

正交试验优选杜仲叶绿原酸的提取工艺

王柏强^{1,2*}, 刘福^{1,2#}, 江承平^{1,2}, 何效平¹, 曾芝兰¹(1.川北医学院附属医院药剂科, 四川南充 637000; 2.川北医学院药学院, 四川南充 637000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2527-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.10

摘要 目的: 优选杜仲叶绿原酸的提取工艺。方法: 采用单因素试验考察酶解pH、酶解时间、酶解温度、酶用量、固液比、超声时间、超声提取温度对绿原酸提取率的影响。以绿原酸提取率为指标, 以超声提取时间、固液比、酶解温度和酶用量为考察因素, 采用正交试验优选杜仲叶绿原酸的提取工艺。结果: 优选工艺为提取时间40 min, 固液比1:15(g/ml), 酶解温度45℃, 酶用量20 mg, 绿原酸提取率为2.37%。结论: 优选的工艺合理、可行, 具有提取率高、节能等优点, 可为工业化生产提供参考。

关键词 超声联合酶法; 杜仲叶; 绿原酸; 正交试验

Extraction Technology of Chlorogenic Acid from *Eucommia ulmoides* by Orthogonal Test

WANG Bai-qiang^{1,2}, LIU Fu^{1,2}, JIANG Cheng-ping^{1,2}, HE Xiao-ping¹, ZENG Zhi-lan¹(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China; 2.Pharmacy College, North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of chlorogenic acid in *Eucommiae ulmoides*. METHODS: The single factor test was used to investigate the effects of pH, time, temperature and amount of enzymolysis, ratio of solid to liquid, ultrasonic time and ultrasonic extraction temperature on extraction rate of chlorogenic acid. The extraction technology was optimized by orthogonal test with the extraction rate of chlorogenic acid as index using ultrasonic extraction time, ratio of solid to liquid, enzymatic temperature and enzymatic amount as factors. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: extracting time 40 min, ratio of solid to liquid was 1:15(g/ml), enzymatic temperature 45℃, enzymatic amount 20 mg. The extraction rate of chlorogenic acid was 2.37%. CONCLUSIONS: The optimized process is reasonable and feasible, which can enhance extract-efficiency and energy-saving. It provides reference for industrial production.

KEYWORDS Ultrasound combined with enzymic method; *Eucommiae ulmoides*; Chlorogenic acid; Orthogonal test

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是我国特有的名贵中药材,传统用药以皮为主,但剥皮后树体容易死亡。现代研究表明,杜仲叶与皮所含化学成分基本相同^[1],且叶中部分有效成分比皮还要高^[2]。杜仲叶具有补肝肾、强筋骨的作用,用于治疗肝肾不足、头晕目眩、腰膝酸痛、筋骨痿软等证^[3]。本研究在众多理论上,采用超声联合纤维素酶法提取杜仲叶绿原酸,通过正交试验确定最优提取工艺。因杜仲叶中的有效成分主要存在于细胞壁包被的叶细胞内^[4],故首先用纤维素酶水解杜仲叶细胞壁,再联合超声辅助提取法对杜仲叶绿原酸进行高效提取,最大限度地利用杜仲叶资源,为其工业化生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

10 A型高效液相色谱仪,包括SPD-10A型紫外检测器(日本岛津公司);SHZ-D III型循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);PHS-SB型pH计(成都瑞驰分析控制仪器有限公司);760型CRT双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司);TP-114型电子分析天平(德国赛多利斯公司);

* 主管药师。研究方向:药物制剂。电话:0817-2262244。E-mail: 31618187@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0817-2262246。E-mail: nclf91@163.com

