

正交试验优选暑热宁口服液挥发性活性物质的提取工艺[△]

李凤丽^{1,2*}, 李进¹, 高文远³, 陈涛^{1#}, 王进博¹(1.天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2.天津中医药大学研究生部, 天津 300193; 3.天津大学生命科学院, 天津 300193)

中图分类号 R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4059-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.09

摘要 目的: 优选暑热宁口服液挥发性活性物质提取工艺。方法: 以麝香草酚与香荆芥酚含量为考察指标, 以蒸馏液体积倍数、浸泡时间、蒸馏速度为考察因素, 通过单因素考察与正交试验优选暑热宁口服液挥发性活性物质提取工艺。结果: 优选工艺为1.5倍提取蒸馏液浸泡12 h, 蒸馏速度30~40滴/min。结论: 优选的工艺合理、可行, 可为工业化生产提供参考。

关键词 暑热宁口服液; 气相色谱法; 麝香草酚; 香荆芥酚; 正交试验; 提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Volatile Active Substance from Shurening Oral Liquid by Orthogonal Test

LI Feng-li^{1,2}, LI Jin¹, GAO Wen-yuan³, CHEN Tao¹, WANG Jin-bo¹(1.The First Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 2.Graduate Dept, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China; 3.College of Life Science, Tianjin University, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of volatile active substance from Shurening oral liquid. METHODS: The extraction technology of volatile active substance from Shurening oral liquid was optimized by single factor and orthogonal design with the volume of distilland, distillation time and distillation speed as factors using the contents of thymol and carvacrol as index. RESULTS: The optimized technology was as follows: 1.5 times distilland, soaking for 12 h and distillation speed of 30-40 drops/min. CONCLUSIONS: The optimized technology is reasonable and feasible, and can provide reference for industrial production.

KEYWORDS Shurening oral liquid; GC; Thymol; Carvacrol; Orthogonal test; Extraction process

暑热宁口服液为天津中医药大学第一附属医院临床使用多年的医院制剂, 多用于治疗儿童急性上呼吸道感染暑湿兼寒证, 该方以葛根芩连汤、藿连汤与香薷饮三方化裁, 由广藿香、香薷、厚朴等13味中药材提取制备而成。

研究资料表明, 方中香薷、广藿香、厚朴均含有挥发性活性物质^[1-4], 为保证复方药效, 拟将此类成分单独提取处理后入药。本研究采用水蒸气蒸馏法提取香薷、广藿香、厚朴混合蒸馏液^[5-6], 并以香薷活性成分麝香草酚和香荆芥酚含量为考察指标, 以L₉(3⁴)正交设计优选最佳提取工艺, 最大程度提取暑

热宁口服液中的挥发性成分, 为其作为新药研究提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

7980A(FID)型气相色谱仪(美国Agilent公司); TCQ250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂); JA2003型电子分析天平(上海精科天平厂)。

1.2 饮片

香薷(批号: C12080101)、厚朴(批号: E12080101)由河北康派中药材有限公司提供; 广藿香(北京盛世龙药业有限公

.....

肌条收缩活动的影响[J]. 山东大学学报: 医学版, 2003, 41(1): 34.

[9] 李伟, 郑天珍, 瞿颂义, 等. 苍术对大鼠离体小肠、结肠收缩活动的影响[J]. 中药药理与临床, 2000, 16(5): 26.

[10] 聂淑琴, 李兰芳, 杨庆, 等. 5种产地苍术提取物主要药理

作用比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(2): 27.

[11] 郭金鹏, 孙如宝, 史云, 等. 苍术挥发油提取物制剂杀菌效果的观察[J]. 中国消毒学杂志, 2009, 26(2): 151.

[12] 红旻, 孙立立, 孙敬勇, 等. 地榆化学成分及药理活性研究进展[J]. 食品与药品, 2009, 11(7): 67.

[13] 卫文强, 吴润, 刘磊. 四味中草药体外抗菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(6): 2 530.

