

## 正交试验优化天舒胶囊超声波提取工艺<sup>△</sup>

伏东宁<sup>1\*</sup>,李祥永<sup>1</sup>,王振中<sup>2</sup>,吴建雄<sup>2</sup>,倪彩莉<sup>3</sup>(1.连云港市中医院药学部,江苏连云港 222004;2.江苏康缘药业股份有限公司研究院,江苏连云港 222004;3.江西中医药大学中药学院,南昌 330045)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4853-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.26

**摘要** 目的:优化天舒胶囊超声波提取工艺。方法:以天舒胶囊中川芎有效成分阿魏酸、天麻有效成分天麻素的转移率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计试验,考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、超声功率等因素对转移率的影响,优化天舒胶囊超声波提取工艺并进行验证试验。结果:优化的天舒胶囊的超声波提取工艺为8倍量的70%乙醇,在超声功率350 W下提取2次,每次提取1.5 h。验证试验中,阿魏酸和天麻素转移率平均值分别为94.06%、95.02%(RSD分别为0.18%、0.47%, $n=3$ )。结论:优化后的提取工艺方法快速、简单,结果稳定、可行,可用于天舒胶囊中有效成分的提取。

**关键词** 超声波提取;天舒胶囊;正交试验;川芎;天麻;阿魏酸;天麻素;工艺优化;含量测定

### Optimization of Ultrasonic Extraction Technology for Tianshu Capsules by Orthogonal Test

FU Dongning<sup>1</sup>, LI Xiangyong<sup>1</sup>, WANG Zhenzhong<sup>2</sup>, WU Jianxiong<sup>2</sup>, NI Caili<sup>3</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Lianyungang Hospital of TCM, Jiangsu Lianyungang 222004, China; 2.Research Institute, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Jiangsu Lianyungang 222004, China; 3.School of TCM, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330045, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology for Tianshu capsules. METHODS: Using the transfer rate of active ingredient ferulic acid in *Ligusticum chuanxiong* and gastrodin in *Gastrodia elata* of Tianshu capsules as investigation indexes,  $L_9(3^4)$  orthogonal design test was adopted to investigate the effects of ethanol volume fraction, ethanol amount, extraction time and ultrasonic power on the extraction rate. Ultrasonic extraction technology for Tianshu capsules was optimized, and verification test was carried out. RESULTS: The optimized extraction technology for Tianshu capsules was as follow as 8-fold 70% ethanol, extracting twice under 350 W, extracting 1.5 h every time. Results of verification test showed the average transfer rate was 94.06% for ferulic acid (RSD=0.18%,  $n=3$ ) and 95.02% for gastrodin (0.47%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: The optimized technology is rapid, simple, stable and feasible, and can be used for extracting the active ingredients in Tianshu capsules.

**KEYWORDS** Ultrasonic extraction; Tianshu capsules; Orthogonal test; *Ligusticum chuanxiong*; *Gastrodia elata*; Ferulic acid; Gastrodin; Technology optimization; Content determination

天舒胶囊源自金代刘完素《宣明论方》卷二的大川芎方,系由川芎、天麻2味中药加工精制而成的中药制剂。该制剂具有活血化瘀、平肝息风、镇定止痛的功效,用于治疗瘀血阻络或肝阳上亢所致的头痛日久、痛有定处,或头晕肋痛、失眠烦躁等,还可治疗血管神经性头痛等病症<sup>[1-6]</sup>。

超声波提取法是利用超声波辐射压强产生的强烈空化作用、热作用、机械作用、搅拌作用等<sup>[7-9]</sup>多级作用,增大物质分子运动频率和速度,增加溶剂穿透力,从而加速目标成分进入溶剂,促进药材有效成分被提取出的一种提取方法。与常规回流提取法、水蒸气蒸馏法、煎

煮法比较,超声波提取法具有提取效率高、操作温度低、提取时间短、生产成本低等优点,目前应用于单味中药材的提取研究较广泛,适用于多种常用中药材中活性成分的提取<sup>[9]</sup>。本试验在参考文献[10-11]的基础上,采用超声波提取法对简单的复方制剂进行提取,设计正交试验法,考察溶剂乙醇用量及其体积分数、提取时间、超声功率4个因素对天舒胶囊有效成分提取效果的影响,确定其最优超声波提取工艺,旨在为天舒胶囊制剂生产提供可靠的参考数据,且为其他复方制剂的超声波提取工艺提供借鉴。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

