

正交试验法优选茜草配方颗粒的提取工艺

蔡乐 古今 项菲菲 刘萍

【摘要】 目的 优选茜草配方颗粒的提取工艺。**方法** 以干浸膏得率、大叶茜草素和羟基茜草素提取量为评价指标,采用正交试验设计法考察加水倍量、提取次数和提取时间 3 个因素对提取效果的影响,通过综合评分筛选出茜草的最佳提取工艺。**结果** 提取次数对试验结果有极显著影响,加水倍量对提取工艺的影响有显著意义,而提取时间对结果无显著影响。综合考虑各因素的影响及生产实际需要,确定的最佳提取工艺为:茜草饮片加入 10 倍量水,煎煮提取 3 次,每次 1 小时。**结论** 该工艺条件提取充分,稳定可行,对茜草配方颗粒的生产具有一定的指导和参考意义。

【关键词】 茜草; 配方颗粒; 提取工艺; 正交设计; 大叶茜草素; 羟基茜草素

【中图分类号】 R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.04.010

Optimization of extraction technology of *Rubia cordifolia* L. for preparing formula granule by orthogonal experiment CAI Le, GU Jin, XIANG Fei-fei, et al. TCM Department, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping0707@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To optimize the extraction process of *Rubia cordifolia* L. formula granule. **Methods** Extraction yields of solid drug, rubimaillin and purpurin were regarded as investigation index, and the amount of water, extraction times and duration on extraction were evaluated by orthogonal experimental design, and the best extraction process was statistically analyzed and screened by multi-index comprehensive evaluation method. **Results** Extraction times had the most notable effect on experimental results, and the amount of water was the secondary notable effect on the results, while the duration of extraction had no notable effects. Considering the effects of three factors and actual production process synthetically, the optimum condition of extraction process was that the decoction pieces were decocted three times in 10 folds water, one hour each time. **Conclusion** The optimum extraction process was simple, reasonable and stable, which will have some instruction meaning and reference value to the production of *Rubia cordifolia* L. formula granule.

【Key words】 *Rubia cordifolia* L.; Formula granule; Extraction process; Orthogonal design; Rubimaillin; Purpurin

茜草为茜草科植物 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根及根茎,始载于《神农本草经》,具有凉血、化瘀、止血、通经之功效,被广泛应用于治疗吐血、衄血、跌打损伤、经闭瘀阻等症。全国几乎都有茜草分布,其中河北、山西、山东、陕西和河南等省为茜草的主

要产地^[1]。其主要成分包括大叶茜草素和羟基茜草素等醌类物质。将茜草制成配方颗粒剂,取代茜草饮片,可免去患者自行煎煮的过程,方便患者使用。本文通过正交试验对茜草配方颗粒的提取工艺进行了优选,为生产工艺参数的确定提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与试药

茜草饮片(由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供)经解放军总医院刘萍主任药师鉴定为茜草科植物茜草(*Rubia cordifolia* L.)的干燥根及根

基金项目:四川新绿色药业合作课题

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院药品保障中心中药房

作者简介:蔡乐(1983-),主管药师。研究方向:药剂学、医院药学。E-mail: caile15009@163.com

通讯作者:刘萍(1953-),女,主任药师。研究方向:药剂学、临床药学。E-mail: liuping0707@yahoo.com.cn

文献标引格式:

蔡乐,古今,项菲菲,等. 正交试验法优选茜草配方颗粒的提取工艺[J]. 环球中医药, 2012, 5(4): 269-272.

茎。大叶茜草素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110884-200604);羟基茜草素(Sigma 公司,批号:MKBC4162V);乙腈、甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯;水为重蒸馏水。

1.2 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,包括 1200 系列四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器、化学工作站(美国 Agilent 公司);Sartorius CP 225D 天平。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

配方颗粒的提取溶剂均规定为水,采用先浸泡再加热提取的方法提取。根据预试验的结果,以加水倍量(A)、提取次数(B)和提取时间(C)为考察因素,选取干浸膏得率、大叶茜草素和羟基茜草素提取量为评价指标,设计正交试验,采用 $L_9(3^4)$ 正交表优选水提茜草的最佳提取工艺条件,因素水平表见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	A:加水倍量 (倍)	B:提取次数 (次)	C:提取时间 (小时)	D:空白
1	8	1	1	-
2	10	2	1.5	-
3	12	3	0.5	-

