

[文章编号] 1003—4684(2022)04-0062-04

# 正交试验优选补血养元合剂提取工艺

陈艳熙, 陈安利, 马 卓

(湖北工业大学生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068)

[摘 要] 为优化补血养元合剂的水提工艺,以加水倍数、提取时间、提取次数为考察因素,通过单因素实验探究各因素对合剂质量的影响。在单因素实验的基础上设计  $L_9(3^4)$  正交实验,以干膏得率和淫羊藿苷含量为评价指标进行综合评分,确定合剂的最佳水提工艺,将优化所得工艺进行 3 次平行验证。结果表明,加水倍数和提取次数对制备工艺有显著影响。由正交实验表得,最佳工艺为加 8 倍水煎煮 2 次,每次 1 h。最佳工艺的干膏得率为 36.26%,淫羊藿苷含量为 27.55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该方法简单可行,为以后有关补血养元合剂的研究、生产提供参考依据。

[关键词] 提取工艺; 淫羊藿苷; 正交优化

[中图分类号] R283 [文献标识码] A

月经问题对年轻女性生活、工作及健康有很大的影响<sup>[1]</sup>。经期常伴有多种症状,如轻度抽筋、力竭等,严重者甚至会导致不孕<sup>[2-4]</sup>。中药因其多靶点、副作用少等优势,深受女性患者的喜爱,而月经不调等症状多与气血不足,阴虚等有关,故可选择补肾益气的药方进行调理<sup>[5]</sup>。补血养元合剂由淫羊藿、山茱萸、月季花、香附等组成。其中,淫羊藿、黄芪属君药,起补气升阳功效;月季花等为臣药,起活血调经功效;山茱萸等为佐药,起补肾养阴功效;香附等为使,起疏肝行气功效。使合剂具有补肾益气、养血调经及治疗阴阳平衡失调所致的月经不调、痛经和不孕症的功效,适应于各种贫血、证属气血亏虚者<sup>[6]</sup>。

本实验为考察不同提取因素对补血养元合剂质量的影响,设计正交试验优选出合剂的最佳水提工艺,为合剂的进一步开发奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 试药

淫羊藿、山茱萸、月季花、香附等中药材购自湖北强康中药饮片公司,经鉴定符合《中国药典》2020 版一部该药材项下标准。

淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定研究院,纯度 98.9%,供含量测定用)。乙腈、甲醇为色谱纯,甲酸为分析纯,实验用水为超纯水。

### 1.2 实验仪器

R206B 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司),

赛默飞 U3000 高效液相色谱仪(匠析生物科技有限公司),H1650-W 医用离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司),ZFI-II 紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司),C21-SN216 多功能电磁炉,实验室超纯水器(武汉优普纯水设备有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 药材吸水率试验

为提高中药饮片水提实验加水量的准确度,确保饮片中有有效成分的溶出度,提高补血养元合剂质量,对中药饮片的吸水量进行考察。按处方比例准确称取淫羊藿、山茱萸、月季花、香附等中药饮片共 3 组,每组重 315 g,分别用纱布包裹,加入 10 倍量水浸泡,常温(25  $^{\circ}\text{C}$ )放置,分别在 0.5、1、1.5、2、2.5、3、12 h 时取出药材,滤除多余水分,以无液体流出为标准,称量湿饮片的重量记录数值,按如下公式计算吸水率<sup>[7-8]</sup>,测定结果见表 1。

$$\text{吸水率} = \frac{\text{药材湿重} - \text{药材干重}}{\text{药材干重}} \times 100\%$$

表 1 中药饮片吸水率 %

组数	时间/h							
	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	12
1	0	66.89	77.56	86.89	93.41	97.7	118.19	119.24
2	0	70.28	87.01	94.94	101.21	104.2	119.84	120.57
3	0	73.95	86.91	94.46	97.2	100.98	118.2	118.22

由表 1 可知,3 h 之后药材的吸水率增加且缓慢达到饱和,测得饱和吸水率平均值为 118.74%,因

[收稿日期] 2021-05-28

[第一作者] 陈艳熙(1996—),女,四川成都人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为中药制剂

