

多指标正交试验优选白花益肝排毒颗粒的醇提工艺

王祥培, 张欣, 靳风云*, 韦燕玲
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:** 正交优选白花益肝颗粒的最佳醇提工艺。**方法:** 采用正交设计表安排试验, 考察乙醇体积分数、加醇量、提取时间、提取次数对提取工艺的影响, 以提干膏率、五味子醇甲、大黄总游离蒽醌含量作为指标, 综合评价, 优选出科学、合理的提取工艺。**结果:** 白花益肝排毒颗粒醇提的最佳工艺为 6 倍 70% 乙醇提取 3 次每次 2 h。**结论:** 验证试验表明优选出的提取工艺稳定, 合理, 可行。

[关键词] 白花益肝排毒颗粒; 醇提工艺; 正交试验; 多指标成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0114-04

Optimization of Extraction Technology for Baihuayiganpaidu Particles by Orthogonal Test with Multi-index

WANG Xiang-pei, ZHANG Xin, JIN Feng-yun*, WEI Yan-ling
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study extraction method of Baihuayiganpaidu Particles. **Method:** Method investigation was made on the effect of concentration of alcohol, alcohol amount, extraction time and extraction times, with the extraction rate of solid, kinds of anthraquinone compounds and schisandrin as the index. **Result:** Orthogonal experimental design was applied to decide the optimal process as follows: extracting time 2 hours, extracting for 3 times, alcohol amount 6 times, alcohol concentration of 70%. **Conclusion:** The verification test showed that the optimum extraction process was stable, reasonable and feasible.

[Key words] Baihuayiganpaidu Particles; alcohol extraction process; orthogonal experimental design; multi-marker components

白花益肝排毒颗粒是长期临床使用的实践中积累的有效方, 具有清热祛湿排毒、活血、舒肝健脾、益肝养肾效果, 用于治疗病毒性急、慢性肝炎, 肝硬化等病变并有一定预防作用^[1-2]。该处方主要由白花蛇舌草、泽泻、五味子、熟大黄、甘草、黄芪等 11 味药材组成, 根据该处方组成药材的有效成分的性质及

临床疗效设计不同的提取方案, 通过药效筛选, 优选最佳提取方案为泽泻、五味子、熟大黄醇提, 其余药材水提。本文以乙醇体积分数、加乙醇量、提取时间、提取次数为考察因素, 以五味子醇甲, 大黄总游离蒽醌的含量及其干膏率为考察指标, 综合评价优选 3 味药材的最佳提取工艺。

1 材料

1.1 仪器 美国 Agilent1100 型高效液相色谱仪、HS20500D 型超声波清洗机、AB204-S 型天平、Buchi 旋转蒸发仪。

1.2 试药 五味子醇甲对照品(批号 110857-200709)、大黄素对照品(批号 0756-200110)、大黄酸对照品(批号 0757-200206)、芦荟大黄素(批号 110795-200504)、大黄酚对照品(批号 110796-201017)、大黄素甲醚对照品(批号 110758-

[收稿日期] 20120219(008)

[基金项目] 贵阳市科学技术计划项目([2009]筑科农合同字第 8-005 号)

[第一作者] 王祥培, 博士, 教授, 从事中药及民族药的品种品质与资源开发的研究, Tel: 0851-5601581, E-mail: 709521748@qq.com

[通讯作者] *靳风云, 教授, 从事中药及民族药的新药开发与质量控制研究, Tel: 0851-5915344, E-mail: jinfengyun01@163.com

200408),五味子醇甲(批号110857-200709)均购自中国药品生物制品检定所,甲醇为色谱甲醇;娃哈哈纯净水。大黄、五味子、泽泻分别购于北京同仁堂药店,贵阳花果园药材市场经贵阳中医学院王祥培教授鉴定,符合2010年版《中国药典》一部项下的各项要求^[3]。

2 实验方法与结果

2.1 大黄,五味子含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Agela odyssil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇(A)-水(B)梯度为流动相(0~45 min, 58%~70% A; 45~60 min, 70%~75% A; 60~80 min, 75%~85% A; 80~90 min, 85%~95% A; 90~100 min, 95%~100% A), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。柱温 25 °C, 理论塔板数不低于 3 000。色谱图见图 1~3。