SB-25-12DT型超声波提取器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药材

杜仲叶,购自重庆医药公司,经川北医学院药学院李生茂讲师鉴定为真品。

1.3 试剂

纤维素酶(上海伯奥生物科技有限公司,活性:≥15 U/mg);绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0753-200111);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 绿原酸含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Hypersic C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:327 nm;柱温:室温。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的绿原酸对照品13 mg,置100 ml量瓶中,以50%甲醇溶解并定容至刻度,即得0.13 mg/ml对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 准确称取杜仲叶粉末10 g,加入pH4 NaAc-HAc缓冲液120 ml,纤维素酶20 mg,置40℃水浴中酶解30 min后再于50℃超声提取30 min,滤过,精密吸取滤液0.5 ml,置10 ml量瓶中,以50%甲醇稀释并定容至刻度,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.1.4 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液1、3、5、8、10 ml,置10 ml量瓶中,以50%甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=31\ 860c+27\ 633$ ($r=0.999\ 9$, $n=5$)。结果表明,绿原酸质量浓度在1.3~130 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2 不同提取方法比较^[5-8]

准确称取杜仲叶粉末10 g,采用不同溶剂、不同提取方法进行考察。采用乙醇超声提取法和超声纤维素酶法所得的绿原酸提取率相对较高,但乙醇超声提取需要有机溶剂,生产成本高;而采用超声纤维素酶法提取,更节省能源,更适合工业化生产。不同提取方法比较结果见表1。

表1 不同提取方法比较($n=3$)

Tab 1 Comparison of different extraction methods($n=3$)

提取方法	绿原酸提取率, %	干膏收率, %
冷浸法	0.94	2.0
水回流法	1.83	17.8
乙醇回流法	2.07	14.7
水超声提取法	1.90	15.1
乙醇超声提取法	2.34	13.8
超声纤维素酶法	2.38	14.4

2.3 单因素试验

2.3.1 酶解 pH 考察 适当的 pH 可维持酶活性中心最佳构象,促进酶与底物结合; pH 不同会导致酶与作用底物所带电荷不同,使得酶与底物的亲和力不同,从而催化速度也不同。由考察结果可知,在 pH=4.5 时,绿原酸提取率最高,随着 pH 再升高,绿原酸的提取率逐渐下降。酶解 pH 对绿原酸提取率的影响见图1。

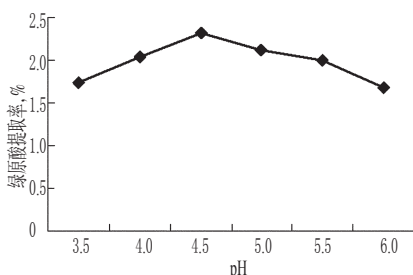


图1 酶解 pH 对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 1 Effects of pH of Enzymatic hydrolysis on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.3.2 酶解时间考察 酶解时间与酶促反应进行程度密切相关,反应时间太短,酶解不充分。在考察范围内随着酶解时间的增加,绿原酸的提取率呈逐渐增加的趋势。当绿原酸提取率达到一定值后,酶促反应时间的延长并不能明显增加提取率。为节省时间,选择酶解时间为60 min。酶解时间对绿原酸提取率的影响见图2。

2.3.3 酶解温度考察 随着酶解温度升高绿原酸提取率逐渐增大,达到40℃后继续升高温度,绿原酸提取率反而呈现不同程度的下降。主要原因是酶促反应中,合适的温度能使酶保持最大活性,同时也有利于提取介质扩散;温度过高,不仅导致绿原酸氧化分解,也会使酶蛋白变性。所以,提取温度在30~50℃之间较为适宜。酶解温度对绿原酸提取率的影响见图3。

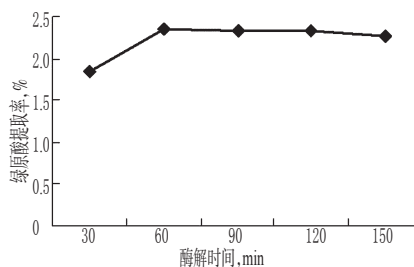


图2 酶解时间对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 2 Effects of time of Enzymatic hydrolysis of pH on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