2.2 干浸膏得率测定方法

将各次试验提取的药液滤过、浓缩、定容至 250 ml,精密吸取 10 ml 置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣于 105℃ 干燥至恒重,取出,于干燥器中放置约 30 分钟至室温后,迅速精密称定质量并计算干浸膏得率。

2.3 大叶茜草素和羟基茜草素的测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 12 小时的大叶茜草素对照品 25 mg,置 5 ml 量瓶中,加甲醇制成每 1 ml 含大叶茜草素 5 mg 的贮备液 A。精密称取羟基茜草素 10 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇制成每 1 ml 含羟基茜草素 1 mg 的贮备液 B。分别精密移取 50 μ l 贮备液 A 和 100 μ l 贮备液 B,置 50 ml 量瓶中,加甲醇制成每 1 ml 含大叶茜草素和羟基茜草素分别为 5 μ g 和 2 μ g 的混合溶液 C,摇匀,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 将各次试验提取的药液滤过、浓缩、定容至 250 ml,吸取药液各 2 ml,高速离心(10000 转/分)15 分钟,取上清液,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。精密吸取滤液 10 μ l,注入高效液相色谱仪测定大叶茜草素和羟基茜草素的含量。

2.3.3 色谱条件及适用性 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相为甲醇-乙腈-0.2% 磷酸,采用梯度洗脱的方法,0~13 分钟配比为 25:35:40,13~15 分钟配比调整至 25:52:23,15~35 分钟配比保持为 25:52:23;流速:1.0 ml/min;检测波长为 250 nm;柱温:30℃。进样量 10 μ l。在此色谱条件下,羟基茜草素和大叶茜草素的保留时间分别为 12.2 分钟和 30.1 分钟左右,其他色谱峰对羟基茜草素和大叶茜草素的峰无干扰,峰形尖锐,基线平稳。色谱图见图 1。

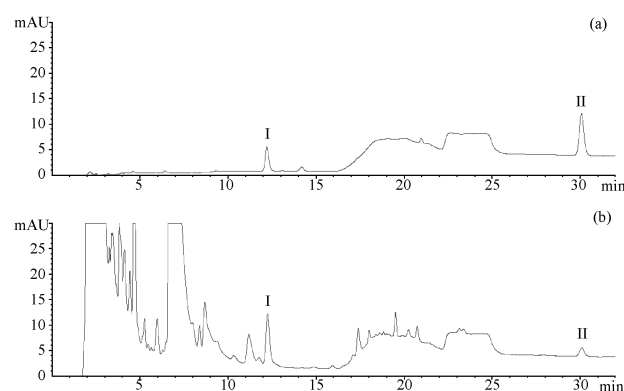


图 1 对照品溶液(a)与供试液(b)的高效液相色谱图
(I:羟基茜草素;II:大叶茜草素)

2.3.4 线性关系与范围的考察 精密吸取适量贮备液 A 和 B,加甲醇配制成含大叶茜草素和羟基茜草素浓度分别为 0.5/0.4、1/0.8、2/2、5/4、10/8、20/20 μ g/ml 的 6 组标准系列溶液。分别精密吸取各浓度标准系列溶液 10 μ l,按上述色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标(Y),标准系列溶液浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,得大叶茜草素的回归方程为 $Y = 29.040X - 0.6080$ ($r = 0.9998$);羟基茜草素的回归方程为 $Y = 36.468X - 5.2430$ ($r = 0.9999$)。结果表明,大叶茜草素在 0.5~20 μ g/ml 范围内,羟基茜草素在 0.4~20 μ g/ml 范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 取“2.3.1”项下混合对照品溶液 C,在上述色谱条件下,连续进样 5 次测定,计算大叶茜草素和羟基茜草素的峰面积 RSD