[通信作者] 马 卓(1962—),女,湖北武汉人,工学博士,湖北工业大学教授,研究方向为药物制剂与中药药理

此首次提取时需多加 1 倍水。

2.2 淫羊藿苷含量测定<sup>[9-11]</sup>

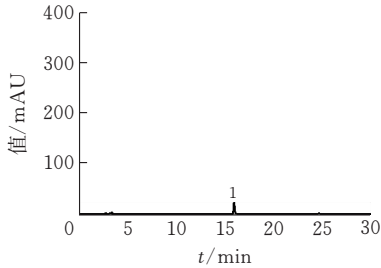
2.2.1 色谱条件 采用十八烷基硅烷键合硅胶分析柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈(A)–0.2%甲酸(B)。流速 1 mL/min,柱温 35 ℃,进样量 20 μL,检测波长 260 nm。梯度洗脱:0~20 min,20% A;20~30 min,20%~40% A;30~30.5 min,40%~20% A;30.5~33 min,20% A。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品 1.0 mg,加甲醇溶解,定容至 100 mL 容量瓶,摇匀,即得 10 μg/mL 对照品溶液。

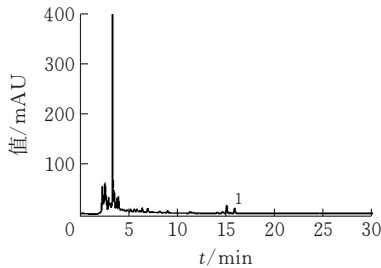
2.2.3 供试品溶液的制备 取制备好的合剂 1 mL,甲醇定容至 100 mL,静置一夜后,0.22 μm 滤膜过滤。滤液即为供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方配比准确称取除淫羊藿以外的其他中药饮片,处理方法同“2.2.3”。

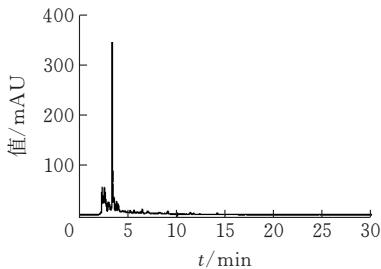
2.2.5 专属性试验 对上述对照品、供试品、阴性溶液进行色谱分析,结果见图 1。结果显示阴性无干扰,说明方法专属性良好。



(a)为淫羊藿苷对照品溶液



(b)供试品溶液



(c)淫羊藿阴性溶液

1—淫羊藿苷

图 1 高效液相色谱

2.2.6 线性关系考察 精密吸取 0.2、0.4、0.6、0.8、

1 mL 对照品溶液,用甲醇定容稀释成 2、4、8、16、32 μg/mL,依次进行色谱分析。以浓度为横坐标 X,峰面积为纵坐标 Y 进行回归(图 2),得回归方程: $y=0.2798x-0.0617(R^2=0.9999)$ ,说明淫羊藿苷在 2~32 μg/mL 范围线性关系良好。

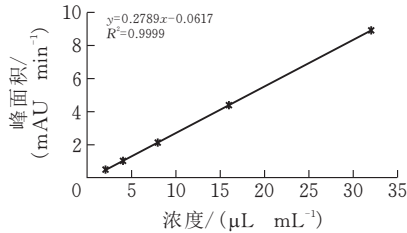


图 2 淫羊藿苷标准曲线

2.2.6 精密度实验 重复取 6 次对照品溶液,每次 20 μL 进行色谱分析。测得淫羊藿苷峰面积 RSD 为 0.294%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性实验 按处方称取饮片 6 份,平行制备 6 份供试品溶液进行色谱分析。测得淫羊藿苷峰面积 RSD 为 1.24%,说明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性实验 分别在 0、2、4、6、8、10、24 h 取同一供试品溶液 20 μL 进行色谱分析。测得淫羊藿苷峰面积 RSD 为 1.73%,说明淫羊藿苷在 24 h 内性质稳定。

