

# 正交设计优化四生颗粒的醇提工艺

刘松山<sup>\*</sup>, 谈静<sup>1</sup>, 陈佳<sup>2</sup>, 袁强华<sup>2</sup>, 宋英<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

**[摘要]** 目的: 优选四生颗粒的乙醇提取工艺。方法: 采用  $L_9(3^4)$  正交试验, 以毛蕊花糖苷、荷叶碱提取量和干膏收率的综合评分为指标, 考察乙醇体积分数、乙醇用量和提取时间对醇提工艺条件的影响。结果: 最佳醇提工艺为加 12 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h。结论: 优选的醇提工艺稳定可行, 可推广于工业化生产应用。

**[关键词]** 四生颗粒; 正交试验; 醇提工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0025-03

**[doi]** 10.11653/syfj2013170025

## Optimization of Ethanol Extraction Process for Sisheng Granules with Orthogonal Test

LIU Song-shan<sup>1\*</sup>, TAN Jing<sup>1</sup>, CHEN Jia<sup>2</sup>, YUAN Qiang-hua<sup>2</sup>, SONG Ying<sup>1</sup>

(1. Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610072, China;  
2. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ethanol extraction process of Sisheng granules. **Method:**  $L_9(3^4)$  orthogonal test was adopted to investigate effects of extraction time, the amount of ethanol and ethanol concentration on ethanol extraction process with composite score of yield of verbascoside, nuciferine and dry extract as index. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: reflux extracted 2 times with 12 folds the amount of 60% ethanol, 1 h per time. **Conclusion:** Optimized ethanol extraction process was stable and feasible, it could be extended for application in industrial production.

**[Key words]** Sisheng granules; orthogonal test; ethanol extraction process

四生颗粒为我院开发的新医院制剂, 源自《妇人大全良方》之经方“四生丸”, 该方由生侧柏叶、生荷叶、生艾叶、生地黄 4 味药组成, 功能凉血止血, 主治血热妄行证、肌衄及过敏性紫癜等症。生地黄清热凉血、养阴生津, 其止血作用的药效活性物质多存在于乙醇提取部位, 止血作用的活性成分与糖类、环烯醚萜苷类有关<sup>[1]</sup>。生荷叶清热止血散瘀, 其主要活性成分为生物碱和黄酮类化合物, 荷叶碱为荷叶中一种脂溶性阿扑啡型生物碱<sup>[2]</sup>。本实验以毛蕊

花糖苷、荷叶碱提取量及干膏收率为综合评价指标, 采用正交试验优选生地黄和生荷叶的醇提工艺条件, 为四生颗粒的临床应用提供依据。

### 1 材料

BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius), HP1100 型高效液相色谱仪 (美国惠普)。毛蕊花糖苷、荷叶碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110766-200719, 111566-200703), 乙腈为色谱纯, 水为蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 毛蕊花糖苷含量测定<sup>[3-5]</sup>

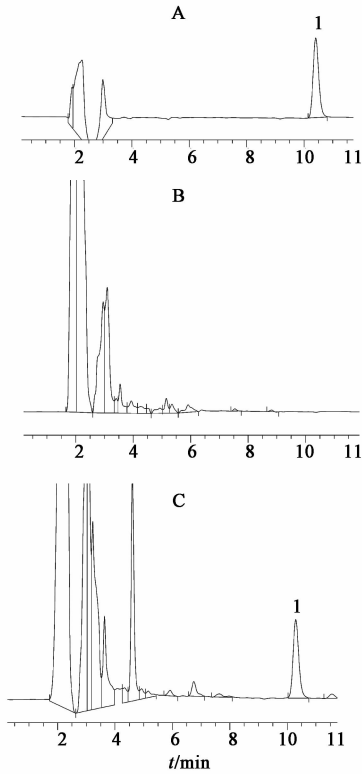
**2.1.1 色谱条件** Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 乙酸 (15:85), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 334 nm。理论板数按毛蕊花糖苷峰计不低于

