

多成分评价优化柴芩清肝方提取工艺研究

付克^{*}, 张坤, 闫广利

(黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 优化柴芩清肝方的提取工艺。方法: 建立柴芩清肝方中黄芩苷、甘草苷和芍药苷 3 种成分同时测定的 HPLC 方法。采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法, 以黄芩苷、甘草苷、芍药苷 3 种成分含量综合评分法进行数据分析, 对柴芩清肝方的提取次数、提取时间和加水量 3 因素进行优化。结果: 3 因素中只有提取次数有显著影响, 最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3$ 。结论: 多成分评价法优选柴芩清肝方提取工艺能较好地保证制剂的质量。

[关键词] 柴芩清肝方; 正交设计; 黄芩苷; 芍药苷; 甘草苷

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0010-03

Optimization of Extraction Technology for Chaiqin Qinggan Formular with Multiple Components Evaluation

FU Ke^{*}, ZHANG Kun, YAN Guang-li

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction technology of Chaiqin Qinggan Formular. **Method:** A HPLC method was established to simultaneously determine the contents of baicalin, paeoniflorin and glycyrrhizin in the extractions of Chaiqin Qinggan Formular. Based on the orthogonal design of $L_9(3^4)$ and the weighted method, three factors including the multiple water, decocting time, and extracting times were evaluated. **Result:** Significant effect was observed in extracting times. The best extraction process is $A_3B_1C_3$. **Conclusion:** The extraction technology optimized with multiple components evaluation is reasonably practicable.

[Key words] Chaiqin Qinggan fomular; orthogonal design; baicalin; paeoniflorin; glycyrrhizin

柴芩清肝方由黄芩、柴胡、甘草、白芍等中药组成, 具有疏肝解郁, 清热解毒的作用。临床上主要用于治疗慢性肝炎、肝硬化、胆囊炎, 症见口苦、咽干、目眩、寒热往来、胸胁苦满、胁肋胀痛等。为了制定科学的提取工艺, 同时保证其药品质量, 更好地发挥其药用功效, 本实验以黄芩苷、甘草苷、芍药苷含量为考察指标, 综合评分研究本方的提取工艺, 并建立同时测定上述 3 种成分的 HPLC 方法, 为工业化生产提供实验依据。本方中主要成分为苷类, 有较高的水溶性, 所以采用水煎煮提取的方法可以获得

满意的转移率。

1 仪器与药品

Waters 600E-2487 型高效液相色谱仪, Millennium³² 色谱工作站数据处理系统, 均为美国产。分析天平: 1/10 万(湘仪天平仪器厂); 乙腈为色谱乙腈, 水为重蒸馏水, 其他均为分析纯; 黄芩苷标准品(110715-200212, 中国药品生物制品检定所);

甘草苷对照品(111610-200401, 中国药品生物制品检定所); 芍药苷标准品(110736-200423, 中国药品生物制品检定所), 供含量测定用。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-磷酸(0.1%) (比例见表 1); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 278 nm(黄芩苷, 甘草苷), 230 nm(芍药苷); 进样量 10 μL。

[收稿日期] 2010-01-16

[基金项目] 黑龙江省科技攻关项目资助(GC08C322)

[通讯作者] 付克, 副研究员, 研究方向: 中药及复方质量标准和新药研究, Tel: 13946168763; E-mail: fuke841213@sina.com

表 1 流动相比列表

时间/min	乙腈/%	磷酸水/%
0 ~5	2	98
5 ~23	14 ~21	86 ~79
23 ~40	21 ~28	79 ~72
40 ~50	28 ~32	72 ~68

2.1.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷、甘草苷、芍药苷对照品适量,加甲醇制成浓度分别为 108, 10, 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,作为对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密吸取 1 至 9 号样品溶液 5.0 mL,置 50 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀。过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积 (Y) 为纵坐标,进样量 (X , μg) 为横坐标,计算回归方程:甘草苷 $Y = 32\,543.75X + 2\,531.9$, $r = 0.9995$ 。表明甘草苷在 0.02 ~0.1 μg 的进样量线性关系良好;芍药苷 $Y = 3\,386.766X - 6.5$, $r = 0.9993$ 。表明芍药苷在 0.015 ~0.003 μg 的进样量线性关系良好;黄芩苷 $Y = 2\,645.728X + 148.120.4$, $r = 0.9991$ 。表明芍药苷在 0.216 ~1.08 μg 的进样量线性关系良好。

2.1.5 稳定性试验 取供试品溶液 10 μL ,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样测定黄芩苷、甘草苷、芍药苷峰面积,计算 RSD 分别为 1.95%, 1.97%, 1.93%。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 方法 取处方量的各药材,精密称定,按正交试验表进行试验。药材用相应倍量的水浸泡 30 min,加热煎煮提取。提取液趁热过滤,滤液适当浓缩,置 1 000 mL 量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,即得样品溶液。