WCSJ-10型粗粉碎机(江阴市苏新干燥设备有限公司);DST-50L型聚能式超声波提取机组(上海矩源机械设备有限公司);1200型高效液相色谱(HPLC)仪(美国

<sup>△</sup> 基金项目:国家“重大新药创制”——现代中药创新集群与数字制药技术平台基金资助项目(No.2013ZX09402203)

\* 主任中药师。研究方向:中药制剂研究与开发。电话:0518-85501719。E-mail:908846266@qq.com

Agilent公司);BP211D型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);HWS26型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

## 1.2 药材、对照品与试剂

川芎药材经江苏康缘药业股份有限公司质量部鉴定为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)的干燥根茎(产地:安徽,亳州市国一堂中药饮片有限公司,批号:Y1402007,阿魏酸含量:0.20%);天麻药材经江苏康缘药业股份有限公司质量部鉴定为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎(产地:安徽,亳州市弘惠药业有限公司,批号:Y1308012,天麻素含量:1.21%);阿魏酸对照品(批号:0773-9910,纯度:100%)、天麻素对照品(批号:110807-200205,纯度:100%)均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验方案设计

经预试验发现,天舒处方药材在提取过程中,以溶剂(乙醇)体积分数(A,% )、提取时间(B,h)、超声功率(C,W)、溶剂(乙醇)用量(D,倍)对阿魏酸及天麻素的转移率有较大影响。因此,以这4个因素为考察因素,每个因素选取3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	乙醇体积分数(A),%	提取时间(B),h	超声功率(C),W	乙醇用量(D),倍
1	60	1.0	250	6
2	70	1.5	350	8
3	80	2.0	450	10

### 2.2 超声提取工艺试验

每组称取川芎、天麻药材分别为1 568.392 g,浸泡2 h,按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表各条件进行超声提取2次,合并提取液,过滤,取样,备用。

### 2.3 含量测定及正交试验

2.3.1 对照品溶液的制备 (1)阿魏酸对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品26.90 mg,置于250 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液(质量浓度为107.60  $\mu\text{g/mL}$ )。精密吸取贮备液10 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液(质量浓度为21.52  $\mu\text{g/mL}$ )。(2)天麻素对照品溶液。精密称取60  $^{\circ}\text{C}$ 下减压干燥至恒质量的天麻素对照品43.95 mg,置于250 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液(质量浓度为175.80  $\mu\text{g/mL}$ )。精密吸取贮备液10 mL,置于25 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液(质量浓度为70.32  $\mu\text{g/mL}$ )。

2.3.2 供试品溶液的制备 (1)检测阿魏酸含量供试品

溶液的制备。精密吸取“2.2”项下各样品溶液15 mL,分别置于蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至50 mL量瓶中,摇匀,用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜滤过,取续滤液,即得。(2)检测天麻素含量供试品溶液的制备。精密吸取“2.2”项下各样品溶液15 mL,分别置于蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用甲醇-0.1%磷酸(5:95,  $V/V$ )混合液溶解并定容至50 mL量瓶中,摇匀,用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 色谱条件 (1)阿魏酸。色谱柱:Symmetry  $C_{18}$  (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈-0.1%磷酸(20:80,  $V/V$ );检测波长:322 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。(2)天麻素。色谱柱:Symmetry  $C_{18}$  (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇-0.1%磷酸(3:97,  $V/V$ );检测波长:221 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

