

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.022

正交试验法优选柴黄清胰活血颗粒水提工艺*

李 静, 赵 剑[△], 李 志, 蒲清荣, 罗 群, 任桂林

(西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 优选柴黄清胰活血颗粒的水提工艺。方法 以栀子苷的转移率为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 考察煎煮时间、浸泡时间、煎煮次数、加水量 4 个因素对水提工艺的影响, 并进行验证试验。结果 最佳水提工艺为加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 3 次, 每次 1.0 h。结论 优选的提取工艺合理可行, 稳定客观。

关键词:柴黄清胰活血颗粒; 正交试验; 转移率; 栀子苷; 提取工艺

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0089-03

Water Extraction Process of Chaihuang Qingyi Huoxue Granules by Orthogonal Test

LI Jing, ZHAO Jian, LI Zhi, PU Qingrong, LUO Qun, REN Guilin

(The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: Objective To optimized the water extraction process of Chaihuang Qingyi Huoxue Granules. **Methods** With the transfer rate of geniposide as an evaluation index, the $L_9(3^4)$ orthogonal test method was used to investigate the effects of four factors: decoction time, soaking time, number of decoctions, and water additions on the water extraction process, and a verification test was performed. **Results** The best water extraction process was to add 10 times the amount of water, soaked for 30 min, and decoction for 3 times, each for 1.0 h. **Conclusion** The optimal extraction process is reasonable, feasible, stable and objective.

Key words: Chaihuang Qingyi Huoxue Granules; orthogonal test; transfer rate; geniposide; extraction process

柴黄清胰活血颗粒为西南医科大学附属中医医院李志教授多年临床经验方, 由生大黄、延胡索、柴胡、栀子、丹参、黄芩、白芍等 14 味中药组方, 具有清热解毒、活血消肿、通腑泄热、理气止痛的功效, 用于治疗急性胰腺炎。将方中君药大黄打粉, 制粒时作母核使用; 柴胡、栀子、黄芩、白芍等中药材所含有效成分均溶于水^[1-2], 故采用水煎煮提取。栀子的主要成分为栀子苷, 有消退黄疸、降低丙氨酸氨基转移酶、保护肝功能、降压、防止动脉硬化、保护血管内皮细胞等作用, 故栀子苷含量常作为评价栀子药材质量的重要指标^[3-6]。本研究采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 以栀子苷的转移率为评价指标, 优选柴黄清胰活血颗粒最佳水提工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); QP-01 型真空泵(天津奥特赛恩仪器有限公司); JPGT0328 型全数字超声波发生器(武汉嘉鹏电子有限公司); NRB17S3W 型电冰箱(日本松下公司); HH 型数显电热恒温水浴箱(江苏金坛金城国胜实验仪器厂); ZK072 型电热真空干燥箱(上海实验仪器厂); AUW120D 型电子天平(日本岛津公司, 精度为十万分之一)。

1.2 试剂

栀子苷对照品(批号为 110721-200912, 中国食品

药品检定研究院); 柴胡、延胡索、丹参、黄芩、白芍、栀子等 13 味中药均购于泸州市宝光中药饮片有限公司, 经泸州市药检所中药室袁常珍主任鉴定为正品, 均符合 2015 年版《中国药典(一部)》规定; 柴黄清胰活血颗粒(西南医科大学附属中医医院制剂室自制); 水为娃哈哈纯净水; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 栀子苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 238 nm; 进样量: 10 μL; 流速: 1 mL/min; 柱温: 40 ℃; 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液(15:85, V/V), 二元高压等度洗脱。

2.1.2 溶液制备

对照品溶液: 取栀子苷对照品约 21 mg, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液。

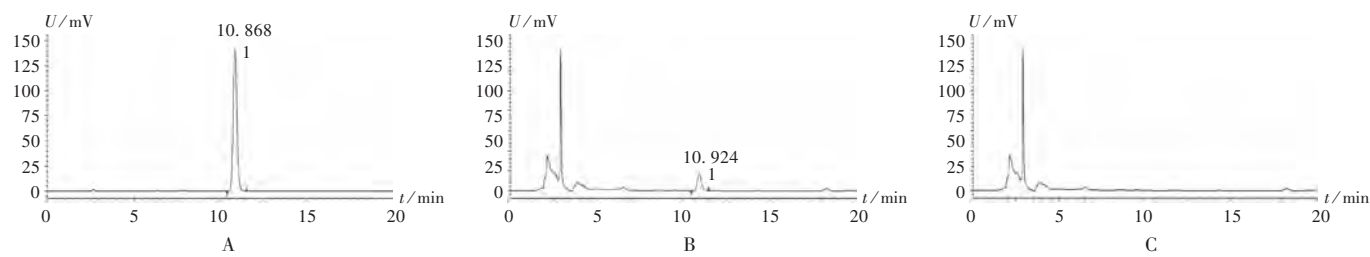
供试品溶液: 取正交试验所得干浸膏 0.5 g, 精密称定, 置磨口具塞锥形瓶中, 分别加入稀乙醇 25 mL, 密闭, 再精密称定, 超声 30 min, 放至室温, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