2.2.2 正交试验设计 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,影响因素有加水量、提取时间、提取次数,每个因素设定 3 个水平,见表 2^[1-2]。

2.2.3 最佳工艺确定 按黄芩苷、甘草苷和芍药苷权重都为 0.33 进行综合评分,综合质量评分 $Y =$ 各样品中甘草苷含量 $\div 9$ 个样品中甘草苷最高含量 $\times 33 +$ 各样品中芍药苷含量 $\div 9$ 个样品中芍药苷最高含量 $\times 33 +$ 各样品中黄芩苷含量 $\div 9$ 个样品中黄芩苷最高含量 $\times 33$ ^[3-4]。以综合评价值对实验结果进行直观分析和方差分析,结果见表 3, 4。

表 2 因素水平表

水平	A 加水量/倍	B 煎煮时间/h	C 煎煮次数/次
1	12	1	1
2	10	1.5	2
3	8	2	3

表 3 柴芩清肝胶囊提取工艺正交实验方案与结果

No.	A	B	C	D	指标成分质量分数/%			综合评分 Y
					甘草苷 Y_1	黄芩苷 Y_2	芍药苷 Y_3	
1	1	1	1	1	0.36	5.69	0.051	50.23
2	1	2	2	2	0.50	8.47	0.081	74.48
3	1	3	3	3	0.74	10.40	0.087	93.17
4	2	1	2	3	0.57	8.63	0.078	77.51
5	2	2	3	1	0.54	10.07	0.086	82.82
6	2	3	1	2	0.45	6.27	0.055	57.23
7	3	1	3	2	0.59	7.49	0.105	82.95
8	3	2	1	3	0.34	5.32	0.054	49.02
9	3	3	2	1	0.55	8.41	0.087	78.56
K_1	217.864	210.679	156.472	211.602				
K_2	217.564	206.322	230.553	214.658				
K_3	210.538	228.965	258.941	219.706				
R	2.442	7.548	34.156	2.701				

表 4 柴芩清肝胶囊正交实验结果方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	p
A	11.457	2	5.729	1.026	
B	96.234	2	48.117	8.618	
C	1 866.048	2	933.024	167.119	<0.001
误差 (D)	11.166	2	5.583		

注: $F_{0.001(2,2)} = 99.00$, $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

直观分析表明,以综合评分为标准,在所选因素水平范围内,影响因素 $C > B > A$; 方差分析表明只有煎煮次数 (C) 有极显著性影响,煎煮时间 (B) 和加水倍数 (A) 均无显著影响。

为进一步确定最佳提取工艺,对极显著因素增加 C_3 和 C_4 (煎煮 4 次) 的比较验证试验,试验结果见表 5。

表 5 显著因素组比较

实验组	甘草苷 Y_1 /%	黄芩苷 Y_2 /%	芍药苷 Y_3 /%	综合评分 Y
$A_3B_1C_3$	0.59	7.49	0.105	82.95
$A_3B_1C_4$	0.55	7.47	0.106	81.74

实验结果表明 $A_3B_1C_4$ 与 $A_3B_1C_3$ 的综合评分相差无几。为了节省时间和能源,综合考虑以上因素确定最佳提取工艺为 $A_3B_1C_3$ 即加 8 倍水煎煮 3 次,每次 1 h。

3 讨论

本方由多味中药组成,如果以单一指标成分进行工艺优选,不能保证本方的整体质量。本实验研究同时考察芍药苷、甘草苷和黄芩苷 3 种有效成分,以加权综合评分作为筛选最佳工艺的依据,兼顾方中多味药的有效成分含量,使结果更具代表性、合理性、全面性和科学性。工艺简单合理,易于操作。

本实验首次建立了同时测定黄芩苷、甘草苷和芍药苷 3 种有效成分的 HPLC 方法,提高了分析效率。在流动相中加入适量的酸能有效抑制黄芩苷峰

的拖尾。双波长测定,方法准确性高,重复性好,结果精确、可靠。

[参考文献]

- [1] 潘洪斌. 肝福片的提取工艺研究[J]. 中草药, 2005, 36(6): 853.
- [2] 刘涨, 范斌, 张秋海, 等. 艾奇康胶囊提取精制工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11): 17.
- [3] 张彤, 徐莲英, 陶建生, 等. 多指标综合评分法优选葛根提取工艺[J]. 中草药, 2004, 35(1): 38.
- [4] 张学兰, 侯杰, 唐超, 等. 正交设计优选酒炖女贞子的炮制工艺[J]. 中草药, 2009, 31(10): 1564.

[责任编辑 仝燕]