

实验研究

和肝理脾颗粒剂提取工艺研究^{*}李江英^{**} 赵 锋¹ 王玥月² 张炜华²

(1. 西安市中医医院, 陕西 西安 710001; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 优选和肝理脾颗粒剂的提取工艺。方法 分别制备和肝理脾颗粒剂处方药材水煎煮提取物和乙醇提取物, 采用 HPLC 法测定提取物中芍药苷的含量, 并比较提取物 HPLC 图谱差异; 采用正交设计优选提取工艺条件。结果 水煎煮和乙醇提取物的主要色谱峰基本一致, 芍药苷的含量分别为 0.138 mg/mL 和 0.140 mg/mL, 无显著差异; 乙醇提取物中部分弱极性成分的相对峰面积明显高于水煎煮提取物 ($P < 0.05$); 乙醇用量、乙醇浓度和提取时间 3 个考察因素中, 提取时间对芍药苷的提取率具有显著影响 ($P < 0.05$)。结论 和肝理脾颗粒剂药材提取以乙醇回流法优于水煎煮, 优选的提取条件为加 7 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h。

关键词:和肝理脾颗粒剂; 提取工艺; 正交设计

中图分类号: R 284.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2015)04-0076-04

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2015.04.029

On Extraction Techniques of Liver-harmonizing and
Spleen-regulating GranuleLI Jiangying¹, ZHAO Feng¹, WANG Yueyue², ZHANG Weihua²

(1. Xi'an Hospital of Chinese Medicine, Xi'an 710001, China;

2. College of Life Science of Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract Objective: To optimize the extracting process of Liver-harmonizing and Spleen-regulating Granule. **Methods:** The water and ethanol extracts of Liver-harmonizing and Spleen-regulating Granule prepared respectively, the difference of HPLC chromatography were compared by determining the paeoniflorin contents in the extracts with HPLC method. The technique condition were optimized by orthogonal design. **Results:** The main chromatographical peaks of the water and ethanol extracts were basically consistent and the contents of paeoniflorin were 0.138 mg/mL and 0.140 mg/mL respectively, there was no significant difference between them; the peak area of parts of the puny polar components in ethanol extracts markedly wider than that in the water extracts ($P < 0.05$); in the 3 elements observed, namely, the amounts and concentrations of ethanol as well as extracting time, the extracting time had significant influence on the extracting rate of paeoniflorin ($P < 0.05$). **Conclusion:** The better technique of extracting Liver-harmonizing and Spleen-regulating Granule is ethanol reflux method and optimizing conditions are twice reflux extractions with 60% ethanol 7 times more than the former ovemount.

Keywords Liver-harmonizing and Spleen-regulating Granule; extracting techniques; orthogonal design

* 基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2013k12-07-06)

** 作者简介: 李江英 (1969-), 女, 主任药师, 主要从事中药药事管理及医院制剂研发。

和肝理脾颗粒剂是西安市中医医院自配制剂改进品种。原剂型为蜜丸剂,处方由白芍、赤芍、冰片、肉桂、薄荷、连翘、厚朴、香附、甘草等组成,具有醒脾健胃、疏肝通络作用,主要用于肝气郁结、脾胃不和、肝腹胀满,食少纳呆、两胁不舒或肝区疼痛等,临床应用已经近 50 年,疗效显著^[1]。因传统蜜丸剂由原药材细粉和炼蜜制备而成,存在服用困难、生物利用度低以及微生物限量易超标等问题^[2],故选择颗粒剂为剂型进行二次开发,使其成为“安全、有效、稳定、可控”的现代中药制剂。考虑到原制剂以药材粉末入药,为了尽可能保持原方的有效成分,本文以芍药苷和多成分指纹谱为评价指标,比较水煎煮和乙醇提取两种方法对处方药材的提取效果,在此基础上优化工艺条件,为和肝理脾颗粒剂的开发应用提供实验依据。

1 仪器和材料

Dionex UltiMate3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司),GZX-GFC. 101-3-BS 型真空干燥箱(上海博泰实验设备有限公司);MH-500 调温型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);JA2003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。