阴性对照品溶液: 准确称取处方量中药饮片(不含

*基金项目: 泸州市人民政府—西南医科大学联合基金项目[2015LZCYD-S09(1/8)]。

第一作者: 李静, 女, 硕士研究生, 中药师, 研究方向为中药制剂及质量标准, (电子信箱)1453014275@qq.com。

[△]通信作者: 赵剑, 男, 大学本科, 主任中药师, 主要从事中药制剂开发工作, (电子信箱)562701410@qq.com。



1. 栀子苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

栀子)适量,制备阴性对照样品,按供试品溶液制备方法制备不含栀子苷的阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:精密量取2.2.2项下3种溶液各10 μL ,按拟订色谱条件依法进样。结果理论板数按栀子苷计应不低于3000^[6],阴性对照无干扰,详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2.2项下对照品贮备液0.1,0.2,0.5,1.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,备用。分别精密量取上述溶液及对照品贮备液10 μL 注入高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,以峰面积(Y)对质量浓度(X , mg/mL)进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,583\,757.470\,7X - 9\,535.213\,1$, $R^2 = 0.999\,7$ ($n = 5$)。结果表明,栀子苷质量浓度在2.1~2100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限测定:取栀子苷含量为2.1 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,稀释成质量浓度为0.0525,0.00525,0.002625 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别进样。当信噪比(S/N)为3倍基线和10倍基线噪声时确定得检测限和定量限分别为0.002625,0.0084 $\mu\text{g/mL}$ 。

精密度试验:精密量取栀子苷对照品溶液10 μL ,按拟订色谱条件进样测定5次,记录峰面积。结果的 RSD 为0.50% ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:按2.2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12,18,24,36 h时按拟订色谱条件分别进样各10 μL ,记录峰面积。结果的 RSD 为1.56% ($n = 10$),表明供试品溶液在36 h内稳定。

重复性试验:取同一批样品,依法制备供试品溶液6份,按拟订色谱条件进样测定栀子苷的峰面积。结果的 RSD 为0.63% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:精密称取正交试验的2号试验条件所得的2号浸膏0.1 g,分别按其含量的50%,100%,150%精密加入对照品溶液,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定峰面积,计算回收率。结果见表1。

2.2 正交试验设计

2.2.1 因素水平设计

黄芩、柴胡、白芍、栀子、丹参、延胡索等13味中药

表1 栀子苷加样回收试验结果($n = 9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
1.0118	0.4950	1.5062	99.88		
1.0016	0.4950	1.5014	100.97		
1.0118	0.4950	1.5067	99.98		
1.0834	0.9900	2.0799	100.66		
1.0834	0.9900	2.0940	102.09	101.26	0.98
1.0936	0.9900	2.0960	101.25		
1.1140	1.4850	2.6405	102.79		
1.1038	1.4850	2.6186	102.01		
1.1140	1.4850	2.6250	101.75		

醇提后药渣采用加水煎煮法提取有效成分,以加水量(因素A)、浸泡时间(因素B)、煎煮时间(因素C)、煎煮次数(因素D)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交试验法进行试验,以栀子苷的转移率^[7-8]为评价指标,优选最佳水提工艺条件,因素水平表见表2。按处方中白芍、柴胡、黄芩、延胡索、栀子、丹参等中药饮片的配比,准确称取9份,每份305 g,按表2中提取工艺条件组合加水进行煎煮,滤过,合并煎煮液,减压浓缩至适量,60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥成干浸膏,称定质量,备用。

表2 正交试验因素水平表

水平	因素A(倍)	因素B(min)	因素C(h)	因素D(次)
1	8	30	1.0	1
2	10	60	1.5	2
3	12	90	2.0	3

2.2.2 正交试验结果

药材干浸膏质量及栀子苷转移率结果见表3。正交试验方差分析结果见表4。可见,各因素对柴黄清胰活血颗粒水提工艺的影响顺序为 $D > A > C > B$ (煎煮次数>加水量>煎煮时间>浸泡时间)。由于因素B的极差与离差平方和最小,因此在方差分析中以其作为误差项,由表3可见,因素A和因素C具有极显著性差异。结合大生产的角度考虑,确定其最佳提取工艺为 $A_2B_1C_1D_3$,即加10倍量水,浸泡30 min,煎煮3次,每次1.0 h。

2.3 最佳工艺验证

按处方量称取中药饮片3份,按优选的最佳工艺进

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

序号	因素				干浸膏 质量(g)	栀子苷转 移率(%)
	A(倍)	B(min)	C(h)	D(次)		
1	1	1	1	1	27.035	37.859 1
2	1	2	2	2	42.665	48.973 1
3	1	3	3	3	54.970	57.417 5
4	2	1	2	3	60.823	60.824 2
5	2	2	3	1	31.487	35.847 9
6	2	3	1	2	48.171	50.678 9
7	3	1	3	2	44.127	45.950 6
8	3	2	1	3	55.589	57.754 4
9	3	3	2	1	34.556	35.940 2
K_1	144.25	144.63	146.29	109.65		
K_2	147.35	142.58	145.74	145.60		
K_3	139.65	144.04	139.22	176.00		
R	7.71	2.06	7.08	66.35		

