

# 正交试验法优选复方淫羊藿咀嚼片的提取工艺

牟 婵<sup>1\*</sup>, 周若鹏<sup>2#</sup>, 赖滢滢<sup>1</sup>(1. 广东药学院中药学院, 广州 510006; 2. 广州奇绩医药科技有限公司, 广州 510663)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3986-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.32

**摘要** 目的: 优选复方淫羊藿咀嚼片的提取工艺。方法: 以淫羊藿苷提取率、粗多糖含量和浸膏得率为综合指标, 采用正交试验法考察加水倍量、提取时间、提取次数对提取效果的影响, 优化提取工艺并进行验证试验。结果: 最优提取工艺为药材加6倍量水提取3次, 每次提取2 h。验证试验显示, 淫羊藿苷提取率均值为(83.80±0.02)%, 粗多糖含量均值为(29.28±0.55) mg/g, 浸膏得率均值为(28.47±0.29)%, RSD均≤0.55% (n=3)。结论: 优选的工艺稳定, 可用于复方淫羊藿咀嚼片的提取。

**关键词** 复方淫羊藿咀嚼片; 淫羊藿苷; 粗多糖; 正交试验; 提取工艺

**Optimization of the Extraction Technology of Compound Epimedium Chewable Tablets by Orthogonal Test**  
MOU Chan<sup>1</sup>, ZHOU Ruo-peng<sup>2</sup>, LAI Ying-ying<sup>1</sup> (1. School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangzhou Keygenes Medicine Sci&Tech Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound epimedium chewable tablets. METHODS: Using the extraction rate of icariin, the content of crude polysaccharide and yield of extractum as index, the effects of water amount, extraction time and extraction times on extraction effect were investigated by orthogonal test. The extraction technology was optimized and validation test was conducted. RESULTS: The optimized extraction technology was as follows as 6-fold water, extracting 3 times, 2 h each time. The validation test showed that the average extraction rate of icariin was (83.80±0.02)%, the average content of crude polysaccharide was (29.28±0.55) mg/g, and the average yield of extractum was (28.47±0.29)% (RSD≤0.55%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology is stable, and can be used for the extraction of Compound epimedium chewable tablets.

**KEYWORDS** Compound epimedium chewable tablets; Icariin; Crude polysaccharides; Orthogonal test; Extraction technology

淫羊藿具有多种药理作用<sup>[1]</sup>。研究表明, 淫羊藿提取物能增加免疫球蛋白 sIgA 和白介素 (IL)-17 的分泌以及免疫细胞的数量从而增强免疫力<sup>[2]</sup>; 淫羊藿多糖能提高机体的体液免疫和细胞免疫功能, 刺激细胞产生免疫应答<sup>[3]</sup>; 淫羊藿总黄酮对免疫功能低下的小鼠有良好的免疫促进作用<sup>[4]</sup>; 淫羊藿苷通过诱导 Th1 型抗体以及调节固有免疫应答中巨噬细胞中 toll 样受体 9 的分泌可加强机体的免疫力<sup>[5-6]</sup>。而复方淫羊藿咀嚼片是根据中医对亚健康辨证的观点, 从“君、臣、佐、使”理论出发, 以淫羊藿为主的具有增强免疫力功能的中药处方, 方中淫羊藿作为君药在增强免疫功能中发挥关键作用。为优选复方淫羊藿咀嚼片提取工艺, 为其实际生产提供理论依据, 从而为临床提供质量合格的制剂, 笔者以淫羊藿苷、粗多糖、干膏得率为指标, 采用正交设计进行试验, 现介绍如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

JM20002 型电子天平 (余姚市铭称重校验设备有限公司); AUY-220 型、AUW-220D 型分析天平 (广州仪通兴仪器仪表有限公司); LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); 800B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); DZTW 型调温电热套

\* 硕士研究生。研究方向: 中药活性成分与新药研发。电话: 020-32211682。E-mail: 18814099713@126.com

# 通信作者: 主治医师, 硕士。研究方向: 乳腺肿瘤防治。电话: 020-32210390。E-mail: taoxildc@163.com

(北京市永光明医疗仪器有限公司); UV756CRT 型紫外-可见分光光度计 (上海佑科仪器仪表有限公司)。

### 1.2 药材、药品及试剂

淫羊藿、茯苓、女贞子等饮片 (亳州市鸿泰药业有限公司, 批号均为 1408001、1410001、1410002、1410003), 经广州分析测试中心鉴定均符合 2010 年版《中国药典》(一部) 要求; 淫羊藿苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 110737-200415, 纯度: 供含量测定用); 葡聚糖对照品 (美国 Sigma 公司, 批号: 00269, 纯度: 供含量测定用); 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为屈臣氏蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取工艺

