

正交试验法优选治郁颗粒提取工艺

孙敬蒙, 才秀丽, 周昕琪, 张炜煜*
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] 目的: 优选治郁颗粒的醇提工艺和水提工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 采用 HPLC 测定栀子苷含量, 流动相乙腈-水(10:90), 检测波长 238 nm; 以栀子苷提取率为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数对醇提工艺的影响。采用 UV 测定总多糖含量, 检测波长 490 nm; 以总多糖提取率为指标, 通过正交试验考察加水量、提取时间及提取次数对水提工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.0 h, 药渣加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 2.0 h; 栀子苷、总多糖提取率分别为 0.013 29, 0.030 39 $g \cdot g^{-1}$ 。结论: 该优选工艺合理可行, 有效成分提取率高。

[关键词] 治郁颗粒; 栀子苷; 总多糖; 提取率

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0036-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1523.005.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:23

Optimization of Extraction Process for Zhiyu Granules by Orthogonal Test

SUN Jing-meng, CAI Xiu-li, ZHOU Xin-qi, ZHANG Wei-yu*
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol and water extraction processes of Zhiyu granules, in order to provide a reference for commercial production of this preparation. **Method:** HPLC was employed to determine the content of geniposide with mobile phase of acetonitrile-water (10:90) and detection wavelength at 238 nm; taking yield of geniposide as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol extraction process with extracting

[收稿日期] 20140512(013)

[基金项目] 吉林省中医药管理局中医药科技项目(2012-075)

[第一作者] 孙敬蒙, 在读硕士, 从事药物新剂型与新型给药系统研究, Tel: 0431-86172198, E-mail: mmhoney7@126.com

[通讯作者] *张炜煜, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新型给药系统研究, Tel: 0431-86172198, E-mail: weiyuzhang2003@126.com

- [4] 匡乔婷, 赵晶晶, 叶春玲, 等. 番石榴叶总三萜对 2 型糖尿病大鼠肾损伤的保护作用[J]. 中药材, 2012, 35(1):94.
- [5] 周迎春, 黄海军, 鄢文, 等. 番石榴叶对诺瓦克样病毒性腹泻患儿唾液中 IFN- γ 、IL-2 水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(2):7.
- [6] 毛芹超, 周迎春, 李润明, 等. 番石榴叶总皂苷对 HIV-1 包膜蛋白介导细胞融合的影响[J]. 中药材, 2010, 33(11):1751.
- [7] 徐金瑞, 张瑞芬, 潘国伟. 番石榴叶黄酮的微波提取及其抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5):166.
- [8] 李玲, 何宇新, 吴晶晶, 等. 番石榴叶提取工艺研究[J]. 陕西中医, 2009, 30(11):1529.
- [9] 王光, 张海林. 番石榴叶总黄酮两种提取方法的比较研究[J]. 商品与质量, 2012(5):305.
- [10] 钟方丽, 祝波, 王慧竹. 番石榴叶总黄酮提取工艺的优选[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(7):567.
- [11] 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, 2010:367.

[责任编辑 刘德文]

time, extracting times, ethanol concentration and amount as factors. The content of total polysaccharides by UV, detection wavelength was set at 490 nm; orthogonal test was used to optimize water extraction process by taking yield of total polysaccharides as index, the amount of water, extraction time and times as factors. **Result:** Optimum extraction technology of Zhiyu granules was as following: extracted twice with 6 times the amount of 70% ethanol for 1.0 h of per time, then medicine residue extracted thrice with 10 times the amount of water for 2.0 hours of each time; yields of geniposide and total polysaccharides were 0.013 29 and 0.030 39 g · g⁻¹.

Conclusion: This optimized process is reliable and feasible with high extraction rate of effective components.

[**Key words**] Zhiyu granules; geniposide; total polysaccharides; extraction rate

治郁颗粒为长春中医药大学附属医院赵建军教授临床经验方,由栀子、郁金、黄连组成,具有疏肝解郁、清肝泻火的作用,治疗轻、中度抑郁症效果很好,治愈好转率分别达 91.5%,85.6%,疗效确切、复发率低、毒副作用小。前期采用小鼠强迫游泳试验,以累积不动时间为考核指标,证明治郁颗粒的药材醇提物和水提物均具有抗抑郁活性,处方中栀子的主要成分栀子苷为该制剂抗抑郁作用的主要成分^[1-2];而多糖类成分是郁金、栀子和黄连的共有成分,对免疫功能有重要调节作用^[3-6]。故本实验拟选择栀子苷、总多糖提取率分别为治郁颗粒的醇提工艺、水提工艺的评价指标,采用正交试验优选提取工艺,为该制剂的工业化生产提供技术参数支持。

