合杂志), 2012, 21: 3563-3564.
- 8 Li YP(李毅平), Wang J(王健), Li Y(李勇), et al. Observations about the curative effect of Qilang Mixture on chronic functional constipation. *Liaoning J T Chinese Med* (辽宁中医杂志), 2008, 35: 1043-1045.
- 9 Yang XJ(杨秀娟), Hong YL(洪燕龙), Wu F(吴飞), et al. Optimization of extraction technology for Zhichan Decoction by orthogonal test. *Chin J Ex Tradit Med Formu* (中国试验方剂学杂志), 2013, 19(9): 21-24.
- 10 Zhang RG(张荣嘎), Wu Y(吴勇), Wang L(王雷), et al. Optimization of water extraction process for preparing Shiwei Guiqi Zhenwu granules by orthogonal design. *J Bengbu Med Coll, January* (蚌埠医学院学报), 2015, 40: 110-113.
- 11 Liu XH(刘晓华), Yu XH(于小华). Optimize the optimum water extraction technology of Astragaloside in Astragalus root by orthogonal design method. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2010, 22(8): 22-23.
- 12 Yang JL(杨季菱), Li GS(李广胜), Zhang JL(张俊丽), et al. Analysis of traditional Chinese medicine formula particles Danggui Buxue granules HPLC ELSD method in determination of astragalus glycosides content. *J Medical Forum* (医药论坛杂志), 2015, 36(12): 27-30.
- 13 Zhang Q(张蔷), Gao WY(高文远), Man SL(满淑丽). 黄芪中有效成分药理活性的研究进展. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 3203-3207.
- 14 Liang HM(梁慧敏), Ou N(欧妮). Content determination of stachydrine hydrochloride in Zhengqifuzheng granules by HPLC - CAD. *China Pharma* (中国药业), 2016, 25(5): 55-57.
- 15 Shi H(石航), Bai J(白洁), Feng X(冯欣), et al. Optimization of water extraction and alcohol precipitation technology for Qiguiyin formula with multi-index. *Chin Archives T Chinese Med* (中华中医药学刊), 2015: 813-816.
- 16 Sun YQ(孙玉琦), Liu XJ(刘晓娟), Dai CM(代春美), et al. 中药醇沉技术应用与评价. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32: 1961-1963.

(上接第 443 页)

- 16 Chen JH(陈建洪), et al. 草乌甲素胶丸治疗肩周炎的疗效观察. *Chin J Clin Ration Drug Use* (临床合理用药杂志), 2012, 5: 30.
- 17 Zheng XH(郑兴华). 草乌甲素和大剂量丹参注射液缓解晚期癌性疼痛 16 例初探. *Clin Med* (临床医学), 2005, 25: 65-66.
- 18 Li F(李芳), et al. Clinical study of Bulleyaconitine A assisted to morphine sulfate sustained-release tablets in the treatment of mid-late cancer pain. *J Changchun Univ Tradit Chin Med* (长春中医药大学学报), 2014, 30: 460-462.
- 19 Liu YQ(刘延青), et al. 草乌甲素片治疗常见慢性疼痛的临床研究. *Chin J Pain Med* (中国疼痛医学杂志), 2011, 17: 314-315.
- 20 Niu ZG(牛占国), et al. 草乌甲素片用于烧伤创面镇痛效果的临床观察. *Jilin Med J* (吉林医学), 2014, 35: 7001-7002.
- 21 Wu LP(吴玲普). The intervention of Bulleyaconitine A Tablet in postoperative motion knee pain. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine (广州中医药大学), MSc. 2010.