

茵陈四苓颗粒乙醇提取工艺优选

赵剑*, 蒲清荣, 陈玉兰, 黄锐, 罗群

(泸州医学院附属中医医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 优选茵陈四苓颗粒的乙醇提取工艺。方法: 以栀子苷提取量为指标, 通过单因素试验比较乙醇回流法、乙醇超声法和乙醇渗漉法, 确定茵陈四苓颗粒中部分药材的提取方法; 通过正交试验考察乙醇体积分数、浸泡时间、加醇量、渗漉流速对提取工艺的影响。采用 HPLC 测定栀子苷含量, 色谱条件为 Ultimate™ C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (15:85), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃, 检测波长 238 nm, 进样量 10 μL。结果: 采用乙醇渗漉法提取, 最佳提取工艺条件为加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 12 h, 渗漉流速 5 mL·min⁻¹, 栀子苷提取量达 42.524 4 mg·g⁻¹。结论: 该工艺客观可行、稳定合理, 可为茵陈四苓颗粒的工业生产提供理论依据。

[关键词] 渗漉提取法; 正交设计; 高效液相色谱; 栀子苷; 茵陈四苓颗粒; 栀子; 泽泻

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0031-04

[doi] 10.11653/syjf2013220031

Optimization of Ethanol Extraction Process for Yinchen Siling Granules

ZHAO Jian*, PU Qing-rong, CHEN Yu-lan, HUANG Rui, LUO Qun

(Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction technology of Yinchen Siling granules. **Method:** With yield of geniposide as index, single factor test was adopted to screen ethanol extraction method, such as refluxing method, ultrasonic method and percolation method; Effects of ethanol concentration, soaking time, ethanol amount and percolation velocity on extraction technology was investigated by orthogonal design. The content of geniposide was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Ultimate™ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-water (15:85), flow rate 1 mL·min⁻¹, column temperature 40 ℃, detection wavelength 238 nm, injection volume 10 μL. **Result:** Ethanol percolation method was adopted, the best extraction conditions were as follows: soaked 12 h by adding 10 times the amount of 70% ethanol with percolation velocity of 5 mL·min⁻¹; Under these conditions, yield of geniposide was up to 42.524 4 mg·g⁻¹. **Conclusion:** This optimized extraction process was stable, reasonable and practical, it could provide a theoretical basis for industrial production of Yinchen Siling granules.

[Key words] percolation extraction method; orthogonal design; HPLC; geniposide; Yinchen Siling granules; Gardeniae Fructus; Alismatis Rhizoma

茵陈四苓颗粒为泸州医学院附属中医医院院内制剂(川药制字 Z20070525), 由茵陈、白术、栀子、赤芍、茯苓、大黄等 9 味中药组成, 具有清热除湿、利胆退黄的功效, 用于治疗慢性活动性乙型肝炎、肝硬化

并发内毒素血症属肝胆湿热证。处方中栀子有效成分为栀子苷, 泽泻有效成分为四环三萜酮醇衍生物^[1-2], 均易溶于醇、醚等有机溶剂。现代药理研究证实栀子苷具有抗病毒、保肝利胆、镇痛抗炎等作用^[3]。为最大限度地提取该复方中有效成分, 充分发挥该制剂治疗肝硬化的功效, 本实验以栀子苷含量为指标, 通过单因素试验比较乙醇回流法、乙醇超声法和乙醇渗漉法对茵陈四苓颗粒中有效成分含量的影响, 筛选最佳提取方法, 并通过正交试验优选该

[收稿日期] 20130503(007)

[基金项目] 四川省泸州医学院课题(2011QN-91)

[通讯作者] * 赵剑, 副主任中药师, 从事中药制剂研究, Tel: 13309083908, E-mail: 562701410@qq.com

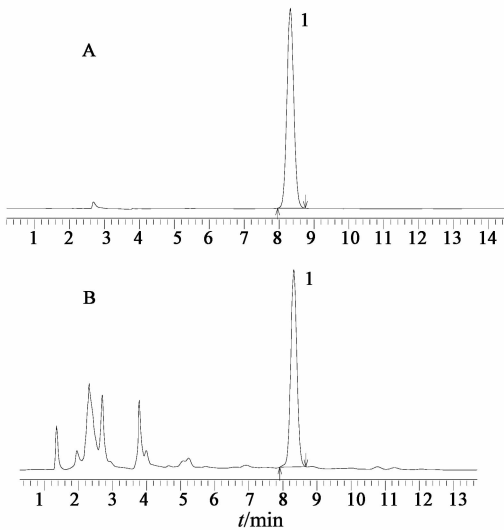
制剂的提取工艺。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),JPGT0328 型超声提取器(武汉嘉鹏电子有限公司),NRB17S3W 型电冰箱(日本松下),HH 型数显电热恒温水浴箱(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂),ZK072 型电热真空干燥箱(上海实验仪器厂),AUW120D 型电子分析天平(日本岛津)。栀子苷(中国食品药品检定研究院,批号 110749-200309),栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis、泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 均购于泸州市宝光中药饮片公司,经泸州市药检所中药室袁常珍主任鉴定,均符合《中国药典》2010 年版相关项下要求。甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ultimate™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(15:85),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,检测波长 238 nm,进样量 10 μL。理论板数按栀子苷峰计算应不低于 3 000^[4],见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 栀子苷

