

# 正交试验优选天麻安神颗粒乙醇提取工艺

樊晖, 田原\*

(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的: 优选天麻安神颗粒的乙醇提取工艺。方法: 以天麻素、五味子醇甲、钩藤碱总提取量及出膏率为综合评价指标, 通过  $L_9(3^4)$  正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数对天麻安神颗粒醇提工艺的影响。采用 HPLC 测定 3 种指标成分的含量, 天麻素流动相乙腈-0.05% 磷酸 (3:97), 检测波长 220 nm; 五味子醇甲和钩藤碱流动相乙腈-0.001% 三乙胺 (45:55), 检测波长 250 nm。结果: 最佳提取工艺为加 6 倍量 50% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。天麻素、五味子醇甲、钩藤碱提取量分别为 2.69, 1.47, 0.18  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , 干膏率 22.64%。结论: 优选的醇提工艺稳定可行, 适用于天麻安神颗粒的工业化生产。

**[关键词]** 天麻安神颗粒; 天麻素; 五味子醇甲; 钩藤碱

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0021-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015070021

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150211.1503.006.html>

**[网络出版时间]** 2015-02-11 15:03

**Optimization of Extraction Technology for Tianma Anshen Granules by Orthogonal Design** FAN Hui, TIAN Yuan\* (Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technology of Tianma Anshen granules. **Method:** With dry extract rate and contents of gastrodin, schizandrin, rhynchophylline as comprehensive index, orthogonal design was adopted to investigate effects of the amount and concentration of ethanol, extracting time and times on extraction technology. Contents of gastrodin, schizandrin and rhynchophylline were determined by HPLC, mobile phase of gastrodin was acetonitrile-0.05% phosphoric acid (3:97), detection wavelength was 220 nm; mobile phase of schizandrin and rhynchophylline was acetonitrile-0.001% triethylamine (45:55), detection wavelength was 250 nm. **Result:** Optimal extraction technology was extracted 3 times with 6 times the amount of 50% ethanol for 1 h per time. Extraction amounts of gastrodin, schizandrin and rhynchophylline were 2.69, 1.47, 0.18  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , dry extract rate was 22.64%. **Conclusion:** This optimized extraction technology is stable, feasible and suitable for industrial production of Tianma Anshen granules.

**[Key words]** Tianma Anshen granules; gastrodin; schizandrin; rhynchophylline

天麻安神汤为临床经验方, 由天麻、五味子、钩藤、黄精、首乌藤等 7 味药材组成, 具有补益肝肾、宁心安神的功效, 常用于治疗失眠多梦等症, 疗效显著。前期药效学试验证明, 该方能增加阈下剂量戊巴比妥钠引起的小鼠入睡维持时间。现代研究表明方中天麻的活性成分——天麻素具有抗焦虑、镇静

催眠的作用<sup>[1]</sup>; 五味子具有镇静、催眠作用, 活性成分为五味子醇甲<sup>[2]</sup>; 钩藤具有镇静作用, 主要活性成分为钩藤碱<sup>[3]</sup>。为了便于携带与服用, 本实验拟将本方开发成颗粒剂, 以天麻素、五味子醇甲、钩藤碱总提取量及出膏率为综合评价指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验优选天麻安神颗粒的醇提工艺, 为该制剂

**[收稿日期]** 20140613(002)

**[基金项目]** 辽宁省科技厅重点实验室项目(2011)

**[第一作者]** 樊晖, 硕士, 主管中药师, 从事中药制剂分析与新药开发研究, Tel:024-31961931, E-mail: fanhuilnyz@qq.com

**[通讯作者]** \* 田原, 副主任药师, 从事中药制剂分析与新药开发研究, Tel:024-31961931, E-mail: 254276239@qq.com

的开发与应用提供参考。

## 1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),AE-240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),HN101-3A 型电热鼓风干燥箱(南通沪南科学仪器有限公司)。天麻(*Gastrodia elata*,产地四川)、五味子(*Schisandra chinensis*,产地辽宁)、钩藤(*Uncaria rhynchophylla*,产地广西)、黄精(*Polygonatum kingianum*,产地云南)、首乌藤(*Polygonum multiflorum*,产地河南)等药材均购自河北安国市神禾中药饮片有限责任公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;天麻素、钩藤碱对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20130322,20120426),五味子醇甲对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110857-201211),乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 干膏率的测定** 按处方比例称取各药材共 170 g,其中天麻、五味子、钩藤各 30 g,按一定条件回流提取,滤过,合并提取液,回收乙醇,浓缩,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥至恒重,精密称定质量,计算干膏率。

