

# 柴苓护肝颗粒的优化工艺

杨瑾 莫国栋 宋凤兰 李嘉良 曾维国 林丽

**【摘要】 目的** 探讨柴苓护肝颗粒的工艺优化研究。**方法** 通过正交实验以干膏得率和总皂苷含量为指标,对水提工艺和醇沉工艺分别进行了优化,水提部分对药材浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数、加水量进行了考察,醇沉部分对醇沉浓度、醇沉时间、浓缩液相对密度进行了优选,筛选出最佳提取工艺。**结果** 柴苓护肝颗粒的最佳水提工艺为加 10 倍量水,药材浸泡 3 小时,提取 2 次,每次提取 2 小时。最佳醇沉工艺为提取液浓缩至相对密度为 1.16 ~ 1.20,加乙醇使含醇量为 50%,静置 36 小时。**结论** 该工艺稳定可行,合理可靠。

**【关键词】** 柴苓护肝颗粒; 正交设计; 水提工艺; 柴胡皂苷

**【中图分类号】** R284.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.12.008

**Optimization process of Chailing Hupan granule** YANG Jin, MO Guo-dong, SONG Feng-lan, et al.

Zhongshan Second People's Hospital, Zhongshan 528447, China

Corresponding author: MO Guo-dong, E-mail: moguodong2002@163.com

**【Abstract】 Objective** To discuss the optimization process of Chailing Hupan granule. **Methods** To optimize the water-extracting process and ethanol-extracting process respectively based on the indexes as dry extract yielding rate and total saponins contents by using orthogonal design. In water-extracting process, soaking time, decocting time, decocting frequencies and the additive quantity of water of herb decocting were observed. In ethanol-extracting process, alcohol concentration, soaking time and relative density of concentrated solution were optimized, in order to select the best extraction process. **Results** The optimization water-extracting process of Chailing Hupan granule was as follows: 10 times of water quantity was added, and herbs were soaked for 3 hours and extracted 2 times with 2 hours for each extraction. The optimization ethanol-extracting process of Chailing Hupan granule was as follows: adding ethanol to the ethanol content of 50%, placed statically for 36 hours and extracted the concentrated solution with relative density in the range of 1.16 ~ 1.20. **Conclusion** This process was stable, practical, reasonable and reliable.

**【Key words】** Chailing Hupan granule; Orthogonal design; Water-extraction technology; Saponin

柴苓护肝颗粒是由柴胡、猪苓、党参、白术、泽泻、姜半夏、桂枝、炙甘草八味药材组成,具疏肝利胆,解酒泻毒的功效,临床用于酒精肝、脂肪肝、急慢性病毒性肝炎等的治疗。方中柴胡疏肝解郁,使肝气条达为君药,现代药理研究表明柴胡皂苷是柴

胡的主要活性成分,具有保肝、抗炎、抗病毒、解热、调节免疫、抗肝纤维化、抗肿瘤等药理活性作用<sup>[1-6]</sup>。干膏得率作为剂型选择的参考指标,是确定颗粒剂药物日服量、单服量及包装规格的重要参数<sup>[7-9]</sup>。因此,本文以方中柴胡总皂苷与浸膏得率的综合评分为评价指标,采用正交试验优选柴苓护肝颗粒水提醇沉工艺。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

紫外可见分光光度计[UV-1800 岛津仪器(苏州)有限公司];十万分之一电子天平(AUW220D

基金项目:中山市科技成果计划(医疗卫生)(2014A1FC150)

作者单位:528400 广东省中山市第二人民医院药剂科(杨瑾、莫国栋、李嘉良、曾维国、林丽);广东药学院医药化工学院(宋凤兰)

作者简介:杨瑾(1981-),女,硕士,副主任药师。研究方向:临床药学。E-mail:yangjin1209@163.com

通讯作者:莫国栋(1977-),本科,主管药师。研究方向:医院药学。E-mail:moguodong2002@163.com

SHIMADZU); 旋转蒸发器 (RE52C 上海亚荣生化仪器厂); 恒温水浴锅 (B-220 上海亚荣生化仪器厂); AS 系列超声波清洗机 (AS20500A 天津奥特赛恩斯仪器有限公司); AP-01P 真空泵 (AP-01P 天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 浓缩锅 (06038 湖南衡阳金一帆制药设备实业有限公司); 数显式电热恒温干燥箱 (10-2A 上海沪越实验仪器有限公司、沪越科学实验仪器厂)。

