

正交试验法优选夏黄颗粒处方药材的乙醇提取工艺

胡 乔^{1,2,3}, 廖茂梁^{2,3}, 张铁军^{2,3*}, 肖瑞颖^{1,2,3}

1. 天津中医药大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院 释药技术与药物代谢动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 中药现代制剂与中药质量控制技术和地方工程实验室, 天津 300193

摘要: 目的 优选夏黄颗粒处方药材的乙醇提取工艺条件。方法 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 对5种蒽醌总转移率、出膏率两个指标进行综合评分, 优选出最佳工艺。结果 最佳提取工艺为10倍量60%乙醇回流提取2次, 每次1.5 h。结论 优选出的夏黄颗粒处方药材的最佳工艺合理, 经验证其稳定可行, 有效成分提取率较高。

关键词: 夏黄颗粒; 总蒽醌; 出膏率; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2013)04-0519-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.04.013

Optimization of ethanol extraction process for medicinal materials in Xiahuang Granule prescription by orthogonal test

HU Qiao^{1,2,3}, LIAO Mao-liang^{2,3}, ZHANG Tie-jun^{2,3}, XIAO Rui-ying^{1,2,3}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technologies and Drug Metabolism, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. The National and Local Engineering Laboratory of the Modernized Chinese Medicine and Chinese Medicine Quality Control Techniques, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the ethanol extraction process for medicinal materials in Xiahuang Granule prescription.

Methods Taking the concentration of ethanol, extraction time, amount of ethanol, and extraction times as factors, $L_9(3^4)$ orthogonal test was designed and evaluated with multi-index of yielded and powdered extract yield of five anthraquinones. **Results** The optimal extraction technology was as follows: reflux extracted twice with 10 times the amount of 60% ethanol, for 1.5 h once. **Conclusion** This optimized extraction technology is feasible, stable, and reasonable with high yield of active ingredients.

Key words: Xiahuang Granule; total anthraquinones; extract yield; orthogonal test

夏黄颗粒来源于临床经验方, 由大黄、芦荟、枳壳、厚朴、决明子等10味中药组成, 具有解毒泻浊、通腑和胃、降逆止呕之功, 适用于癌痛患者服用阿片类药物所致的气滞腑实型便秘、呕吐者。方中大黄、芦荟、决明子泻下解毒, 共为君药, 因大黄、芦荟、决明子中均含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等5种蒽醌, 因此本研究采用正交设计法, 以5种总蒽醌转移率以及各工

艺出膏率为考核指标, 对夏黄颗粒处方药材的乙醇提取工艺条件进行了优选。

1 仪器和试剂

Dionex Summit 高效液相色谱仪(美国戴安公司); AS3120 超声波提取器(奥特塞恩思仪器有限公司); 赛多利斯十万分之一天平(Sartorius 公司); Mettler Toledo 万分之一天平(Mettler Toledo 公司); R501B 星海旋转蒸发器(无锡市星海王生化设备有

收稿日期: 2013-04-01

作者简介: 胡 乔(1986—), 女, 天津中医药大学中药专业硕士研究生, 研究方向为中药新药的研发与质量标准的建立。

Tel: 15122601619 E-mail: 641167800@qq.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 Fax: (022)23006843 E-mail: zhangtj@tjipr.com

限公司)。

色谱纯甲醇(天津市康科德科技有限公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酚(批号 110796-201017)、大黄素甲醚(批号 110758-201013)、芦荟大黄素(批号 110795-201007)对照品均为含量测定用,购自中国药品生物制品检定所。

方中各味药材,除决明子购自于天津安舜大药房,其余均购自天津中药饮片厂,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部规定。

2 方法和结果

2.1 因素水平的设计

根据方中泻下成分大黄蒽醌类的理化性质,本实验拟定的影响因素为乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)和提取次数(D)。根据预实验,每个因素选 3 个水平,A 选取 60%、70%、80%,B 选取 8、10、12 倍,C 选取 1、1.5、2 h,D 选取 1、2、3 次,因素水平见表 1。

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A/%	B/倍	C/h	D/次
1	60	8	1	1
2	70	10	1.5	2
3	80	12	2	3

2.2 工艺路线

按 1 倍处方量称取 9 份样品(每份 115 g),每份提取前用相应体积分数乙醇浸泡 30 min,按 $L_9(3^4)$ 正交试验提取,将提取液抽滤后测量体积,得到 1~9 号样品。