(收稿日期: 2014-05-05 修回日期: 2014-08-13)

△基金项目: 国家科技重大专项课题(No.2010ZX09102-201)。

* 主管中药师, 博士。研究方向: 中药药物分析与新药开发。

E-mail: lff992610@163.com

通信作者: 主任中药师, 研究方向: 中药新药开发。电话: 022-83969822

司,批号:111124)。以上药材均经天津中医药大学第一附属医院陈涛教授鉴定为真品。

1.3 试剂

麝香草酚对照品(批号:100508-200902)、香荆芥酚对照品(批号:111691-200501)由中国食品药品检定研究院提供;正己烷为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:HP-5弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);柱升温程序:起始温度110℃,保持10 min,25℃/min的速度升温至230℃,保持9.2 min;进样口温度:220℃;FID检测器温度220℃;载气:高纯N₂(>99.99%);柱流量1.0 ml/min;分流比:10:1(V/V);分流进样量:1 μl。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取麝香草酚和香荆芥酚对照品适量,用正己烷制备成麝香草酚质量浓度为0.52 mg/ml和香荆芥酚质量浓度为0.29 mg/ml的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取正交试验优选工艺下制备的蒸馏液10 ml,加入环己烷等体积萃取,萃取3次,每次30 min,合并萃取液,自然挥干,正己烷溶解并定容于2 ml量瓶中,摇匀,作为供试品溶液。

2.1.4 阴性溶液的制备 根据处方精密称取厚朴、广藿香药材适量,按“2.1.3”项下方法制备阴性对照溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。色谱见图1。

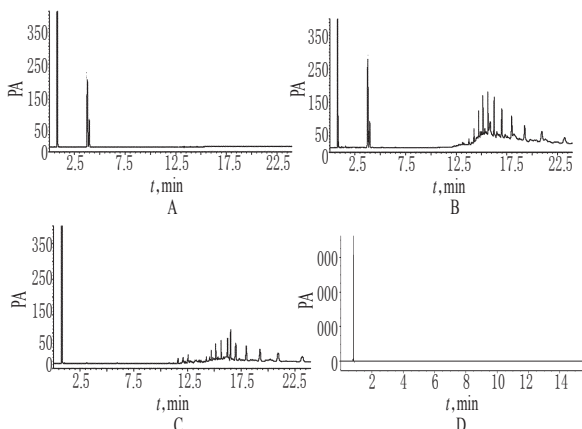


图1 气相色谱图

A.混合对照品;B.供试液;C.阴性对照;D.空白对照

Fig 1 GC chromatograms

A.mixed control;B.test solution;C.negative control;D.blank control

2.1.5 标准曲线的制备 以正己烷为溶剂制成一系列不同质量浓度的混合标准溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以质量浓度(x, ng/μl)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得麝香草酚和香荆芥酚回归方程分别为 $y=1748.1x+31.5$ ($r=0.999\ 92$)、 $y=1629.4x+16.5$ ($r=0.999\ 86$)。结果表明,麝香草酚和香荆芥酚质量浓度分别在0.080~2.603 mg/ml、0.045~1.455 mg/ml范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.6 精密密度试验 取混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,连续6次。结果,麝香草酚和香荆芥酚的RSD分别为0.9%、1.0%,表明仪器精密密度良好。

2.1.7 重现性试验 取同一批样品适量,共6份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进

样测定,记录色谱图。结果,麝香草酚和香荆芥酚的RSD分别为1.2%、1.0%,表明方法重现性好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,室温放置,分别于0、2、4、6、12、24、48 h按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,麝香草酚和香荆芥酚的RSD分别为0.3%、0.3%,表明溶液在48 h内基本稳定。

2.1.9 加样回收率试验 称取同一样品9份,每份5 ml,每3份为一组。每组3份样品分别精密加入含麝香草酚1.526 8 mg/ml、香荆芥酚0.494 7 mg/ml的对照品溶液0.5、1.0、1.5 ml。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,根据加入量计算回收率。结果,麝香草酚和香荆芥酚的加样回收率分别为97.9%~101.5%、98.2%~102.4%,RSD分别为1.8%、2.1%。

2.2 单因素试验^[7]

2.2.1 提取蒸馏液体积考察 按处方量取香薷、厚朴、广藿香3味药材加10倍量水,分别提取生药量的0.5、1.0、1.5、2.0、2.5倍蒸馏液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法计算样品中麝香草酚和香荆芥酚含量。提取蒸馏液体积倍数对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响见图2。

