

正交试验法优选清脂通脉颗粒醇提工艺

陈雪¹, 田原², 于睿³, 闫冬¹, 翟延君^{1*}

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

[摘要] 目的: 优选清脂通脉颗粒的醇提取工艺。方法: 以柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d, 酸枣仁皂苷 A, 斯皮诺素总含量和干膏率为评价指标, 乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选醇提工艺。结果: 最佳提取工艺为加 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h。结论: 优选的提取工艺科学合理、稳定简便, 适用于清脂通脉颗粒的工业化生产。

[关键词] 清脂通脉颗粒; 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)11-0022-03

[doi] 10.11653/syfyj2013110022

Optimization of Alcohol Extraction Technology of Qingzhi Tongmai Granules by Orthogonal Test

CHEN Xue¹, TIAN Yuan², YU Rui³, YAN Dong¹, ZHAI Yan-jun^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Dalian 116600, China;
2. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China;
3. Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol extraction technology of Qingzhi Tongmai granules. **Method:** With total content of saikosaponin a, saikosaponin d, jujuboside A, spinosin and yield of dry extract as index, orthogonal design was taken for investigating effects of the concentration of alcohol, the amount of alcohol, extraction time and times on extraction technology. **Result:** Optimal extraction conditions were as followings: reflux extracted 3 times with 6 folds of 70% ethanol for 1.5 hours each time. **Conclusion:** This optimized technology was reasonable, stable, simple, and suitable for industrial production of Qingzhi Tongmai granules.

[Key words] Qingzhi Tongmai granules; orthogonal test; alcohol extraction technology

清脂通脉颗粒为我院临床常用方, 由柴胡、当归、酸枣仁、绞股蓝等组成, 具有清浊化痰、降脂通脉之功效。本实验根据处方中各药味有效成分的理化性质, 采用乙醇回流提取法, 通过 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验, 以柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d, 酸枣仁皂苷 A,

斯皮诺素的总含量和干膏率为评价指标, 考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数 4 个因素对醇提取工艺的影响, 确定最佳提取工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。

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 (上海梅特勒-托利多仪器上海有限公司), HN101-3A 型电热鼓风干燥箱 (南通沪南科学仪器有限公司), DK-98-1 型电热恒温水箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

柴胡、当归、酸枣仁、绞股蓝 (均购自河北安国, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定), 柴胡皂苷 a,

[收稿日期] 20121210(016)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术项目 (LT2010071)

[第一作者] 陈雪, 在读硕士, 从事中药质量评价研究, Tel: 18640216450, E-mail: chenxue080501@126.com

[通讯作者] * 翟延君, 博士, 教授, 从事中药质量评价研究, Tel: 13019499386, E-mail: lnzyzyj@sohu.com

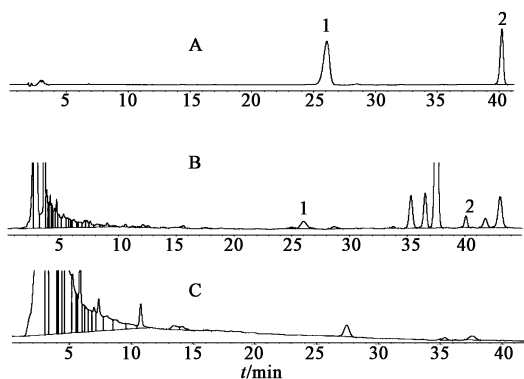
柴胡皂苷 d, 酸枣仁皂苷 A, 斯皮诺素对照品(均由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 110777-200507, 110778-200506, 110734-200510, 111869-201102); 甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 干膏率的测定^[1] 按处方比例分别称取柴胡、当归、酸枣仁、绞股蓝 15, 15, 18, 15 g, 回流提取, 滤过, 合并提取液, 浓缩, 定容至 100 mL 量瓶, 精密量取 30 mL 回收至无醇味, 置于干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥至恒重, 精密称重, 计算干膏率。剩余 70 mL 提取液浓缩至 20 mL 用于含量测定。

2.2 柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d 的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B) 梯度洗脱 (0 min, 35% A; 23 min, 35% A; 33 min, 45% A), 检测波长 210 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照溶液; 1. 柴胡皂苷 a; 2. 柴胡皂苷 d

图 1 清脂通脉颗粒提取液中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的 HPLC

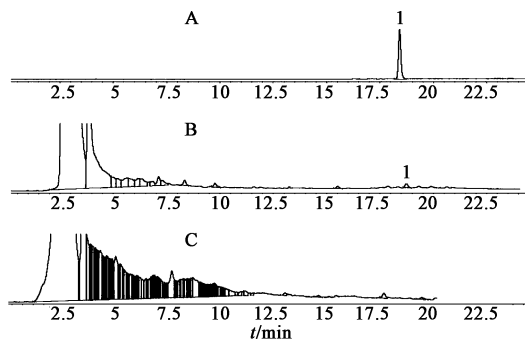
2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d 对照品适量, 加甲醇制成柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 质量浓度分别为 1.234, 0.828 g · L⁻¹ 的混合溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取提取液 4 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 滤过, 用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣, 洗液与滤液合并, 回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 酸枣仁皂苷 A 含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B) 梯度洗脱 (0 min, 20% A; 15 min, 40% A; 28 min,

40% A; 30 min, 70% A; 32 min, 100% A), 蒸发光散射检测器, 雾化室温度 50 °C, 雾化气体为高纯氮气, 氮气压力 0.3 MPa, Gain 10, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照溶液; 1. 酸枣仁皂苷 A