精密称取处中淫羊藿、茯苓、女贞子等药材共 18 份 (正交试验共 9 组, 每组 2 份), 每份 320 g, 其中淫羊藿 40 g, 加水提取。分别取各组提取液 10 ml, 加水稀释并定容至 100 ml, 得 1~18 号样品溶液, 供检测。

### 2.2 样品溶液中淫羊藿苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: InertSustain C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (28:72); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μl。

2.2.2 淫羊藿空白溶液的制备 称取处方中除淫羊藿以外的其余各药材, 加入 10 倍量水, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液滤过, 合并滤液。取滤液 10 ml, 加水稀释并定容至 100 ml, 摇匀,

0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

**2.2.3 标准曲线的建立** 精密称取干燥的淫羊藿苷对照品适量,置于50 ml量瓶中,加甲醇超声溶解,定容至刻度,制备成含淫羊藿苷0.332 5 mg/ml的对照品贮备液。分别取上述贮备液0、2、4、6、8、10 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过。分别取20 μl,注入液相色谱仪中测定峰面积。以峰面积(y)对淫羊藿苷质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=38\ 832\ 934.01x-17\ 303.4$ ( $r=0.999\ 0$ )。结果表明,淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为20.8~332.5 μg/ml;定量限为20.8 μg/ml。

**2.2.4 精密度、稳定性、回收率试验** 按相关方法进行试验。结果,精密度试验中RSD为0.96%( $n=6$ );稳定性试验中峰面积的RSD为1.04%( $n=6$ ),供试品溶液在48 h内基本稳定;平均回收率为99.04%,RSD为1.14%( $n=6$ )。

**2.2.5 专属性考察** 分别吸取淫羊藿苷对照品溶液、供试品溶液(正交试验6号)、淫羊藿空白溶液各20 μl,进样测定。结果,淫羊藿苷对照品溶液、供试品溶液在16 min左右出现淫羊藿苷特征吸收峰,而淫羊藿空白溶液在此处无干扰;淫羊藿苷与相邻杂质峰的分离度大于1.5;理论板数按淫羊藿苷峰计大于1 500。以上表明方法专属性良好,详见图1。

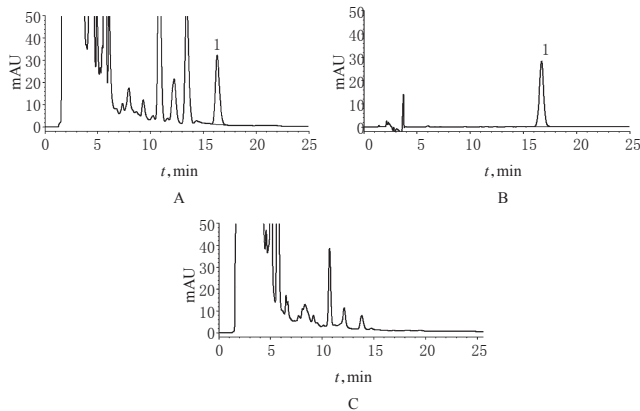


图1 高效液相色谱图

A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; C. 空白溶液; 1. 淫羊藿苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. sample solution; B. control solution; C. blank solution; 1. icariin

**2.2.6 样品中淫羊藿苷含量测定及提取率计算** 吸取“2.1”项下1~18号样品溶液2 ml,过0.45 μm滤膜,精密吸取20 μl注入色谱仪,测定。记录淫羊藿苷峰面积,由回归方程得到样品液中淫羊藿苷的质量浓度,计算淫羊藿苷的提取率(提取液中淫羊藿苷的量/药材干品中淫羊藿苷的量×100%)。

### 2.3 样品溶液中粗多糖含量测定<sup>[7]</sup>

**2.3.1 葡聚糖标准液的制备** 精密称取葡聚糖对照品10 mg,置于100 ml量瓶中,加水溶解并定容至刻度,混匀,即得0.1 mg/ml葡聚糖对照液。

**2.3.2 标准曲线的建立** 采用硫酸-苯酚法。精密吸取葡聚糖对照液0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 ml,分别置于25 ml比色管中,准确补充水至2.0 ml,加入50 g/L苯酚溶液1.0 ml,在振荡器上混匀,加入浓硫酸10.0 ml,于振荡器上小心混匀,置于沸水浴中煮沸2 min,冷却。以试剂为参比,用分光光度法在450~550 nm波长范围内进行扫描,结果在485 nm波长处有最大吸收。选定该波长测定吸光度,以葡聚糖质量浓度(x)为横

坐标、吸光度(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=0.148x-0.001$ ( $r=0.999\ 0$ )。结果表明,葡聚糖检测质量浓度线性范围为12.8~128.0 μg/ml。

