

正交试验优化“柴胡-白芍”药对提取工艺的研究

卜水, 林华庆*, 邓红, 李欣蔚

(广东药学院, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选出柴胡-白芍药对的最佳提取工艺。方法: 采用正交设计法, 通过高效液相色谱法以柴胡皂苷 a、d 和芍药苷等苷类成分的含量为指标综合评价, 优化提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇, 提取 2 次, 每次 1.5 h。结论: 优选的提取工艺稳定, 可行。

[关键词] 药对; 柴胡-白芍; 正交设计; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)14-0020-03

Study on Extracting Technology for Radix Bupleuri Matched Paeoniae Alba by Orthogonal Test

BU Shui, LIN Hua-qing*, DENG Hong, LI Xin-wei

(Guangzhou Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery;
Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of the combination of Radix Bupleuri and Paeoniae Alba. **Method:** The proper extracting condition was optimized by orthogonal tests with the amount of saikosaponin A, D and paeoniflorin as index. **Result:** The proper extracting condition was that alcohol concentration was 70 percent, and extracted with 10 fold alcohol for 2 times, 1.5 hour each time. **Conclusion:** Optimized process condition was scientific, stable and feasible.

[Key words] herbal pair; Radix Bupleuri-paeoniae Alba; orthogonal tests; extraction process

柴胡白芍药对为治疗肝郁血虚之常用药对, 其配伍最早见于《伤寒论》之四逆散、大柴胡汤^[1]。柴胡疏肝解郁, 辛散善行, 白芍补养阴血, 柔肝平肝。二药配伍, 使肝气行疏, 肝血得补, 临床应用上无论是古代经方还是现代新方, 柴胡-白芍都是一对常用的非常重要的配伍。在防治肝损伤试验研究方面, 柴胡白芍药对和很多含这个配伍的中药复方证实有明确疗效^[2-4]。现代药理学研究证实, 柴胡具有保肝活性的成分主要为其皂苷类成分, 以柴胡皂苷 a、d 药理活性较强^[5], 芍药中的主要有效成分为糖苷类

物质, 其中以芍药苷含量最高^[6]。参考疏肝解郁经方《伤寒论》四逆散, 《和剂局方》逍遥散中柴胡白芍配伍比例均为 1:1, 本试验从柴胡白芍(1:1)配伍入手, 以 HPLC 法测定药效成分提取率为指标, 采用正交试验设计, 对该药对的最佳提取工艺进行考察, 为“柴胡-白芍”药对的新药开发提供试验依据。

1 仪器与试剂

Ultimate 3000 高效液相色谱仪, PDA-3000 型检测器, Chromeleon 6.80 Version 工作站(美国戴安); Sartorius BS110S 型, CP225D 型电子天平(北京塞多利斯天平有限公司)。

柴胡皂苷 a 对照品(110777-200507)、柴胡皂苷 d 对照品(110778-200505)、芍药苷(110736-200424)均购自中国药品生物制品检定所; 柴胡、白芍购自广州市药材公司中药饮片厂; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯; 水为超纯水。

[收稿日期] 20100705(008)

[第一作者] 卜水, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型研究。
Tel: 020-39352512, E-mail: yaoxueren@126.com

[通讯作者] * 林华庆, 教授, 主要从事中药新剂型研究, Tel:
020-39352502, E-mail: huaqing_@163.net

2 方法与结果

2.1 单因素试验 选取药材粉碎粒径、乙醇体积分数、提取时间、提取温度、提取溶剂倍数、提取次数等 6 个可能影响提取效果的因素做单因素试验,以确定相关因素对柴胡-白芍药对提取物中药效成分的含量的影响,结果表明:粉碎粒径越小提取效果越好,但细粉提取较难过滤,故采用粒径 0.5 cm 粗颗粒投料;考察了 40%,60%,80% 的乙醇,以 60% 的乙醇药效成分提取率较高;提取时间大于 2 h,提取率降低,以 2 h 为高;提取溶剂倍数以 10 倍量提取率高;提取次数为 3 次时提取效率最高,但提取 2 次后得率增长不大。

2.2 正交试验因素水平的确定 通过单因素试验,选取乙醇体积分数、溶剂量、提取时间和提取次数 4 个因素,运用正交试验设计,以芍药苷、柴胡皂苷 a,d 含量为考察指标,每个因素设计 3 个水平(表 1)。