**[收稿日期]** 20130120(011)

**[基金项目]** 成都中医药大学附属医院基金项目 (2011-D-YY-13)

**[通讯作者]** \* 刘松山, 硕士, 主任医师, 从事中医治疗血液系统疾病与临床评价研究, Tel: 028-87765620, E-mail: pine009@163.com

5 000, 见图 1。



A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. 毛蕊花糖苷

图 1 四生颗粒中毛蕊花糖苷 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取毛蕊花糖苷对照品 2.96 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

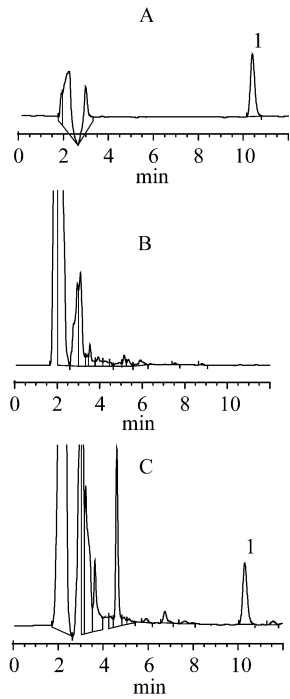
**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密吸取提取液 20 mL, 减压回收溶剂近干, 残渣用流动相溶解, 转移至 50 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.4 线性范围的考察** 分别精密吸取毛蕊花糖苷对照品溶液 0.5, 1, 3, 7, 10 μL 进样, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以毛蕊花糖苷峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程  $Y = 802.514X - 5.56$  ( $r = 0.99997$ ), 表明毛蕊花糖苷进样量在 0.0592 ~ 1.184 μg 与峰面积呈良好线性关系。

**2.2 荷叶碱含量测定**<sup>[2,4,6]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Agilent-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水-三乙胺-冰乙酸 (27:70.6:1.6:0.78), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 270 nm。理论板数按荷叶碱峰计不低于 2 000, 见图 2。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取荷叶碱对照品 2.99 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。



A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. 荷叶碱

图 2 四生颗粒中荷叶碱 HPLC

**2.2.3 供试品溶液的制备** 吸取适量提取液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2.4 线性范围的考察** 精密吸取荷叶碱对照品溶液 0.5, 1, 2, 7, 10 μL, 分别进样, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以荷叶碱峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程  $Y = 3576.490X - 6.219$  ( $r = 0.99996$ ), 表明荷叶碱进样量在 0.05982 ~ 1.196 μg 与峰面积呈良好线性关系。

**2.3 醇提工艺的优化**<sup>[7-9]</sup> 取 2 倍处方量药材 9 份, 每份 48.4 g, 在预试验基础上, 以毛蕊花糖苷和生物碱提取量及干膏收率的综合评分为考察指标, 权重系数依次为 0.35, 0.35, 0.3, 选择乙醇体积分数、乙醇用量及提取时间为考察因素, 采用 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交表进行回流提取试验, 提取数确定为 2 次, 提取液滤过, 合并滤液, 滤液浓缩并定容至 1 L, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 四生颗粒中生地黄和生荷叶的醇提工艺优选正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h
1	50	8	0.5
2	60	10	1.0
3	70	12	1.5

从直观分析可知, 影响提取效果的因素顺序为 A > C > B。方差分析表明因素 A 对提取工艺影响显

表2 四生颗粒中生地黄和生荷叶的醇提工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	毛蕊花糖苷提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	荷叶碱提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	干膏收率/%	综合评分
1	1	1	1	1	0.295	0.586	34.36	58.23
2	1	2	2	2	0.722	0.707	44.70	82.28
3	1	3	3	3	0.649	0.605	46.25	78.88
4	2	1	2	3	0.815	0.773	38.03	86.61
5	2	2	3	1	1.024	0.724	46.01	96.80
6	2	3	1	2	0.901	0.793	32.07	86.58
7	3	1	3	2	0.661	0.770	33.58	78.53
8	3	2	1	3	0.451	0.720	35.52	70.22
9	3	3	2	1	0.819	0.721	42.18	87.13
$K_1$	219.39	223.37	215.04	242.17				
$K_2$	269.99	249.31	256.02	247.39				
$K_3$	235.88	252.59	254.21	235.71				
R	16.87	9.74	13.66	3.90				

