

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00574

• 研究简报 •

# 正交设计优选复方大黄颗粒中大黄蒽醌的提取工艺

## Orthogonal design in optimizing extraction technique of anthraquinones from compound *Fufangdahuang* particles

朱雪瑜<sup>1,2</sup>, 郭 鹏<sup>3</sup>, 张铁军<sup>2</sup>

- 1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070
- 2. 天津药物研究院中药现代研究部, 天津 300193
- 3. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193

[关键词] 复方大黄颗粒; 正交试验; 提取工艺; 大黄蒽醌

[中图分类号] R 931.6 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2010)05-0574-02

复方大黄颗粒来源于临床经验方,由大黄、黄连、知母、益母草、丹参等七味中药组成,具有补益脾胃、益气养阴、通阳利水,兼以活血之功效,适用于治疗脾肾气虚、淤血、水湿、浊毒内停的糖尿病肾病。将其研制成为质量稳定、疗效显著、服用及携带方便的现代中药复方制剂,根据方中大黄有效化学成分总蒽醌的理化性质,以蒽醌转移率和出膏率为考核指标,采用综合评分法<sup>[1-3]</sup>对方中大黄的提取工艺进行正交试验优选。

### 1 仪器和试剂

Dionex Summit 高效液相色谱仪(美国戴安公司),超声波提取器 AS3120(江苏汉邦科技有限公司),分析天平(Shimadzu Libror AEL-40SM),R501B 星海旋转蒸发器(无锡市星海王生化设备有限公司),电加热套。乙腈(天津市康科德科技有限公司)为色谱纯,水为纯水,其余试剂均为分析纯。大黄酸标准品(批号:110757-200206)、大黄素标准品(批号:110756-200110)、大黄酚标准品(批号:110796-200513)、大黄素甲醚标准品(批号:110758-200509)、芦荟大黄素标准品(批号:110795-200504)均为含量测定用,纯度>98%,购自中国药品生物制品检定所。方中各味药材,除大黄来自于兰州大得利生物化学制药(厂)有限公司,均购自河北安国市药材批发市场,经鉴定符合《中国药典》2005 版各药味项下规定或自订标准。

### 2 方法和结果

2.1 工艺路线设计 大黄主含蒽醌类化合物,本实验初步拟定影响有效部位的因素为乙醇浓度、提取时间、提取次数和溶剂量。根据预实验,每个因素选 3 个水平,乙醇浓度(A)选取 60%、70%、80%,提取时间(B)选取 0.5、1、1.5 h,提取次数(C)选取 2、3、4 次,溶剂量(D)选取 6、8、10 倍。设计 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验。

2.2 提取 称取大黄 20 g,共 9 份,用相应浓度乙醇溶液浸泡 30 min,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验的要求用 85℃ 的水浴提取,将提取液过滤后,取滤液 5 ml 按 2.3.1 项下供试品制备方法处理,得到 1~9 号样品,进行含量分析。

### 2.3 大黄蒽醌的含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱 Kromasil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-0.1%磷酸(80:20)为流动相,检测波长为 254 nm,柱温为 35℃。理论板数以大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素峰计,不低于 3 000。在此条件下,样品得到良好分离。色谱图见图 1。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量,加甲醇分别制成每 1 ml 约含芦荟大黄素 50 μg,大黄酸、大黄素、大黄酚各 80 μg,大黄素甲醚 100 μg 的溶液;分别精密量取上述对照品溶液各 2 ml,混匀,即得(每 1 ml 中约含芦荟大黄素 10 μg,大黄酸、大黄素、大黄酚各 16 μg,大黄素甲醚 20 μg)。

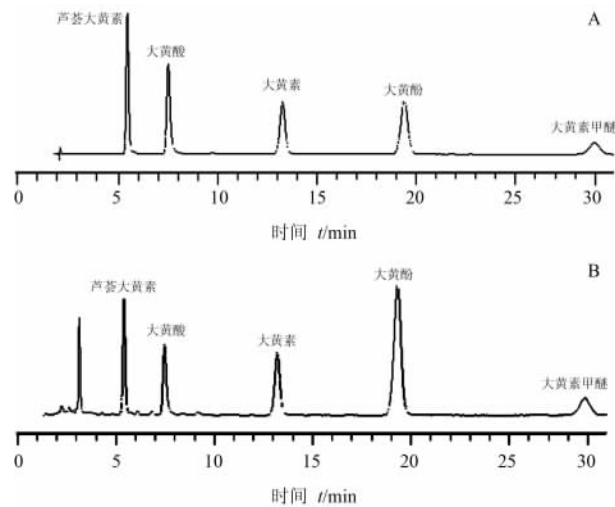


图 1 混合对照品(A)及供试品(B) HPLC 图谱

2.3.3 供试品溶液制备 精密吸取大黄提取液 5 ml,置烧瓶中,挥去溶剂,加 8% 盐酸溶液 10 ml,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 10 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

[收稿日期] 2009-12-22 [接受日期] 2010-03-11

[基金项目] 国家科技支撑计划 (2007BAI37B08). Supported by National Science and Technology Pillar Program (2007BAI37B08).