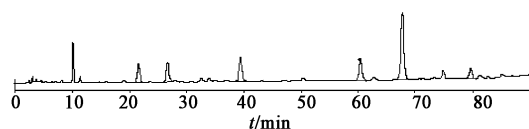
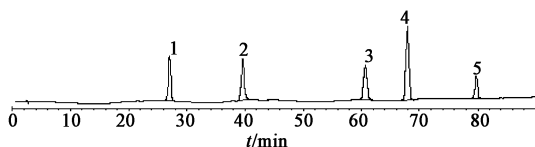


图1 供试品 HPLC



1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚

图2 大黄总游离蒽醌类化合物对照品 HPLC

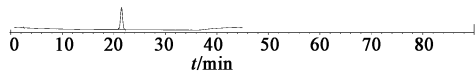


图3 五味子醇甲对照品 HPLC

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取五味子醇甲对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含五味子醇甲 0.112 mg 的溶液,即得。

精密称取大黄素对照品、大黄酸对照品、芦荟大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量加甲醇分别制成每 1 mL 含大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 0.065 6, 0.078 8, 0.052, 0.100 8, 0.062 mg 的混合溶液,即得。

2.1.3 标准曲线 分别精密吸取大黄,五味子醇甲混合对照品储备液(芦荟大黄素对照品 0.052 g·L⁻¹, 大黄酸对照品 0.078 8 g·L⁻¹, 大黄素对照品 0.065 6 g·L⁻¹, 大黄酚对照品 0.100 8 g·L⁻¹, 大黄素甲醚对照品 0.062 g·L⁻¹, 五味子醇甲对照品 0.111 2 g·L⁻¹) 10, 8, 6, 4, 2 mL 定容至 10 mL 制备

成系列大黄混合对照品溶液,进样量 1 μL,记录峰面积。以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归,回归方程为芦荟大黄素 $Y = 213.09X + 23.64$ ($r = 0.999 2$); 大黄酸 $Y = 244.65X + 19.5$ ($r = 0.999 3$); 大黄素 $Y = 225.06X + 8.25$ ($r = 0.999 3$); 大黄酚 $Y = 441.1X - 6.22$ ($r = 0.999 8$); 大黄素甲醚 $Y = 126.36X - 5.98$ ($r = 0.999 7$); 五味子醇甲 $Y = 221.72X - 2.7$ ($r = 0.999 9$)。结果表明芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、五味子醇甲在质量分数 10.4~52, 15.76~78.8, 13.122~65.6, 20.16~100.8, 12.4~62, 22.24~111.2 μg 呈良好线性关系。

2.1.4 供试品制备^[3] 精密吸取样品液 25 mL,置 50 mL 圆底烧瓶中,挥去溶剂,加入 8% 的盐酸溶液 10 mL,超声处理 2 min,再加入三氯甲烷 10 mL 加热回流 1 h,放冷,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取 3 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷液,加压回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 的量瓶中,摇匀,即得。

2.2 干膏率测定 精密吸取样品液 250 mL,减压浓缩至一定密度,置恒重的蒸发皿中水浴蒸干,105 °C 干燥 3 h 至恒重,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定其质量,得干膏率。

2.3 正交试验结果分析

2.3.1 因素与水平的确定 影响醇提取效果的因素主要为乙醇体积分数、乙醇用量、提取次数及其提取时间,故本文综合大黄游离蒽醌,五味子醇甲及其干膏率为考察指标,选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验,优选提取工艺参数,因素水平见表 1。

表1 白花益肝排毒颗粒醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇 体积分数/%	B 乙醇用量	C 提取次数	D 提取时间
1	60	6	1	1
2	70	8	2	1.5
3	80	10	3	2

2.3.2 正交试验设计及其结果^[4] 取大黄 12 g,五味子 12 g,泽泻 12 g 共 36 g,选择 L₉(3⁴) 正交表按正交表 2 设计的试验方案进行 18 次实验,所得醇提液经过滤、浓缩至 1 000 mL。精密吸取正交实验所得各样品液 25 mL,按照 2.1.4 项下制备供试品溶液,供试品溶液用 0.45 μm 微滤膜过滤,按照 2.1.1

