

# 正交试验法优选柴胡消瘿颗粒的乙醇提取工艺

周旭<sup>1</sup>, 张兰<sup>2</sup>, 田原<sup>2</sup>, 樊晖<sup>2</sup>, 马明悦<sup>1</sup>, 翟延君<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的: 优选柴胡消瘿颗粒的醇提工艺, 为该制剂的临床用药提供参考。方法: 以干膏率和芍药苷、橙皮苷、柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 含量的综合评分为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数对醇提工艺的影响。采用 HPLC 测定指标成分含量, 柴胡皂苷类成分的流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B) 梯度洗脱(0~10 min, 10%~25% A; 10~25 min, 25%~35% A; 25~33 min, 35%~45% A; 33~50 min, 45% A; 50~55 min, 45%~10% A), 检测波长 210 nm; 芍药苷与橙皮苷的流动相乙腈-0.2% 乙酸(15:85), 检测波长分别为 230, 283 nm。结果: 最佳提取工艺为加 6 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。干膏率 35.98%, 干膏中芍药苷、橙皮苷、柴胡皂苷 a + d 的质量分数分别为 0.944%, 1.543%, 0.089%。结论: 优选的提取工艺科学合理、稳定可行, 为柴胡消瘿颗粒的工业化生产提供参考。

**[关键词]** 柴胡消瘿颗粒; 醇提工艺; 芍药苷; 橙皮苷; 柴胡皂苷类成分

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0020-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020020

## Optimization of Ethanol Extraction Technology of Chaihu Xiaoying Granules by Orthogonal Test

ZHOU Xu<sup>1</sup>, ZHANG Lan<sup>2</sup>, TIAN Yuan<sup>2</sup>, FAN Hui<sup>2</sup>, MA Ming-yue<sup>1</sup>, ZHAI Yan-jun<sup>1\*</sup> (1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China; 2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ethanol extraction technology of Chaihu Xiaoying granules which could guide clinical medication of this preparation. **Method:** With composite score of yield of dry extract and mass percents of paeoniflorin, hesperidin, saikosaponin a and saikosaponin d as index, orthogonal design was taken for investigating effects of the concentration of ethanol, the amount of ethanol, extraction time and times on extraction technology. Contents were determined by HPLC, mobile phase of saikosaponin consisted of acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution program of (0-10 min, 10%-25% A; 10-25 min, 25%-35% A; 25-33 min, 35%-45% A; 33-50 min, 45% A; 50-55 min, 45%-10% A), detection wavelength was set at 210 nm; mobile phase of paeoniflorin and hesperidin consisted of acetonitrile-0.2% acetic acid solution (15:85), detection wavelengths were set at 230 nm and 283 nm, respectively. **Result:** Optimal extraction condition was to reflux extract twice with 6 times the amount of 60% ethanol for 1.5 hours per time. Yield of dry extract was 35.98%, mass percents of paeoniflorin, hesperidin, saikosaponin a and saikosaponin d were 0.944%, 1.543%, 0.089%, respectively. **Conclusion:** This optimized technology is scientific, reasonable, stable and feasible, which can provide a reference for industrial production of Chaihu Xiaoying granules.

**[Key words]** Chaihu Xiaoying granules; alcohol extraction technology; paeoniflorin; hesperidin; saikosaponin

柴胡消瘿颗粒为辽宁中医附属医院的临床经验方, 由柴胡、赤芍、陈皮、当归、浙贝母、莪术等 8 味中

药组成, 具有健脾化痰、活血软坚的功效, 适用于以瘿病实邪为主的早、中期阶段, 即慢性淋巴细胞性甲

**[收稿日期]** 20140513(019)

**[基金项目]** 沈阳市科技局资助项目(F10-149-9-11)

**[第一作者]** 周旭, 在读硕士, 从事中药质量评价研究, Tel:18640570586, E-mail:zx\_lnzyy@sina.com

**[通讯作者]** \* 翟延君, 博士, 教授, 从事中药质量评价研究, E-mail:lnzyzyj@sohu.com

状腺炎初、中期,疗效确切、标本兼治。为提高柴胡消癭颗粒中各有效成分提取率,本实验选择乙醇为溶媒,以芍药苷、橙皮苷、柴胡皂苷类成分含量和干膏率为综合评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察提取时间、提取次数、乙醇体积分数及用量对该方提取工艺的影响。