1 材料

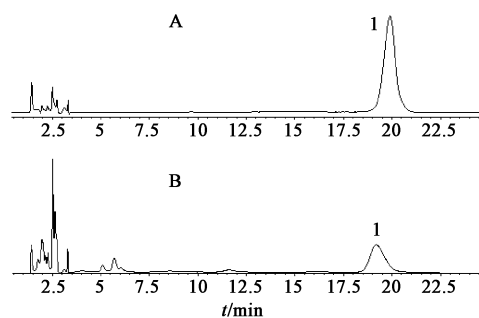
WFH-203J 型三用紫外-可见分析仪(上海精科实业有限公司),AR2140 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。栀子 *Gardenia jasminoides*, 郁金 *Curcuma wenyujin*, 黄连 *Coptis chinensis* 均购自于河南聚仁中药饮片有限公司,经长春中医药大学姜大成教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求;栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110749-200714),治郁颗粒(自制,批号 20130501),乙腈、甲醇均为色谱纯,乙醇为分析纯,水为娃哈哈水。

2 方法与结果

2.1 栀子苷分析方法的建立^[7-10]

2.1.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(10:90),流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 238 nm,进样量 10 μL,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品约 1.0 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 20 min 使溶解,用甲醇稀释至刻度,得 0.020 4 g · L⁻¹ 的对照品溶液。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 栀子苷

图 1 治郁颗粒 HPLC

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取治郁颗粒粉末(过五号筛)约 0.02 g,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声处理 20 min 使溶解,加甲醇稀释至刻度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取栀子苷对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 22.863X - 6.89$ ($r = 1$),线性范围 3.28 ~ 16.40 mg · L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 取对照品溶液按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,记录对照品峰面积,计算日内精密度 RSD 0.64%;取对照品溶液按 2.1.1 项下色谱条件,每天进样 1 次,连续 6 d,记录对照品峰面积,计算日间精密度 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8, 12 h,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算栀子苷峰面积的 RSD 1.4%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批样品 6 份,每份约 0.02 g,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD 1.0%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的供

试品溶液 6 份,各精密加入栀子苷对照品 0.020 4 mg,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率 101.03%,RSD 0.7%,表明该方法准确可靠。

2.2 总多糖的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取葡萄糖对照品约 5 mg,置 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,得 0.482 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取治郁颗粒细粉约 0.025 g,置 10 mL 量瓶中,加适量水超声提取 30 min,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,用石油醚萃取 2 次,每次 25 mL,吸取石油醚层,水层加无水乙醇约 40 mL,边加边振摇,使含醇量达 80%,于 3 000 r·min⁻¹离心 15 min,沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次,加水溶解,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,即得。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。精密量取 2.0 mL 至具塞试管中,加入 5% 苯酚溶液 1 mL,迅速摇匀,加入浓硫酸 5.0 mL,振摇 2 min,置于沸水浴中加热 15 min,立即置于冰水浴中冷却 30 min,以相应试剂作为空白溶液,按紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 V A)于 490 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 71.265C - 0.0503$ ($r = 0.9995$),线性范围 4.7 ~ 9.4 mg·L⁻¹。

2.2.4 中间精密度试验 取 2 批平行样品各 3 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下方法显色和测定,计算 RSD 0.8%,表明仪器精密良好。

2.2.5 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.3 项下方法显色和测定,计算 RSD 1.4%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液,分别在室温放置 0,10,20,30,60,120 min,按 2.2.3 项下方法操作,计算 RSD 0.8%,表明供试品溶液至少在 120 min 内稳定。

2.2.7 回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液 6 份,各精密加入葡萄糖对照品 0.048 2 mg,按 2.2.3 项下方法操作,计算平均加样回收率 101.83%,RSD 1.3%,表明该方法可行。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 乙醇提取工艺 按处方比例称取药材 9 份,

每份 100 g,选择乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数为考察因素,以栀子苷提取率为评价指标,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。结果表明影响醇提工艺的因素作用顺序为 $D > C > B > A$;以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,显示 D 因素具有显著性影响,结合药效学试验和生产成本考虑,确定最佳工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1.0 h。

表 1 治郁颗粒醇提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 加醇量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	栀子苷 提取率 /g·g ⁻¹
1	65	6	0.5	1	0.009 75
2	65	8	1.0	2	0.013 17
3	65	10	1.5	3	0.013 43
4	70	6	1.0	3	0.011 84
5	70	8	1.5	1	0.010 58
6	70	10	0.5	2	0.013 11
7	75	6	1.5	2	0.013 72
8	75	8	0.5	3	0.010 62
9	75	10	1.0	1	0.010 25
K ₁	1.184	1.177	1.116	1.019	
K ₂	1.212	1.146	1.175	1.333	
K ₃	1.153	1.226	1.258	1.196	
R	0.059	0.080	0.142	0.314	