表 2 正交试验结果

试验号	因素				干浸膏得率 (%)	大叶茜草素含量 (μg/g)	羟基茜草素含量 (μg/g)	综合评分 y
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	11.9	5.74	17.42	0.000
2	1	2	2	2	18.9	11.53	53.07	0.503
3	1	3	3	3	19.1	8.95	35.45	0.415
4	2	1	2	3	12.8	10.28	42.78	0.192
5	2	2	3	1	18.3	15.32	42.24	0.501
6	2	3	1	2	22.1	22.42	88.48	0.921
7	3	1	3	2	12.9	8.62	19.52	0.095
8	3	2	1	3	20.3	19.83	64.51	0.728
9	3	3	2	1	23.6	22.41	93.22	1.000
K1	0.92	0.29	1.65	1.50				
K2	1.61	1.73	1.69	1.52				
K3	1.82	2.34	1.01	1.33				
R	0.30	0.68	0.23	0.06				

($n=5$) 分别为 0.34% 和 0.57%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 取同一批样品, 共 5 份, 分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算大叶茜草素和羟基茜草素的峰面积 RSD($n=5$) 分别为 2.07% 和 2.09%, 表明方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 取已知含量的茜草干浸膏 6 份, 每份约 0.1 g, 精密称定, 精密加入大叶茜草素和羟基茜草素对照品适量, 加重蒸馏水定容至 25 ml, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 并计算加样回收率。大叶茜草素和羟基茜草素的平均回收率分别为 102.8% (RSD = 1.59%) 和 98.1% (RSD = 1.76%)。

2.4 正交试验方法及结果

称取 10 g 茜草饮片共 9 份, 浸泡 2 小时后, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验(表 2), 煮沸回流提取, 制得茜草水提取液。将提取液过滤、浓缩、定容至 250 ml 后, 按“2.2”和“2.3”项下方法测定干浸膏得率及大叶茜草素和羟基茜草素的提取量。将干浸膏得率、大叶茜草素和羟基茜草素提取量等 3 个指标转换成相应的隶属度, 计算方法为: 指标隶属度 = (指标值 - 指标最小值) / (指标最大值 - 指标最小值)^[2], 按照各指标隶属度的权重系数(0.5 : 0.25 : 0.25) 计算综合评分, 并对实验结果进行分析。见表 2。为进一步确定各因素对结果的影响大小, 对试验结果

进行了方差分析。见表 3。

表 3 方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	P
A	0.1496	2	21.6	<0.05
B	0.7388	2	106.9	<0.01
C	0.0972	2	14.1	>0.05
误差	0.0069	2	1	-

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$

极差分析结果表明, 3 个因素的影响大小依次为: 提取次数(B) > 加水量(A) > 提取时间(C); 表 3 方差分析结果表明, 提取次数(B) 和加水量(A) 2 个因素对水提工艺有显著性影响, 其中提取次数(B) 的影响有极显著差异, 而提取时间(C) 影响较小, 由此得出的最佳工艺组合为 A3B3C2, 即以 12 倍量水, 煎 3 次, 每次 1.5 小时, 但这一组合的生产周期长、用水量大, 将增加生产成本, 同时也不符合节能降耗的原则。

由于提取时间这一因素对试验结果的影响程度最小, 因此考虑选取更为经济的水平; 虽然加水量因素对试验结果的影响显著, 但通过直观分析发现加水量为 10 倍量和 12 倍量这 2 个水平间的差异却很小, 在保证提取充分的前提下, 考虑到缩短生产周期, 降低生产成本等生产实际的需要, 选择 A2B3C1 组合作为水提取工艺参数, 即饮片加入 10 倍量水, 煮沸后保持微沸 1 小时, 提取 3 次。

文献标引格式:

蔡乐, 古今, 项菲菲, 等. 正交试验法优选茜草配方颗粒的提取工艺[J]. 环球中医药, 2012, 5(4): 269-272.

2.5 验证试验

为确定优选工艺的优劣和稳定性,以 A2B3C1 组合进行了 3 批验证试验,由表 4 结果可见,此工艺稳定可靠,合理可行。

表 4 水煎煮提取优选工艺验证实验结果

编号	干浸膏收率 (%)	大叶茜草素 含量(μg/g)	羟基茜草素 含量(μg/g)	综合评分
1	22.5	21.45	91.28	0.932
2	22.1	21.92	92.45	0.929
3	22.2	21.52	90.59	0.921