2.3 样品测定

2.3.1 色谱条件 Welchrom C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱条件:0~15 min, 60%A; 15~45 min, 60%~80%A; 45~60 min, 80%~88%A, 60~70 min, 88%~60%A;检测波长为 254 nm;柱温为 30 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min。

2.3.2 对照品溶液的制备 按照《中国药典》2010 年版中大黄药材的含量测定方法^[1]。分别精密称取

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品 2.98、2.85、2.09、2.07、2.19 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释到刻度;分别从芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品溶液中精密吸取 1 mL,从大黄酸、大黄素、大黄酚对照品溶液中精密吸取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,混匀,加甲醇至刻度,即得混和对照品溶液。

2.3.3 药材供试品溶液的制备 按照《中国药典》2010 年版中大黄药材的含量测定方法^[1]。分别制备大黄、芦荟、决明子的药材供试品溶液,取续滤液,即得。

2.3.4 各工艺供试品溶液的制备 按照《中国药典》2010 年版中大黄药材的含量测定方法^[1]。移取处方提取液,精密移取 1 号处方液 5 mL、2~9 号处方液 10 mL 置烧瓶中,挥去溶剂,加 8%盐酸溶液 20 mL,超声处理 2 min 使溶解,再加三氯甲烷 20 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,酸液再用三氯甲烷萃取 3 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加 1 mL 三氯甲烷溶解,转移至 25 mL 量瓶,继续用甲醇溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μ m 滤膜,取续滤液,即得。

2.3.5 阴性供试品溶液的制备 按处方比例分别称取本处方中缺大黄、芦荟、决明子的阴性样品,提取,滤过。按“2.3.4”项下方法操作,即得。

2.3.6 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μ L,按以上色谱条件测定峰面积,以峰面积对进样质量回归,得回归方程。芦荟大黄素: $Y=11\ 109 X+65.001$, $r=0.999\ 9$; 大黄酸: $Y=7\ 013.3 X+81.343$, $r=1.000$; 大黄素: $Y=12\ 345 X+111.67$, $r=1.000$; 大黄酚: $Y=1298 X+111.44$, $r=0.999\ 9$; 大黄素甲醚: $Y=6578.8 X+26.139$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明大黄酸在 0.022 8~0.456 0 μ g、芦荟大黄素在 0.011 9~0.238 4 μ g、大黄素在 0.016 7~0.334 0 μ g、大黄酚在 0.016 6~0.331 2 μ g、大黄素甲醚在 0.008 8~0.175 2 μ g 线性关系良好。

2.3.7 测定 将各药材供试品溶液、对照品溶液、1~9 号共 18 个供试品溶液、阴性供试品溶液各取 10 μ L,分别按以上色谱条件进样测定,计算总蒽醌转移率。色谱图见图 1,所测药材蒽醌含量结果见表 2。

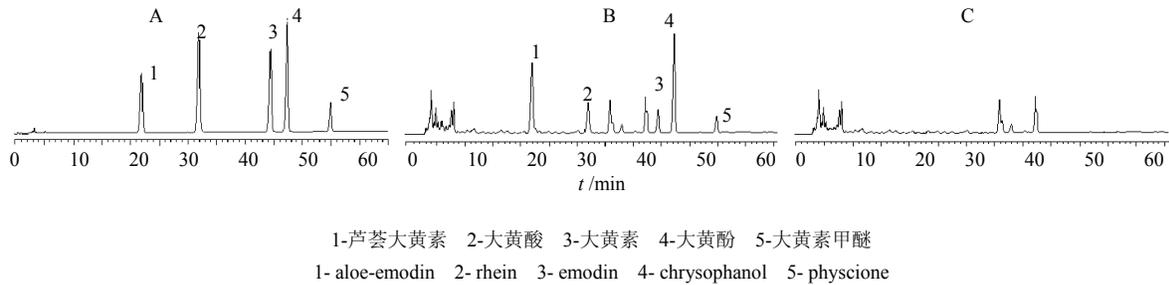


图1 混合对照品(A)、供试品溶液(B)和阴性样品(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance (A), sample solution (B), and negative sample (C)

