

多指标正交试验法优选桂黄降脂颗粒乙醇提取工艺

赵剑*, 蒲清荣, 黄锐, 陈玉兰, 杨光华

(泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 优选桂黄降脂颗粒的乙醇提取工艺。方法: 以醇提物的干浸膏质量、槲皮素和丹参酮 II_A 的含量为综合评分指标, 选取浸泡时间、提取时间、乙醇体积分数及加醇量为考察因素, 采用正交试验法优选桂黄降脂颗粒的乙醇回流提取工艺。结果: 最佳回流提取工艺为药材浸泡 60 min, 10 倍量 55% 乙醇回流提取 90 min。结论: 该优选工艺客观可行、稳定合理, 可为桂黄降脂颗粒的工业生产提供实验依据。

[关键词] 多指标成分; 正交设计; 槲皮素; 丹参酮 II_A; 桂黄降脂颗粒

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0046-03

Optimization of Ethanol Extraction Technology for Guihuang Jiangzhi Granule by Orthogonal Design with Multi-target

ZHAO Jian*, PU Qing-rong, HUANG Rui, CHEN Yu-lan, YANG Guang-hua

(Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction technology of Guihuang Jiangzhi granule. **Method:** With quality of drying extract, the content of quercetin and tanshinone II_A as comprehensive evaluation indexes, soaking time, extraction time, the concentration of ethanol and the amount of ethanol were selected as factors, orthogonal design was used to optimize ethanol reflux extraction technology of Guihuang Jiangzhi granule. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: soaked 60 min, refluxing extracted 90 min with 10 times the amount of 55% ethanol. **Conclusion:** This optimized extraction process was stable, reasonable and practical, it could provide experimental basis for industrial production of Guihuang Jiangzhi granule.

[Key words] multi-target components; orthogonal design; quercetin; tanshinone II_A; Guihuang Jiangzhi granule

桂黄降脂颗粒是泸州医学院附属中医医院院内制剂, 批准文号川药制字 Z20080291, 由山楂、丹参、泽泻、党参、陈皮、蒲黄、郁金 7 味中药组成, 具有益气化痰、活血化瘀的功效, 主治脂肪肝、高脂血症。处方中山楂、丹参、泽泻所含有效成分主要是槲皮素、黄酮类化合物、丹参酮 II_A、隐丹参酮、四环三萜酮醇衍生物等成分^[1], 难溶于水, 但易溶于醇、醚等有机溶剂。为最大限度地提取上述有效成分, 充分

发挥该制剂的降脂功效, 本试验考虑采用乙醇回流提取桂黄降脂颗粒的脂溶性成分, 以干浸膏、槲皮素收率、丹参酮 II_A 收率为综合评分指标, 采用正交试验法多指标优选桂黄降脂颗粒的乙醇回流提取工艺。

1 材料

SPD-20A 型高效液相色谱仪(美国科学系统公司), Ultimate™ C₁₈ 键合硅胶柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), NRB17S3W 型电冰箱(日本松下), ZK072 型电热真空干燥箱(上海实验仪器厂), JA203H 型电子天平(常州幸运电子), 槲皮素及丹参酮 II_A 的对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110742-200516, 110766-200619, 供含量测定用), 山楂、丹参、泽泻均购于泸州市宝光中药饮片公司, 经

[收稿日期] 20120713(002)

[基金项目] 四川省泸州市科技局中医药研究基金项目(20110315)

[通讯作者] * 赵剑, 学士, 副主任中医师, 从事中药制剂研究, Tel: 0830-3162253, E-mail: 562701410@qq.com

泸州市药检所中药室袁常珍主任鉴定均符合《中国药典》2010年版相关要求;甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 回流提取工艺优选 山楂、丹参、泽泻采用乙醇回流法提取有效成分,选取乙醇体积分数、浸泡时间、加醇量、提取时间为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,以干浸膏质量、槲皮素及丹参酮 II_A 收率为指标,多指标综合优选乙醇回流提取工艺条件^[2-4]。准确称取 9 份样品(每份中含山楂 30 g,丹参 30 g,泽泻 20 g),粉碎成中粉,混匀,进行回流提取,提取液适当浓缩并定容至 250 mL,备用。

表 1 山楂、丹参、泽泻乙醇回流提取工艺优选正交试验水平因素

水平	A 浸泡 时间/min	B 乙醇体积 分数/%	C 加醇量 /倍	D 提取 时间/min
1	30	55	6	30
2	60	70	8	60
3	90	85	10	90