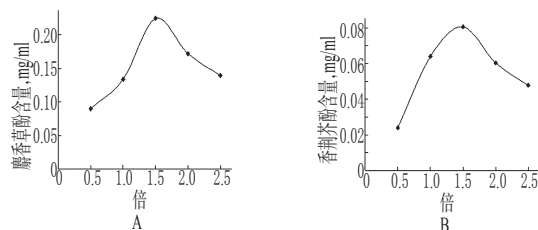


图2 提取蒸馏液体积倍数对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响

A.麝香草酚;B.香荆芥酚

Fig 2 Effect of extraction distillation and liquid volume of thymol and cavacrol grass phenol content

A.thymol;B.carvacrol

2.2.2 浸泡时间考察 按处方量取香薷、厚朴、广藿香3味药材加10倍量水,分别提取生药浸泡时间为0、3、6、12、24 h的蒸馏液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法计算样品中麝香草酚和香荆芥酚含量。浸泡时间对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响见图3。

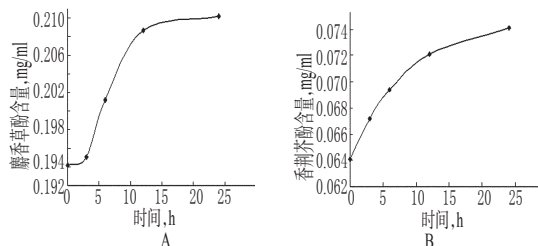


图3 浸泡时间对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响

A.麝香草酚;B.香荆芥酚

Fig 3 Effect of time of thymol and cavacrol grass phenol content

A.thymol;B.carvacrol

2.2.3 蒸流速度考察 按处方量取香薷、厚朴、广藿香3味药材加10倍量水,提取蒸馏液速度为30~40、50~60、70~80、90~100、110~120滴/min。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法计算样品中麝香草酚和香荆芥酚

含量。蒸流速度对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响见图4。

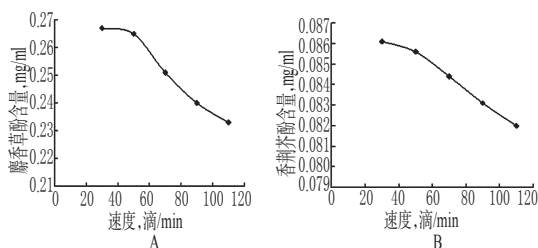


图4 蒸馏速度对麝香草酚和香荆芥酚含量的影响
A. 麝香草酚; B. 香荆芥酚

Fig 4 Effect of distillation rate of thymol and carvacrol grass phenol content
A. thymol; B. carvacrol

2.3 正交试验^[8-10]

根据单因素考察结果,以提取蒸馏液倍数(A)、浸泡时间(B)、蒸馏速度(C)为考察因素,分别以麝香草酚和香荆芥酚含量为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素水平见表1;正交试验、方差分析结果见表2~表5。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A, 倍	B, h	C, 滴/min
1	1.0	6	30~40
2	1.5	12	50~60
3	2.0	24	70~80

表2 正交试验结果(以麝香草酚为考察指标)

Tab 2 Results of orthogonal experiment (using thymol as index)

试验号	因素				麝香草酚含量, mg/ml
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.078 7
2	1	2	2	2	0.159 6
3	1	3	3	3	0.093 4
4	2	1	2	3	0.220 4
5	2	2	3	1	0.295 9
6	2	3	1	2	0.389 8
7	3	1	3	2	0.075 8
8	3	2	1	3	0.252 6
9	3	3	2	1	0.179 0
K_1	0.111	0.125	0.240	0.185	
K_2	0.302	0.236	0.186	0.208	
K_3	0.169	0.221	0.155	0.189	
R	0.191	0.111	0.085	0.023	

表3 方差分析结果(以麝香草酚为考察指标)

Tab 3 Analysis of variance (using thymol as index)