## 1.2 试药

柴胡、猪苓、党参、白术、泽泻、姜半夏、桂枝、炙甘草八味药材购于广州致信药业有限公司。

柴胡皂苷 d 对照品 (含量 98%, 中国药品生物制品检定所), 无水葡萄糖对照品 (批号: 110833-200302, 中国药品生物制品检定所); 硅藻土、氨水、甲醇、对二甲氨基苯甲醛、乙醇、蒸馏水。

## 2 方法

### 2.1 干膏得率的测定方法

参照 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)(附录 XA) 浸出物测定法。各正交实验中药液浓缩或定容至 100 mL, 精密吸取正交试验所得的药液 5 mL, 分别置于已干燥至恒重的蒸发皿 (设重量为  $W_1$ ) 中, 水浴挥干, 残渣于 105℃ 干燥 3 小时, 取出, 置干燥器中冷却 30 分钟, 迅速精密称定总重量 (重量为  $W_2$ ), 通过公式 1 计算其干膏得率。

$$\text{干膏得率} = \frac{(W_2 - W_1) \times 20}{\text{药材重量}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

### 2.2 总皂苷的含量测定方法的建立

2.2.1 标准曲线制备 精密称取柴胡皂苷 d 对照品 10.68 mg, 置 5 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 得对照品储备液。分别精密吸取对照品储备液 0.05 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.20 mL、0.25 mL、0.5 mL 置 1 mL 容量瓶中, 稀释成系列标准溶液。移取各溶液 0.5 mL, 另取 0.5 mL 甲醇作为空白, 分别精密加入 0.1% 对二甲氨基苯甲醛乙醇溶液 0.5 mL 摇匀, 于 70℃ 反应 10 分钟, 取出, 放冷, 加入磷酸 6 mL, 70℃ 反应 30 分钟, 取出, 放冷, 在波长 300 nm 至 600 nm 扫描, 得最大吸收波长为 544 nm。于 544 nm 波长处测定吸收度。以吸光度值 ( $Y$ ) 为纵坐标, 以柴胡皂苷 d 的浓度 ( $X$ ) 为横纵坐标, 绘制标准曲线, 计算得回归方程:  $Y = 0.7067X - 0.0227$  ( $r = 0.9998$ ), 表明柴胡皂苷 d 在 0.1068 ~ 1.068 mg/mL 内线性关系良好。见图 1。

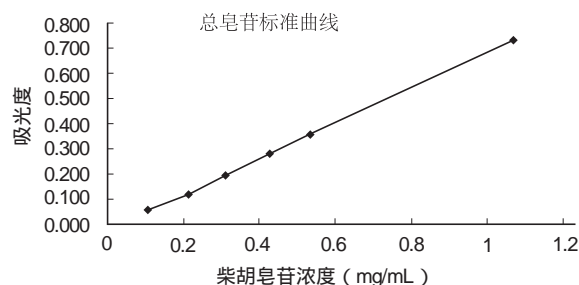


图 1 柴胡皂苷 d 标准曲线图

2.2.2 精密度考察 取同一柴胡皂苷 d 对照品溶液, 按 2.2.1 项下显色方法进行操作, 于 544 nm 连续测定吸光度 6 次, 吸光度的 RSD 值为 0.19%, 表明仪器的精密度良好, 符合测定要求。见表 1。

表 1 供试品的精密度试验结果

试验次数	吸光度值	平均值	RSD (%)
1	0.352	0.353	0.19
2	0.352		
3	0.353		
4	0.355		
5	0.355		
6	0.354		

2.2.3 重现性考察 分别取相同的 6 份供试品溶液, 按 2.2.1 项下显色方法进行操作, 进行测定, 计算总皂苷含量, 结果皂苷含量的 RSD 为 1.1%, 表明该方法的重现性较好。见表 2。