赤芍、白芍、甘草、厚朴、连翘、枳壳、肉桂、香附购自西安盛兴中药饮片厂,经医院制剂实验室鉴定均符合药典要求;芍药苷对照品(中国药品食品检定研究院,批号:110736-201330);95%乙醇(分析纯级,天津市百世化工有限公司);乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学仪器有限公司);水为超纯水,其它试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)柱,乙腈(A)和 0.1 %磷酸溶液(B)为流动相按表 1 程序进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,检测波长 230 nm,柱温 25 ℃,进样量 20 μL。理论塔板数按芍药苷峰计算应不低于 4000。

2.2 标准曲线的绘制 芍药苷对照品分别配制成 44. 4、66. 6、88. 8、111. 0、133. 2、155. 4、177. 6 μg/mL 的溶液,精密量取 20 μL,在上述色谱条件下,进样分析,记录色谱图,测定峰面积。以

芍药苷进样量(X, μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y=454. 2X-3. 384$, $r=0. 9995$ 。表明芍药苷在 0. 888 μg ~ 3. 552 μg 范围内线性关系良好。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	12	88
10	12	88
30	14	86
65	26	74
70	40	60

2.3 提取方法的选择

2.3.1 水煎煮提取及样品处理 按处方比例精密称取各药材饮片,共计 17. 17 g,置圆底烧瓶内加入 8 倍量蒸馏水回流提取 2 次,每次 1. 5 h,滤过,合并滤液,即得水煎煮提取液^[3,4]。提取液 70 ℃减压浓缩(-0. 085 MPa)至 33 mL,加入 95 %乙醇 92 mL,边加边搅,静置,滤过(残渣用 70 %乙醇洗涤 3 次),将滤液浓缩,加 70 %乙醇定容至 50 mL。精密量取该溶液 2 mL,70 %乙醇定容至 25 mL,即得供试品溶液。

2.3.2 乙醇提取及样品处理 按处方比例精密称取各药材饮片,共计 17. 19 g,置圆底烧瓶内加入 8 倍量 70 %乙醇回流提取 2 次,每次 1. 5 h,滤过,合并滤液,即得乙醇提取液^[5]。提取液适当浓缩,用 70 %乙醇定容至 100 mL。精密量取该溶液 4 mL,70 %乙醇定容至 25 mL,即得供试品溶液。

2.3.3 提取物的 HPLC 分析 取“2. 3. 1”和“2. 3. 2”项下供试品溶液,注入液相色谱仪,记录各色谱图,见图 1。以芍药苷为参照对各主要成分峰面积归一化,并进行对比,结果见表 2。结果表明,两种提取物的主要色谱峰基本一致,表明提取物中主要化学成分不存在质的差异,且两提取物供试品中芍药苷(2 号峰)的含量分别为 0. 138 mg/mL 和 0. 140 mg/mL,无显著差异。但与乙醇提取物相比,水煎煮提取物中部分弱极性成分(3、4、6 号峰)的相对峰面积明显小于乙醇提取物($P<0. 05$),故以 70 %乙醇提取为优。