取“2.3.1”项下对照品溶液及“2.3.2”项下供试品溶液(正交试验1号的样品)进样分析,色谱图见图1。

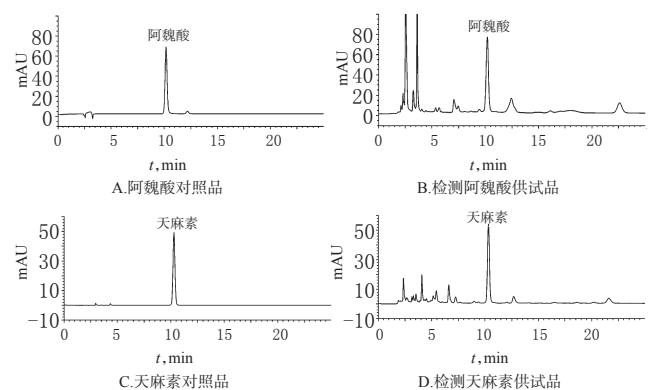


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.4 线性关系考察 (1)阿魏酸。取“2.3.1”项下阿魏酸对照品贮备液,分别精密吸取1、2、4、6、8、10 mL至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别得质量浓度为10.76、21.52、43.04、64.56、86.08、107.60  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,进样,测定峰面积。以对照品质量浓度( $x, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y=51.633x+1.1071$  ( $R^2=0.9999, n=6$ )。结果,阿魏酸检测质量浓度线性范围为10.76~107.60  $\mu\text{g/mL}$ 。(2)天麻素。取“2.3.1”项下天麻素对照品贮备液,分别精密吸取1、2、4、6、8、10 mL至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别得质量浓度为17.58、35.16、70.32、105.48、140.64、175.80  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,进样,测定峰面积。以对照品质量浓度( $x, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y=8.845x+2.1893$  ( $R^2=0.9999, n=6$ )。结果,天麻素检测质量浓度线性范围为17.58~175.80  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密度考察 取阿魏酸对照品溶液(质量浓度为43.04  $\mu\text{g/mL}$ )、天麻素对照品溶液(质量浓度为70.32

μg/mL)连续进样6次,计算峰面积的RSD。结果,阿魏酸、天麻素的峰面积的RSD分别为0.47%、0.87%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取正交试验1号样品制备成供试品溶液,分别于放置0、2、4、8、12 h后进样测定,计算各时间点峰面积的RSD。结果,阿魏酸、天麻素峰面积的RSD分别为1.04%、0.92%( $n=5$ ),表明供试品溶液放置12 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 取正交试验1号样品制备成供试品溶液,平行制备6份,进样测定,计算6份样品中阿魏酸、天麻素的含量及RSD。结果,阿魏酸、天麻素平均含量分别为66.71、96.12 μg/mL, RSD分别为0.64%、0.85%( $n=6$ ),表明试验重复性良好。

2.3.8 准确度考察 取正交试验1号样品(阿魏酸、天麻素的含量分别为66.71、96.12 μg/mL)7.5 mL,分别加入阿魏酸和天麻素对照品贮备液(质量浓度分别为107.60、175.80 μg/mL)5、4 mL,制备成供试品溶液,平行制备6份,测定峰面积。结果,阿魏酸、天麻素的平均加样回收率分别为99.72%、98.21%(RSD分别为1.82%、1.14%, $n=6$ ),表明本法准确度符合要求。

2.3.9 有效成分含量测定及正交试验结果 分别精密吸取各供试品和对照品溶液10 μL进样,测定峰面积,计算各供试品中阿魏酸、天麻素的转移率(阿魏酸转移率=提取液中阿魏酸总量/川芎药材中阿魏酸总量×100%;天麻素转移率=提取液中天麻素总量/天麻药材中天麻素总量×100%),并计算总转移率评分(阿魏酸的转移率/阿魏酸最大转移率×100×0.5+天麻素的转移率/天麻素最大转移率×100×0.5)。正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal test design and results

试验号	因素				阿魏酸转移率, %	天麻素转移率, %	总转移率评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	85.52	81.13	87.27
2	1	2	2	2	95.33	95.64	100
3	1	3	3	3	90.37	93.01	96.02
4	2	1	3	2	92.46	90.95	96.04
5	2	2	1	3	89.69	88.64	93.38
6	2	3	2	1	93.54	94.07	98.24
7	3	1	2	3	84.60	80.13	86.26
8	3	2	3	1	87.22	82.06	88.65
9	3	3	1	2	82.19	79.10	84.46
$K_1$	94.430	89.857	91.387	88.370			
$K_2$	95.887	94.010	93.500	94.833			
$K_3$	86.457	92.907	91.887	93.570			
$R$	9.430	4.153	2.113	6.463			