2.2.9 加样回收率实验 取 9 份供试品溶液(每份含 9.359 μg 淫羊藿苷),分为 3 组,各组分别加入淫羊藿苷标准品高中低剂量,用甲醇定容后进行色谱分析,结果见表 2。

$$\text{加样回收率} = \frac{\text{加标样后测得量} - \text{样品含量}}{\text{加标样量}} \times 100\%$$

表 2 加样回收率实验结果

编号	样品	淫羊藿苷的量/ (μg · mL <sup>-1</sup> )	测得	回收 率/%
1		7.49	16.833	99.79
2		7.49	16.841	99.89
3		7.49	16.839	99.87
4		9.359	18.731	100.14
5	9.359	9.359	18.724	100.01
6		9.359	18.726	100.09
7		11.23	20.591	100.02
8		11.23	20.587	99.98
9		11.23	20.586	99.97

实验测得淫羊藿苷平均加样回收率为 99.97%,RSD 为 1.09%,说明该含量测定方法准确可靠。

2.3 干膏得率测定

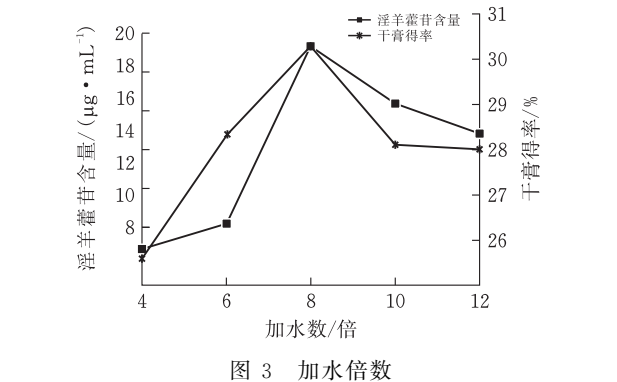
取制备好的合剂 300 mL,置于干燥至恒重的坩埚中,水浴蒸干,再于烘箱中 105℃干燥 3 h,移至干燥器中冷却 30 min,精密称定其质量。

$$\text{干膏得率} = \text{干膏质量} / \text{原药材质量} \times 100\%$$

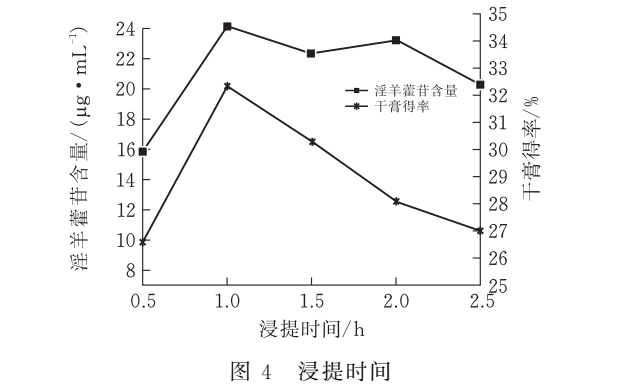
2.4 单因素考察实验

2.4.1 加水倍数 按处方配比精密称取中药饮片,

分别加 4、6、8、10、12 倍水,提取 2 次,每次 1 h,合并 2 次煎煮液并浓缩,得到提取液。由图 3 可知,随水倍数增加,淫羊藿苷含量和干膏得率呈先增加后下降趋势。究其原因,可能是当加水量过少,饮片未能浸泡完全,有效成分及其他物质溶出率低;当加水量过多,饮片中除淫羊藿苷外的其他物质也充分溶出,物质间可能发生了相互作用。当加入 8 倍水时,淫羊藿苷含量和干膏得率达到最大值,故选择 6 倍、8 倍、10 倍水为后续优化参考水平。