### 2.2 天麻素的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸(3:97),检测波长 220 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取天麻素对照品适量,置于量瓶中,加流动相制成 45.4 mg·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液制备** 取提取液干膏,研细,精密称取约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,称定质量,超声提取 30 min,放置至室温,称定质量,加 50% 乙醇补充缺失的质量,摇匀,静置,取上清液,过滤,即得。

**2.2.4 方法学考察** 经线性范围考察确定天麻素回归方程  $Y = 2\,570.0X + 3.8$  ( $r = 0.999\,6$ ),天麻素进样量在 0.45 4 ~ 2.27 μg 与峰面积呈良好线性关系。精密度试验中天麻素峰面积的 RSD 1.0%,表明仪器精密度良好;稳定性试验 8 h 内供试品溶液中天麻素峰面积的 RSD 1.0%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性较好;重复性试验中天麻素含量的 RSD 1.8%,表明本方法重复性较好。精密称取已知天麻素质量分数(0.83 mg·g<sup>-1</sup>)的提取液干膏 6 份,每份

0.5 g,各加入天麻素对照品 0.41 mg,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,计算平均加样回收率 96.99%,RSD 2.1%。

### 2.3 五味子醇甲和钩藤碱的含量测定

**2.3.1 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.001% 三乙胺(45:55),检测波长 250 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C。

**2.3.2 对照品溶液制备** 精密称取五味子醇甲、钩藤碱对照品置量瓶中,加流动相制成质量浓度分别为 139,20.9 mg·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液制备** 取提取液干膏,研细,精密称取约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,称定质量,超声 30 min,放置至室温,加甲醇补充缺失的质量,摇匀,静置,取上清液,过滤,即得。

**2.3.4 方法学考察** 经线性范围考察,五味子醇甲、钩藤碱回归方程分别为  $Y = 2\,218.9X + 21.1$  ( $r = 0.999\,7$ ), $Y = 9\,960.8X + 33.6$  ( $r = 0.999\,6$ ),二者进样量分别在 1.39 ~ 6.95,0.020 9 ~ 0.104 5 μg 呈良好线性关系。精密度试验中五味子醇甲、钩藤碱峰面积的 RSD 均为 1.0%,表明仪器精密度良好;稳定性试验 8 h 内五味子醇甲、钩藤碱峰面积的 RSD 分别为 1.1%,1.2%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性较好;重复性试验五味子醇甲、钩藤碱含量的 RSD 分别为 1.8%,1.5%,表明本方法重复性较好。精密称取已知含量的提取液干膏 6 份(五味子醇甲、钩藤碱质量分数分别为 1.01,0.18 mg·g<sup>-1</sup>),每份 0.5 g,各加入五味子醇甲对照品 0.51 mg 和钩藤碱对照品 0.09 mg,按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液,计算平均加样回收率分别为 96.99%,98.72%,RSD 均为 2.1%。

**2.4 正交试验优选** 在前期试验基础上,选择乙醇为提取溶剂,乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素,以天麻素、五味子醇甲、钩藤碱总提取量和干膏率为综合评价指标,总含量和干膏得率的权重分别为 0.7,0.3。称取处方量药材,共 9 份,每份 170 g,其中天麻、五味子、钩藤各 30 g,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验优选提取工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 A > D > B > C。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果表明因素 A 具有极显著性影响,因素 D 的影响具有显著性,确定最佳提取工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,即加 6 倍量 50% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。