2.2 干浸膏收率的测定 精密量取样品溶液各 100 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,80℃减压干燥至恒重,精密称定质量,计算干浸膏收率。

2.3 槲皮素含量测定

2.3.1 色谱条件 Ultimate™ C₁₈ 键合硅胶柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.4%磷酸(52:48),流速 0.8 mL·min⁻¹,温度 40℃,波长 373 nm,理论板数按槲皮素峰计算应不低于 2 000^[5-6]。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取经 105℃干燥至恒重的槲皮素对照品适量,加甲醇制成 22.4 mg·L⁻¹的溶液,即得。

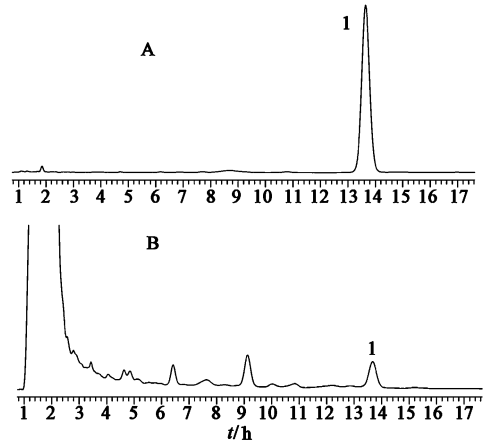
2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取干浸膏 2 g,置锥形瓶中,加甲醇 40 mL 和 25% 盐酸 5 mL,摇匀,超声 20 min,移置水浴中加热回流 2 h,迅速冷却至室温,甲醇定容至 50 mL 量瓶中,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 线性范围的考察 分别精密吸取上述对照品溶液 5,7.5,10,12.5,15 μL 注入高效液相色谱仪,按拟定的色谱条件测定,将峰面积与进样量进行线性回归,得回归方程 $Y = 6 \times 10^7 X + 91\ 397$ ($r = 0.999$),表明槲皮素对照品在 11.3~33.6 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.4 丹参酮 II_A 含量测定

2.4.1 色谱条件 Inertsill ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相甲醇-水(75:25),检测

波长 270 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。在上述色谱条件下,丹参酮 II_A 与其他成分得到了很好的分离,理论板数以丹参酮 II_A 计不低于 3 000。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品溶液;1. 丹参酮 II_A

图 1 桂黄降脂颗粒 HPLC

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取丹参酮 II_A 对照品 8.9 mg,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备^[7] 精密称取干浸膏 2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入 50 mL 甲醇,密塞,称定质量,加热回流 1 h,放冷,密塞,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 滤膜,滤过,即得。

2.4.4 线性关系 取丹参酮 II_A 对照品溶液用甲醇稀释,制得质量浓度分别为 1.4,4.2,8.5,17.1,34.2,68.4 mg·L⁻¹的溶液,依次吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定。以峰面积为纵坐标,丹参酮 II_A 的质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 7 \times 10^{-6} X - 10\ 315$ ($r = 0.999\ 9$)。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度考察 取槲皮素,丹参酮 II_A 对照品溶液,分别按照各自色谱条件连续进样 5 次,每次 10 μL,测定峰面积,结果 RSD 分别为 0.96%,0.70%,表明仪器精密度较高。

2.5.2 稳定性试验 取同一供试品溶液分别于 0,1,2,4,8 h 各进样 1 次,每次 10 μL,测定峰面积,结果 RSD 分别为 0.89%,0.56%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份,分别按 2.3.1 和 2.4.1 项下色谱条件进行测定,结果 RSD 分别为 0.75%,1.32%,表明方法重复性良好。

2.5.4 加样回收试验 称取 6 份已知含量的供试

品溶液,分别精密加入槲皮素及丹参酮 II_A 的对照品溶液,按 2.3.3 和 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 和 2.4.1 项下色谱条件进行测定,计算槲皮素的平均回收率 98.83%,RSD 0.6%,丹参酮 II_A 的平均回收率 99.22%,RSD 0.38%。

2.6 正交试验分析 试验安排与结果见表 2,方差分析见表 3。对表 2 中结果用多指标试验全概率方法进行数理处理^[8-11],根据各指标在处方中意义进行全概率记分处理。因山楂为处方中君药,故其有效成分槲皮素记 50%,丹参为臣药,其有效成分丹参酮 II_A 记 40%,干浸膏为辅助考察指标记 10%,3 个指标的 $P_i = X_j / \sum X_j$ (X 为各指标值, $i = 1, 2, 3, j = 1, 2, 3 \dots 9$), 综合评分 = $0.1P_1 + 0.5P_2 + 0.4P_3$ 。