2.4.2 提取时间 按处方配比精密称取中药饮片 5 份,分别提取 30、60、90、120、150 min,均加入 8 倍水,提取 2 次,合并 2 次煎煮液并浓缩,得到提取液。由图 4 可知,随着提取时间延长,淫羊藿苷含量和干膏得率呈现先增加后下降趋势,可能是提取时间太短使得饮片中溶出的成分过少,而长时间提取则会使溶出的成分被破坏。淫羊藿苷含量和干膏得率在提取 1h 时达到最大值,故选择 0.5、1、1.5 为后续优化参考水平。



2.4.3 提取次数 按处方配比精密称取中药饮片 3 份,依次提取 1、2、3 次,均加 8 倍水,每次提取 1 h,然后将煎液过滤并浓缩,得到提取液。由图 5 可知,淫羊藿苷含量和干膏得率在提取 2 次后达到最大值,可能原因是提取次数过少,饮片成分不能充分溶出,而提取次数过多,则溶出的成份被破坏或成分之间发生相互作用使其含量降低。故选择提取次数为 1 次、2 次、3 次为后续优化参考水平。

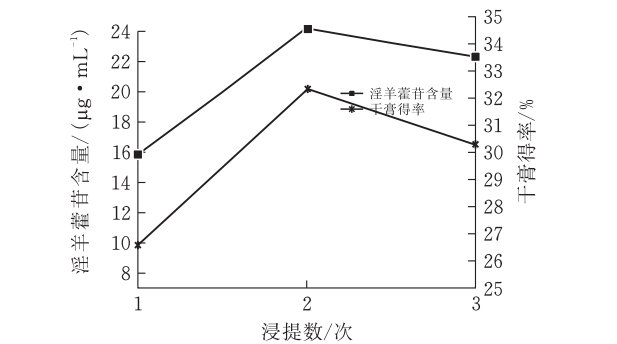


图 5 浸提次数

2.5 水提正交试验方案设计

用  $L_9(3^4)$  正交表设计试验,正交试验因素水平表见表 3。测定淫羊藿苷含量(a)和干膏得率(b)进行综合评分(Y),其中淫羊藿苷含量占评分 70%,干膏得率占评分 30%。直观结果见表 4,方差分析见表 5。

表 3 因素水平表				
序号	因素			
	加水倍数/倍	提取时间/h	提取次数/次	空白
	A	B	C	D
1	6	1	1	—
2	8	1.5	2	—
3	10	2	3	—

表 4 提取工艺正交实验直观分析表							
序号	A	B	C	D	淫羊藿苷含量/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	干膏得 率/%	综合 得分
1	1	1	1	1	10.92	22.35	14.35
2	1	2	2	2	23.56	26.86	24.55
3	1	3	3	3	18.04	25.32	20.22
4	2	1	2	3	22.98	34.13	26.33
5	2	2	3	1	25.09	34.55	27.93
6	2	3	1	2	16.08	31.58	20.73
7	3	1	3	2	20.06	28.13	22.49
8	3	2	1	3	12.52	26.68	16.77
9	3	3	2	1	18.92	29.02	21.95
K1	19.71	21.05	17.28				
K2	24.99	23.08	24.28				
K3	20.40	20.97	23.54				
R	5.29	2.11	6.99				

表 5 方差分析结果					
因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	49.539	2	24.769	13.483	*
B	8.598	2	4.299	2.34	
C	88.644	2	44.322	24.127	*
误差 D	3.674	2	1.837		

从表 4 中极值 R 可以看出,影响淫羊藿苷含量的 3 个因素次序为:提取次数>加水倍数>提取时间。与方差分析表所分析的“因素 A 和因素 C 对实验有显著影响”结论相同。根据以上实验结果,考虑到成本和提取时长,确定最佳提取工艺为  $A_2B_1C_2$ ,即 8 倍水提取 2 次,每次 1 h。

2.6 验证实验

按处方配比称取中药饮片 3 份,按优化工艺 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>(8 倍水提取 2 次,每次 1 h)做 3 次平行试验,测定干膏得率和淫羊藿苷含量。试验结果见表 6,淫羊藿苷含量为 27.55 μg/mL,干膏得率为 36.26%。验证结果与正交结果相近,说明优化的工艺条件具有可行性。

