

正交设计-重复试验法优选赤芍的提取工艺

白海波, 宋子荣, 李 波 (海南养生堂药业有限公司, 浙江 杭州 310007)

摘要: 目的: 筛选抗缺血性脑中风中中药复方中赤芍的提取工艺参数。方法: 以芍药苷为指标成分, 以 HPLC 法为含量测定方法, 以提取率为评价标准, 采用正交设计-重复试验法, 优化提取工艺。结果: 提取次数与提取时间对方中芍药苷的提取率有显著性影响。结论: 赤芍最佳提取工艺条件用 8 倍量的水提取 2 次, 每次 1.5h。

关键词: 赤芍; 正交设计; 重复试验; 高效液相色谱法

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)04-0016-02

中药复方由黄芪、川芎、赤芍等中药组成。本文以加溶媒量、提取时间、提取次数等工艺条件为考察因素, 以提取率为考察指标, 对方中的赤芍提取工艺进行正交优化试验。为估算试验误差, 故作重复试验, 进行方差分析, 以确定各因素的显著性水平, 从而得出赤芍的最佳工艺参数。

1 仪器、药材与试剂

电子分析天平(梅特勒), 日本岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪(配 SPD-10Avp 紫外可见检测器, CTO-10A 柱温箱, Class-VP 工作站), TC-15 套式恒温器(浙江新华医疗器械厂)。

乙腈(色谱纯), Millipore 超纯水, 其他试剂(分析纯)。

芍药苷对照品(中国药品生物制品鉴定所, 供含量测定用, 批号 0736-200014) 药材购自华东医药中药材分公司, 经鉴定, 赤芍为 *Paenia lactiflora* Pall. 的干燥根。

2 实验方法与结果

2.1 高效液相色谱条件 芍药苷含量测定采用高效液相色谱法, 色谱条件为: 色谱柱为瑞士 SPHERI-GEL ODS(4.6mm ID × 150mm), 流动相 CH₃CN-H₂O (16: 84), 流速 1ml · min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 230nm。

2.2 提取溶剂的选择 根据指标成分的理化性质, 分别以水和 70% 乙醇为提取溶媒, 在同等条件下考察了两种提取物指标成分提取率。

从提取率看, 水为 90.41%, 70% 乙醇为 94.55%, 经 *t* 检验, 两者无显著差异(*n* = 4)。从提取物固含量来看, 水为 27.38%, 70% 乙醇为

24.70%。

根据以上对比试验, 并考虑到能耗、成本等方面的因素, 最后确定水为提取溶剂。

2.3 提取工艺筛选

以提取率为指标, 进行 L₉(3⁴) 的正交试验, 正交因素、水平见表 1。

表 1 正交试验因素、水平表

水平	因素		
	A 溶剂量(倍)	B 提取时间(h)	C 提取次数
1	8	0.5	1
2	10	1	2
3	12	1.5	3

提取工艺过程: 称取赤芍饮片 9 份, 每份 2g, 分别按 L₉(3⁴) 表中给出的条件进行提取, 提取时间从沸腾开始时记录。提取结束后, 分别合并提取液, 以水稀释定容, 得 1-9 号样品液, 测定含量。每项试验平行重复 1 次。

2.4 正交试验结果 精密量取上述样品溶液, 稀释 10 倍后分别注入色谱仪进行测定, 以外标法计算芍药苷含量, 并和测得的药材芍药苷含量作比较, 计算赤芍提取过程中芍药苷的提取率(提取出的芍药苷含量/药材中芍药苷含量 × 100%)。计算结果及方差分析见表 2, 表 3。

以芍药苷的浸出率为指标, 则: A 因素: 不显著性因素, 且 II > I > III

B 因素: 显著性因素, 且 III > II > I

C 因素: 极显著性因素, 且 II > III > I

表 2 关于赤芍药材提取条件的正交试验表

试验号	A	B	C	D	芍药苷提取率(%)	
1	1	1	1	1	54.40	50.10
2	1	2	2	2	81.58	81.58
3	1	3	3	3	77.65	86.47
4	2	1	2	3	77.95	78.75
5	2	2	3	1	60.62	65.33
6	2	3	1	2	73.44	73.21
7	3	1	3	2	82.60	95.53
8	3	2	1	3	71.26	84.15
9	3	3	2	1	61.55	59.70
I_j	439	406	351	431	$G = \sum_{y_i} = 1315$	
II_i	444	441	487	429	$G^2 = 98720$	
III_j	432	468	476	454	$GT = G^2/9 = 96195$	
离均差平方和						
$(I^2 + II^2 + III^2)$	13.15	318.2	1900	65.85	$/9 \cdot CT$	
误差平方和 228.0						

表 3 影响赤芍药材提取因素的方差分析

来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	13.14	2	6.572	0.2595	
B	318.2	2	159.1	6.281	$P < 0.05$
C	1900	2	950.0	37.51	$P < 0.01$
误差	228.0	9	25.33		

查方差分析表, $F_{0.01(2,9)} = 8.02$, $F_{0.05(2,9)} = 4.26$

由上可见, 较佳提取条件应为 $A_2B_3C_2$, 但本工艺中 A 因素为不显著因素, 且 3 水平值相近, 考虑到工业生产中节约要求, 定溶剂倍量为 8 倍, 即每次加 8 倍量, 回流提取 2 次, 每次 1.5h。

2.5 工艺验证 工艺筛选完成后, 按上述条件与方法, 对最佳提取工艺进行验证, 即加水量为 8 倍, 回流提取 2 次, 每次 1.5h, 结果芍药苷提取率为 95.71%, 高于正交试验中的全部 9 个试验, 从而证明了该工艺的合理性。

3 讨论

芍药苷是赤芍中的主要有效成分, 它具有抗血栓^[1]、保护小鼠脑缺血再灌注损伤^[2]等作用, 故选择芍药苷为指标成分, 并以该成分的提取率作为工艺优选的依据。

有文献报道随煎煮时间延长, 芍药苷的含量降低^[3]。因此我们进一步研究了提取时间对芍药苷含量的影响, 对不同提取时间点芍药苷含量进行了测定, 结果表明水煮 1.5h 和 2h 之间芍药苷含量最高, 2h 后芍药苷含量下降, 提示水煎时间过长可能使芍药苷分解, 有必要对水煎时间作进一步的研究。

在因素水平相同的情况下, 正交设计-重复试验既避免了使用更大的正交表, 又提高了试验的精确度。通过重复试验, 可较好地消除操作误差、方法误差等对试验结果的影响, 使方差分析更准确, 使结论更可靠。

参考文献:

- [1] 徐红梅, 刘青云, 戴敏, 等. 赤芍总苷抗血栓作用研究[J]. 安徽中医学院学报, 2000, 19(1): 46-47.
- [2] 杨军, 王静, 冯平安, 等. 赤芍总苷对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药材, 2000, 23(2): 95-97.
- [3] 李淑芝, 王玉芝, 郭亚健, 等. 不同煎煮条件对芍药苷煎出量的影响[J]. 中成药, 1999, 21(3): 115-116.