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.058	2	0.029 0	58.00	<0.05
B	0.022	2	0.011 0	22.000	<0.05
C	0.011	2	0.005 5	11.000	
D	0.001	2	0.000 5	1.000	
误差	0.000	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

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

由表1~表5可知,对麝香草酚和香荆芥酚含量影响由强到弱顺序均为A>C>B,即提取蒸馏液倍数影响最大。由于

表4 正交试验结果(以香荆芥酚为考察指标)

Tab 4 Results of orthogonal experiment (using carvacrol as index)

试验号	因素				香荆芥酚含量, mg/ml
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.022 4
2	1	2	2	2	0.054 0
3	1	3	3	3	0.025 1
4	2	1	2	3	0.070 4
5	2	2	3	1	0.091 9
6	2	3	1	2	0.152 8
7	3	1	3	2	0.030 8
8	3	2	1	3	0.081 4
9	3	3	2	1	0.043 8
K_1	0.034	0.041	0.086	0.053	
K_2	0.105	0.076	0.056	0.079	
K_3	0.052	0.074	0.049	0.059	
R	0.071	0.035	0.037	0.026	

表5 方差分析结果(以香荆芥酚为考察指标)

Tab 5 Analysis of variance (using carvacrol as index)

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.008	2	0.004 0	8.000	
B	0.002	2	0.001 0	2.000	
C	0.002	2	0.001 0	2.000	
D	0.001	2	0.000 5	1.000	
误差	0.000	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

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

麝香草酚含量远高于香荆芥酚含量且相关资料表明麝香草酚药效活性较明显,因此首先考虑麝香草酚提取影响的因素,其次要考虑香荆芥酚提取的影响因素。综合分析,最优提取工艺为 $A_2B_2C_1$,即提取蒸馏液倍数为1.5倍,浸泡12h,蒸馏速度30~40滴/min。为验证提取1.5倍蒸馏液后是否将有效活性物质提取充分,笔者进行了其与提取2倍量蒸馏液和3倍量蒸馏液有效活性物质含量比较,发现三者所含有效活性物质总量较接近。

2.4 工艺验证试验

按处方量取香薷、厚朴、广藿香3味药材,在正交试验设计所优选的工艺条件下进行验证试验,测定最佳工艺条件下的麝香草酚和香荆芥酚含量,可见该工艺稳定可行。验证试验结果见表6。

表6 验证试验结果

Tab 6 Results of verification test

批号	麝香草酚含量, mg/ml	香荆芥酚含量, mg/ml
1	0.306 1	0.100 9
2	0.294 5	0.102 1
3	0.281 4	0.096 7

3 讨论

本试验根据预试验与资料查询直接采用生药量10倍量水提取蒸馏液,加水量过少对药材浸透效果差,不易于有效物质提取;加水量过多,耗费能源,增加成本。同时,由于影响该试验主要因素较多,所以不将加水量定为考察因素,而将提取蒸馏液倍数、浸泡时间、蒸馏速度作为主要考察对象进行研究。

香薷、厚朴、广藿香3味药材均含有挥发性活性物质,根据预试验发现其他药材有效物质含量及稳定性均较低于香薷中

正交试验优选十一方药酒的超声提取工艺^Δ

陈晓明*, 莫小林#, 韦振源, 龚敏阳, 陈朝(广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4062-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.10

摘要 目的: 优选十一方药酒的超声提取工艺。方法: 以大黄酚含量、人参皂苷 Rg₁ 含量与总固体量为考察指标, 通过单因素试验优选浸泡时间、药材粉碎度、白酒体积分数、料液比、超声提取时间、提取次数; 以白酒体积分数、料液比、提取时间、提取次数为因素, 通过正交试验优选十一方药酒的超声提取工艺。结果: 优选的超声提取工艺为料液比(1:5, g/ml), 50% 白酒超声提取 1 次, 时间为 75 min。结论: 该优选工艺合理可行, 可为十一方药酒的制备工艺选择提供参考。

关键词 十一方药酒; 超声提取; 人参皂苷 Rg₁; 大黄酚

Optimization of Ultrasonic Extraction Technology of Shiyifang Vinum by Orthogonal Test