表 2 白花益肝排毒颗粒醇提工艺正交表试验

No.	因素				干膏率	五味子醇甲	大黄总游离蒽醌	综合评分				
	A	B	C	D								
1	1	1	1	1	0.146	0.137	0.083	0.088	0.731	0.842	36.175 9	39.280 4
2	1	2	2	2	0.22	0.233	0.423	0.441	1.195	1.058	70.475 9	67.655 7
3	1	3	3	3	0.268	0.265	0.722	0.631	1.589	1.362	98.829 2	87.563 7
4	2	1	2	3	0.256	0.244	0.606	0.597	1.214	1.427	80.821 5	87.150 3
5	2	2	3	1	0.266	0.254	0.642	0.685	1.191	1.33	82.701 3	88.172 8
6	2	3	1	2	0.185	0.196	0.218	0.307	0.854	0.891	49.592 1	53.023 2
7	3	1	3	2	0.310	0.305	0.693	0.657	1.052	1.175	86.656 7	81.591 9
8	3	2	1	3	0.229	0.247	0.190	0.296	0.752	0.838	55.387	46.889 9
9	3	3	2	1	0.268	0.271	0.334	0.341	0.855	0.789	59.407 2	56.889 0

注:大黄总游离蒽醌含量 = 芦荟大黄素的含量 + 大黄酸的含量 + 大黄素的含量 + 大黄酚的含量 + 大黄素甲醚的含量。

项下色谱条件进样测定,并计算各成分含量。精密吸取正交实验所得各样品液 250 mL,按照 2.2 项下方法测定干膏率。以大黄总游离蒽醌含量、五味子醇甲含量、干膏得率为指标,采用综合评价(综合评价 = 大黄总游离蒽醌含量/最大总游离蒽醌含量 × 50% + 五味子醇甲含量/最大五味子醇甲含量 × 30% + 干膏得率/最大干膏得率 × 20%),得最优工艺。正交设计表及其结果见表 2。

SPSS 方差分析结果见表 3。^[5]

表 3 方差分析

源	SS	df	MS	F	P
A	688.689	2	344.344	26.918	0.000
B	47.470	2	23.735	1.855	0.176
C	9 721.421	2	4 860.710	379.977	0.000
D	1 498.476	2	749.238	58.570	0.000

由表 3 方差分析结果可知乙醇体积分数、提取次数、提取时间对结果都具有显著性的差异,而乙醇

用量对于试验结果无显著性的影响,4 个因素对试验结果影响大小为提取次数 > 提取时间 > 乙醇浓度 > 乙醇用量。

由上述各因素成对比较的数据统计结果可知:70% 乙醇较 60% 乙醇,80% 乙醇有显著性差异,故选择 70% 乙醇;乙醇用量的各个水平间无显著性差异故选择 6 倍量;提取时间 3 个水平之间都存在显著性差异,故选择提取 2 h;提取次数 3 个水平都存在显著性差异,故选择提取 3 次。故本处方最佳提取工艺为 6 倍量 70% 乙醇提取 3 次每次 2 h。

2.4 比较验证试验 SPSS 软件分析得 6 倍 70% 乙醇提取 3 次每次 2 h 为最佳提取工艺,由于该工艺不存在于正交试验安排表中。为确保该工艺的合理可行,分别称取大黄 12 g,五味子 12 g,泽泻 12 g 共计 36 g 药材按“表 2 试验号 3”的条件和最佳提取工艺各 3 份进行提取,依法测定,计算每克药材中大黄总游离蒽醌,五味子醇甲含量及其干膏率,结果见表 4。

表 4 验证实验结果 (n=3)

No.	A 乙醇的浓度/%	B 乙醇用量/倍	C 提取次数/次	D 提取时间/h	大黄游离蒽醌/mg·g ⁻¹	五味子醇甲/mg·g ⁻¹	干膏率/%
1	80	10	3	2	11.049 9	0.436 9	24.9
2	70	6	3	2	10.840 6	0.424 7	25.3