### 1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),AE-240型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。柴胡、赤芍、陈皮等药材均购于安国市禾神中药材饮片有限责任公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,均符合2010年版《中国药典》相关项下要求;芍药苷、橙皮苷、柴胡皂苷a及柴胡皂苷d对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-201136, 110721-200211, 110777-200507, 110778-200506),乙腈、甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

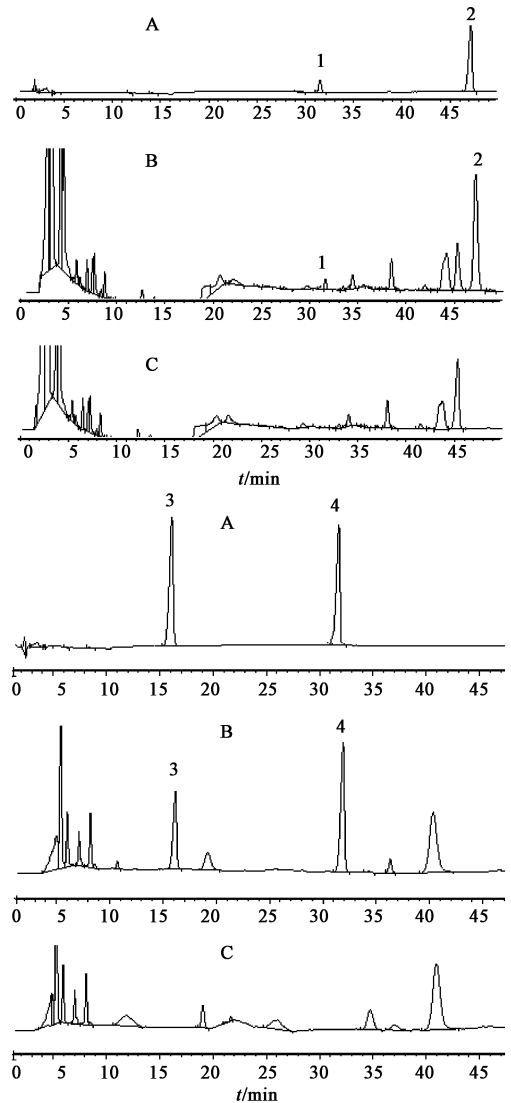
**2.1 干膏率的测定** 提取液回收乙醇至无醇味,浓缩,置已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,70℃干燥至恒重,称定质量,计算干膏率。

#### 2.2 指标成分的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速1 mL·min<sup>-1</sup>。柴胡皂苷类成分的流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~25% A; 10~25 min, 25%~35% A; 25~33 min, 35%~45% A; 33~50 min, 45% A; 50~55 min, 45%~10% A),检测波长210 nm,柱温40℃。芍药苷与橙皮苷的流动相乙腈-0.2%乙酸(15:85),检测波长分别为230, 283 nm,柱温30℃。见图1。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取柴胡皂苷a, d对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.098, 0.115 g·L<sup>-1</sup>的溶液<sup>[1]</sup>。精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成0.184 g·L<sup>-1</sup>的溶液<sup>[2]</sup>。精密称取橙皮苷对照品适量,加甲醇制成0.4 g·L<sup>-1</sup>的溶液<sup>[2]</sup>。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取干膏适量,过80目筛研细,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入含5%浓氨试液的甲醇溶液25 mL,密塞,水温30℃超声处理(200 W, 40 kHz)30 min,滤过,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解并转移至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,得柴胡皂苷类成分含量测定的供试品溶液<sup>[1]</sup>。取干膏适量,过80目筛研细,精密



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 d; 3. 芍药苷; 4. 橙皮苷

图1 柴胡消癭颗粒 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of extract of Chaihu Xiaoying granules

称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声处理(100 W, 25 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,得芍药苷和橙皮苷含量测定的供试品溶液<sup>[2]</sup>。

#### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系考察** 精密吸取芍药苷、橙皮苷及柴胡皂苷a, d等比混合对照品溶液各4, 8, 12, 16, 20, 24 μL,分别按2.2.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 1271.2X - 11.84$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 667.99X + 0.006$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 639.4X - 0.84$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 4184.9X - 1.88$  ( $r = 0.9999$ ),线性