著,因素B,C对提取工艺无显著影响。综合实际生产考虑,确立生地黄和生荷叶的最佳醇提工艺为 $A_2B_3C_2$ ,即加12倍量60%乙醇回流提取2次,每次1h。

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	444.00	2	222.00	19.44	<0.05
B	170.83	2	85.42	7.48	>0.05
C	357.42	2	178.71	15.42	>0.05
D(误差)	22.84	2	11.42		

注: $F_{0.01}(2,2)=99$ , $F_{0.05}(2,2)=19$ 。

**2.4 验证试验** 称取2倍处方量药材3份,按最佳醇提工艺进行验证试验,结果毛蕊花糖苷提取量分别为0.924,0.919,0.901  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,荷叶碱提取量依次为0.764,0.759,0.766  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,干膏收率分别为42.46%,41.23%,41.15%,表明优选的醇提工艺稳定可行。

### 3 讨论

治疗过敏性紫癜病症疗效显著的中药制剂品种有限。四生丸为治疗吐血、衄血名方,功效凉血止血,可用于血热妄行之血证,而侧柏叶、荷叶、艾叶均属“叶”类药物,取其“以皮透皮”之性治疗皮肤出血,属中医取象比类之法,结合全方的功能主治,用于皮肤血证之过敏性紫癜血热妄行证,可谓药专效著,即异病(吐血、衄血与皮肤紫癜之不同疾病)同治法(同为血热妄行证)。

曾考察4种色谱条件对毛蕊花糖苷含量测定的影响,① Waters- $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流速1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,流动相乙腈-0.1%乙酸

(16:84),柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ;② Agilent- $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流速1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,流动相乙腈-0.1%乙酸(16:84),柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ;③ Agilent- $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流速1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,流动相乙腈-0.1%乙酸(15:85),柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ;④ Agilent- $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流速1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,流动相乙腈-0.1%乙酸(15:85),柱温40  $^{\circ}\text{C}$ 。其中色谱条件④分离效果好,出峰时间适中,峰形对称性好,且较为稳定可行。

### [参考文献]

- [1] 张丽娟.生地黄止血物质基础及海绵剂制备工艺研究[D].西安:陕西中医学院,2011.
- [2] 陈凌,肖文军,傅冬和,等.荷叶中荷叶碱的高效液相色谱检测方法及其提取工艺研究[J].食品与机械,2012,28(4):81.
- [3] 张岩.高效液相色谱法测定宽肠理气汤中松果菊苷和毛蕊花糖苷[J].中草药,2010,41(12):1994.
- [4] 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,2010:115,258.
- [5] 郭晓鸥,熊英,肖丽和.参杞益脑胶囊中毛蕊花糖苷的HPLC分析[J].中成药,2004,26(6):30.
- [6] 柴金玲,李伟,谷学新.高效液相色谱法测定荷叶中荷叶碱的含量[J].药物分析杂志,2005,25(8):932.
- [7] 黄莉婷,孙少平,郑颖.生地黄中梓醇和毛蕊花糖苷的HPLC测定及提取工艺优化[J].中药材,2012,35(8):1318.
- [8] 蒋益虹.荷叶生物碱的提取工艺优化[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2004,30(5):51.
- [9] 赵骏,王洪章,齐喜红,等.荷叶中荷叶碱提取工艺的研究[J].中草药,2003,34(10):55.

[责任编辑 全燕]