

正交试验优化白术配方颗粒的索氏提取工艺^Δ

李功华^{1*}, 李洪玉², 费莹³, 寿旦^{2#}(1.浙江省立同德医院药学部, 杭州 310012; 2.浙江省中医药研究院中药研究中心, 杭州 310007; 3.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0964-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.29

摘要 目的:优化白术药材的索氏提取工艺,为其配方颗粒的研制提供依据。方法:以白术内酯 I、II、III 的含量为指标,在单因素试验基础上,以提取时间、料液比、提取次数为因素,采用 L₉(3⁴) 正交试验,优化及验证白术配方颗粒的索氏提取工艺并与其他 3 种工艺(常温浸提法、超声提取法、回流提取法)进行比较。结果:优化的提取工艺为用 6 倍药材量乙醇提取 3 次,共提取 8 h;验证试验结果显示,白术内酯 3 次提取量分别为 0.769、0.752、0.781 mg/g(RSD=1.99%, n=3),均高于其他 3 种方法的提取量(0.683、0.489、0.693 mg/g)。结论:优化后的提取方法对白术内酯 I、II、III 的提取效率较高,可用于配方颗粒制备时白术中内酯成分的提取。
关键词 白术;白术内酯;索氏提取;工艺优化;正交试验

Optimization of the Soxhlet Extraction Technology of *Atractylodes macrocephala* Formula Granules by Orthogonal Test

LI Gonghua¹, LI Hongyu², FEI Ying³, SHOU Dan²(1.Dept. of Pharmacy, Zhejiang Provincial Tongde Hospital, Hangzhou 310012, China; 2.TCM Research Center, Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China; 3. School of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the soxhlet extraction technology of *Atractylodes macrocephalae*, and to provide evidence for research and preparation of its formula granules. METHODS: Using the contents of atractylenolide I, II, III as index, based on single factor test, the Soxhlet extraction technology of *A. macrocephalae* formula granules was optimized and verified by L₉(3⁴) orthogonal test with extraction time, solid-liquid ratio, extraction times as factors, and then compared with other technologies (normal temperature extraction method, ultrasonic extraction method, reflux extraction method). RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 6-fold ethanol, extracting for 3 times, lasting for 8 h. Results of validation test showed that the extraction amounts of atractylenolide were 0.769, 0.752, 0.781 mg/g (RSD=1.99%, n=3) for 3 times, which were higher than the extraction amounts of other 3 methods (0.683, 0.489, 0.693 mg/g). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology possesses high extraction rates of atractylenolide I, II, III, and can be used for the extraction of internal ether from *A. macrocephalae* formula granules.

KEYWORDS *Atractylodes macrocephalae*; Atractylenolide; Soxhlet extraction; Technology optimization; Orthogonal test

白术为菊科植物白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)的干燥根茎,味苦,性甘、温,归脾、胃经,具健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎之功效^[1]。白术属于脾胃病常用药,临床广泛应用于治疗便秘、泄泻等症^[2]。白术内酯 I、II、III 既是白术的特征性成分,也是白术的主要活性成分,其通常作为评价白术饮片及配方颗粒质量的重要指标^[3-4]。中药配方颗粒是在中医药理论指导下,以炮制加工的中药饮片为原料,经现代化科学提取、浓缩、干燥、制粒等工序精制而成的粉末或颗粒状制剂,具有免煎易服、安全有效、携带方便等优点^[5]。

由于白术中白术内酯 I 和 III 含量较低,性质不稳定,该类成分的提取常采用水蒸气蒸馏法、乙醇加热回流法、CO₂超临界萃取法和索氏提取法等^[6-9],其中索氏提取工艺在工业化的中药浸膏提取中具有广阔的应用

前景^[10]。为了充分提取白术饮片的有效成分,笔者先采用单因素试验筛选白术中白术内酯类成分的提取方式,建立白术中 3 种内酯成分的高效液相色谱(HPLC)定量测定方法,再采用正交试验对白术索氏提取工艺进行优化^[9],期望为进一步开展白术内酯的药理研究及白术配方颗粒的工业化开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC20A-VP HPLC 仪、SPD-M20A 二极管阵列检测器、SIL-20A 自动进样器(日本岛津有限公司);BS210S 电子天平(德国赛多利斯有限公司);索氏提取器(中国科学技术大学玻璃仪器厂)。