表 2 山楂、丹参、泽泻乙醇回流提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	干浸膏 收率/%	槲皮素 /mg·g ⁻¹	丹参酮 II _A /mg·g ⁻¹	综合 评分
1	1	1	1	1	24.73	0.61	0.004	0.59
2	1	2	2	2	23.46	0.67	0.061	1.08
3	1	3	3	3	27.57	0.80	0.068	1.25
4	2	1	2	3	26.76	0.82	0.072	1.29
5	2	2	3	1	19.23	0.57	0.040	0.82
6	2	3	1	2	18.88	0.66	0.041	0.89
7	3	1	3	2	26.21	0.72	0.065	1.16
8	3	2	1	3	23.04	0.71	0.058	1.09
9	3	3	2	1	18.19	0.53	0.037	0.76
K ₁	2.92	3.04	2.57	2.17				
K ₂	3.01	2.99	3.14	3.14				
K ₃	3.01	2.91	3.24	3.63				
R	0.09	0.13	0.67	1.46				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	0.001 6	2	0.000 8		
B	0.003 4	2	0.001 7	2.13	
C	0.084 4	2	0.042 2	52.75	<0.05
D	0.367 0	2	0.183 5	229.38	<0.01

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

由直观分析可知,各因素对试验结果的影响顺序为 $D > C > B > A$,即提取时间 > 加醇量 > 乙醇体积分数 > 浸泡时间。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果表明 D 因素有极显著性差异, C 因素有显著性差异, B 因素无显著性差异,故确定其最佳提取工艺为 A₂B₁C₃D₃,即浸泡 60 min,乙醇体积分数 55%,乙醇用量 10 倍量,回流提取 90 min。

2.7 验证试验 按处方量称取药材 3 份(每份 80 g 药材),按优选的提取工艺进行提取,测定各指标成分含量。结果干浸膏收率分别为 26.63%, 27.86%, 26.95%;槲皮素质量分数分别为 0.853, 0.837, 0.865 mg·g⁻¹;丹参酮 II_A 质量分数依次为

0.073, 0.069, 0.066 mg·g⁻¹;综合评分分别为 1.34, 1.30, 1.29。说明该优选工艺稳定可行。

3 讨论

桂黄降脂颗粒中含脂溶性成分的药主要为山楂、丹参、泽泻,其中山楂、丹参分别为处方中君药和臣药,在临床应用过程中发挥主要治疗作用,从药效学角度考虑,需充分提取其有效成分,故本文对桂黄降脂颗粒的乙醇回流提取工艺进行优选,优选工艺为 55%,乙醇回流提取,也可将丹参中丹参酚酸类有效成分一并提取出来。

HPLC 测定槲皮素常用的检测波长是 360, 373 nm,预试验使用 360 nm 检测分离效果不理想,373 nm 得到的色谱图分离较好。

本试验根据各药味的理化性质结合临床疗效,筛选符合工艺的多个指标成分进行试验,并采用全概率公式评分法结合正交设计优化乙醇回流提取工艺,因此较单指标分析的传统方法更全面、科学、实用。

[参考文献]

- [1] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 586.
- [2] 汝绍刚, 赵文英, 朱庆书, 等. 苍耳子油回流提取工艺优化及其动力学研究[J]. 化学工业与工程, 2012, 29(1): 34.
- [3] 张康, 何宇新, 吴丽, 等. 正交试验优选镇痛贴乙醇提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 37.
- [4] 郭廷东, 张燕, 胡敏, 等. 正交试验法优选复方沙棘胶囊回流提取工艺[J]. 西南国防医药, 2010, 20(12): 1287.
- [5] 王德旺, 马坤芳. 高效液相色谱法测定山楂果实中槲皮素的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2214.
- [6] 梁洁, 柳贤福, 孙正伊, 等. HPLC 测定鱼腥草配方颗粒中槲皮素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 140.
- [7] 中国药典. 一部[S]. 2010: 70.
- [8] 李成舰, 夏新华. 降糖灵颗粒醇提工艺的研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(12): 25.
- [9] 江宝红, 鞠建民, 蔡雪萍, 等. 多指标优选蛹虫草提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 29.
- [10] 李静, 杨博华, 杨丽娟. 多指标正交试验优选复方溃疡高最佳超临界二氧化碳萃取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 33.
- [11] 文小燕, 刘力, 徐德生. 多指标正交试验法优选坎离颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 20.

[责任编辑 全燕]