表 2 供试品溶液的重现性试验结果

取样量 (mL)	吸光度值	总皂苷含量 / (mg/mL)	平均含量 / (mg/mL)	RSD (%)
5.00	0.275	2.109	2.111	1.1
5.00	0.277	2.123		
5.00	0.281	2.146		
5.00	0.273	2.094		
5.00	0.272	2.086		
5.00	0.276	2.111		

2.2.4 稳定性考察 取同一供试品溶液, 按 2.2.1 项下显色方法进行操作, 室温放置, 分别于 0、15、30、45、60、90、120 分钟测定吸光度, 计算相对标准偏差 RSD 为 1.2%, 表明样品溶液在 90 分钟内稳定。见表 3。

2.2.5 加样回收考察 精密量取已知皂苷含量的样品溶液 2.5 mL, 共 9 份, 每份分别准确加入柴胡皂苷 d 对照品 2.638 mg、5.278 mg、10.560 mg (每个浓度 3 份), 定容至 5 mL, 按样品测定项下方法操作,

测定吸光度,皂苷的平均加样回收率为 100.9%,RSD 为 2.9%。见表 4。

表 3 供试品溶液的稳定性试验结果

测定时间(min)	吸光度值	平均值	RSD(%)
0	0.306		
15	0.308		
30	0.311		
45	0.312	0.312	1.2
60	0.315		
90	0.315		
120	0.316		

表 4 加样回收率试验结果

加入皂苷量(mg)	测得皂苷量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
2.638	2.612	99.01		
2.638	2.541	96.33		
2.638	2.789	105.72		
5.278	5.301	100.43		
5.278	5.407	102.44	100.9	2.9
5.278	5.147	97.52		
10.56	10.854	102.79		
10.56	10.725	101.56		
10.56	10.796	102.23		

2.2.6 样品测定 精密量取样品溶液 5 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,加入 1.5 g 硅藻土混合,研匀,全部转移至锥形瓶中,加入 5% 氨水甲醇溶液 25 mL,浸泡 30 分钟,超声 30 分钟,滤过,再用 5% 氨水甲醇 15 mL 清洗锥形瓶和漏斗,合并滤液,挥干,残渣加甲醇溶解,定容至 10 mL。再分别精密吸取 2 mL 至具塞试管中,加甲醇至 5 mL。按 2.2.1 项下进行操作,测得其吸光度值,根据标准曲线求总皂苷的含量。

2.3 水提工艺优化

2.3.1 因素水平的确定 在单因素考察的基础上,根据处方中药物性质及实践经验选择药材浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数、加水量为考察因素,对水提工艺的优选,以确定最佳水提条件,为生产提供依据。各因素设 3 个水平,因素水平表见表 5。

2.3.2 样品溶液的制备 处方:柴胡 160 g、猪苓 200 g、党参 200 g、白术 133 g、泽泻 160 g、姜半夏 133 g、桂枝 133 g、炙甘草 80 g、葡萄糖粉适量。按以上处方配比称取柴胡、猪苓、党参、白术、泽泻、姜半夏、桂枝、炙甘草八味药材共 90 g,根据  $L_9(3^4)$  正交试验表安排进行药材水提处理,加水浸泡煎煮,

收集水提液,浓缩至 100 mL,得 9 份样品溶液,按上述干膏得率测定方法和总皂苷测定方法测定。

表 5 水提因素水平表

水平	因素			
	A 浸泡时间/h	B 煎煮时间/h	C 煎煮次数/次	D 加水量/倍
1	1	1	1	8
2	2	1.5	2	10
3	3	2	3	12

2.4 醇沉工艺优化

2.4.1 因素水平的确定 根据药物的特性并结合生产实际,醇沉工艺选取了对醇沉影响较大的醇沉浓度、醇沉时间及浓缩液相对密度(50℃测)3 个因素进行考察,每个因素选择了 3 个水平,选择  $L_9(3^4)$  正交试验表进行实验。见表 6。

表 6 醇沉因素水平表

水平	因素		
	A 醇沉浓度/%	B 醇沉时间/h	C 浓缩液相对密度
1	40	12	1.11 ~ 1.15
2	50	24	1.16 ~ 1.20
3	60	36	1.21 ~ 1.25