1.2 药材、对照品与试剂

白术(华东医药股份有限公司,批号:20151024,经浙江省立同德医院药学部余平副主任中药师鉴定为菊科植物白术);白术内酯 I(批号: MUST-14012005,纯度: >98%)、白术内酯 II(批号: MUST-11122211,纯度: >98%)均购自北京恒元启天化工技术研究院;白术内酯 III(浙江省中医药研究院中药研究中心,批号:

Δ 基金项目:浙江省中医药科技计划项目(No.2016ZB008)

* 副主任药师。研究方向:药物制剂。E-mail: ligonghua88@163.com

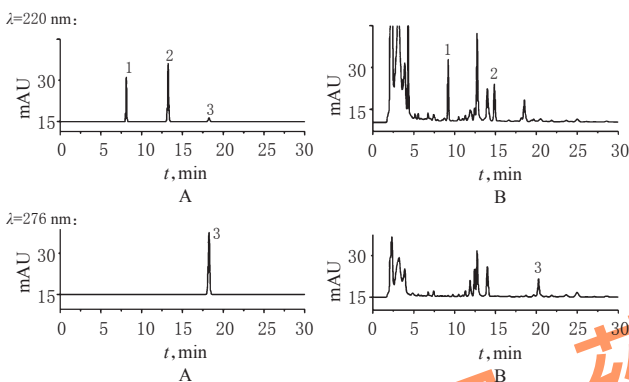
通信作者:研究员,博士。研究方向:中药制剂开发与研究。E-mail: shoudanok@163.com

20150316,纯度:>98%);甲醇、乙腈均为色谱纯,乙醇为药用级,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性考察

色谱柱:SHISEIDO CAPCELLPAK C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~16 min,60%A~70%A;16~18 min,70%A~65%A;18~30 min,65%A);柱温:30℃;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;检测波长:白术内酯 I、III 均为 220 nm,白术内酯 II 为 276 nm。取“2.2”项下 3 种对照品和供试品溶液(正交试验 7 号)进样分析,结果在该系统条件下各峰分离度良好,3 种内酯成分的分度均大于 1.5,理论板数以 3 种成分计均大于 3 000,系统适用性良好。色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 白术内酯 III; 2. 白术内酯 I; 3. 白术内酯 II
A. substance control; B. test sample; 1. atractylenolide III; 2. atractylenolide I; 3. atractylenolide II

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取白术内酯 I、II、III 对照品各 10.0 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 摇匀, 制成对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取白术粗粉 10 g, 放在滤纸包内, 置于索氏提取器中, 提取器下端与盛有提取溶剂的圆底烧瓶相连接, 上接回流冷凝管。85℃ 恒温水浴加热, 从开始出现虹吸计时, 提取结束后停止加热, 放冷, 取出提取液。按优化后的提取方法重复提取, 合并提取液, 置于 250 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 即得不同条件的索氏提取溶液。取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 得供试品溶液。

2.3 线性关系考察

将白术内酯 I、II、III 对照品溶液依次稀释制备成 5 个质量浓度梯度溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以进样量(ng)为 x 轴、峰面积为 y 轴, 分别绘制标准曲线并得出线性方程。结果表明, 白术内酯 I、II、III 的峰面积在线性范围内与进样量呈良好的线性关系。线性关系考察结果见表 1。

2.4 含量测定方法学考察

2.4.1 精密度试验 取“2.2.2”项下同一供试品溶液, 连

续重复进样 6 次, 测定峰面积。结果, 白术内酯 I、II、III 峰面积的 RSD 分别为 1.02%、1.31%、0.97% (n=6), 表明仪器精密度良好。

表 1 3 种成分线性关系考察结果

Tab 1 Results of linear relationship of 3 components

成分	回归方程	r	进样量线性范围, ng	定量限, ng
白术内酯 I	y=37 568x+20 959	0.999 8	66.5~1 330.0	66.5
白术内酯 II	y=49 933x+40 997	1.000 0	52.6~420.7	52.6
白术内酯 III	y=25 274x-23 377	0.999 9	101.0~3 030.0	101.0

