

正交试验优化清解雾化液的提取工艺

陈少萍^{1*},莫小林^{2#},陈晓明²,韦振源²(1.广西壮族自治区妇幼保健院,南宁 530003;2.广西中医药大学第一附属医院,南宁 530023)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1403-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.32

摘要 目的:优化清解雾化液的提取工艺。方法:以金丝桃苷含量为考察指标,以加水量、提取时间、提取次数为考察因素,采用正交试验优化清解雾化液的提取工艺并进行验证。结果:最优提取工艺为药材加12倍量水提取2次,每次1h;3次工艺验证试验中金丝桃苷平均含量为4.129 μg/g(RSD=1.81%,n=3)。结论:优化工艺稳定、可行,可为清解雾化液的工艺及质量标准的建立提供依据。

关键词 清解雾化液;提取工艺;正交试验;金丝桃苷

Optimization of the Extraction Technology of Qingjie Atomized Liquid by Orthogonal Test

CHEN Shaoping¹, MO Xiaolin², CHEN Xiaoming², WEI Zhenyuan²(1.The Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China; 2.The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Qingjie atomized liquid. METHODS: The extraction technology of Qingjie atomized liquid was optimized by orthogonal test with hyperoside content as index, using the amount of added water, extraction time and extraction times as factors, and the verification test was conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 12-folds water, extracting for 2 times and 1 hour each time. The content of hyperoside was 4.129 μg/g in 3 validation tests (RSD=1.81%, n=3). CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is stable and practical, and can provide reference for the formulation of technology and quality standard for Qingjie atomized liquid.

KEYWORDS Qingjie atomized liquid; Extraction technology; Orthogonal test; Hyperoside

清解雾化液处方源于广西壮乡民间,由广西中医药大学第一附属医院儿科李伟伟主任医师挖掘整理而成。该药以喷雾方式给药,在儿科临床用于治疗呼吸道感染性疾病十多年,疗效确切。该药主要由千里光、岗梅根、一点红、桑叶组成,具

有疏风清热、解毒利咽的功效^[1]。千里光为菊科植物 *Senecio scandens* Buch.-Ham.的干燥地上部分^[2],味苦、辛,性寒,可清热解毒、明目、利湿,用于痈肿疮毒、感冒发热、目赤肿痛、泄泻痢疾、皮肤湿疹等证。药理研究表明,千里光抗菌止痒有效部位

低^[7]。笔者在本试验过程中考察高温对蟾皮提取物固体脂质纳米粒稳定性的影响时发现,放置3d时固体纳米粒就已经产生絮凝,并有变色等现象。究其原因,可能是本制剂选用的油相为大豆卵磷脂,其结构中的双键在高温下易发生氧化所致。且相关文献报道,大豆卵磷脂制备的脂质体相变温度大约为50℃^[8]。因此,这可能是纳米粒在高温条件下包封率明显下降的原因。而在低温条件下保存时,纳米粒包封率变化较小,并且无絮凝现象,因此,建议在低温条件下保存蟾皮提取物固体脂质纳米粒^[9]。

参考文献

- [1] 咎日增,胡万杨,黄玉叶,等.干蟾皮中蟾毒内酯类成分的提取工艺研究[J].中草药,2011,42(7):1330.
- [2] 严子平,彭国宇,张莉,等.多指标综合评价优选蟾皮脂溶性成分提取工艺[J].解放军药学学报,2012,28(5):400.

*主管中药师。研究方向:医院药学。电话:0771-5802167。E-mail:fhycsp@163.com

#通信作者:副主任中药师。研究方向:制剂开发和质量标准。电话:0771-5645433。E-mail:moxiaolin@163.com

- [3] Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drug[J]. *Int J Pharm*, 2002, 242(1):121.
- [4] 艾颖娟,王东,代英辉,等. HPLC法测定蟾皮中蟾毒配基类成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(4):290.
- [5] 刘少彬,胡海洋,赵秀丽,等. 长春西汀固体脂质纳米粒的制备及其性质考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(5):335.
- [6] 丁立新,杨珊珊,张楠楠. 毛蕊花苷固体脂质纳米粒的处方优选及其质量评价[J]. 中国药房, 2014, 25(3):231.
- [7] 甘良春. 载带不同性质药物的 PLGA 纳米粒成型质量与规律的探讨[D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [8] 穆筱梅,钟振声,夏志伟,等. 大豆卵磷脂脂质体制备的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(3):451.
- [9] 杨鹏波,张华. 脂质体的研究新进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 39(7):936.