表 2 醇提工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A(误差)	0.005	0.003	1.000	
B	0.010	0.005	2.000	>0.05
C	0.030	0.015	6.000	>0.05
D	0.149	0.075	29.800	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 4 同)。

2.3.2 水煎煮工艺 取醇提后的药渣,等分为 9 份,以总多糖提取率为评价指标,选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,采用 L₉(3⁴) 正交设计优选水煎煮工艺,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。由直观分析可知,各因素影响水煎煮工艺的顺序为 $C > A > B$;方差分析表明因素 A, C 均具有极显著性差异,因素 B 具有显著性差异,结合生产实际考虑,确定最佳工艺条件为加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 2.0 h。

2.4 验证试验 称取 10 倍处方量的药材,共 3 份,每份 1 kg,按优选的醇提工艺条件提取,计算栀子苷

表3 治郁颗粒水煎工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 提取 时间 /h	C 提取数 /次	D (空白)	总多糖提取率 /g·g ⁻¹
1	6	1.0	1	1	0.018 98
2	6	1.5	2	2	0.024 37
3	6	2.0	3	3	0.030 49
4	8	1.0	2	3	0.018 24
5	8	1.5	3	1	0.020 72
6	8	2.0	1	2	0.012 90
7	10	1.0	3	2	0.029 60
8	10	1.5	1	3	0.018 44
9	10	2.0	2	1	0.026 85
K ₁	2.461	2.227	1.677	2.218	
K ₂	1.729	2.118	2.315	2.229	
K ₃	2.496	2.341	2.694	2.239	
R	0.767	0.223	1.017	0.021	

表4 水煎工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	1.127	0.564	1 127.00	<0.01
B	0.075	0.038	75.00	<0.05
C	1.583	0.792	1 583.00	<0.01
D(误差)	0.010	0.005		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

提取率平均值 $0.013 29 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 0.5%。取醇提后的药渣按优选的水提工艺提取,计算总多糖提取率平均值 $0.030 39 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.2%,结果表明该工艺稳定可行。

3 讨论

预试验中栀子、郁金采用 70% 乙醇提取后,再将药渣与黄连混合后煎煮,将提取物混合,结果表明混合后的提取物抗抑郁活性不如将 3 种药材同时醇

提再水煎的混合提取物,故本文将 3 种药材同时醇提后再水煎的方法提取有效物质。

正交试验中乙醇体积分数的确定是依据前期小鼠强迫游泳试验,曾将治郁颗粒的药材分别用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇回流提取物及相应药渣的水提取物混合,以小鼠累积不动时间为考核指标,证明 70% 乙醇提取物与水提物混合后抗抑郁效果最好。采用单因素试验考察乙醇体积分数(65%~80%),结果显示栀子苷提取率在 70% 时达最大值,之后随体积分数的增高而降低,故正交试验中乙醇体积分数的水平确定为 65%~75%。

[参考文献]

- [1] 游伟良,平其能,孙敏捷,等. 栀子苷的药理学研究新进展[J]. 药学进展,2012,36(4):158.
- [2] 郝文字,杨楠,高云周,等. 栀子粗提物对抑郁模型小鼠行为学及海马神经发生的影响[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(10):11.
- [3] 王统一,赵兵,王玉春. 多糖免疫调节和抗肿瘤研究进展[J]. 过程工程学报,2006,6(4):674.
- [4] 王晓华,朱华,陈旭,等. 郁金化学成分及其质量控制研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5873.
- [5] 廖夫生. 中药栀子研究进展[J]. 广州化工,2013,41(1):12.
- [6] 姜爽. 黄连多糖的提取、分离及抗大鼠 2 型糖尿病作用的实验研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [7] 刘菊芳,吴庆芳,赵燕芬. 栀子苷乙醇提取的方法优化[J]. 山东中医杂志,2004,23(11):687.
- [8] 胡震,杨广德,罗国安,等. 栀子中栀子苷提取工艺及 HPLC 分析[J]. 中成药,2006,28(3):336.
- [9] 涂盛辉,邱祖民,刘燕燕,等. 中药栀子提取工艺的优化[J]. 中成药,2006,28(10):1519.
- [10] 孙黎黎. 栀子抗抑郁活性部位微球的制备工艺研究[D]. 长春:长春中医药大学,2011.

[责任编辑 刘德文]