[作者简介] 朱雪瑜, 硕士生, 助理研究员. E-mail: alix@sina.com

用三氯甲烷提取3次,每次10 ml,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 线性范围 精密吸取混合对照品溶液4、6、8、10、12、14、16  $\mu\text{l}$ ,按2.3.1色谱条件测定峰面积(A),以峰面积对进样量( $\mu\text{g}$ )回归,得回归方程。大黄酸: $A=10\ 205\ C-16.288$ ,  $r=0.999\ 9$ ,大黄酸在63.12~252.48  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。大黄素: $A=9\ 029\ C-5.900\ 8$ ,  $r=0.999\ 9$ ,大黄素在59.52~238.08  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。大黄酚: $A=13\ 323\ C-9.585\ 8$ ,  $r=0.999\ 9$ ,大黄酚在60.80~243.20  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。大黄素甲醚: $A=2\ 829.7\ C-7.936\ 2$ ,  $r=0.999\ 8$ ,大黄素甲醚在74.00~296.00  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。芦荟大黄素: $A=11\ 862\ C-4.586\ 6$ ,  $r=0.999\ 9$ ,芦荟大黄素在43.50~174.00  $\mu\text{g}$ 内线性关系良好。

2.3.5 样品的含量测定 将1~9号样品各取20  $\mu\text{l}$ ,分别进样高效液相色谱仪,然后按2.3.1色谱条件进行测定,并计

算大黄蒽醌的转移率(%)。

2.4 出膏率的测定 用移液管吸取上述提取液20 ml,置已于105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴上蒸干,于105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒质量,测定出膏率(%)。

2.5 正交试验结果 按正交试验表方案,以外标两点法测定指标含量,并进行多指标综合评分。评分时以各指标最大值为参照对数据进行归一化,再给出不同权重,转移率与出膏率权重系数分别设为0.7和0.3。以综合值进行统计分析,结果见表1和表2。综合评分(M)=[(P<sub>A</sub>×A<sub>i</sub>/A<sub>max</sub>)+P<sub>B</sub>×B<sub>i</sub>/B<sub>max</sub>]×100,式中P<sub>A</sub>为转移率权重系数,A<sub>i</sub>为转移率指标测定值,A<sub>max</sub>为转移率指标最大值,P<sub>B</sub>为出膏率权重系数,B<sub>i</sub>为出膏率指标测定值,B<sub>max</sub>为出膏率指标最大值。大黄蒽醌转移率(%)=C样×V样×稀释倍数/(W样×药材百分含量)×100%,式中C样为样品测得浓度,V样为样品体积,W样为药材投料量。

表1 大黄蒽醌提取工艺正交试验结果

序号	A(乙醇浓度)	B(提取时间)	C(提取次数)	D(溶剂量)	转移率(%)	出膏率(%)	综合评分
1	1	1	1	1	49.78	25.01	58.860
2	1	2	2	2	83.50	36.61	94.630
3	1	3	3	3	87.87	36.62	98.119
4	2	1	2	3	80.22	36.46	91.902
5	2	2	3	1	86.90	39.07	99.227
6	2	3	1	2	71.42	37.24	85.490
7	3	1	3	2	78.22	33.66	88.158
8	3	2	1	3	68.97	28.39	76.743
9	3	3	2	1	64.66	29.85	74.431
K <sub>1</sub>	83.870	79.640	73.698	77.506			
K <sub>2</sub>	92.206	90.200	86.988	89.426			
K <sub>3</sub>	79.777	86.013	95.168	88.921			
R	12.429	10.560	21.470	11.920			

表2 大黄蒽醌提取工艺正交试验方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	F值	P值
A(乙醇浓度)	240.727	2	1.419	>0.05
B(提取时间)	169.661	2	1.000	>0.05
C(提取次数)	704.517	2	4.152	>0.05
D(溶剂量)	272.651	2	1.607	>0.05
误差	169.660	2		

由表1、表2可知 $R_C > R_D > R_A > R_B$ ,由此可见,提取次数是影响大黄蒽醌提取率的主要因素。直观分析K值得出,最佳提取工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即药材用70%的乙醇提取4次,1 h/次,溶剂量为药材的10倍。但经过方差分析,4个因素对结果均无显著性差异,且综合考虑到大生产时生产周期的问题,确定最佳提取工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>,即药材用70%的乙醇提取3次,每次1 h,溶剂量为药材的10、8、8倍。

2.6 验证实验 以大黄3批,每批200 g,采用最佳提取条件进行实验,结果3份提取液中大黄蒽醌的转移率分别为84.80%、83.67%、84.57%,表明该大黄提取工艺稳定可行。

### 3 讨论

大黄主要含蒽醌类化合物,包括结合型和游离型。为了最大程度提取和保留有效成分,用一定浓度的乙醇提取有效部

位。由于蒽醌类成分的稳定性受温度影响较大,在高温长时间加热的情况下会使其分解,温度控制方面既要保证提取率,又要使化学降解率控制在最小范围。在测定了大黄在70%乙醇液中的沸点为85 $^{\circ}\text{C}$ 后,确定本工艺提取温度采用85 $^{\circ}\text{C}$ 。

大黄提取工艺中,一般提取溶剂乙醇浓度范围较大(50%~95%)。为了合理确定乙醇浓度以得到更好的实验结果,在正交试验前,对乙醇浓度进行了单因素考察,结果表明60%~80%乙醇浓度对大黄总蒽醌(游离蒽醌和结合蒽醌)有较好的提取效果,故确定60%、70%、80%为乙醇浓度的考察水平。

验证实验中,为进一步考察提取次数是否对结果有影响,在按照优化工艺提取后对药渣进行第4次提取,结果大黄蒽醌转移率仅为5%,与正交试验结果基本一致,提示优化工艺稳定可行。

### 【参考文献】

- [1] 赵应征,鲁翠涛,梅兴国.常用多指标综合评价法在优选实验中的应用[J].医学研究生学报,2004,17:624-626.
- [2] 盛海林,王艾.多指标正交试验的分析[J].数理医药学杂志,2000,13:395-396.
- [3] 丁毅,陆兔林,李莉,熊汝菊,黄玮.多指标综合评分法优化益肾清利颗粒的醇提工艺[J].中国药师,2008,11:1208-1210.