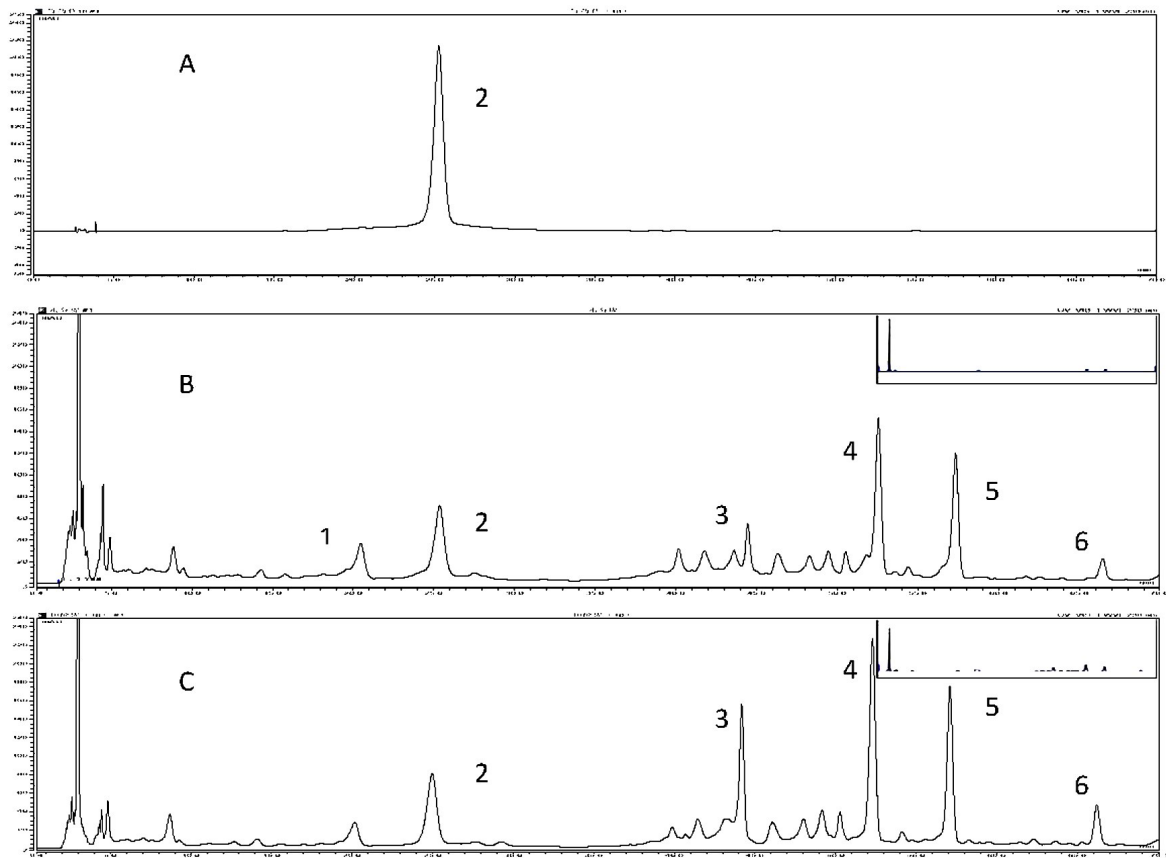


图 1 和肝脾脾颗粒药材提取物 HPLC 图

A. 芍药苷对照品 B. 水煎煮提取物 C. 乙醇提取物 2-芍药苷

表 2 水煎煮提取和乙醇提取主要成分保留时间与峰面积

共有峰编号	保留时间			相对峰面积	
	水煎提取物	乙醇提取物	RSD (%)	水煎煮提取物	乙醇提取物
1	20.62	20.18	1.10	0.503	0.280
2	25.54	24.98	1.13	1.000	1.000
3	44.55	44.18	0.44	0.270	0.697 *
4	52.66	52.29	0.37	1.160	1.580 *
5	57.43	57.09	0.31	0.981	1.145
6	66.57	66.20	0.28	0.191	0.294 *

注:与水煎煮提取物相比,* $P<0.05$

2.4 提取条件的优化 以乙醇浓度、乙醇用量、提取时间作为考察的 3 个因素,选择不同水平,芍药苷含量为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优化乙醇提取条件,见表 3。

表 3 因素水平表

水平	因素		
	乙醇浓度 A(%)	乙醇用量 B(倍)	提取时间 C(h)
1	60	5	1
2	70	6	1.5
3	80	7	2

取处方药材饮片 9 份,每份 20 g,回流提取 2 次。结果见表 4,方差分析见表 5。

结果表明,以芍药苷为评价指标,影响提取因素的大小顺序为 $C>B>A$ 。提取时间(C)对芍药苷的提取率有显著影响($P<0.05$),溶剂用量(B)和乙醇浓度(A)没有显著影响。因乙醇浓度对芍药苷提取量影响很小,为节约成本,选择 60 % 乙醇为提取溶剂,得优选的工艺条件为 $A_1B_3C_3$,即 60 % 乙醇回流 2 h,每次加溶剂 7 倍量(提取 2 次)。