(收稿日期:2015-07-16 修回日期:2015-12-24)
(编辑:刘萍)

主要含黄酮类和酚酸类成分^[3-4];而金丝桃苷是其中最主要的黄酮类成分^[5],具有抗炎、抗菌、抗急性肝损伤、抗癌等显著的药理活性^[6-7]。本试验以金丝桃苷含量为考察指标,采用正交试验法优选清解雾化液的最优工艺,为清解雾化液的制备提供依据。

1 材料

1.1 仪器

DGU-20A5型高效液相色谱仪、SPD-20A型紫外检测器(日本岛津公司);GH-252型电子分析天平(广州市艾安得仪器有限公司);CD-UPT-II-10L型超纯水制造系统(成都越纯科技有限公司);KQ3200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-W420型数显三用恒温水箱(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

千里光(批号:1202014)、桑叶(批号:1204033)、岗梅根(批号:121115)、一点红(批号:1203164)均购自广西万宝堂药业有限公司,经广西中医药大学第一附属医院龚敏阳副主任药师鉴定分别为菊科植物千里光 *Senecio scandens* Buch.-Ham. 的干燥地上部分、桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶、冬青科植物梅叶冬青 *Ilex asprella* (Hook.f.et Arn) Champ.ex Benth. 的干燥根、菊科植物一点红 *Emilia sonchifolia* (L.) DC 的干燥全草,且经检验,以上饮片均为符合2010年版《中国药典》(一部)规定的合格饮片;金丝桃苷对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-11122003,纯度:≥98%);甲醇、乙腈、醋酸均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取金丝桃苷对照品1.641 mg,加甲醇溶解并定容至25 ml;精密量取1 ml,加甲醇定容至25 ml量瓶中,用0.45 μm微孔滤膜过滤,即得质量浓度为2.625 μg/ml的金丝桃苷对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取正交试验中的煎煮液,药液浓缩至相对密度为1.3左右;加95%乙醇至含醇量达65%,边加边搅拌,冷藏24 h,滤过,滤液回收乙醇,药液浓缩至相对密度为1.35左右;加95%乙醇至含醇量达80%,加40% NaOH调pH为7,边加边搅拌,冷藏24 h,过滤,滤液回收乙醇;药液驱尽醇味,加纯化水定容至500 ml,备用。精密量取10 ml,置于分液漏斗内,用乙酸乙酯萃取3次(40、30、30 ml),合并乙酸乙酯层,挥干,冷却后残渣加甲醇并定容至10 ml,用0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.1.3 阴性对照溶液 按处方取除千里光外的其余药材,制备成缺千里光的提取液,按“2.1.2”项下方法制成阴性对照溶液,即得。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[8] 色谱柱:WondaSil C₁₈ Superb(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%醋酸(18:82),流速:1.0 ml/min;检测波长:358 nm;柱温35℃;进样量:20 μl。结果表明,在此色谱条件下,金丝桃苷与相邻色谱峰的分度大于2,理论板数按金丝桃苷峰计不少于5 000,且阴性对照无干扰。

2.2.2 线性关系考察 分别精密量取金丝桃苷对照品溶液

0.2、1.0、2.0、3.0、4.0 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液,进样。以金丝桃苷质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=23\ 210x-264.27$ ($r=0.999\ 8$, $n=5$)。结果表明,金丝桃苷检测质量浓度线性范围为0.105~2.625 μg/ml。

2.2.3 精密度的试验 取对照品溶液重复进样6次,计算金丝桃苷峰面积的RSD为1.3%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取正交试验9号供试品溶液,在室温下放置0、4、8、22、24 h后分别进样。结果供试品溶液在24 h内峰面积值几乎无变化,RSD=1.6%($n=5$),表明该溶液在室温条件下24 h内稳定。

