

正交试验优选十一方药酒的超声提取工艺[△]

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^[11-12], 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)

[△] 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

十一方药酒(批准文号:桂药制字Z01060025)为我院制剂室的自制品种,由三七、重楼、大黄、红花、煅自然铜、乳香、秦艽、没药、续断、制马钱子等中药组成,临床用于治疗跌打扭伤,各种骨折、骨伤、风湿骨痛等症,疗效显著。目前,较常用的酒剂制备方法为浸渍法、渗漉法、回流提取法或其他适宜方法^[1]。近年来,越来越多的学者利用超声波技术提取中药制剂^[2-5],该法具有处理时间短、提取效率高、操作简便等优点^[6]。本研究采用单因素试验初步考察了超声波法提取十一方药酒的工艺参数,并以白酒体积分数、白酒用量、提取时间与提取次数为考察因素,以十一方药酒总固体量、人参皂苷Rg₁与总黄酮含量为指标,采用正交试验法考察超声波提取十一方药酒的方法,以为十一方药酒的制备工艺选择提供科研依据。

1 材料

1.1 仪器

DCU-20A5型高效液相色谱仪、SPD-20A型紫外检测仪(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(成都超纯科技有限公司);KQ3200E型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

人参皂苷Rg₁对照品(批号:110703-201027)、总黄酮对照品(批号:110796-201118)均购自中国食品药品检定研究院;十一方药酒(广西中医药大学第一附属医院制剂室,批号:20130507、20130523、20130611,规格:100 ml/瓶);乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 人参皂苷Rg₁含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:WondaSil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.05%磷酸水溶液(22:78, V/V);检测波长:205 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;柱温:30 ℃。在此条件下人参皂苷Rg₁可与其他峰完全分离,保留时间约为22.6 min,理论板数不低于5 000。

2.1.2 溶液的制备 (1)对照品溶液的制备。精密称取2.0 mg人参皂苷Rg₁对照品,置10 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含0.20 mg人参皂苷Rg₁的对照品溶液。(2)供试品溶液的制备。精密吸取3.0 ml十一方药酒,水浴蒸干至无醇味,加15 ml水溶解,滤过,滤液用乙醚萃取2次,每次10 ml,弃去乙醚液,水溶液用水饱和的正丁醇萃取3次,每次8 ml,合并正丁醇液,超声处理30 min,用5% NaOH溶液洗涤2次,每次10 ml,合并正丁醇液,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解于25 ml量瓶中,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取人参皂苷Rg₁对照品溶液0.4、1.0、1.8、2.6、3.4 ml,置10 ml量瓶中,用甲醇定容,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,连续进样3次。以人参皂苷Rg₁质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=1\ 390.2x+831.7$ ($r=$

0.99 80)。结果表明,人参皂苷Rg₁质量浓度在8.0~68.0 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:WondaSil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(84:16, V/V);检测波长254 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;柱温:30 ℃。在此条件下总黄酮可与其他峰完全分离,保留时间约为13.7 min,理论板数不低于6 000。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液的制备。精密称取总黄酮对照品0.205 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含20.5 μg总黄酮的对照品溶液;(2)供试品溶液的制备。精密吸取3.0 ml十一方药酒,水浴蒸干至无醇味,加入20 ml 10%盐酸溶液,超声处理30 min,用氯仿溶液萃取3次,每次10 ml,合并氯仿溶液,加2%碳酸钠溶液洗涤,弃去碳酸钠液层,氯仿层用20 ml水洗涤,弃去水层,氯仿层水浴挥干,用甲醇定容于10 ml量瓶中,摇匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 标准曲线的制备 精密吸取0.1、0.3、0.8、1.4、2.0 ml总黄酮对照品溶液,置5 ml量瓶中,用甲醇定容,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以总黄酮质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=77\ 726x+7\ 175.1$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,总黄酮质量浓度在0.41~8.20 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3 总固体量的测定

精密量取各样品溶液50 ml,置已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴上蒸干,于105 ℃干燥3 h,移至干燥器中,冷却30 min,迅速精密称定质量,计算总固体量^[7]。