表2 药材中各蒽醌类成分的测定结果

Table 2 Determination of anthraquinones in medicinal materials

药材	芦荟大黄素/%	大黄酸/%	大黄素/%	大黄酚/%	大黄素甲醚/%
芦荟	0.194	0.004	0.002	0.001	未测出
决明子	未测出	0.025	0.012	0.079	0.015
大黄	0.153	0.748	0.408	0.914	0.221

2.4 出膏率的测定

用移液管吸取各工艺提取液 5 mL, 置已于 105℃干燥至恒质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃干燥至恒质量, 计算出膏率。

2.5 正交试验分析

按正交试验表方案, 对正交试验结果进行多指标综合评分^[2]。评分时以各指标最大值作为参照对

数据进行归一化, 再给出不同权重, 总蒽醌转移率和出膏率的权重系数分别设为 0.7、0.3。以综合值进行统计分析, 结果见表 3。

综合评分= $[(P_A \times A_i/A_{i\text{优}}) + (P_B \times B_i/B_{i\text{优}})] \times 100$, 式中 P_A 为转移率权重系数, A_i 为转移率指标测定值, $A_{i\text{优}}$ 为转移率指标最大值; P_B 为出膏率权重系数, B_i 为出膏率指标测定值, $B_{i\text{优}}$ 为出膏率指标最大值

表3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	总蒽醌转移率/%	出膏率/%	综合评分
1	1	1	1	1	47.55	21.50	61.47
2	1	2	2	2	76.97	32.55	97.60
3	1	3	3	3	75.56	35.38	98.71
4	2	1	2	3	66.39	32.90	88.28
5	2	2	3	1	58.07	24.75	73.80
6	2	3	1	2	61.98	25.97	78.39
7	3	1	3	2	62.84	25.16	78.48
8	3	2	1	3	70.37	24.70	84.94
9	3	3	2	1	61.14	19.52	72.16
K_1	85.927	76.077	76.600	69.143			
K_2	80.157	87.113	86.013	84.823			
K_3	80.193	83.087	83.663	92.310			
R	5.770	11.036	9.413	23.167			

由直观分析结果看出：各试验对结果的影响次序为 $D > B > C > A$ ，最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2D_3$ 。考虑到生产时生产周期的问题及操作成本问题，确定最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2D_2$ ，即 10 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 1.5 h。

2.6 验证试验

按处方量称取同一批药材 3 份，按最佳提取工艺进行验证试验，结果 3 批转移率分别为 73.43%、68.40%、71.61%，出膏率分别为 29.22%、29.17%、29.49%，表明该工艺稳定可行。

3 讨论

方中大黄、芦荟、决明子均含有蒽醌类，是本方中泻下作用的主要药效成分，也是本方的主要有效成分，预实验表明乙醇提取可以最大程度地提取出来，所以选择用一定体积分数的乙醇回流提取。考虑到蒽醌类成分对热不稳定，长时间加热或者加热温度过高会发生蒽醌类成分的分解以及相互之间的转化，所以提取时既要保证提取率又要尽量降低分解转化^[3]。本实验最佳工艺为提取两次，每次 1.5 h，也验证了上述理论。

方中某些蒽醌类成分如大黄素甲醚极性较小，用甲醇溶解时易出现不溶物，所以供试品溶液的制备时，在甲醇溶解前滴加少量氯仿，再用甲醇继续

溶解，能有效地溶解不溶物。

由于本方成分较多，测定本方中蒽醌类成分时，在《中国药典》2010 年版一部大黄药材含量测定中，色谱条件上依次选用了等度的甲醇 - 0.1% 磷酸水溶液 (80:20)、(75:25)、(70:30)、(60:40)、(55:45) 流动相条件，由于等度洗脱时间较长，故选用梯度洗脱；本实验优选出的乙醇提取工艺可有效地提取方中的有效成分。

中药是一个多组分组成的复杂体系，其化学成分的多样性与其生物活性的关联性是其疗效的根本保证^[4]，也是实验设计的主要依据。在以后的复方药物研究中不仅要着重于主要有效成分，还要分析测定出与药效相关联的其他有效成分以获取更多的信息，从而更全面更合理地优选最佳工艺。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 22.
- [2] 徐连明, 邵杰, 付小环, 等. 正交试验优选全蝎盐制工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1811-1812.
- [3] 朱雪瑜, 郭鹏, 张铁军. 正交设计优选复方大黄颗粒中大黄蒽醌的提取工艺 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(5): 574-575.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.