2.2.5 重复性试验 取同一批样品,平行制备5份供试品溶液,分别进样,测定峰面积,计算金丝桃苷的平均含量为4.050 μg/g(RSD=1.31%, $n=5$),表明本法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密吸取已知含量的同一批提取液2.0 ml,共6份,分别精密加入质量浓度为2.625 μg/ml的金丝桃苷对照品溶液1 ml,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果平均加样回收率为98.4%(RSD=1.3%, $n=6$),表明本方法准确度好。

2.3 单因素试验

2.3.1 加水量的考察 精密称取处方量的千里光、岗梅根、桑叶、一点红共27.2 g,共5份,分别加6、8、10、12、14倍量水,煎煮提取2次,每次1 h,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定金丝桃苷含量。结果表明,加水量大于10倍后,金丝桃苷含量趋于稳定,故选择8倍、10倍、12倍量水作为正交试验中加水量的3个考察水平。加水量对金丝桃苷含量的影响见图1A。

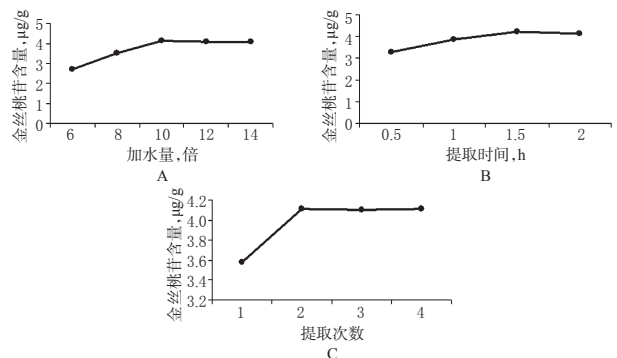


图1 各因素对金丝桃苷含量的影响

A.加水量;B.提取时间;C.提取次数

Fig 1 Effects of each factors on the content of hyperoside

A. the amount of added water; B. extraction time; C. extraction times

2.3.2 提取时间的考察 精密称取处方量的千里光、岗梅根、桑叶、一点红共27.2 g,共4份,分别加12倍量水,煎煮提取2次,每次分别为0.5、1、1.5、2 h,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定金丝桃苷含量。结果表明,提取时间对金丝桃苷含量有较大影响,金丝桃苷含量随提取时间的延长而增加,并在1.5 h达到最大值,之后金丝桃苷含量略有降低。故选择0.5、1、1.5 h作为正交试验中提取时间的3个考察水平。提取时间对金丝桃苷含量的影响见图1B。

2.3.3 提取次数的考察 精密称取组方量的千里光、岗梅根、桑叶、一点红共27.2 g,共5份,加12倍量水,分别煎煮提取1、2、3、4次,每次1 h,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,测定

金丝桃苷含量。结果表明,随着提取次数的增加,金丝桃苷含量增加;提取2次后,含量趋于平稳且提取趋于完全。为充分提取药材中有效成分,又兼顾考工业成本,选择1、2、3次作为正交试验中提取次数的3个考察水平。提取次数对金丝桃苷含量的影响见图1C。

2.4 正交试验

以单因素试验结果为基础,采用水提法,选择加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,以金丝桃苷含量为考察指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水量),倍	B(提取时间),h	C(提取次数)
1	8	0.5	1
2	10	1	2
3	12	1.5	3

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	D(空白)	金丝桃苷含量, $\mu\text{g/g}$
1	1	1	1	1	1.090
2	1	2	2	2	1.228
3	1	3	3	3	1.579
4	2	1	2	3	3.083
5	2	2	3	1	2.682
6	2	3	1	2	1.362
7	3	1	3	2	2.086
8	3	2	1	3	3.097
9	3	3	2	1	4.333
K_1	1.299	2.086	1.850	2.702	
K_2	2.376	2.336	2.881	1.559	
K_3	3.172	2.425	2.116	2.586	
R	1.873	0.339	1.031	1.143	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	5.301	2	2.651	28.654	<0.05
B	0.185	2	0.093	1	
C	1.721	2	0.861	9.303	
误差	0.18	2	0.09		