CHEN Xiao-ming, MO Xiao-lin, WEI Zhen-yuan, GONG Min-yang, CHEN Chao (The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology of Shiyifang vinum. METHODS: Soaking time, grinding degree of material, liquor volume fraction, the ratio of material to liquid, ultrasonic extraction time, extraction times was optimized by single factor test as index with liquor concentration, solid-liquid ratio, extraction time, extraction times as factors. The ultrasonic extraction technology of Shiyifang vinum was optimized by orthogonal test using total amount of Shiyifang vinum solids, the contents of ginsenoside Rg₁ and chrysophanol as index with liquor concentration, solid-liquid ratio, extraction time, extraction times as factors. RESULTS: The ultrasonic extraction technology of Shiyifang vinum was as follows: solid-fluid ratio of 1:5 (g/ml), 50% liquor ultrasonic extracting for 1 time, extraction time of 75 min. CONCLUSIONS: Ultrasonic extraction technology is reasonable and feasible, and can provide reference for preparation technology of Shiyifang vinum.

KEYWORDS Shiyifang vinum; Ultrasonic extraction; Ginsenoside Rg₁; Chrysophanol

麝香草酚和香荆芥酚, 为保证该工艺的合理性, 本试验以麝香草酚和香荆芥酚两个指标综合评价最佳工艺, 结果稳定可行。

预试验进行了香薷、厚朴、广藿香 3 味中药材提取挥发油和提取蒸馏液比较。二者有效物质含量基本相近, 由于提取物要溶于水溶液, 而暑热宁口服液又为儿童用药, 不允许添加乙醇等潜溶剂, 所以选择提取蒸馏液较为合理。

在供试品溶液的制备上, 采用了环丙烷、三氯甲烷、乙醚、正己烷、石油醚(30~60℃)、石油醚(60~90℃)、甲苯、乙酸乙酯萃取^[1-12], 同时对萃取时间和萃取溶剂体积进行了考察, 结果发现以环丙烷等体积萃取 3 次, 每次 30 min, 萃取效果最佳。

参考文献

- [1] 刘莹, 李喜凤, 刘艾林, 等. 秦海林细皱香薷叶的化学成分研究中[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1356.
- [2] 程雪宁, 张宏武, 杨立伟, 等. 药用广藿香挥发油提取物专属性鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2270.
- [3] 舒任庚, 胡浩武, 张普照, 等. 不同采收期江香薷挥发油成分 GC-MS 分析[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 443.
- [4] 黄澜, 黄丽. RP-HPLC 法同时测定保济丸中厚朴酚和厚

朴酚木香烃内酯及去氢木香内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 396.

- [5] 李玲玲. 厚朴挥发油化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(8): 686.
- [6] 黄家卫, 盛振华, 吴巧凤. 香薷挥发油的提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2136.
- [7] 袁德彬, 张宏, 廖颖, 等. 正交试验优选黑骨藤的超声提取工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1543.
- [8] 张爱丽, 毕宇安, 张庆芬, 等. 金振口服液矫味工艺研究[J]. 中草药, 2013, 44(5): 562.
- [9] 闵建华, 曹旻旻, 韦冬菊, 等. 微波辅助提取红景天苷的工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(8): 1536.
- [10] 徐忠坤, 郭传宝, 殷洪梅, 等. 正交试验优化羌黄祛痹颗粒处方药材醇提工艺[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1764.
- [11] Deng CH, Song GX, Hu YM, et al. Analysis of the volatile constituents of Schisandra chinensis (Turcz.) bail by gas chromatography-mass spectrometry, using headspace solid-phase microextraction[J]. *Chromatographia*, 2003, 58(5/6): 289.
- [12] Deng CH, Song GX, Zheng XH, et al. Analysis of the volatile constituents of *Apium graveolens* L and *Oenanthe* L by gas chromatography-mass spectrometry, using headspace solid-phase microextraction [J]. *Chromatographia*, 2003, 57(11/12): 805.

(收稿日期: 2014-02-07 修回日期: 2014-04-04)

^Δ 基金项目: 广西中医药大学自然科学研究课题(No.P2012051)
* 主管中药师。研究方向: 制剂质量标准。电话: 0771-5645390。E-mail: 1042030867@qq.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