2.4.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下同一供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样, 测定峰面积。结果, 白术内酯 I、II、III 峰面积的 RSD 分别为 1.14%、1.03%、1.22% (n=6), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取白术粗粉 6 份, 每份 10 g, 按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液, 进样, 测定峰面积。结果, 白术内酯 I、II、III 峰面积的 RSD 分别为 1.64%、1.26%、0.99% (n=6), 表明方法重复性良好。

2.4.4 加样回收试验 取白术粗粉 9 份, 每份 10 g, 按照高、中、低比例, 分别精密加入白术内酯 I、II、III 对照品, 按“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液, 进样, 测定峰面积, 计算含量及加样回收率。结果, 白术内酯 I、II、III 的平均加样回收率分别为 99.76%、100.08%、98.81% (RSD 分别为 1.06%、1.67%、1.58%, n=9)。

2.5 白术内酯 I、II、III 索氏提取工艺的优化

2.5.1 单因素试验 以提取液中白术内酯 I、II、III 的含量为评价指标, 考察单因素对提取率的影响。精密称取白术饮片粗粉 10 g, 按照“2.2.2”项下制备方法, 分别设计料液比 1:6、1:8、1:10、1:12, 提取总时间(即回流提取加热时间)4、6、8、10 h, 提取次数 1、2、3、4 次 4 个水平的单因素试验条件, 测定提取液中白术内酯 I、II、III 的含量, 得出各因素的最优范围。

单因素试验结果显示, 白术内酯 I、II、III 的提取率随料液比的增大, 有效成分提取率呈升高趋势; 当料液比达到 1:12 时, 白术内酯 III 有下降趋势, 白术内酯 I、II 增加不明显。在考察时间内发现, 采用索氏提取 8 h 后, 已基本提取完全; 提取次数则以 3 次为宜。

2.5.2 正交试验 (1) 因素与水平设计。在单因素试验基础上, 确定提取时间(A, h)、料液比(B, 溶剂量)、提取次数(C)3 个因素的 3 个水平。因素与水平见表 2。

表 2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素		
	A	B	C
1	4(1次, 4 h; 2次, 2.2 h; 3次, 1.5, 1.5, 1 h)	6	1
2	6(1次, 6 h; 2次, 3.3 h; 3次, 2.2, 2 h)	8	2
3	8(1次, 8 h; 2次, 4.4 h; 3次, 3.3, 2 h)	10	3

(2) 正交试验方法与结果。精密称取白术粗粉 9 份, 每份 10 g, 放在滤纸包内, 置于索氏提取器中, 按 L₉(3⁴) 正交试验安排进行索氏提取, 提取液过滤, 减压除尽乙醇, 残渣用甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶并定容, 得供试品溶液 1~9 号。测定白术内酯 I、II、III 的含量, 以 3 种

成分的含量总和为指标,进行极差和方差分析。正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D(空白项)	3种内酯总量,mg/g
1	1	1	1	1	0.672
2	1	2	2	2	0.643
3	1	3	3	3	0.622
4	2	1	2	3	0.704
5	2	2	3	1	0.614
6	2	3	1	2	0.600
7	3	1	3	2	0.760
8	3	2	1	3	0.658
9	3	3	2	1	0.633
K_1	6.457	7.120	6.433	6.397	
K_2	6.393	6.383	6.600	6.677	
K_3	6.837	6.183	6.653	6.613	
R	0.444	0.937	0.220	0.280	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F	F临界值	显著性
A	0.345	2	2.674	19.000	无显著性
B	1.460	2	11.318	19.000	无显著性
C	0.079	2	0.612	19.000	无显著性
误差	0.130	2			

从表3极差R值看出,各因素对提取效果的影响大小依次为B>A>C。再结合方差分析,综合考虑提取效率与能耗因素,确定最优提取工艺组合为A₁B₃C₃,即加6倍乙醇,提取3次,提取总时间8h,每次为3、3、2h。

(3)验证试验。精密称取同一批白术粗粉3份,每份100g,放在滤纸包内,按优化的提取方法,进行提取方法验证。经含量测定,3次提取样品中白术内酯含量总和分别为0.769、0.752、0.781 mg/g, RSD=1.99% (n=3),表明本研究所确定的提取工艺稳定、可行。