表 1 天麻安神颗粒醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of ethanol extraction process of Tianma Anshen granules

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	干膏率 /%	天麻素 /mg·g <sup>-1</sup>	五味子醇甲 /mg·g <sup>-1</sup>	钩藤碱 /mg·g <sup>-1</sup>	综合评分 /分
1	50	6	1	1	16.61	2.65	1.01	0.18	84.80
2	50	8	2	2	20.81	2.66	1.23	0.19	94.24
3	50	10	3	3	23.03	2.72	1.33	0.19	100.00
4	70	6	2	3	21.37	1.89	1.70	0.17	89.71
5	70	8	3	1	16.28	1.14	1.93	0.14	74.00
6	70	10	1	2	20.52	0.83	1.98	0.12	75.03
7	90	6	3	2	18.54	0.54	2.06	0.11	68.73
8	90	8	1	3	20.91	0.51	2.32	0.12	75.83
9	90	10	2	1	13.82	0.41	1.78	0.09	55.59

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	1 037.43	142.14	<0.01
B	37.87	4.53	>0.05
C(误差)	8.36	1.00	
D	436.91	52.28	<0.05

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ ,  $F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

**2.5 验证试验** 按处方比例称取处方量药材,共 3 份,按最佳提取工艺进行验证试验,结果天麻素、五味子醇甲、钩藤碱的平均提取量分别为 2.69,1.47,0.18 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 分别为 2.8%,2.1%,2.3%,平均干膏率 22.64%,RSD 1.1%,表明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

天麻素、五味子醇甲及钩藤碱是与天麻安神方疗效密切相关的指标性成分,故采用这 3 种成分总提取量为指标;干膏率对药效及大生产亦有一定影响。两者结合较单一指标指标更加全面、合理,符合中药复方多成分、多靶点的作用特点,为该复方的颗粒剂开发提供参考。预试验选择水和 65% 乙醇为提取溶剂进行考察,结果发现选择 65% 乙醇时,3 种指标成分的提取量较高,结合参考文献[1-3],确定以乙醇为提取溶剂。曾尝试采用 HPLC 梯度洗脱法同时测定天麻素、五味子醇甲及钩藤碱含量,但分离周期长,色谱峰有拖尾现象,故天麻素单独进行含量测定,而五味子醇甲及钩藤碱同时测定。

在测定钩藤碱含量时,采用缓冲盐溶液及不同浓度三乙胺溶液为流动相,钩藤碱虽能获得良好分离,但文献中缓冲盐流动相配置比较繁琐,三乙胺溶液碱性偏大,对色谱柱有一定影响<sup>[4-7]</sup>。经过反复试验,采用比文献中低浓度的三乙胺溶液为流动相,同时测定了五味子醇甲和钩藤碱含量<sup>[4-7]</sup>,结果钩藤碱色谱峰峰形及分离度良好,为其他复方中多指标成分的同时测定提供参考。

### [参考文献]

- [1] 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,2010:54-55.
- [2] 张震,张长林. 正交试验优选天麻的提取工艺[J]. 齐鲁药事,2011,30(6):311-313.
- [3] 左红香,金勇. 正交法优选孔枕益智片五味子的提取工艺[J]. 北华大学学报:自然科学版,2011,12(2):177-179.
- [4] 王晓靓. RP-HPLC 法测定钩藤中钩藤碱和异钩藤碱的含量[J]. 黑龙江医学,2014,38(1):64-65.
- [5] 刘明,汤建林,胡岚岚,等. 中药钩藤中钩藤碱含量的测定[J]. 第三军医大学学报,2010,32(14):1539-1541.
- [6] 陈志远,王兴,李晓倩,等. 异钩藤碱与天麻素合用对异钩藤碱在大鼠肝脏分布的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):193-196.
- [7] 李珊,李江,游绍雪. 高效液相色谱法同时测定钩藤中 4 种生物碱的含量[J]. 贵州农业科学,2013,41(2):50-53.

[责任编辑 刘德文]