范围分别为 0.184 ~ 1.104, 0.4 ~ 2.4, 0.098 ~ 0.588, 0.115 ~ 0.69 μg。

**2.3.2 精密度试验** 精密吸取柴胡皂苷 a, d 及芍药苷、橙皮苷对照品溶液各 8 μL, 分别按 2.2.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 1.8%, 1.7%, 1.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 精密称取柴胡消瘦干膏第 1 组正交样品约 0.1 g, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 各精密吸取 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算柴胡皂苷 a, d 及芍药苷、橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.9%, 1.5%, 1.8%, 表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.3.4 重复性试验** 精密称取柴胡消瘦干膏第 2 组正交样品 6 份, 每份约 0.1 g, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 各精密吸取 10 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果柴胡皂苷 a, d 及芍药苷、橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 2.2%, 2.5%, 1.6%, 2.1%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.5 加样回收率试验** 精密称取柴胡消瘦干膏第 2 组正交样品 6 份, 各准确加入柴胡皂苷 a, d 及

芍药苷、橙皮苷对照品适量, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 2 μL, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算各成分含量及回收率, 结果平均加样回收率分别为 98.1%, 100.8%, 99.9%, 101.1%, RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 1.7%, 1.9%, 表明该方法回收率良好。

**2.4 正交因素设计** 按处方比例称取柴胡 5 g, 赤芍 5 g, 陈皮 5 g 及其他药味, 共 9 份, 选取提取时间、提取次数、乙醇体积分数及用量为考察因素, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验进行乙醇回流提取, 以芍药苷 ( $W_1$ )、橙皮苷 ( $W_2$ )、柴胡皂苷 a + d ( $W_3$ ) 的质量分数和干膏率 ( $W_4$ ) 的综合评分为指标, 干膏率、芍药苷、橙皮苷和柴胡皂苷 a + d 的权重系数分别为 0.4, 0.1, 0.1, 0.4, 综合评分 =  $(0.4 \times W_4/W_{4max} + 0.1 \times W_1/W_{1max} + 0.1 \times W_2/W_{2max} + 0.4 \times W_3/W_{3max}) \times 100\%$ , 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。由表直观分析可知, 各因素对醇提工艺的影响程度依次为  $C > A > B > D$ 。方差分析表明因素 C 具有显著性影响, 其他因素则均无显著性差异, 根据经济节约节能原理确定最佳提取工艺为  $A_1B_1C_2D_1$ , 即加 6 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。

表 1 柴胡消瘦颗粒醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of alcohol extraction technology of Chaihu Xiaoying granules

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	干膏率 /%	柴胡皂苷 a + d/%	芍药苷 /%	橙皮苷 /%	综合评分 /%
1	60	6	1.0	2	28.07	0.102	0.933	1.673	80.86
2	60	8	1.5	3	36.31	0.091	0.839	1.639	84.75
3	60	10	2.0	4	37.94	0.079	0.908	1.287	81.33
4	70	6	1.5	4	36.56	0.098	0.896	1.068	85.30
5	70	8	2.0	2	20.88	0.097	1.115	1.212	71.06
6	70	10	1.0	3	30.31	0.082	0.978	0.933	73.31
7	80	6	2.0	3	30.69	0.095	1.016	1.300	80.23
8	80	8	1.0	4	29.63	0.094	1.018	1.090	77.81
9	80	10	1.5	2	30.44	0.116	1.096	2.166	91.92

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	79.895	39.948	10.423	<0.05
B	36.727	18.364	4.792	<0.05
C	195.693	97.846	25.531	>0.05
D(误差)	7.665	3.833	1.000	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

**2.5 验证试验** 按处方比例称取柴胡 50 g, 赤芍 50 g, 陈皮 50 g 及其他药味, 共 3 份, 按最佳提取工艺条件进行验证试验, 结果见表 3, 表明该提取工艺合理、稳定可行。

### 3 讨论

柴胡消瘦颗粒是以逍遥散为基本方, 经张兰教授根据中医药理论并结合现代药理研究及临床经验改进而成的医院制剂。方中君药柴胡引经入肝、疏

表 3 柴胡消瘿颗粒醇提工艺验证试验

Table 3 Verification test of alcohol extraction technology of Chaihu

No.	干膏率	柴胡皂苷 a + d	芍药苷	橙皮苷
1	35.75	0.091	0.957	1.582
2	36.13	0.090	0.935	1.515
3	36.07	0.087	0.941	1.533