表 1 提取工艺因素水平

水平	A	B	C	D
	乙醇浓度/%	溶剂量/倍	提取时间/h	提取次数/次
1	50	6	1	1
2	60	8	1.5	2
3	70	10	2	3

取柴胡、白芍粗粉各 10 g,共称 9 份,按正交设计表 $L_9(3^4)$ 设计方案进行提取,滤过,合并各组提取液,定容至 500 mL 量瓶。

2.3 柴胡皂苷 a,d 的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Kromat C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱:0~50 min,乙腈-水(25:75)→(55:45);流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL;检测波长 210 nm;柱温 30 ℃。理论塔板数以柴胡皂苷 a 峰计算不低于 10 000。按上述条件进行测定,可使供试品中主要峰得以充分分离,且峰形良好,阴性无干扰,见图 1。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取柴胡皂苷 a 4.90 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成每 1 mL 含柴胡皂苷 a 0.098 mg 的溶液;精密称取柴胡皂苷 d 7.20 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成每 1 mL 含柴胡皂苷 d 0.144 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 从 9 份样品溶液中分别精密取出 25 mL 旋蒸至干,残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL,0.22 μm 滤膜滤过,得供试品溶液。

2.3.4 测定法 分别精密吸取上述 2 种对照品溶

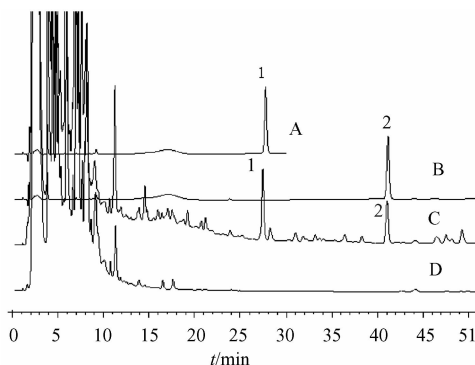


图 1 柴胡皂苷 a,d 含量测定高效液相色谱

A. 柴胡皂苷 a 对照品;B. 柴胡皂苷 d 对照品;C. 药对样品;
D. 柴胡阴性样品;1. 柴胡皂苷 a;2. 柴胡皂苷 d。

液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,测定,结果见表 2。

表 2 提取工艺正交试验结果

No.	A	B	C	D	柴胡皂苷		芍药苷 /mg	综合评分
					a/mg	d/mg		
1	1	1	1	1	8.453	6.132	3.535	55.67
2	1	2	2	2	11.935	8.253	4.583	74.96
3	1	3	3	3	12.390	8.299	4.614	76.28
4	2	1	2	3	11.565	9.599	4.536	76.46
5	2	2	3	1	12.136	9.704	3.603	71.44
6	2	3	1	2	11.152	10.724	4.199	75.42
7	3	1	3	2	14.927	13.686	3.430	84.34
8	3	2	1	3	12.980	12.911	4.185	83.73
9	3	3	2	1	15.667	15.169	5.017	100.00
K_1	68.970	72.157	71.607	75.703				
K_2	74.440	76.710	83.807	78.240				
K_3	89.357	83.900	77.353	78.823				
R	20.387	11.743	12.200	3.120				

2.4 芍药苷的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱 Kromat C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以乙腈-0.1% 磷酸水溶液(13:87);流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL;检测波长 230 nm;柱温 30 ℃。理论塔板数以芍药苷峰计算不低于 2 000。按上述条件进行测定,可使供试品中主要峰得以充分分离,且芍药苷峰形良好,阴性无干扰,见图 2。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷 4.52 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成每 1 mL 含芍药苷 0.045 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 从 9 份样品溶液中分别精密取出 25 mL 按 2.2.3 法制备,得供试品溶液。