结果表明,综合比较大黄总游离蒽醌,五味子醇甲的含量及其干膏率等指标都无明显差异,说明 6 倍 70% 乙醇提取 3 次每次 2 h 工艺成本低,提取效率高而且该工艺合理可行。

3 讨论

本处方由 11 味药材组成,化学成分复杂,采用传统的提取工艺可能不能发挥其最好的临床疗效,

故综合药效及其化学成分的性质,针对本方中大黄、五味子、泽泻 3 味药材中水溶性差的有效成分^[6],故设计正交试验优选最佳醇提工艺。以大黄总游离蒽醌含量、五味子醇甲含量、干膏得率为指标,根据其权重的差异进行综合评价,并进行方差分析,结果显示优选的提取工艺重复性好,可操作性强。本工艺不引入异物,不污染环境,能适合工业大生产。

结合该处方的处方分析,大黄为该处方的臣药,大黄游离蒽醌类物质具有明显的保肝作用,通过不同环节,不同靶点防止肝病治疗各类肝炎^[7-9],在综合加权评分时故权重系数为 0.5。五味子的有效成分五味子醇甲对肝细胞具有保护作用,能促进损伤肝细胞的修复或抑制肝细胞病变,可以增加肝脏的解毒功能^[10-12],故权重系数为 0.3,为了保证疗效,干膏率也是较为重要的指标,故其权重系数为 0.2。

大黄、五味子、泽泻的主要活性成分基本明确,且也有较成熟的定量方法^[3]。故本实验同时测定大黄,五味子药材中共 6 个有效成分作为含测指标,更全面反映各个因素对提取工艺的影响,确定最佳提取工艺且该方法操作简单,快速,重复性好。

不仅对 2010 年版《中国药典》中大黄、五味子的吸收波长 254, 250 nm 进行了考察,还比较了 210, 230, 280 nm 等不同波长下同时测定五味子和大黄药材中有效成分的紫外吸收强弱,发现在 250, 254 nm 处五味子醇甲、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的紫外吸收较强,但 250 nm 处基线较平稳。故采用 250 nm 作为检测波长。曾采用文献报道^[13]的色谱方法对样品进行测试,未能使 6 个有效成分达到完全分离,而本文建立的色谱条件能够符合要求。

本实验通过直接吸取按正交试验所得醇提液经浓缩至一定体积的样品液,而不将醇提液浓缩至干并制成颗粒来称取样品进行供试品溶液的制备,其操作过程更简单,测定结果准确、可靠。

[参考文献]

- [1] 严跃华. 一种益肝排毒药物及其制备方法. 中国: CN200410022730[P]. 2004-06-04.
- [2] 李川. 中医辨治慢性病毒性肝炎概况[J]. 中医药信息, 2005, 22(4): 20.
- [3] 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: 22, 61, 212.
- [4] 刘起华, 文谨, 王菲. 正交实验优选扶正丸的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 22(9): 2110.
- [5] 韩永龙, 王浩, 付丽佳. SPSS 软件用于药学研究中的正交设计数据处理[J]. 药学进展, 2002, 26(3): 179.
- [6] 秦云, 李祥, 陈建伟, 等. 大黄中蒽醌类成分配伍前后的量变规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 96.
- [7] 李向阳. 大黄醇提液抗乙肝病毒作用[J]. 热带医学杂志, 2005, 5(3): 282.
- [8] 郭美姿, 李孝生, 沈鼎明, 等. 大黄酸对大鼠肝纤维化形成的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(1): 26.
- [9] 黄以群, 林珍辉, 王崇国. 大黄对黄疸型肝炎患者 Fas/FasL 表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(2): 236.
- [10] 张成俊. 中药五味子降血清丙氨酸氨基转移酶的效果与机制[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(25): 6190.
- [11] 赵稳兴, 杨举伦, 陈忠明, 等. 五味子乙素对大鼠肝星状细胞增殖和胶原基因表达合成的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(4): 25.
- [12] 朱玉岚, 彭国平. 泽泻的萜类化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 348.
- [13] 薛小平, 鹿燕敏, 王倩, 等. HPLC 法测定清热解毒方芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 6.

[责任编辑 顾雪竹]