2.4 超声波提取条件对提取效果的影响

2.4.1 浸泡时间考察 在一定条件下,先将十一方药酒原料药材用溶剂浸泡不同时间后超声波(150 W, 40 kHz)提取,分别测定人参皂苷Rg₁、总黄酮含量与总固体量。药材浸泡2 h所测得人参皂苷Rg₁含量、总黄酮含量与总固体量均最高;3 h后随浸泡时间的延长,各含量有所下降。结果表明,在超声波提取前选择浸泡2 h即可。不同浸泡时间对十一方药酒提取效果的影响见表1。

表1 不同浸泡时间对十一方药酒提取效果的影响

Tab 1 Effects of different soaking time on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	浸泡时间/h			
	1	2	3	4
人参皂苷Rg ₁ /mg/ml	0.140	0.459	0.416	0.407
总黄酮/μg/ml	8.34	23.34	11.62	12.71
总固体量/g	1.299 5	1.640 0	1.370 4	1.399 3

2.4.2 药材粉碎度考察 在成药的制备过程中,中药有效成分的浸出常常与扩散面积(粉碎度)和扩散时间有关^[8]。在超声波提取前先将十一方药酒原料药材粉碎成不同的粒度,分别测定不同粉碎度下超声波提取后药酒中人参皂苷Rg₁、总黄

酚含量与总固体量。药材粉碎成最粗粉时人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚含量最高,总固体量接近高值。结果表明,超声波提取前药材粉碎成最粗粉(10目)为宜。不同粉碎度对十一方药酒提取效果的影响见表2。

表2 不同粉碎度对十一方药酒提取效果的影响

Tab 2 Effect of different grinding degree on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	粉碎度			
	粗颗粒(5 mm)	最粗粉(10目)	粗粉(24目)	中粉(65目)
人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	0.093	0.459	0.356	0.352
大黄酚, μ g/ml	5.98	23.34	20.35	17.49
总固体量, g	1.182 4	1.640 0	1.780 4	1.629 6

2.4.3 白酒体积分数考察 在一定条件下,分别用45%、50%、60%、70%白酒超声波提取样品。在其他条件不变的情况下,50%白酒提取得到的各成分含量均最高,60%与70%白酒提取得到的各成分含量有所下降。结果表明,白酒体积分数以50%为宜。不同体积分数白酒对十一方药酒提取效果的影响见表3。

表3 不同白酒体积分数对十一方药酒提取效果的影响

Tab 3 Effect of different liquor concentration on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	体积分数			
	45%	50%	60%	70%
人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	0.259	0.459	0.421	0.395
大黄酚, μ g/ml	19.78	23.34	21.54	20.49
总固体量, g	1.396 8	1.640 0	1.570 4	1.559 3

2.4.4 料液比考察 十一方药酒不同料液比测定人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚含量与总固体量。料液比在1:5(g/ml)时,人参皂苷 R_{g_1} 含量、大黄酚含量与总固体量均最高,当料液比超过1:5(g/ml)时,各成分含量有所下降。结果表明,选择料液比1:5(g/ml)较为合适。不同料液比对十一方药酒提取效果的影响见表4。

表4 不同料液比对十一方药酒提取效果的影响

Tab 4 Effect of different solid-liquid ratio on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	料液比, g/ml			
	1:4	1:5	1:6	1:7
人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	0.459	0.468	0.402	0.413
大黄酚, μ g/ml	23.34	24.59	22.69	21.66
总固体量, g	1.640 0	1.649 2	1.601 8	1.578 1

2.4.5 超声提取时间考察 在一定条件下,分别对十一方药酒进行45、60、75、90 min的超声提取。结果表明,在60 min时,人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚的含量及总固体量为最高,超声时间延长其含量反而有所降低。不同超声提取时间对十一方药酒提取效果的影响见表5。