图 1 茵陈四苓颗粒 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品 4.1 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 线性范围考察 分别精密吸取上述对照品溶液 2.5, 5, 10, 15, 20 μL 注入高效液相色谱仪,按 2.1 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 $Y = 243\ 053X + 24\ 727$ ($R^2 = 0.999\ 8$),表明栀子苷在 0.41 ~ 3.28 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.4 提取方法比较

2.4.1 乙醇回流法 取栀子、泽泻粉碎成粗颗粒(过 20 目筛),各精密称取 30 g,置 1 L 磨口烧瓶中,加 20 倍量 60% 乙醇浸泡 30 min,加热回流提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液并减压浓缩至适量,恒温干燥,得粗提物 1。

2.4.2 乙醇超声法 取栀子、泽泻粉碎成粗颗粒(过 20 目筛),各精密称取 30 g,置 1 L 烧杯中,加入 20 倍量 60% 乙醇浸泡 30 min,超声提取 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,减压浓缩至适量,恒温干燥,得粗提物 2。

2.4.3 乙醇渗漉法 取栀子、泽泻粉碎成粗颗粒(过 20 目筛),各精密称取 30 g,加适量 60% 乙醇浸泡 30 min,取脱脂棉一团,用浸泡液润湿后垫在渗漉筒底部铺平,装筒,共加入 20 倍量 60% 乙醇,加盖密闭 24 h,以 1 ~ 3 mL·min⁻¹ 流速渗漉,收集渗漉液,减压浓缩至适量,恒温干燥,得粗提物 3。

2.5 供试品溶液的制备 分别取干浸膏各 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声 30 min,放至室温,称定质量,加甲醇补足损失质量,摇匀,滤过,精密取续滤液 10 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,即得^[5-7]。准确称取上述 3 种粗提物各 0.2 g,按上述方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定栀子苷含量,结果发现栀子苷提取量依次为 25.62, 20.57, 34.16 mg·g⁻¹,即乙醇渗漉法提取的栀子苷含量最高。

2.6 正交试验设计 选择乙醇体积分数、浸泡时间、加醇量、渗漉流速为考察因素,每个因素设 3 个水平。称取栀子、泽泻适量,粉碎成粗颗粒(过 20 目筛),准确称取 9 份样品,每份含栀子、泽泻各 30 g,采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,提取液于 80 °C 减压干燥成干浸膏,见表 1。

表 1 茵陈四苓颗粒的乙醇渗漉工艺正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间 /h	B 醇浓度 /%	C 加醇量 /倍	D 流速 /mL·min ⁻¹
1	12	50	8	1
2	24	60	10	3
3	48	70	12	5

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 精密吸取栀子苷对照品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次,结果栀子苷峰面积的 RSD 0.86%,表明仪器精密度较高。

2.7.2 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分

别于制备后 0,2,4,6,8,10 h 按 2.1 项下色谱条件进样,结果栀子苷峰面积的 RSD 1.09%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.7.3 重复性试验 取同一供试品溶液 6 份,分别按 2.1 项下色谱条件进行测定,结果栀子苷峰面积的 RSD 0.91%,表明该方法重复性良好。

2.7.4 加样回收试验 取 6 份 1 号正交试验干浸膏 0.1 g,精密称定,按 2.5 项下方法制备供试品溶液,各精密加入栀子苷对照品溶液 1 mL($0.0984 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),按 2.1 项下色谱条件测定,计算栀子苷回收率^[8],结果见表 2。

2.8 提取工艺优选 以干浸膏量、栀子苷提取量为

表 2 栀子苷加样回收率

No.	称样量 /g	样品中 质量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.1015	0.0954	0.1934	99.59	99.26	1.17
2	0.1021	0.0959	0.1955	101.22		
3	0.1016	0.0955	0.1918	97.87		
4	0.1013	0.0952	0.1921	98.48		
5	0.1025	0.0963	0.1936	98.88		
6	0.1011	0.0950	0.1929	99.49		

评价指标,优选茵陈四苓颗粒的乙醇渗漉工艺,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 3 茵陈四苓颗粒的乙醇渗漉提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	干浸膏量/g	栀子苷提取量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	1	1	1	1	7.502	14.683
2	1	2	2	2	16.218	35.720
3	1	3	3	3	19.776	43.137
4	2	1	2	3	17.716	27.863
5	2	2	3	1	7.708	18.000
6	2	3	1	2	16.915	42.308
7	3	1	3	2	13.679	21.597
8	3	2	1	3	18.265	39.654
9	3	3	2	1	11.759	33.690
栀子苷提取量	K_1	93.540	64.144	96.645	66.373	
	K_2	88.172	93.373	97.273	99.626	
	K_3	94.941	119.136	82.735	110.655	
	R	6.770	54.992	14.538	44.282	