以总转移率评分为评价指标进行直观分析,由表2可见,各因素影响大小顺序为A>D>B>C,即乙醇体积分数>乙醇用量>提取时间>超声功率;最优工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即药材加8倍量70%乙醇浸泡2 h后,在超声功率350 W下超声1.5 h,提取2次。以离均差平方和最

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	均方差	F	P
A	154.621	2	77.310 5	21.126	<0.05
B	27.770	2	11.385 0	3.794	>0.05
C(误差)	7.319	2	3.659 5	1.000	>0.05
D	70.411	2	35.205 5	9.620	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2)=19.0, F_{0.01}(2,2)=99.0$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.0, F_{0.01}(2,2)=99.0$

小的因素项(C)为误差项进行方差分析,由表3可见,B、D因素对阿魏酸、天麻素两者的总转移率评分无显著性影响,而A因素对阿魏酸、天麻素两者的总转移率评分有显著性影响。

综合总转移率评分、生产成本等多方面考虑,确定超声波提取最优工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,即取天麻、川芎饮片,加8倍量70%乙醇浸泡2 h,以提取功率350 W超声提取2次,每次1.5 h。

## 2.4 工艺验证

称取同一批川芎、天麻药材各3份,其中每份川芎药材1 568 g、天麻药材392 g,按最优提取工艺进行验证,结果见表4。

表4 工艺验证结果

Tab 4 Results of verification test

批次	阿魏酸转移率, %	天麻素转移率, %
1	94.07	94.53
2	94.23	95.10
3	93.89	95.42
平均值	94.06	95.02
RSD, %	0.18	0.47

由表4可见,按照正交试验优化的超声波提取工艺条件进行验证试验后,阿魏酸和天麻素转移率平均值分别为94.06%、95.02%(RSD分别为0.18%、0.47%, $n=3$ ),表明该优化工艺转移率高,结果稳定、可行。

## 3 讨论

在预试验中,笔者曾采用90%乙醇回流提取法进行提取,结果阿魏酸转移率为81.5%,天麻素转移率为85.6%,故采用乙醇超声提取以期进一步提高其转移率。

阿魏酸是川芎中具有代表性的活性成分,可溶于热水、乙醇、乙酸乙酯中,但不耐热,水回流提取工艺下温度太高易被破坏,而且水煎提取液中阿魏酸的含量较低、含糖量较高,不利于后续工艺的处理,所以本试验选择乙醇为提取溶剂。

天麻药材质地坚硬,宜用溶剂将药材浸泡2 h后再进行提取,既可增加有效成分在溶剂中的溶解度,提高提取效果,又可避免长时间提取对有效成分的破坏。

本试验采用正交试验,考察了溶剂(乙醇)体积分数、溶剂(乙醇)用量、提取时间、超声功率4个因素的影响;至于浸泡时间、提取次数、超声频率3个因素及浓缩、干燥对阿魏酸、天麻素含量的影响,将有待进一步研究。

## 参考文献

# 多指标-正交试验优化沙棘叶和沙棘籽中黄酮的提取工艺<sup>Δ</sup>

惠人杰<sup>1\*</sup>, 冯静<sup>1</sup>, 蔺默含<sup>1</sup>, 冯柏年<sup>1,2#</sup>(1.江南大学药学院, 江苏无锡 214122; 2.江苏艾凡生物医药有限公司, 江苏无锡 214122)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4856-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.27

**摘要** 目的:优化沙棘叶和沙棘籽中黄酮的提取工艺。方法:以6种黄酮苷元即儿茶素、芦丁、杨梅素、槲皮素、山柰酚、异鼠李素的提取率总和为指标,以乙醇体积分数、提取时间、提取次数、料液比为考察因素,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)表设计正交试验,分别优化沙棘叶和沙棘籽中黄酮的提取工艺,并进行验证试验。结果:沙棘叶中黄酮的最优提取工艺为乙醇体积分数70%、提取3次、每次提取2.0 h、料液比1:16;沙棘籽中黄酮的最优提取工艺为乙醇体积分数50%、提取3次、每次提取1.5 h、料液比1:24;验证试验中,沙棘叶和沙棘籽中6种黄酮苷元的提取率总和分别为56.4、15.4 mg/g(RSD分别为1.4%、3.4%, n=3)。结论:优化后的提取工艺方法简便、稳定、可行,可用于沙棘叶和沙棘籽中黄酮成分的提取。

