

# 正交试验法优选骨愈搽剂的提取工艺

温然<sup>1</sup>, 高瑛<sup>2</sup>, 陆洋<sup>1</sup>, 杜守颖<sup>1\*</sup>, 赵雪姣<sup>1</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京市顺义区中医医院, 北京 101300)

**[摘要]** 目的: 优选骨愈搽剂的提取工艺。方法: 以羟基红花黄色素 A 含量为指标, 采用 HPLC 测定, 通过 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验法考察乙醇体积分数、提取次数、溶剂用量、提取时间对骨愈搽剂提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 且羟基红花黄色素 A 含量较高。

**[关键词]** 骨愈搽剂; 提取工艺; 正交试验; 羟基红花黄色素 A; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0039-03

**[doi]** 10.11653/zgsyfyjzz2013070039

## Optimization of Extraction Technology for Guyu Liniment by Orthogonal Design

WEN Ran<sup>1</sup>, GAO Ying<sup>2</sup>, LU Yang<sup>1</sup>, DU Shou-ying<sup>1\*</sup>, ZHAO Xue-jiao<sup>1</sup>

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Shunyi Traditional Chinese Medicine Hospital, Beijing 101300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Guyu liniment. **Method:** Orthogonal test was employed to optimize extraction procedure, including the concentration of ethanol, the amount of solvent, extraction time and extracting times. The content of hydroxy safflor yellow A (HSYA) was used as index which was determined by HPLC. **Result:** Optimum extracting process for Guyu liniment was as follows: reflux extracted 2 times with 12 times the amount of 70% ethanol, 1.5 h per time. **Conclusion:** This optimized process was stable and feasible with relatively high content of HSYA.

**[Key words]** Guyu liniment; extraction process; orthogonal test; hydroxy safflor yellow A; HPLC

骨愈搽剂处方来源于北京中医医药骨外科临床经验方, 由红花、艾叶等 6 味中药组成, 具有活血化瘀止痛的功效。处方中药味所含有效成分以黄酮、生物碱、萜类、挥发油为主<sup>[1]</sup>, 这些化学成分均具有较好的醇溶性, 故拟采用乙醇溶液为提取溶媒, 除红花中明确以羟基红花黄色素 A 为指标成分外, 其他药材中无明确指标成分。本实验以羟基红花黄色素 A 为指标, 选取乙醇体积分数、提取次数、溶剂用量、

提取时间为考察因素, 通过正交试验优选骨愈搽剂的提取工艺, 为骨愈搽剂的制备和临床推广提供实验依据。

### 1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), BS 110S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。红花、艾叶等饮片购自北京盛世龙药业有限公司, 经本校生药教研室刘春生教授鉴定, 均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求。羟基红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111637-201106), 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯, 乙醇为医用乙醇, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 羟基红花黄色素 A 含量测定

2.1.1 供试品溶液的制备 称取处方量药材进行

**[收稿日期]** 20121026(004)

**[基金项目]** 北京市中医药科技项目(JJ2011-36)

**[第一作者]** 温然, 硕士, 从事中药制剂研究, E-mail: ran09291210@sina.com

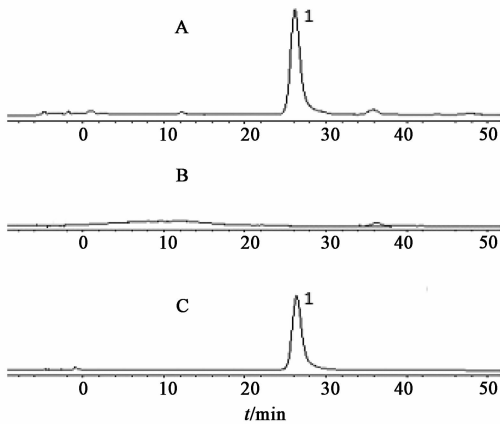
**[通讯作者]** \* 杜守颖, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738615, E-mail: dushouying@263.net