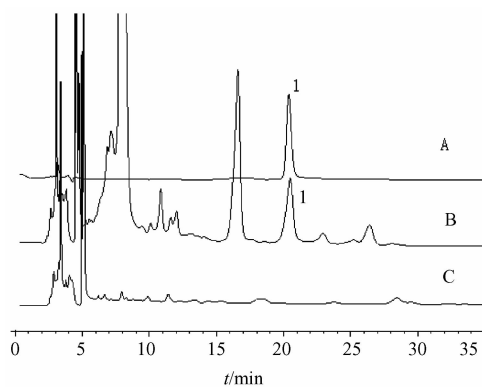


图 2 芍药苷含量测定高效液相色谱

A. 芍药苷对照品; B. 药对样品; C. 白芍阴性样品; 1. 芍药苷。

2.4.4 测定法 分别精密吸取上述对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 结果见表 2。

试验结果采用加权综合评分, 即柴胡皂苷 a (I, 权重系数 0.35)、柴胡皂苷 d (II, 权重系数 0.30)、芍药苷 (III, 权重系数 0.35) 来分析, 综合评分 = (I / I 最大值 \times 0.35 + II / II 最大值 \times 0.30 + III / III 最大值 \times 0.35) \times 100。结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	668.044	2	40.465	<0.05
B	210.335	2	12.741	>0.05
C	223.51	2	13.539	>0.05
D 误差	16.509	2		

注: 根据直观分析的结果, 以第 4 列作为误差列进行方差分析估算, $F_{0.05}(2, 2) = 19.000$ 。

比较各因素的极差值可看出, 影响提取效果的因素顺序为: $A > C > B > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项, 进行方差估算, 乙醇体积分数对提取效果影响显著, 优选提取条件为: $A_3B_3C_2D_3$, 即乙醇体积分数为 70%, 乙醇用量为 10 倍量, 提取次数为 3 次, 提取时间为 1.5 h。但考虑提取次数 3 水平与 2 水平接近, 为缩短提取周期, 提取次数采用 2 次。故初步确定最佳优化条件为 $A_3B_3C_2D_2$, 即用 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h。

2.5 工艺验证 取柴胡-白芍药对 (10 g: 10 g) 3 份, 按优选出的提取工艺 $A_3B_3C_2D_2$ 进行提取, 分别测定柴胡皂苷 a、d、芍药苷的含量, 结果见表 4。表明优选出的工艺条件稳定, 可行。

表 4 柴胡-白芍药对提取工艺验证结果

No.	柴胡皂苷 a /mg	柴胡皂苷 d /mg	芍药苷 /mg	综合 评分	RSD /%
1	16.910	16.239	5.035	99.37	
2	16.768	16.107	4.975	98.42	0.65
3	17.123	16.056	5.063	99.66	

3 讨论

预试验发现水提工艺对柴胡中皂苷类成分提取率较低, 尤其是柴胡皂苷 d 水提无法提出, 而醇提对柴胡皂苷类提取率较高。芍药苷的醇提效果也优于水提, 故柴胡白芍药对的提取溶剂采用乙醇较为合理, 能较完全的提取有效成分。

由于在含有该药对的疏肝解郁经方中柴胡多为君药, 白芍为臣药, 本试验在设权重系数时, 柴胡中有效成分权重系数之和较大。

药对是中药配伍中的最小单位, 为方剂配伍研究的重要内容。药对配伍或相须, 或相制, 或相反, 从而起到协同增效, 制偏减毒的效果。药物的药效基础在于其活性成分, 明确药对中的化学成分, 及其配伍后化学成分的变化对药对研究是十分重要的, 本试验以柴胡白芍药对为研究对象, 从主要药效成分苷类成分入手, 对提取工艺进行了优化, 在后续研究中, 还将对柴胡白芍配伍可能产生的成分变化进行研究, 为这一经典药对的深入研究打下基础。

[参考文献]

- [1] 陈少丽. 柴胡、白芍药配伍的古今应用[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(3): 71.
- [2] 韩向东, 陈少丽, 陈德兴, 等. 柴胡、白芍抗 CCl_4 致试验性肝损伤的配伍规律研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(8): 593.
- [3] 张国骏, 王东强, 史丽萍, 等. 经方四逆散对肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 天津中医药, 2004, 21(6): 503.
- [4] 陈梁, 朱锦善, 任建平. 柴胡疏肝散对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的防治作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2004, 14(1): 42.
- [5] 谢东浩, 蔡宝昌, 安益强, 等. 柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 63.
- [6] 李瑞麟, 马勇, 魏伟, 等. 白芍总苷治疗四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用与其影响肝星状细胞功能的关系[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(9): 685.

[责任编辑 全燕]