**关键词** 沙棘叶;沙棘籽;正交试验;提取工艺;黄酮苷元

## Optimization of Extraction Technology for Flavonoids in Leaves and Seeds of *Hippophae rhamnoides* by Multiindex-Orthogonal Test

HUI Renjie<sup>1</sup>, FENG Jing<sup>1</sup>, LIN Mohan<sup>1</sup>, FENG Bainian<sup>1,2</sup>(1.School of Pharmacy, Jiangnan University, Jiangsu Wuxi 214122, China; 2.Jiangsu Alpha Biopharmaceuticals Co. Ltd., Jiangsu Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology for flavonoids in leaves and seeds of *Hippophae rhamnoides*. METHODS: Using the total extraction rate of 6 flavonoid aglycones (catechins, rutin, myricetin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin) as index, ethanol volume fraction, extraction time, extraction times, material-lipid ratio as investigation indexes, L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was designed to optimize the extraction technology of flavonoids in leaves and seeds of *H. rhamnoides*, and verification test was carried out. RESULTS: The optimum extraction technology for flavonoids in leaves of *H. rhamnoides* was ethanol volume fraction of 70%, extracting for 3 times with material-lipid ratio of 1:16, and 2.0 h each time; and that of seeds was ethanol volume fraction of 50%, extracting for 3 times with material-lipid ratio of 1:24, and 1.5 h each time. In verification test, the total extraction rate of 6 flavonoid aglycones was 56.4 mg/g in the leaves (RSD=1.4%, n=3) and 15.4 mg/g in the seeds (RSD=3.4%, n=3). CONCLUSIONS: Optimized extraction technology is simple, stable, feasible, and can be used for extracting the flavonoids in leaves and seeds of *H. rhamnoides*.

**KEY WORDS** Leaves of *Hippophae rhamnoides*; Seeds of *Hippophae rhamnoides*; Orthogonal test; Extraction technology; Flavonoid aglycone

- [1] 江苏新医学院.中药大辞典:上册[M].上海:上海科学技术出版社,1985:221.
- [2] 李秋怡, 干国平, 刘焱文.川芎的化学成分及药理研究进展[J].时珍国医国药, 2006, 17(7): 1298-1299.
- [3] 陶云海.天麻药理研究新进展[J].中国中药杂志, 2008, 33(1): 108-110.
- [4] 于颖, 樊光辉.天麻素的临床应用研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(9): 1117-1118.
- [5] 刘旭, 徐江平, 程艳芹, 等.基于谱效关系表达的中药川芎药效物质筛选[J].中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1969-1973.
- [6] 肖庆华.中药药对大全[M].北京:中国中医药出版社, 1996:253.
- [7] 曹建华, 李光辉, 张敏.超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺优化[J].中国药房, 2015, 26(31): 4426-4428.
- [8] 廖维良, 赵美顺, 杨红.超声波辅助提取技术研究进展[J].广东药学院学报, 2012, 28(3): 347-349.
- [9] 马亚琴, 叶兴乾, 吴厚玖, 等.超声波辅助提取植物活性成分的研究进展[J].食品科学, 2010, 31(21): 459-462.
- [10] 杨广德, 梁明金, 贺浪冲, 等.川芎中阿魏酸的提取方法研究[J].中成药, 2002, 24(6): 418-420.
- [11] 郑秀艳, 邓青芳, 陈国华, 等.天麻中天麻素的提取工艺优化[J].贵州农业科学, 2013, 41(12): 163-166.

<sup>Δ</sup>基金项目:江苏省自然科学基金青年基金项目(No.BK20140136); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(No.PPZY2015B146)

\* 副教授, 博士。研究方向:药物分析。E-mail: huiranjie@jiangnan.edu.cn

# 通信作者:教授, 博士生导师, 博士。研究方向:药物化学、药物分析。E-mail: fengbainian@jiangnan.edu.cn

(收稿日期:2017-05-09 修回日期:2017-08-29)  
(编辑:刘 萍)