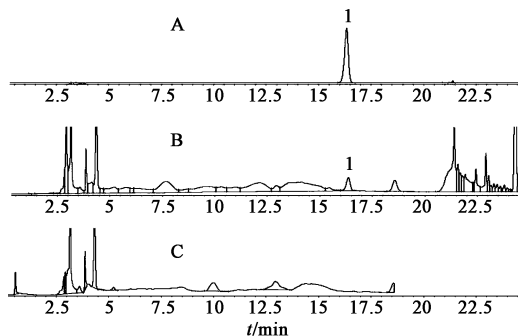
图 2 清脂通脉颗粒提取液中酸枣仁皂苷 A 的 HPLC

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品适量, 加甲醇摇匀, 制成 0.169 2 g · L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液。

2.4 斯皮诺素含量测定

2.4.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B) 梯度洗脱 (0 min, 12% A; 10 min, 19% A; 16 min, 20% A; 22 min, 100% A; 30 min, 100% A), 检测波长 335 nm, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照溶液; 1. 斯皮诺素

图 3 清脂通脉颗粒提取液中斯皮诺素 HPLC

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取斯皮诺素对照品适量, 加甲醇摇匀, 制成 0.244 g · L⁻¹ 的溶液, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液。

2.5 正交试验优选 在预试验基础上, 选取乙醇为提取溶剂, 乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 以

柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d, 酸枣仁皂苷 A, 斯皮诺素的总含量^[2] (权重系数 0.6) 和干膏率 (权重系数 0.4) 为评价指标, 确定最佳提取工艺, 因素与水平见表 1, 试验安排及结果见表 2^[3], 方差分析见表 3。

表 1 清脂通脉颗粒醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇 用量/倍	C 提取 时间/h	D 提取数 /次
1	60	6	1.0	1
2	70	8	1.5	2
3	80	10	2	3

由表 2 可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为提取次数 > 乙醇体积分数 > 乙醇用量 > 提取时间, 以 A₂B₁C₂D₃ 组合方案为佳; 以极值最小的 C 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 D 具有显著性影响, 因素 A, B 均无显著性差异; 根据节省能源原理, 确定最佳提取工艺为 A₂B₁C₂D₃, 即用 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h。

2.6 验证试验 称取处方量柴胡、当归、酸枣仁、绞股蓝, 各 3 份, 按最佳提取工艺进行 3 次验证试验,

表 2 清脂通脉颗粒醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	干膏率 /%	柴胡皂苷 a/%	柴胡皂苷 d/%	酸枣仁 皂苷 A/%	斯皮诺素 /%	总含量 /%	综合评分 /%
1	1	1	1	1	21.79	0.013	0.007	0.004	0.020	0.044	43.03
2	1	2	2	2	23.01	0.012	0.010	0.005	0.025	0.052	47.36
3	1	3	3	3	27.55	0.036	0.034	0.008	0.030	0.108	72.74
4	2	1	2	3	31.21	0.075	0.072	0.007	0.020	0.174	100.00
5	2	2	3	1	22.53	0.012	0.014	0.003	0.020	0.049	45.64
6	2	3	1	2	25.27	0.024	0.018	0.007	0.017	0.066	55.30
7	3	1	3	2	25.79	0.028	0.021	0.002	0.020	0.071	57.49
8	3	2	1	3	27.73	0.029	0.033	0.023	0.025	0.110	73.49
9	3	3	2	1	21.78	0.013	0.006	0.003	0.018	0.039	41.53
K ₁	18.126	22.28	19.091	14.467							
K ₂	22.327	18.499	20.988	17.794							
K ₃	19.168	18.841	19.541	27.359							
R	4.201	3.781	1.897	12.892							

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	258.43	2	129.21	4.87	>0.05
B	236.16	2	118.08	4.45	>0.05
C(误差)	53.03	2	26.52	1.00	
D	2 418.03	2	1 209.02	45.61	<0.05

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.00。

结果干膏率依次为 30.54%, 31.49%, 31.18%; 有效成分总含量分别为 0.167%, 0.170%, 0.177%; 表明该提取工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

测定柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d 含量时, 曾采用流动相乙腈-水梯度洗脱^[4] (0 min, 25% 乙腈; 50 min, 90% 乙腈; 55 min, 90% 乙腈), 虽然保留时间短, 但不能同时满足柴胡皂苷 a, 柴胡皂苷 d 分离度的要求, 之后调整至 2.2.1 项下比例梯度洗脱, 分离度达到要求且分离效果良好。文献报道柴胡皂苷 a 和柴

胡皂苷 d 随加热时间延长含量降低, 加热提取 8 h, 柴胡皂苷 a 已损失殆尽^[5], 因此, 柴胡加热提取时间不宜超过 6 h。

[参考文献]

- [1] 卜水, 林华庆, 邓红, 等. 正交试验优化“柴胡-白芍”药对提取工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 20.
- [2] 汪坤, 张振凌, 贾秀梅, 等. 一测多评法优选黄连最佳提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 9.
- [3] 杨人泽, 钟美兴, 严金玲, 等. 正交试验法优选安神颗粒的醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 41.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 263.
- [5] 张玲, 徐本明, 徐新刚, 等. 柴胡提取工艺研究[J]. 中成药, 1997, 19(8): 1.

[责任编辑 全燕]