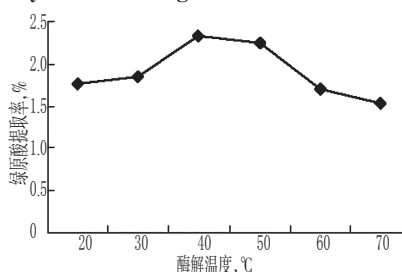


图3 酶解温度对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 3 Effects of temperature of Enzymatic hydrolysis on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.3.4 酶用量考察 随着纤维素酶用量的增加,绿原酸提取率明显增加,当酶的用量增加到20 mg时,酶分子逐渐趋于饱和,提取液中绿原酸的含量增加速度变慢。酶用量对绿原酸提取率的影响见图4。

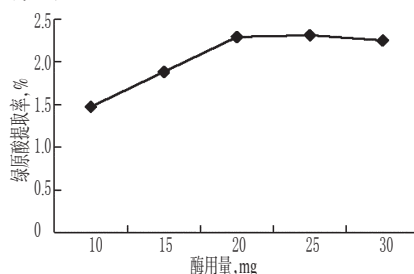


图4 酶用量对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 4 Effects of consumption of Enzymatic hydrolysis on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.3.5 固液比考察 固液比过小时,溶液黏度大、滤过困难;在固液比为1:15(g/ml)时,绿原酸提取率最大,而固液比过大,导致体系中酶的浓度降低,影响绿原酸提取效果,同时滤过费时,还会给后续纯化工艺带来困难。固液比对绿原酸提取率的影响见图5。

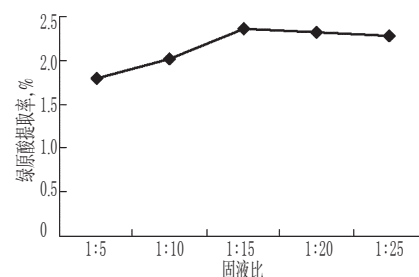


图5 固液比对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 5 Effects of the ratio of solid to liquid on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.3.6 超声提取时间考察 超声提取初期,绿原酸提取率随着超声时间的延长而逐渐升高,至超声处理40 min时,绿原酸提取率达最大值,而后绿原酸含量随时间的延长逐渐降低。超声提取时间对绿原酸提取率的影响见图6。

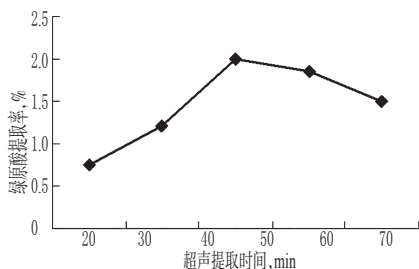


图6 超声提取时间对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 6 Effects of dosage of ultrasonic time on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.3.7 超声提取温度考察 超声提取温度对绿原酸提取率影响也较大,随温度的升高,绿原酸提取率呈增加趋势,同时杂质溶出量也相应增大,温度过高活性成分易被破坏。为了避免长时间高温下绿原酸被氧化分解,以及提高提取操作效率,超声提取温度在50℃左右较为适宜。超声提取温度对绿原酸提取率的影响见图7。

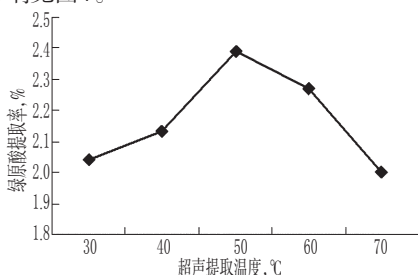


图7 超声提取温度对绿原酸提取率的影响($n=3$)

Fig 7 Effects of dosage of ultrasonic extraction temperature on the yield of chlorogenic acid($n=3$)