2.6 不同提取方法的比较

采用以下3种方法^[11]对100g白术药材进行提取效果的比较。常温浸提法:8倍溶剂,常温浸提3d;超声提取法:8倍溶剂,超声提取3次,每次30min;回流提取法:8倍溶剂,提取3次,每次提取时间为3、3、2h。将各提取方法所得产品含量测定结果与“2.5”项结果比较,提示索氏提取法获得的白术内酯含量总和最高。3种方法提取的白术内酯含量结果见表5。

表5 3种方法提取白术内酯的含量结果(n=3)

Tab 5 Results of the contents of atractylenolide by 3 kinds of methods(n=3)

提取方法	白术内酯Ⅰ,mg/g	白术内酯Ⅱ,mg/g	白术内酯Ⅲ,mg/g	内酯总量,mg/g
常温浸提法	0.141	0.182	0.360	0.683
超声提取法	0.123	0.165	0.201	0.489
回流提取法	0.150	0.179	0.364	0.693

3 讨论

索氏提取法利用溶剂回流和虹吸原理,使固体中的可溶物富集到烧瓶内,同时蒸气通过导气管上升,被冷凝为液体滴入提取器中,从而实现使固体物质每次都能

被纯净的溶剂所萃取,故具有萃取效率高、提取杂质少等优点,尤其适用于小分子、低沸点、受热不稳定成分的提取^[12]。

前期研究中,笔者按照浸提法和超声提取法提取白术内酯,结果提示,索氏提取法提取效率最高,因而最终采用索氏提取法作为白术的提取方法进行进一步的提取方法优化。

笔者前期曾对不同种类的提取溶剂(甲醇、75%乙醇、乙酸乙酯、石油醚)进行考察,结果提示,75%乙醇、乙酸乙酯、石油醚等溶剂提取的样品内酯含量低、样品色谱分析峰形差;而甲醇与乙醇提取的样品中白术内酯含量最高、各峰分离完全。考虑后续药效实验及实际生产安全性,选择乙醇为提取溶剂。

有研究表明,白术内酯Ⅰ和白术内酯Ⅲ结构不稳定,受热易转化^[13],而本研究采用索氏提取法可有效成分在高温下损失。另外,所筛选的最优提取工艺,与浸提法、超声提取法及回流提取方法比较,提取率高,并适合大规模工业化中药配方颗粒的提取生产。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103-104.
- [2] 段启,许冬谨,刘传祥,等.白术的研究进展[J].中草药,2008,39(5):附4-6.
- [3] 杨娥,钟艳梅,冯毅凡.白术化学成分和药理作用的研究进展[J].广东药学院学报,2012,28(2):218-221.
- [4] 寿旦,俞忠明,章建民.白术高效液相色谱指纹图谱的建立及种源差异分析[J].中华中医药杂志,2010,25(3):466-469.
- [5] 涂瑶生,罗文汇,毕晓黎.白术与麸炒白术配方颗粒的红外光谱研究[J].中药新药与临床药理,2013,24(5):493-495.
- [6] 王芳.白术内酯Ⅲ提取工艺研究[J].陕西教育学院学报,2008,24(3):56-58.
- [7] 王峰,蔡光明,刘军,等.正交试验法优选白术挥发油提取工艺[J].解放军药学报,2009,25(4):311-313.
- [8] 吴素香,吕圭源,李万里,等.白术超临界CO₂萃取工艺及萃取物的化学成分研究[J].中成药,2005,27(8):885-887.
- [9] 卫修来,陈镇,夏泉,等.索氏提取法提取白术内酯Ⅰ的工艺研究[J].时珍国医国药,2009,20(6):1427-1430.
- [10] 李国名,郑彦慧,乔赛男.索氏提取浓缩机组在中药浸膏生产中的应用[J].中国医药工业杂志,2013,44(8):810-813.
- [11] 阎克里,朱秀卿,赵丽.白术挥发油提取方法研究[J].中国药物与临床,2011,11(7):763-767.
- [12] 李熙灿,黄坤旺,赖丙异,等.矿石甲壳类硬质中药索氏提取法的改进[J].中国药房,2007,18(30):2349-2352.
- [13] 梁志远,甘秀海,吴坤,等.正交试验优选白术中白术内酯Ⅰ和白术内酯Ⅲ提取工艺[J].中成药,2015,37(6):1356-1359.

(收稿日期:2016-06-22 修回日期:2016-08-26)

(编辑:刘萍)