表4 栀子苷转移率方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	10.0220	2	5.011 0	13.41	<0.05
C	10.3236	2	5.161 82	13.81	<0.05
D	735.417	2	367.708 72	983.69	>0.05
B(误差)	0.7476	2	0.373 805	1	

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

行提取,测定干浸膏质量及栀子苷转移率。结果干浸膏质量分别为 56.375, 58.237, 58.611 g, 栀子苷转移率分别为 57.855%, 58.653%, 58.816%。可见,该工艺条件可行,简便,稳定,重复性好。

3 讨论

因处方中君药生大黄将打粉,制粒时作母核使用,在水提工艺中不考虑将大黄作为考察指标;考虑选用臣药柴胡中的有效成分柴胡皂苷 a、d 作为考察指标,但由于柴胡皂苷 a、d 在煎煮过程中均已发生转化^[9-11],故在试验中未检测到柴胡皂苷 a、d 吸收峰。且 2015 年版《中国药典(一部)》收录的以柴胡为君药的所有中成药均未选用柴胡作为考察指标,故本研究选用质量较稳定的栀子苷作为考察指标。采用高效液相色谱法测定浸膏中栀子苷含量,分离效果较好,操作简便,稳定可靠。

由于 $L_9(3^4)$ 试验中 9 个试验的出膏率不一样,采用干浸膏中栀子苷含量作为数据分析的依据,结果不具有参考价值,正交试验方差分析数据也不够准确,故本研究中采用栀子苷的转移率为考察指标。其含量测定方法参考了 2015 年版《中国药典(一部)》栀子药材的液相色谱条件,即以乙腈-水(15:85, V/V)为流动相,检测波长为 238 nm,结果分离效果不好且峰形拖尾;后采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液(15:85, V/V)为流动相,流速为 1 mL/min,检测波长为 230 nm,能较好地将栀

子苷分离^[12-16]。

本研究中取正交试验的 1 号试验条件所得的 1 号浸膏适量,依法制备供试品溶液,分别在色谱条件小的变动条件下[流速(0.8±0.2)mL/min,波长(254±2)nm,柱温(40±5)℃],测得栀子苷含量的 RSD 为 0.99%,表明高效液相色谱法测定栀子苷时,波长、流速、柱温在小的变动时耐用性合适,满足系统适应性要求,方法可靠、可行。

综上所述,栀子中的栀子苷可作为柴黄清胰活血颗粒水提工艺的考察指标,有利于提高该颗粒的质量标准,本研究中建立的高效液相色谱法快速、准确、灵敏度高,可作为柴黄清胰活血颗粒生产过程中的质量控制方法。

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,1994:586-588.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:105-248.
- [3] 王伟影,范蕾. 丽水地产栀子的质量研究[J]. 中国药业,2012,21(19):19-20.
- [4] 刘弘,张振巍,姬志强. 多指标综合评分法优选清热解毒口服液提取工艺[J]. 中药材,2012,35(8):1326-1330.
- [5] 宫鹏,陈镇,余剑萍. HPLC 法测定疏风祛湿胶囊中栀子苷的含量[J]. 安徽医药,2010,14(6):646-647.
- [6] 李竹雯. HPLC 法测定 4 种不同产地栀子中栀子苷的含量[J]. 中国医药导报,2009,6(34):39-41.
- [7] 霍务贞,吴燕红,李苑新,等. 不同提取工艺对复方中东莨菪碱含量的影响[J]. 中国药业,2013,22(14):26-27.
- [8] 刘涛,郭晓恒,吴春梅,等. 肺毒清颗粒中有效成分的含量测定及转移率考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):54-56.
- [9] 李军,姜华,张延萍,等. 柴胡水煎液中柴胡皂苷 a 和 d 的溶出与转化差异[J]. 中国药理学杂志,2014,49(19):1692-1696.
- [10] 李军,姜华,张延萍,等. HPLC 测定柴黄片中柴胡皂苷 b1、b2 的含量[J]. 中国药理学杂志,2011,46(1):61-63.
- [11] 李军,姜华,张延萍,等. 柴胡皂苷 b2 降解产物结构研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(10):2430-2431.
- [12] 吴静,陆红. 舒胆通颗粒的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):89-92.
- [13] 吕士杰,李妍,芦晓晶,等. HPLC 测定芥丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):81-84.
- [14] 吴红娟,王清波,谭朝阳,等. 不同来源栀子中栀子苷含量测定[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(5):35-37.
- [15] 朱慧慧,白岩. 栀子花中栀子苷的提取与测定[J]. 浙江中医杂志,2018,53(7):543-544.
- [16] 蒋元斌,林丛发,郭慧慧,等. 水浴热烫炮制对栀子中栀子苷含量的影响[J]. 时珍国医国药,2018,29(5):1100-1102.

(收稿日期:2019-07-09)