2.4 正交试验优选提取工艺

在单因素考察基础上,以超声提取时间(A)、固液比(B)、酶解温度(C)、酶用量(D)为考察因素,绿原酸提取率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表2;正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A, min	B	C, °C	D, mg
1	30	1:10	35	15
2	40	1:15	40	20
3	50	1:20	45	25

由表3、表4可以看出,4个因素对绿原酸提取率的影响趋势与单因素考察结果基本一致,因素影响的大小为固液比>超声提取时间>酶解温度>酶用量。在考察范围内,就绿原酸提取率而言,固液比与超声提取时间为显著性影响。根据正交试验和方差分析结果确定最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3D_2$,即超声提取时间40 min,固液比1:15(g/ml),酶解温度45℃,酶用量20 mg。

2.5 工艺验证试验

为考察最佳工艺条件的重现性,按最佳工艺条件重复试

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	绿原酸提取率, %
1	1	1	1	1	1.79
2	1	2	2	2	2.19
3	1	3	3	3	2.25
4	2	1	2	3	1.95
5	2	2	3	1	2.36
6	2	3	1	2	2.21
7	3	1	3	2	1.84
8	3	2	1	3	2.01
9	3	3	2	1	1.98
k_1	2.077	1.860	2.003	2.043	
k_2	2.173	2.187	2.040	2.080	
k_3	1.943	2.147	2.150	2.070	
R	0.230	0.327	0.147	0.037	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.08	2	0.040 0	40.00	<0.05
B	0.19	2	0.095 0	95.00	<0.05
C	0.035	2	0.017 5	17.50	
D	0.002	2	0.001 0		

注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

验6次。结果,绿原酸的平均提取率为2.37%,RSD=2.8%($n=6$),说明优选的工艺合理、可行,重现性较好。

3 讨论

笔者对不同提取方法与不同提取溶剂进行初步考察发现,以乙醇超声提取法和超声纤维素酶法中绿原酸提取率相对较高。乙醇回流提取杂质多^[5],不易滤过,且温度高,加热时间长,易使绿原酸氧化分解。水回流提取法的不足之处在于提取温度比醇提法更高,滤过分离困难,绿原酸含量也比醇提法偏低。超声纤维素酶法与乙醇超声提取法比较,更节省能源,更适合工业化生产。

超声纤维素酶法提取可从多方面促进绿原酸的提取,首先运用纤维素酶破坏细胞壁中的纤维素^[9],以加快杜仲叶有效成分的释放,利于提取分离。其次,利用超声波的机械效应、空化效应及热效应,通过增大介质分子的运动速度,可增大介质的穿透力以提取中药有效成分。综上,笔者优选的工艺不但可提高绿原酸提取率,更重要的是大大节约了能源,由于所用的酶安全、廉价,同时工艺还具有经济、环保等特点,为杜仲叶绿原酸的工业化提取奠定了试验基础。

参考文献

- [1] 张凌裳,王红连,杜郭君,等.杜仲叶粉提取绿原酸工艺的优化[J].安徽农业科学,2009,3(17):8 162.
- [2] 戴瑜,李姣娟,周尽花,等.半纤维素酶法提取杜仲叶绿原酸[J].林业科技开发,2009,23(3):96.
- [3] 陈泽彬,刘敏,张尚斌.杜仲平压分散片的制备及其质量标准研究[J].中国药房,2009,20(18):1 395.
- [4] 陈洪章.纤维素生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005:137.
- [5] 王柏强,刘福,江承平,等.正交试验优化杜仲叶中绿原酸的超声提取工艺[J].中国药业,2013,22(23):43.