表4 正交试验结果

试验号	乙醇浓度	乙醇用量	提取时间	空白列	实验结果
	A (%)	B (倍)	C (h)	D	芍药苷提取率 (%)
1	1	1	1	1	68.7
2	1	2	2	2	76.0
3	1	3	3	3	86.2
4	2	1	2	3	68.3
5	2	2	3	1	83.6
6	2	3	1	2	78.7
7	3	1	3	2	84.7
8	3	2	1	3	71.8
9	3	3	2	1	81.1
I	230.9	221.7	219.2	233.4	$\Sigma y_i = 699.1$ CT=54304.5
II	230.6	231.4	225.4	239.4	
III	237.6	246.0	254.5	226.3	
R	7.0	24.3	35.3	13.1	

表5 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	显著性
B	99.8	2	49.9	5.09	$P>0.05$
C	236.8	2	118.4	12.08	$P<0.05$
误差(A+D)	39.2	4	9.8		

$F_{0.05(2,4)} = 6.94$

2.5 提取工艺验证和比较试验 在正交试验优选出的饮片提取条件基础上进行验证试验,并比较提取2次和提取3次芍药苷提取率的差异,结果见表6。

表6 工艺验证和比较试验 (n=3)

提取方法	芍药苷提取率 (%)
A ₁ B ₃ C ₃ , 2次	86.8
A ₁ B ₃ C ₃ , 3次	89.2

结果表明,采用 A₁B₃C₃ 条件,提取2次,芍药苷提取率大于85%,与提取3次相比无显著性差异,故确定提取次数为2次。

3 讨论

水是中药提取的常用溶剂,极性大,安全价

廉,溶解范围较广,但对亲脂性强的成分浸出能力弱;乙醇能与水以任意比例混合,调节其极性和溶解性,既可以溶解极性成分,也能溶解亲脂性成分,但乙醇易燃且成本较高。本研究结果显示,和肝理脾颗粒剂处方药材水煎煮和乙醇提取物主要化学成分基本一致,惟乙醇提取物中部分脂溶性成分的提取率明显高于水煎煮,提示乙醇提取效率优于水煎煮。至于这些成分是否为制剂的药效成分,有待进一步研究。

“和肝理脾方”是我院黄保中主任医师的经验方,方以赤、白芍为君药,赤芍凉血活血,白芍与甘草配伍,酸甘化阴以缓肝之急;冰片醒脾清热;厚朴、香附、薄荷、连翘行气祛风解毒;少量肉桂鼓动阳气^[6]。本实验以赤芍、白芍中的主要成分芍药苷作为评价指标,结合多成分色谱峰分析比较,用于和肝理脾颗粒剂的提取工艺优选,能够较好地反映制剂质量。

参考文献

[1] 吕文哲,刘素香,李晓燕,等. 和肝理脾丸治疗杂症举隅[J]. 辽宁中医学院学报,2005,7(6):598.

[2] 岳宝森,王显著. 超微粉碎技术提高和肝理脾丸溶出度的研究[J]. 陕西中医学院学报,2014,37(4):107-109.

[3] 杨玲娟,赵晓莉,狄留庆,等. HPLC法测定芍药甘草汤总有效部位中4个活性成分的含量[J]. 中华中医药学刊,2007,25(3):522-523.

[4] 何丽仙,黄忠京,谭倪,等. HPLC研究芍药甘草汤合煎与分煎的化学成分变化[J]. 云南师范大学学报,2009,26(6):32-35.

[5] 贺青姣,邓阳,颜苗,等. 正交试验法优选白芍当归复方的提取工艺[J]. 中国医学工业杂志,2014,45(1):28-31.

[6] 李晓燕,吕文哲,黄小林,等. 黄保中辨治病毒性肝病经验[J]. 中医杂志,2011,52(16):1360-1363.

(收稿日期:2014-12-05 编辑:文颖娟)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

<http://tgxt.sntcm.edu.cn>