2.4.6 提取次数考察 在一定条件下,测定十一方药酒不同提取次数人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚的含量与总固体量。结果表明,超声波提取1次时人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚的含量为最高,总固体量与提取2次接近。说明超声波提取1次已基本提取完

全,从经济、时间、效率等综合考虑,选择提取次数为1次较为合适。不同提取次数对十一方药酒提取效果的影响见表6。

表5 不同超声提取时间对十一方药酒提取效果的影响

Tab 5 Effect of different extraction time on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	超声提取时间, min			
	45	60	75	90
人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	0.341	0.459	0.401	0.385
大黄酚, μ g/ml	20.47	23.34	20.98	18.44
总固体量, g	1.382 4	1.640 0	1.627 1	1.618 8

表6 不同提取次数对十一方药酒提取效果的影响

Tab 6 Effect of different extraction times on the extraction of Shiyifang vinum

测定指标	提取次数, 次		
	1	2	3
人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	0.459	0.383	0.405
大黄酚, μ g/ml	23.34	19.86	20.79
总固体量, g	1.640 0	1.642 0	1.624 4

根据单因素试验结果可知,单因素试验的优化条件为药材粉碎成最粗粉(10目),浸泡2 h,白酒体积分数为50%,料液比为1:5(g/ml),提取时间为60 min,提取次数为1次。

2.5 正交试验优选超声提取最佳工艺条件

在单因素试验基础上,以人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚含量与总固体量作为考察指标,白酒体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取次数(D)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。中药有效成分是中药复方发挥治疗作用的物质基础^[9],而总固体量影响制剂澄清度和成品稳定性。故选择人参皂苷 R_{g_1} 、大黄酚作为评价指标权重系数均为0.4,总固体量作为评价指标权重系数为0.2,得到综合评分。因素水平见表7;正交试验结果见表8;方差分析结果见表9。

表7 因素与水平

Tab 7 Factors and levels

水平	因素			
	A, %	B, g/ml	C, min	D, 次
1	45	1:4	45	1
2	50	1:5	60	2
3	60	1:6	75	3

表8 正交试验结果

Tab 8 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	人参皂苷 R_{g_1} , mg/ml	大黄酚, μ g/ml	总固体量, g	综合评分
1	1	1	1	1	0.169	4.68	1.1954	37.57
2	1	2	2	2	0.214	5.07	1.4203	44.95
3	1	3	3	3	0.361	4.75	1.3172	56.03
4	2	1	2	3	0.423	21.63	1.5147	92.82
5	2	2	3	1	0.456	23.35	1.5859	99.54
6	2	3	1	2	0.405	21.13	1.4980	90.18
7	3	1	3	2	0.336	17.65	1.6231	79.71
8	3	2	1	3	0.311	15.23	1.5394	72.30
9	3	3	2	1	0.289	14.97	1.4278	68.59
\bar{x}_1	46.183	70.033	66.683	68.567				
\bar{x}_2	94.180	72.263	68.787	71.613				
\bar{x}_3	73.533	71.600	78.427	73.717				
R	47.997	2.230	11.744	5.15				

表9 方差分析结果

Tab 9 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	3 477.987	2	1 738.994	442.042	$P < 0.01$
B	7.867	2	3.934	1	
C	235.259	2	117.630	29.901	$P < 0.05$
D	40.229	2	20.115	5.113	
误差	7.867	2	3.934		

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

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

由表8、表9可知,影响十一方药酒超声波提取效果的因素顺序为A>C>D>B,即白酒体积分数>提取时间>提取次数>料液比。其中,因素A对试验结果有非常显著性影响;因素C对试验结果有显著性影响。结合溶剂回收、节约时间等因素,最终确定超声波提取最优工艺条件为A₂B₂C₃D₁,即料液比(1:5)g/ml,50%白酒超声波提取1次,时间为75 min,这与前述单因素试验结果比较基本一致。