表 4 栀子苷含量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	8.512	2	4.256		
B	504.689	2	252.344	59.288	<0.05
C	45.030	2	22.515	5.290	>0.05
D	354.238	2	177.119	41.616	<0.05

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

由直观分析可知,各因素对栀子苷提取量的影响顺序为 $B > D > C > A$ 。以极值最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果表明 B、D 因素对提取工艺的影响具有显著性差异,C 因素则无显著性差异,结合生产实际考虑,确定最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2D_3$,即加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 12 h,渗漉流速 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.9 验证试验 按处方量称取药材 3 份,按最佳

提取工艺进行 3 次验证试验,按 2.1 项下色谱条件测定,结果栀子苷提取量分别为 42.3715,41.1172,44.0846 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

通过粗略比较 3 种不同的乙醇提取方法,显示乙醇渗漉法提取得到的栀子苷含量最高。在大生产中,渗漉提取工艺既具有较高的提取率,又能为生产企业节约生产成本,是一种理想的提取工艺。栀子苷为环烯醚萜类化合物,易溶于水、甲醇和乙醇,具有抗病毒、保肝利胆、镇痛抗炎等作用,其性质稳定,含量较高,故选用栀子苷含量作为考察指标。各正交试验中出膏率不一样,但采用干浸膏中栀子苷含量作为数据分析的依据,结果无可比性,正交试验方差分析数据也不准确,故计算栀子苷含量时,选择了栀子苷在药材中绝对量。

响应面法优化槐耳/板蓝根双向发酵条件

张婧, 郭明晔, 程亦雄, 周黎, 戚岑聪, 史新元*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:优化槐耳/板蓝根双向发酵条件并确定发酵终点。方法:以菌质多糖含量为响应值,采用响应面法考察温度、相对湿度、接种量对槐耳/板蓝根双向发酵条件的影响,同时确定槐耳/板蓝根菌质双向发酵终点。利用紫外分光光度法测定菌质多糖含量。结果:槐耳板蓝根菌质多糖的最佳发酵条件为温度 29.4 ℃,接种量 0.826 mL·g⁻¹,相对湿度 75.5%,菌质多糖质量分数 11.496%,与预测值(11.548%)偏差 0.45%,二项式拟合复相关系数 0.9826,所得回归模型拟合情况良好,达到设计要求;确定发酵终点 20 d。结论:响应面法可用于优选槐耳/板蓝根双向发酵条件,具有简便、预测性良好等优点。

[关键词] 槐耳;板蓝根;双向发酵;响应面法;发酵终点;紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0034-04

[doi] 10.11653/syfyj2013220034

Optimization of Bio-Solid Bidirectional Fermentation Conditions of *Trametes robiniophila* for *Isatidis Radix* by Response Surface Methodology

ZHANG Jing, GUO Ming-ye, CHENG Yi-xiong, ZHOU Li, QI Cen-cong, SHI Xin-yuan*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize bio-solid bidirectional fermentation conditions of *Trametes robiniophila* for *Isatidis Radix* and determine fermentation terminal. **Method:** Dependent variable was the content of polysaccharides, while independent variables were temperature, moisture and inoculation amount, response surface methodology was used to optimize bio-solid bidirectional fermentation conditions; Then fermentation terminal was defined. The content of polysaccharides was determined by UV. **Result:** Optimal fermentation conditions was as following: temperature 29.4 ℃, moisture 75.5%, inoculation amount 0.826 mL·g⁻¹, bias between the observed value (11.496%) and the predicted value (11.548%) of the content of polysaccharide was 0.45%, regression coefficients of binomial fitting complex model was as high as 0.9826; Terminal of bio-solid

[收稿日期] 20130524(009)

[第一作者] 张婧, 硕士, 从事发酵工程研究, E-mail: elsazhangjing@126.com

[通讯作者] *史新元, 副教授, 研究生导师, 从事中药生物技术研究, Tel: 010-84738621, E-mail: xyshi@126.com

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第2卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 666.
- [2] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 586.
- [3] 董婉茹, 刘洪毓, 丁雅光, 等. 栀子在治疗肝脏疾病中的研究进展[M]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 250.
- [4] 王伟影, 范蕾. 丽水地产栀子的质量研究[J]. 中国药业, 2012, 21(19): 19.
- [5] 吴红娟, 王清波, 谭朝阳, 等. 不同来源栀子中栀子苷

含量测定[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(5): 35.

[6] 陈红, 唐灿, 黄锐. 优选栀子提取工艺[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(1): 36.

[7] 高宝益, 裴妙荣. 高效液相色谱法测定栀子组中栀子苷含量[J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(3): 212.

[8] 刘弘, 张振巍, 姬志强. 多指标综合评分法优选清热解毒口服液提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1326.

[责任编辑 仝燕]