**2.3.3 精密度、回收率试验** 按相关方法进行试验。结果,精密度试验的RSD≤2.09%( $n=6$ );平均回收率为96.04%(RSD=2.27%, $n=6$ )。

**2.3.4 样品溶液中粗多糖含量测定** 精密吸取“2.1”项下1~18号样品溶液各2 ml,置于10 ml离心管中,加入无水乙醇8 ml,混匀5 min,以3 000 r/min(离心半径6.6 cm)离心5 min,弃去上清液。残渣用80%乙醇溶液适量洗涤,离心后弃上清液,反复3~4次操作。残渣用2.0 ml水溶解,混匀,加入100 g/L氢氧化钠溶液2.0 ml、铜试剂溶液2.0 ml,沸水浴中煮沸2 min,冷却后以3 000 r/min离心5 min,弃去上清液。残渣用洗涤液适量洗涤,离心,弃去上清液,反复3次操作。残渣用100 ml/L硫酸溶液2.0 ml溶解并转移至50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,混匀。此溶液为试样测定液。精密吸取试样测定液2.0 ml置于25 ml比色管中,加入50 g/L苯酚溶液1.0 ml,在振荡器上混匀后,加入浓硫酸10.0 ml后于振荡器上小心混匀,置于沸水浴中煮沸2 min,冷却至室温。用分光光度法在485 nm波长处测定吸光度值,计算试样中水溶性粗多糖含量,同时做试样空白试验。对照品溶液、正交试验6号样品溶液的紫外吸收光谱图见图2。

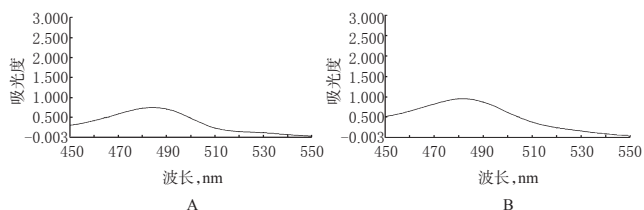


图2 紫外吸收光谱图

A. 对照品; B. 供试品

Fig 2 UV absorption spectrum

A. substance control; B. test sample

### 2.4 浸膏得率测定<sup>[8]</sup>

精密吸取1~18号样品滤液30 ml,至已恒质量的坩埚中,水浴蒸干后,105 ℃烘3 h,冷却,精密称定,计算浸膏得率(浸膏质量/药材质量×100%)。

### 2.5 正交试验及其结果

**2.5.1 正交试验** 根据单因素初筛试验结果,分别确定加水倍数(加水体积:药材质量)(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为因素,每个因素各取3个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交试验安排用水进行回流提取,提取液过滤后合并。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水倍数),倍	B(提取时间),h	C(提取次数)
1	6	1.0	1
2	8	1.5	2
3	10	2.0	3

按照表 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验,评价指标为粗多糖含量、淫羊藿苷提取率、浸膏得率,综合评分=(粗多糖含量/粗多糖最大含量×0.4+淫羊藿苷提取率/淫羊藿苷提取率最大值×0.35+得膏率/得膏率最大值×0.25)×100。正交试验安排与结果见表2,方差分析见表3。

表2 正交试验安排与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白粗多糖含量,mg/g)	淫羊藿苷提取率,%	浸膏得率,%	综合评分
1	1	1	1	1	11.41	38.49	15.64
2	1	2	2	2	21.60	67.34	24.78
3	1	3	3	3	29.06	84.46	27.56
4	2	1	2	3	13.32	61.79	24.08
5	2	2	3	1	26.83	81.38	28.55
6	2	3	1	2	13.94	42.84	19.13
7	3	1	3	2	19.50	83.83	28.34
8	3	2	1	3	11.44	42.99	19.40
9	3	3	2	1	21.92	74.44	27.31
$K_1$	74.60	65.58	49.86	75.31			
$K_2$	71.46	75.17	76.42	73.13			
$K_3$	73.95	79.25	93.73	71.56			
$R$	3.140	13.67	43.87	3.747			

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	$F$	$P$
A	16.507	2	8.254	0.777	0.563
B	295.365	2	147.683	13.906	0.067
C	2 929.770	2	1 464.885	137.936	0.007
D	21.240	2	10.620		

注: $F_{0.1}(2,2)=9$ ;  $F_{0.05}(2,2)=19$ ;  $F_{0.01}(2,2)=99$ Note: $F_{0.1}(2,2)=9$ ;  $F_{0.05}(2,2)=19$ ;  $F_{0.01}(2,2)=99$ 

由表2、表3可知,各因素影响程度顺序为 $C>B>A$ ,提取次数影响最大,其次是提取时间,最后为加水倍量;正交试验显示最优工艺为 $A_1B_3C_3$ 。由方差分析可知,C因素各水平对粗多糖含量、淫羊藿苷转移率和得膏率有显著性影响( $P<0.01$ ),选择 $C_3$ 为最优;B因素各水平对指标成分含量影响有区别( $P<0.1$ ),选择 $B_3$ 为最优;A因素则对试验指标的影响较小,从工业化生产角度考虑,减少提取溶剂可有效降低成本,故选择 $A_1$ 水平。由此确定最优工艺为 $A_1B_3C_3$ ,即:称取处方量药材,加入6倍量的水,微沸回流提取3次,每次2h。