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

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

根据各因素的极差值(R)显示,影响清解雾化液提取效果的因素顺序为 $A>C>B$,即加水量>提取次数>提取时间。其中因素A对试验结果有显著性影响($P<0.05$),因素B与C对试验结果影响较小。结合制备生产实际中滤过残留、溶剂回收、工艺成本、节约时间等因素,最终确定最优工艺为 $A_3B_2C_2$,即加水量为药材量的12倍,提取2次,每次1h。

2.5 验证试验

根据处方量分别称取千里光、岗梅根、桑叶、一点红共27.2g,按照最优工艺条件提取3次进行验证试验,测定提取液中金丝桃苷的含量。结果金丝桃苷平均含量为4.129 $\mu\text{g/g}$

($RSD=1.81\%, n=3$),且接近正交试验结果的最高值(4.333 $\mu\text{g/g}$),表明该工艺条件稳定、可行。

3 讨论

金丝桃苷为黄酮醇苷类化合物,在260nm及360nm左右波长下有最大吸收。本试验选择358nm为检测波长,以尽可能地排除提取物中其他杂质的干扰,且试验表明得到的金丝桃苷色谱峰与其他杂质峰分离度良好。

为对色谱条件进行优化,笔者在预试验中分别考察了流动相分别为甲醇-水、乙腈-磷酸、乙腈-0.2%冰醋酸、乙腈-0.5%醋酸、乙腈-1.0%冰醋酸及其不同比例下的分离结果。结果显示,乙腈-0.2%醋酸(18:82)为流动相时金丝桃苷分离效果最好。故本试验选取此为流动相对样品进行分析。

供试品溶液的制备曾参考文献[9-10]采用了超声提取的方法以节约提取时间,即将药液蒸干,分别加入甲醇、乙醇、正丁醇超声提取30min,冷却后过滤,挥干,加甲醇定容。但以上方法均不能很好地分离金丝桃苷,故最终未采用超声提取法制备供试品溶液。

实际生产中,提取液浓缩至相对密度约为1.3~1.35时,提取液体积接近理论所需体积,且节约能源,生产效率较高,能较好地控制提取液受热时间。故选择将提取液浓缩至相对密度为1.3~1.35,再稀释至理论值。

本文通过正交试验优选出清解雾化液的提取条件,所得提取条件具有操作简单、提取率较高、便于进行大生产的特点,可为该药的工艺及质量标准的建立提供依据。

参考文献

- [1] 莫小林,李伟伟,申燕燕,等.壮药清解雾化液的制备与治疗天行赤眼的疗效观察[J].广西中医药,2012,35(1):39.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:32.
- [3] 张文平,陈惠群,张文书,等.千里光总黄酮的抗炎作用研究[J].时珍国医国药,2008,19(3):605.
- [4] 孟凡君,张雪君,谢卫东.中草药千里光研究进展[J].东北农业大学学报,2010,41(9):156.
- [5] 陈录新,马鸿雁,张勉.千里光化学成分研究[J].中国中药杂志,2006,31(22):1872.
- [6] 林萍,易宏伟,张斐.金丝桃苷药理作用研究进展[J].中国现代中药,2012,14(10):23.
- [7] 李锦松,陈剑鸿,孟民杰.金丝桃苷药理作用及其作用机制的研究进展[J].广东药学院学报,2015,31(2):269.
- [8] 熊爱珍,杨莉,杨雪晶,等.RP-HPLC法测定千里光药材中金丝桃苷的含量[J].药物分析杂志,2010,30(5):936.
- [9] 李卓恒,孟德胜,卢来春,等.正交试验优选莛叶金丝桃中金丝桃苷的乙醇提取工艺[J].中国药房,2011,22(11):992.
- [10] 张治蓉,黄勇,郑林,等.正交试验优选莛叶软胶囊中莛草和山楂叶的提取工艺[J].中国药房,2012,23(35):3297.

(收稿日期:2015-06-01 修回日期:2015-10-21)

(编辑:刘萍)