2.6 工艺验证试验

按超声波提取最佳工艺条件重复试验3次,测定人参皂苷Rg₁、大黄酚含量与总固体量。使用最佳验证工艺参数,人参皂苷Rg₁含量平均为0.445 mg/ml, RSD=0.70%;大黄酚含量平均为22.10 μg/ml, RSD=1.53%;总固体量均值为1.604 7 g, RSD=0.71%。以上数据接近正交试验结果的最高值,说明正交试验结果可靠。

3 讨论

我院十一方药酒的制备方法为浸渍法,即将组方药物粉碎成粗粉,用50℃白酒密闭浸泡6个月,定期搅拌,滤过,灌装,用于院内临床使用,并获得了医院制剂批准文号(桂药制字Z01060025)。该法具有生产周期长,溶剂挥发较多,药液损耗大等缺点。方中三七、大黄为君药,三七有效成分为皂苷类,其中以人参皂苷Rg₁等成分含量最高^[10]。大黄具有清热泻下、抗菌、行瘀化积、消炎止血、抗肿瘤等功效^[11]。笔者已对浸渍法和回流法提取十一方药酒中人参皂苷Rg₁的含量进行了测定^[12-13]并与超声波提取进行比较。结果,超声波提取十一方药酒中的人参皂苷Rg₁的含量较回流法高,较浸渍法高出2倍,且不需加热,减少了挥发性成分的损耗,提取时间也大大减少,只需75 min。

在超声提取时,为了避免白酒损失,用具塞三角烧瓶进行提取。测定人参皂苷Rg₁时分别对乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.05%磷酸水溶液^[14]、甲醇-

水^[15]等不同流动相及流动相的不同比例进行了考察,发现乙腈-0.05%磷酸水溶液(22:78, V/V)作流动相时人参皂苷Rg₁分离效果最好。在人参皂苷Rg₁供试品溶液的制备中,还考察了不用碱洗、不同碱洗和碱洗浓度和次数,结果发现5%NaOH溶液洗2次,人参皂苷Rg₁分离效果最好和含量最高。

参考文献

- [1] 战渤玉,车绪凤,尉炳超.中药酒剂的研究进展[J].中医药信息,2010,27(3):120.
- [2] 杨鼎隆,李育民,黄晓君,等.复方玉屏风超声提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):17.
- [3] 冯子旺,俞力超,李峰,等.正交试验优选桑黄多酚超声提取工艺[J].中国药房,2012,23(3):221.
- [4] 刘振华,李炳奇,刘红,等.超声法提取中药制剂中醇溶性成分的研究[J].现代食品科技,23(1):35.
- [5] 董娟娥,马柏林,刘丽,等.超声波提取杜仲叶中有效成分工艺研究[J].西北林学院学报,2003,18(3):66.
- [6] 牛立新,李章念,李红卷,等.超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J].中药材,2007,30(1):85.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:附录10.
- [8] 张汉忠,董明华,张汉贞.三七粉碎度对药物成分提取率的影响[J].中国医院药学杂志,2004,24(11):719.
- [9] 杜冠华.中药复方有效成分组学研究[J].中成药,2002,24(11):878.
- [10] 鲍建才,刘刚.三七的化学成分研究进展[J].中成药,2006,28(2):246.
- [11] 周嘉裕,汤佳,廖海,等.大黄、何首乌中大黄素和大黄酚的提取与含量测定[J].时珍国医国药,2008,19(5):1 056.
- [12] 莫小林,黄小鹏,龚敏阳,等.HPLC测定十一方药酒中人参皂苷Rg₁的含量[J].江西中医学院学报,2013,25(2):43.
- [13] 莫小林,伍小燕,龚敏阳,等.优选十一方药酒回流提取制备工艺[J].医药导报,2014,33(1):89.
- [14] 石钺,程星烨,曹阳.糖尿乐颗粒中人参皂苷Rg₁、Re和Rb₁的HPLC测定[J].中成药,2007,29(4):524.
- [15] 赵祥军,刘峰群.高效液相色谱法测定复方鳖甲软肝片中三七皂苷R₁和人参皂苷Rg₁的含量[J].时珍国医国药,2002,13(6):324.

(收稿日期:2014-05-05 修回日期:2014-07-01)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