2.5.2 验证试验 精密称取3批干燥的处方各药材共320g,按最优工艺条件平行操作,测定粗多糖含量、淫羊藿苷转移率、干膏得率,结果见表4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation test

项目	粗多糖含量,mg/g	淫羊藿苷提取率,%	浸膏得率,%	综合评分
验证1	29.43	83.82	28.52	99.70
验证2	29.11	83.78	28.63	99.71
验证3	29.31	83.80	28.47	99.65
均值	29.28	83.80	28.47	99.69
RSD,%	0.55	0.02	0.29	

结果表明,用最优工艺条件提取,提取物中粗多糖含量、淫羊藿苷转移率均较高,且高于其他各正交试验值;综合评分均值99.69,也高于正交试验中最高值;且各指标3次试验的RSD均 $\leq 0.55\%$ ,故所选最优工艺条件合理、稳定性较好。

### 3 讨论

采用多指标并经正交试验综合平衡后所得的工艺条件,能根据实际需要并兼顾到各指标的理化性质<sup>[9]</sup>。本试验以粗多糖含量、淫羊藿苷提取率、干膏得率为指标,经综合平衡后

选择最优工艺,兼顾到粗多糖为本方中君臣佐药中所含的增强免疫力的主要成分,在综合评分中权重系数为0.4;淫羊藿苷为君药淫羊藿主要成分,评分时权重系数为0.35,以保证所选工艺对臣药主要成分的提取率;干膏得率权重系数为0.25,以控制所选工艺所得干膏量适当,便于控制日服用量。

在选择提取溶剂时,根据各指标成分的理化性质,分别以水和50%乙醇为提取溶剂,在同等条件下考察粗多糖含量、淫羊藿苷提取率及得膏率。在前期试验中,选用不同溶剂提取时,粗多糖含量以水提取时为16.65 mg/g,以50%乙醇提取时为4.37 mg/g;淫羊藿苷提取率以水提取时为87.21%,以50%乙醇提取时为94.33%;浸膏得率以水提取时为27.48%,以50%乙醇提取时为30.17%。根据以上对比试验,并考虑到粗多糖以水为溶剂提取较以醇为溶剂提取率更高,以及能耗、成本等方面的因素,最后确定水为提取溶剂。

在对提取液中的淫羊藿苷进行含量测定时,考察了不同流动相对峰形的影响。流动相采用乙腈-水(30:70)时<sup>[8]</sup>,色谱峰峰形对称,但保留时间过短,分离度不好;流动相采用乙腈-水(26:74)时<sup>[10]</sup>,色谱峰峰形对称,但保留时间过长;流动相采用乙腈-水(28:72)时色谱峰峰形对称,分离效果佳,保留时间适中,故最终选用其为流动相组成。

本试验方法操作简便,优选出的提取工艺稳定性好、可靠性强,可为进一步开发利用该有效成分提供重要的试验基础。

### 参考文献

- [1] 韩冰,杨峻山.淫羊藿药理作用研究概况[J].中草药,2000,31(11):75.
- [2] Chen X, Chen X, Qiu S, et al. Effects of epimedium polysaccharide-propolis flavone oral liquid on mucosal immunity in chickens[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64:6.
- [3] 卢宇,王凯民,郭振环,等.硫酸化淫羊藿多糖对鸡外周血淋巴细胞IL-2和IFN- $\gamma$ 的mRNA表达的影响[J].江苏农业学报,2009,25(5):1073.
- [4] Bao Y, Jin C, Shi W. Effects of Chinese herbal recipes on immunity in immunosuppressive mice[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2012, 9(4):548.
- [5] Rhew KY, Han Y. Immunoadjuvant activity of icariin that induces Th1-type antibody in mice[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(9):1685.
- [6] Li L, Peng L, Miao J, et al. Icariin induces the expression of toll-like receptor 9 in ana-1 murine macrophages[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11):1732.
- [7] 王光亚.保健食品功效成分检测方法[M].北京:中国轻工业出版社,2002:19-22.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:306,附录XA.
- [9] 林青,林亚平,邱德文.用多指标活动水平正交设计合并线性回归法对苏长史茺莢汤II方提取工艺进行优选[J].中国药理学杂志,2004,39(6):16.
- [10] 王蕾,谈瑄忠,毛春芹,等.淫桂通便秘颗粒的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(15):1400.

(收稿日期:2015-04-15 修回日期:2015-06-08)

(编辑:刘 萍)