3 讨论

中药配方颗粒是中药饮片改革的一种新形式,它保持了中药汤剂的特点,且有所专长,具有“三效”(高效、速效、长效)、“三小”(剂量小、毒性小、作用小)以及“五方便”(服用、携带、贮藏、组方、运输方便)等特点^[3]。近年来,中药配方颗粒得到了迅速的发展,但在质量工艺、质量控制技术和质量标准建立等多方面并不完善。笔者曾对 6 个厂家茜草配方颗粒样品进行质量评价,发现其中大叶茜草素的含量差异显著(差异高达 10 多倍)^[4],且不同厂家的茜草配方颗粒性状差异明显,这表明不同厂家采用的生产工艺不尽相同。为此,本研究通过正交试验对茜草配方颗粒的提取工艺进行了优选,以期为工业标准化生产提供依据。

尽管有研究用不同浓度的乙醇作为提取溶剂优选茜草的提取工艺^[5],但考虑到配方颗粒剂实际工业生产的经济因素以及配方颗粒剂是在传统汤药基础上对中药饮片改革的一种新形式,因此本文仍采用水作为提取溶剂对茜草配方颗粒的提取工艺进行研究。

中药的成分相对复杂,其提取工艺的评价如采用单一指标进行工艺优选,则代表性较差,不能保证整体质量,故往往采用几个评判指标共同筛选最佳工艺条件。2010 年版《中国药典》以大叶茜草素和羟基茜草素 2 种成分作为茜草含量测定的检测指标,因此本研究采用梯度洗脱的方法对茜草提取液进行分析,同时测定了大叶茜草素和羟基茜草素 2 种成分的含量。通过对干浸膏得率、大叶茜草素和羟基茜草素提取量等多指标进行综合评分,可更为有效地评价茜草的提取工艺,使结果更具代表性、合理性和全面性。

由于不同类型的评价指标其结果有时不在同一数量级,直接累加则使数量级大的对结果的贡献大,而小的贡献小,因此对多指标正交试验评价分析时,需解决指标间量纲不一致和相容与否等问题^[6]。本研究通过将 3 个指标转换成相应的隶属度,使不同量纲和数量级的指标数据可比化。然后针对各指标重要性的差异给出不同的权重,综合评分后再进行统计分析。在有效成分明确的前提下,浸膏得率越高则有效成分纯度越低,应减少干浸膏得率的权重系数;若指标成分不明确,以浸出物多少来代表有效成分时,干浸膏得率的权重系数应相应增大^[7]。由于茜草中除含有大叶茜草素和羟基茜草素等醌类物质外,还含有萜类、己肽类和多糖等多种物质,化学成分较复杂,因此本研究适当地提高了干浸膏得率的权重系数,将其定为 0.5,而将大叶茜草素和羟基茜草素 2 种主要成分的权重系数各定为 0.25,这样经过方差分析优选出的工艺条件更加合理。

研究发现,提取次数和加水量 2 个因素对水提工艺有显著性影响,而提取时间影响较小,但若以正交试验得分最高的组合(A3B3C2)进行实际生产则生产周期长、用水量大,将增加生产成本。在保证提取充分的前提下,从生产实际出发,笔者适当地缩短了提取时间和减少了加水量。通过验证试验,本文优选的提取工艺的平均综合评分达到 0.927 分,与 A3B3C2 组合相比,得分减少约 7.3%,但提取时间缩短了 1.5 小时,从省时节能、降低成本的生

参 考 文 献

- [1] 高学敏. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2006:298.
- [2] 李云雁,胡传荣. 实验设计与数据处理[M]. 2 版. 北京:化学工业出版社,2008:134-136.
- [3] 贾晓斌,黄丽霞,陈彦,等. 中药配方颗粒标准化是临床疗效的基础[J]. 中华中医药学刊,2008,26(6):1200-1202.
- [4] 蔡乐,刘萍,郭桂明,等. 不同厂家茜草配方颗粒中大叶茜草素含量的比较[J]. 北京中医药,2011,30(11):856-858.
- [5] 谭朝阳,尤昭玲. 茜草提取工艺的研究[J]. 中草药,2004,35(4):339-401.
- [6] 闫小平,郭宇洁,郑蕊,等. 多指标综合评分法考察肠安 I 号方醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):12-15.
- [7] 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):38-40.

(收稿日期:2012-01-03)

(本文编辑:刘群)