星点设计-效应面法优选青龙白虎利咽含片主要辅料的用量

闫莉^{1*},季宁平²,廖琬²(1.新疆医科大学中心实验室,乌鲁木齐 830011;2.成都中医药大学药学院,成都 611137)

中图分类号 R283;R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2530-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.11

摘要 目的:优选青龙白虎利咽含片主要辅料的用量。方法:以甘露醇和微晶纤维素、蛋白糖、薄荷脑、硬脂酸镁用量为自变量,以含片口感、硬度、崩解时限为因变量,通过对自变量各水平多元线性回归及二项式拟合,采用星点设计-效应面法优选青龙白虎利咽含片的主要辅料。结果:优选的最佳工艺条件为甘露醇和微晶纤维素用量(2:1, *m/m*)30 g/100片、蛋白糖用量1 g/100片、薄荷脑用量1.5 g/100片、硬脂酸镁用量0.45 g/100片。结论:优选的青龙白虎利咽含片主要辅料用量具有良好的预测性。

关键词 青龙白虎利咽含片;星点设计-效应面法;制剂辅料

Optimization of Main Excipients in Qinglong Baihu Buccal Tablet by Central Composite Design and Response Surface Method

YAN Li¹, JI Ning-ping², LIAO Wan²(1. Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the main excipients in Qinglong baihu buccal tablet. METHODS: Central composite design-response surface methodology was applied to optimize main excipients in Qinglong baihu buccal tablet using the amounts of mannitol, microcrystalline cellulose, proteoglycan, menthol and magnesium stearate as independent variables and the taste of buccal tablet, rigidity and disintegration time as dependent variables. Multiple linear regression and binomial expression were fitted with independent variables. RESULTS: The optimal technology was as follows: the amount of mannitol and microcrystalline cellulose dosage (2:1, *m/m*) 300 g/100 tablets; proteoglycan dosage 10 g/100 tablets; menthol dosage: 15 g/100 tablets; magnesium stearate dosage: 4.5 g/100 tablets. CONCLUSIONS: It is proved to be predictable that central composite design and response surface methodology optimize main excipients in Qinglong baihu buccal tablet.

KEYWORDS Qinglong baihu buccal tablet; Central composite design-response surface methodology; Pharmaceutical excipients

青龙白虎汤出自清代著名医家王孟英所著《王氏医案》,具有清热利咽、生津止渴之功,方中青果素清肺利咽、生津止渴,莱菔具清热生津、凉血止血^[1-4]。含片多用于咽喉疾患,因其直接作用于咽喉部位且停留时间较长,因此为咽喉疾病用药的最佳选择^[5-10]。星点设计是一种新型的试验设计方法,其具有试验次数少、精度高等特点,国内外近年来常用集数学和统计学方法于一体的星点设计-效应面法来筛选和优化制剂处方^[11-13]。本研究采用星点设计-效应面法^[14],将青龙白虎汤改变剂型制成含片,筛选其主要的辅料用量。

1 材料

1.1 仪器

DGG-9240型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);DJ灵巧型粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);Sartorius-BS110S型分析天平(德国赛多利斯公司);YPJ-200A型片剂硬度计(上海黄海药检仪器有限公司);ZB-IB型智能崩解仪(天津大学精密仪器厂);ZRS-8G型智能溶出仪(四川赛普瑞斯仪器有限公司);YP1400型压片机(上海顺仪科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

甘露醇(河北华旭药业有限责任公司);薄荷脑(成都市科龙化工试剂厂);微晶纤维素(成都市科龙化工试剂厂);蛋白糖(郑州天星食品科技发展有限公司);硬脂酸镁(成都市科龙

[6] 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: 154.

[7] 贾永光, 吴铮超. 超声联合酶法提取黄芪总多糖的影响因素分析[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(2): 134.

[8] 宋宏新, 戴瑜. 酶法提取杜仲叶中绿原酸工艺研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2: 383.

[9] 陆世惠, 李秀霞. 超声-酶法提取两面针中氯化两面针碱的研究[J]. 中成药, 2013, 35(4): 841.

(收稿日期:2014-03-26 修回日期:2014-05-05)

* 实习研究员, 硕士。研究方向: 中药新剂型、新制剂。E-mail: 597205931@qq.com