2.4.2 样品溶液的制备 按处方配比称取柴胡、猪苓、党参、白术、泽泻、姜半夏、桂枝、炙甘草药材 810 g,按上述确定的水提工艺进行提取,提取液过滤,浓缩至 900 mL,精确分为 9 份,每份 100 mL,将各份溶液根据  $L_9(3^4)$  正交实验表安排进行浓缩及醇沉,抽滤,滤液减压回收乙醇,再分别定容至 100 mL。按上述干膏得率测定方法和总皂苷测定方法测定。

3 结果

3.1 水提工艺结果

以上实验结果表明,水提过程中影响提取效率的因素 D(加水量)>A(浸泡时间)>B(煎煮时间)>C(煎煮次数),最佳水提工艺条件为  $A_3B_3C_3D_2$ ,即药材加 10 倍量水,浸泡 3 小时,提取 3 次,每次提取 2 小时。方差分析表明浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数、加水量对提取效率均没有显著性影响。煎煮次数对提取效率影响较小,为了缩短提取周期,节约能源,结合大生产实际,将最终工艺确定为  $A_3B_3C_2D_2$ ,即加 10 倍量水,药材浸泡 3 小时,提取 2 次,每次提取 2 小时。见表 7、8。

表 7 水提正交试验结果表

试验号	因素				干膏得率(%)	总皂苷含量 mg/mL	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	19.67	2.304	63.80
2	1	2	2	2	23.40	3.479	88.08
3	1	3	3	3	24.33	3.196	84.62
4	2	1	2	3	28.94	2.057	71.85
5	2	2	3	1	27.78	2.297	74.30
6	2	3	1	2	29.51	3.224	91.87
7	3	1	3	2	29.18	3.634	98.21
8	3	2	1	3	29.22	2.785	84.25
9	3	3	2	1	30.55	2.062	82.96
ka1	22.47	25.93	26.13	26.00			
ka2	28.74	26.80	27.63	27.36			
ka3	29.65	28.13	27.10	27.50			
Ra	7.18	2.20	1.50	1.50			
kb1	2.993	2.665	2.771	2.221			
kb2	2.526	2.854	2.533	3.446			
kb3	2.827	2.827	3.042	2.679			
Rb	0.467	0.189	0.509	1.225			
kc1	78.83	77.95	79.97	73.69			
kc2	79.34	82.21	80.96	92.72			
kc3	88.41	86.48	85.71	80.24			
Rc	9.64	8.53	5.74	19.03			

注：a 为干膏得率；b 为总皂苷含量；c 为综合评分。

表 8 综合评分方差分析

方差来源	偏差平均和	自由度	F 值	显著性
A	176.60	2	3.13	
B	109.14	2	1.93	
C	56.42	2	1.00	
D	560.96	2	9.94	

注：F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00, f=2

表 9 醇沉正交试验结果表

试验号	因素				干膏得率(%)	总皂苷含量 mg/mL	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	15.18	2.297	73.91
2	1	2	2	2	14.41	2.694	79.61
3	1	3	3	3	13.06	2.785	78.49
4	2	1	2	3	16.48	2.821	86.26
5	2	2	3	1	10.23	2.386	65.24
6	2	3	1	2	16.22	3.132	91.45
7	3	1	3	2	9.51	2.354	63.16
8	3	2	1	3	12.74	2.460	71.83
9	3	3	2	1	16.43	3.257	94.19
ka1	14.21	13.72	14.71	13.95			
ka2	14.31	12.46	15.77	13.38			
ka3	12.89	15.24	10.93	14.09			
Ra	1.42	2.78	4.84	0.71			
kb1	2.592	2.491	2.630	2.647			
kb2	2.78	2.513	2.924	2.727			
kb3	2.69	3.058	2.508	2.689			
Rb	0.19	0.57	0.42	0.08			
kc1	77.34	74.44	79.06	77.78			
kc2	80.98	72.23	86.69	78.07			
kc3	76.39	88.04	68.96	78.86			
Rc	4.59	15.81	17.73	1.08			