提取,精密移取提取液 1 mL,用 25% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中;精密移取 1 mL,用 25% 甲醇定容至 10 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,加 25% 甲醇溶解并定容,即得。

**2.1.3 阴性对照溶液的制备** 按处方比例称取除红花外的其他药材进行提取,提取液按 2.1.1 项下方法制备阴性对照液。

**2.1.4 色谱条件**<sup>[2-4]</sup> 流动相甲醇-乙腈-0.7% 磷酸(26:2:72),Diamonsil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 403 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。见图 1。



A. 供试品;B. 阴性样品;C. 对照品;1. 羟基红花黄色素 A

图 1 骨愈搽剂 HPLC

**2.1.5 标准曲线制备** 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品 3.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加 25% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得 303 mg·L<sup>-1</sup> 母液;分别精密量取适量母液,加 25% 甲醇制成 3.0, 9.0, 15.0, 24.0, 30.0, 39.0 mg·L<sup>-1</sup> 系列质量浓度的对照品溶液,分别吸取上述 6 份对照品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按《中国药典》2010 年版一部附录 VID 项下方法测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $A = 30.161C + 2.607$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 3.0 ~ 39.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.1.6 样品测定** 精密吸取供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,按《中国药典》2010 年版一部附录 VI D 项下方法测定。

**2.2 提取工艺优选** 在预试验基础上,选择乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间、提取次数为考察因素<sup>[5]</sup>,以羟基红花黄色素 A 质量为考察指标,每个因素设定 3 个水平,因素水平见表 1。称取处方药材,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验( $n = 2$ ),按正交试验条件进行提取,药液滤过,冷却,减压回收乙醇至

1 g·mL<sup>-1</sup>,备用。试验安排及结果见表 2,将 18 组试验数据代入 SPSS 17.0 软件进行统计分析,方差分析见表 3。

表 1 骨愈搽剂提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 溶剂用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	30	8	1	1
2	50	10	1.5	2
3	70	12	2	3

表 2 骨愈搽剂的提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	羟基红花黄色素 A 质量/mg
1	30	8	1	1	99.147
2	30	10	1.5	2	130.180
3	30	12	2	3	120.771
4	50	8	1.5	3	137.302
5	50	10	2	1	105.711
6	50	12	1	2	134.636
7	70	8	2	2	131.135
8	70	10	1	3	133.681
9	70	12	1.5	1	118.105
K <sub>1</sub>	116.699	122.528	122.488	107.654	
K <sub>2</sub>	125.883	123.191	128.529	131.984	
K <sub>3</sub>	127.640	124.504	119.206	130.585	
R	10.941	1.976	9.323	24.329	

表 3 骨愈搽剂的提取工艺正交试验方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	414.302	2	207.151	17.631	<0.01
B	12.138	2	6.069	0.517	>0.05
C	268.374	2	134.187	11.421	<0.01
D	2 239.333	2	1 119.667	95.296	<0.01
误差	105.744	9	11.749		

注:  $F_{0.05}(2,9) = 4.26, F_{0.01}(2,9) = 8.02$

由表 2 结果可知,影响因素的大小顺序为  $D > A > C > B$ ,最佳提取工艺为  $A_2B_1C_2D_3$ ;方差分析结果表明因素 A, D 对提取工艺有极显著影响, C 因素具有显著影响, B 因素无显著影响,最佳工艺为  $A_3B_3C_2D_2$ 。为比较两者的提取效率,分别按  $A_2B_1C_2D_3$  和  $A_3B_3C_2D_2$  进行 2 次验证试验。结果羟基红花黄色素 A 平均质量分别为 139.619, 151.346 mg;表明  $A_3B_3C_2D_2$  要显著高于  $A_2B_1C_2D_3$ ,故确定最佳提取工艺为  $A_3B_3C_2D_2$ ,即加 12 倍量 70% 乙醇回