肝解郁、调达肝气；臣药赤芍入肝经血分、散瘀敛阴、柔肝止痛，陈皮疏肝理气、健脾和中。诸药合用气血兼顾、肝脾同调、软坚散结、活血化瘀，共奏祛邪扶正、标本兼治之功。由于柴胡水提过程易受酚类或酸性成分的影响，有效成分柴胡皂苷 a、d 中环氧醚键易开环转化为柴胡皂苷 b<sub>1</sub>、b<sub>2</sub><sup>[3-5]</sup>；赤芍含淀粉较多，水提易糊化，过滤较困难<sup>[6]</sup>；陈皮中橙皮苷属于黄酮类化合物，水溶性较差<sup>[7-8]</sup>；综合本方有效成分的理化性质考虑，故选择乙醇作为提取溶媒，以提高有效成分的溶出度，增强疗效。

中药复方疗效是由方中各药味的有效成分共同作用的结果，本文以方中君药柴胡、臣药赤芍和陈皮中的有效成分及干膏率作为综合评价指标，更能全面反映该提取方法的科学性。中药提取工艺研究时，指标性成分和干膏率的权重系数通常确定为 0.6 和 0.4<sup>[9]</sup>，考虑到君药柴胡对本方疗效发挥着极其重要的作用，故本文在设计权重系数时，有效成分按 0.6 比例计算，其中柴胡皂苷 a + d 为 0.4，芍药苷 0.1，橙皮苷 0.1。

本方成分复杂，杂峰较多，以 2010 年版《中国药典》(一部)“柴胡”含量测定项下的流动相进行洗脱，杂峰干扰严重，分离度不佳。查阅了大量文献<sup>[10-15]</sup>，考察了乙腈-水，乙腈-磷酸水，乙腈-甲酸水，乙腈-乙酸水等流动相体系，分别按不同方法进行梯度洗脱。结果表明流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~25% A; 10~25 min, 25%~35% A; 25~33 min, 35%~45% A; 33~50 min, 45% A; 50~55 min, 45%~10% A)时效果最佳，无杂峰影响，基线平稳、分离度较好，可作为柴胡皂苷类成分的含量测定方法。芍药苷和橙皮苷的最佳吸收波长分别为 230, 283 nm，本文选择双波长切

换法进行同时检测，能保证与其他组分完全分离，基线平稳，且阴性样品无干扰，该方法可用于评价柴胡消瘿颗粒的质量，同时对含有赤芍与陈皮的复方制剂质量标准研究具有参考价值。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 263-264.

[2] 陈家仪, 贾薇, 曾元儿, 等. HPLC 波长切换法同时测定枳芍散水煎液中 4 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 114-116.

[3] 鲁湘鄂, 郭海福, 汪洪武, 等. HPLC 法测定柴胡中柴胡皂苷 a, d 的含量[J]. 肇庆学院学报, 2006, 27(2): 43-46.

[4] 张国松, 封传华, 罗晓健, 等. 柴胡总皂苷提取工艺的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 17-20.

[5] 赵森铭. HPLC 法再研究水煎煮时间对柴胡皂苷成分溶出量的影响[J]. 北方药学, 2013, 10(5): 1-2, 60.

[6] 徐先祥, 周丽, 马燕, 等. 正交试验优选赤芍提取工艺研究[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 27(5): 41-43.

[7] 林林, 林子夏, 黄庆华. 新会陈皮中总黄酮的提取工艺[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(1): 23-27.

[8] 张凤, 黄芳, 李健. 正交试验优化橘皮中橙皮苷提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(21): 11048-11049.

[9] 付玮辰, 白海玉, 韩德强, 等. 正交试验法优选肾炎消白颗粒提取工艺研究[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(17): 122-123.

[10] 肖蓉, 王春英, 张志斐, 等. 河北道地药材北柴胡 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2006, 29(2): 119-123.

[11] 茅仁刚, 林东昊, 王智华, 等. HPLC 法测定不同品种柴胡中的柴胡皂苷 a, c, d 的含量[J]. 中草药, 2002, 33(5): 412-414.

[12] 龚建华, 石森林. 五个产地北柴胡中皂苷含量的比较[J]. 中国中医药学刊, 2014, 32(1): 200-203.

[13] 孟杰, 陈兴福, 杨文钰, 等. 柴胡主根与侧根中柴胡皂苷 a 及皂苷 d 含量测定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1218-1222.

[14] 靳勇, 孙磊, 乔善义, 等. 小柴胡汤高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(2): 224-232.

[15] 孙国祥, 毕雨萌, 刘金丹, 等. 柴胡高效液相色谱数字化指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2007, 5(1): 79-82.

[责任编辑 刘德文]