注：a 为干膏得率；b 为总皂苷含量；c 为综合评分。

表 10 方差分析表

方差来源	偏差平均和	自由度	F 值	显著性
A	35.26	2	18.84	
B	440.04	2	235.19	*
C	474.24	2	253.47	*
D	1.871	2	1.00	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00, f=2$

3.2 醇沉工艺结果

从以上结果可知,醇沉过程中影响提取效率的因素 C(浓缩液相对密度)>B(醇沉时间)>A(醇沉浓度),经方差分析可知,浓缩液相对密度和醇沉时间对醇沉效果有显著性影响,醇沉最佳工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即提取液浓缩至相对密度为 1.16~1.20,加乙醇使含醇量为 50%,静置 36 小时。见表 9、10。

3.3 验证试验结果

为进一步验证正交试验结果的准确性,以确保提取工艺合理可行,按上述优选水提及醇沉工艺,重复试验 3 次。即按处方配比称取药材 90 g,加 10 倍量水,浸泡 3 小时,煎煮 2 次,每次 2 小时,药液浓缩至相对密度为 1.16~1.20,放冷,加乙醇使药液含醇量为 50%,静置 36 小时,取上清液滤过,滤液减压回收乙醇至无乙醇味,浓缩液定容至 100 mL,按上述干膏得率测定方法和总皂苷测定方法测定。由表 11 可知,采用此水提工艺干膏得率均值为 16.70%,总皂苷均值为 3.752 mg/mL,说明该水提工艺条件基本稳定,具有可重现性。

表 11 提取工艺验证试验结果表

批号	干膏得率(%)	总皂苷含量(mg/mL)
20130809	16.96	3.748
20130826	16.47	3.816
20130912	16.68	3.693

3 讨论

柴胡作为传统中药,主归肝胆经,具有解表退热,疏肝解郁,升举阳气的功效,由柴胡组成的方剂治疗肝病均有较好的临床疗效<sup>[10-11]</sup>。中药传统汤剂多以水煎煮提取,本试验尊重柴苓护肝方的传统水煎方式,以君药柴胡的主要活性成分柴胡总皂苷及得膏率为评价指标,其中干膏得率权重系数 0.4,总皂苷含量权重系数 0.6,规定干膏得率最大值为 40 分,总皂苷含量最大值为 60 分,其余值对应比

较,两项相加得综合评分,对柴苓护肝方的提取工艺条件进行了优化,优选的工艺简单,活性成分的提取率高,为柴苓护肝颗粒的制备工艺研究奠定了基础,并为其质量控制提供依据。

猪苓多糖、党参多糖等成分具有明显的保肝作用,因此,总多糖含量也作为考察的指标,为日后建立其质量标准做准备。但是目前总多糖含量测定数据不理想,所以课题组将总多糖含量的测定作为后期工艺优化的重点。

参 考 文 献

[1] 张华锋,刘炯,张杰,等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J]. 中草药,2013,44(19): 2696-2702.

[2] 王丽娜,汪巍,徐驰,等. 柴胡醋制前后抗炎作用比较研究[J]. 中成药,2013,35(5):1079-1081.

[3] 金国泰,李博,王树荣. 中药柴胡解热的物质基础、药效及机制的实验研究[J]. 成都中医药大学学报,2013,36(4): 28-30.

[4] 杨错,邢立国,刘玉兰. 柴胡乳剂对小鼠免疫功能的影响[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(3):169-171.

[5] 何燕,胡志峰,齐李平,等. 柴胡皂苷-d 抗肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(8): 915-919.

[6] 刘振国,陈红,程延安,等. 柴胡皂苷 d 对大鼠实验性肝癌形成的预防作用[J]. 西安交通大学学报(医学版),2007,28(6): 645-647.

[7] 苗得足,何茂群. 正交试验优选糖肾康颗粒提取工艺[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(6):54-55.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2010:附录 XA.

[9] 刘芬. 温心活血颗粒的药学部分研究[D]. 成都:成都中医药大学,2008.

[10] 张廷模. 临床中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2004: 143-145.

[11] 沈霞,赵振宇. 柴胡治疗肝病有效成分及药理作用研究进展[J]. 生物技术世界,2014,(2):100-102.

(收稿日期: 2015-04-24)

(本文编辑: 董历华)