# 威灵仙挥发油的超临界萃取工艺优化及 GC-MS 分析

傅瑶<sup>1,2</sup>, 李颜<sup>1</sup>, 霍炎<sup>1</sup>, 郭澄<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海交通大学附属第六人民医院药剂科, 上海 200233; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 优选超临界 CO<sub>2</sub> 萃取威灵仙挥发油的工艺, 并对挥发油成分进行 GC-MS 分析。方法: 以挥发油提取率为指标, 通过单因素试验和正交试验考察提取时间、原料粒度、萃取压力和温度对威灵仙挥发油的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺的影响, 并通过 GC-MS 对威灵仙挥发油中化学成分进行分析。结果: 各因素对挥发油得率的影响顺序为萃取压力 > 萃取时间 > 萃取温度; 最佳萃取工艺为压力 20 MPa, 时间 1.5 h, 温度 45 °C; 挥发油得率 0.44%。GC-MS 分析确认了 156 种化学成分, 占挥发油总含量的 85.03%, 相对含量 > 1% 的成分占挥发油总含量的 51.78%。结论: 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法用于提取威灵仙挥发油具有时间短、收率高等优点, 较传统的水蒸气蒸馏法提取效率高, 优化的工艺稳定可靠, 通过 GC-MS 发现威灵仙挥发油中活性成分原白头翁素。

**[关键词]** 威灵仙, 挥发油, 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺, 正交试验设计, GC-MS

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0041-05

**[doi]** 10.11653/zgsyfyjxzz2013070041

## Optimization of Supercritical Fluid<sub>E</sub>xtraction Technology and GC-MS Analysis of Volatile Oil from *Clematis chinensis*

FU Yao<sup>1,2</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, HUO Yan<sup>1</sup>, GUO Cheng<sup>1,2\*</sup>

**[收稿日期]** 20121031(004)

**[基金项目]** 上海市卫生局中医药科研基金课题(2010Y008A)

**[第一作者]** 傅瑶, 硕士, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 021-24058789, E-mail: jzzyfy1987@126.com

**[通讯作者]** \* 郭澄, 教授, 主任药师, 博士生导师, 博士, 从事中药有效成分、质量标准及临床药理学研究, E-mail: gboss@126.com

流提取 2 次, 每次 1.5 h; 该工艺提取物中羟基红花黄色素 A 质量分数为 0.25%。

### 3 讨论

羟基红花黄色素 A 为具有单查尔酮苷类结构的化合物, 是红花活血化瘀的有效成分, 具有扩张周围血管、降低血压、抗血小板和抗心肌缺血等作用<sup>[6]</sup>。但有报道其对光、热敏感, 长时间加热或暴露在空气中, 含量会下降<sup>[7]</sup>, 说明其稳定性不好, 故推测回流时间增加, 其含量会有所下降, 与正交试验结果正好相符。另外, 羟基红花黄色素 A 为水溶性成分, 但其在 70% 乙醇中含量较高, 有文献以羟基红花黄色素 A 为指标考察制剂提取工艺, 最终也将提取溶剂确定为 70% 乙醇<sup>[8]</sup>, 分析原因可能为在此条件下, 其水解降低或方中其他成分对羟基红花黄色素 A 有增溶作用, 具体机制还有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 杨云, 张晶, 陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 336.
- [2] 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: 103.
- [3] 王永新, 徐荣, 白霜. 高效液相色谱法测定红花散瘀胶囊中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 12.
- [4] 庞来祥, 刘艳梅, 张丽艳, 等. 乳疾一贴灵巴布剂水提工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 26.
- [5] 王振辉, 李超生, 王海森, 等. 甘草苷提取工艺正交试验优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 30.
- [6] 姚苗苗, 董仲才, 任爱农. 羟基红花黄色素 A 的研究进展 [J]. 中南药学, 2009, 7(12): 931.
- [7] 王慧, 张立伟, 晋民杰, 等. 羟基红花黄色素 A 稳定性研究 [J]. 太原科技大学学报, 2010, 31(1): 81.
- [8] 李德华, 严锦贤. 正交法提取神农颈痛灵软膏中有效成份的工艺研究 [J]. 海峡药学, 2011, 23(11): 24.

[责任编辑 全燕]