表 6 验证实验结果		
试验号	干膏得率/%	淫羊藿苷含量 /(μg · mL <sup>-1</sup> )
1	35.79	26.6
2	36.16	27.29
3	36.84	28.76
平均	36.26	27.55

3 结束语

本研究采用正交法优选补血养元合剂的提取工艺。结果表明,与常规提取条件所得结果相比,优化工艺合剂中有效成分含量显著提高,且最佳工艺条件为 8 倍水提取 2 次,每次 1 h。验证实验表明,本法具有可行性,且优化工艺操作简单、有可靠性,为制剂的大规模制备奠定了基础。

本研究重在优化补血养元合剂的提取工艺,提高有效成分的溶出度,若要保证临床安全用药,确定临床用药剂量,则还需进行药理学和毒理学实验。

[ 参 考 文 献 ]

[1] 刘卉,张涵,李珂,等.从“因虚、积冷、结气”辨治痛经经

验[J].山东中医杂志,2021,40(8):779-783.

[2] KIM J H, KIM O, JUNG H, et al. Body mass index, menstruation, acne, and hirsutism of polycystic ovary syndrome in women: a cross-sectional study [J]. Health Care for Women International, 2021, 43(1-3): 11-13.

[3] 赵艳,宋佳.试论萧龙友先生从肝脾不和辨治月经不调[J].浙江中医杂志,2021,56(7):526-527.

[4] 康建华,夏琴琴,童娟娟.温经祛瘀汤治疗寒凝血阻型月经不调的效果[J].当代医学,2021,27(19):66-68.

[5] 吴海燕,田颖.补肾活血疏肝汤对肾虚肝郁型卵巢早衰闭经患者月经复潮及内分泌激素水平的影响[J].陕西中医,2021,42(7):863-866.

[6] LIU L, LIU M, LIU M N, et al. Efficacy and safety of moxibustion for menstrual irregularities: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(14) : e25281.

[7] 杨杰辉,乔培浩,黄玉,等.全草类中药饮片吸水量的初步探索[J].药实践杂志,2019,37(3):254-259.

[8] 穆兰澄,仝小林,刘峰,等.中药饮片煎煮过程中吸水量的实验研究[J].中国实验方剂学,2010,16(4):7-8.

[9] 李钦青,柴金苗,贺文彬,等.高效液相色谱法同时测定复方藿枝颗粒中淫羊藿苷、宝藿苷 I、甘草苷和甘草酸铵的含量[J].中药新药与临床药理,2020,31(6):714-717.

[10] 仝立国,牛艳艳,王若瑜,等.一测多评法同时测定扶正固本颗粒中 6 种成分的含量[J].中国药房,2021,32(2):225-230.

[11] 吴承忠,王丹锐,蔡婉怡.益肾片中淫羊藿苷含量测定研究[J].按摩与康复医学,2019,10(24):50-53.

Optimization of the Extraction Process of Buxueyangyuan Mixture by Orthogonal Experiment

CHEN Yanxi, CHEN Anli, MA Zhuo

(School of Biological Engineering and Food Science, Hubei Univ. of Tech., Wuhan 430068, Chine)

**Abstract:** The objective of this study is to optimize the water extraction technology of Buxueyangyuan Mixture. To this end, the influence of each factor on the quality of the mixture was investigated by single factor experiment with water multiple, extraction time and extraction times as the factors. On the basis of single factor experiment, L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal experiment was designed to comprehensively score the yield of dry paste and the content of icariin as the evaluation indexes to determine the best water extraction process of the mixture. The optimized process was validated three times in parallel. The results showed that water addition times and extraction times had significant effects on the preparation process. According to the orthogonal experiment table, the best process is to add 8 times water and decoct twice, each time for 2 h. The yield of dry paste was 36.70% and the content of icariin was 27.55 μg/mL. It is concluded that the method is simple and feasible, and provides reference for the future research and production of Buxueyangyuan Mixture.

**Keywords:** extraction process; icariin; orthogonal optimization

[责任编辑:张 众]