正交试验优选地龙水提取工艺

贺葵邦，王英姿*，张春泥，冯艾灵，张胜海
（北京中医药大学中药学院，北京 100102）

［摘要］ **目的**：优选地龙的水提取工艺条件。**方法**：以次黄嘌呤含量为指标，HPLC 测定指标成分含量，在单因素试验基础上，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察加水量、提取次数、提取时间对次黄嘌呤含量的影响，优选地龙的水提取工艺。**结果**：各因素对水提取工艺的影响顺序为提取次数 > 提取时间 > 加水量；最佳水提取工艺为地龙药材加 10 倍量水回流提取 1 次，提取时间 1 h。**结论**：优选的水提取工艺稳定可行。

［关键词］ 地龙，提取工艺，单因素试验，正交试验
［中图分类号］ R283.6 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2013)06-0033-03

Optimization of Water Extraction Technology for *Pheretima aspergillum* by Orthogonal Test

HE Kui-bang, *WANG Ying-zi**, *ZHANG Chun-ni*, *FENG Ai-ling*, *ZHANG Sheng-hai*
(*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100102, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: To optimize water extraction technology conditions of *Pheretima aspergillum*. **Method**: With the content of hypoxanthine as index, based on single factor test, effects of extraction time, extraction times and the amount of water were investigated by L_9 (3^4) orthogonal test. HPLC was used to determine the content of hypoxanthine. **Result**: Influencing order of various factors on water extraction technology was extraction times > extraction time > the amount of water; Optimal water extraction technology was as following: reflux extracted 1 time with 10 times the amount of water, extraction time of one hour. **Conclusion**: This optimized technology was stable and feasible.

［**Key words**］ *Pheretima aspergillum*; extraction technology; single factor test; orthogonal test

地龙性寒，味咸，具有清热定惊、通络平喘、利尿等功效，用于治疗高热神昏、惊痫抽搐、高血压等症[1-2]。地龙中富含的氨基酸、核酸等成分具有抗血栓、促进伤口愈合、增强免疫等作用[3]。本实验以次黄嘌呤含量为指标，采用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交试验优选广地龙的水提取工艺，为广地龙的纯化工艺提供实验依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪（SIL-20A 型自动进样器，SPD-20A 型紫外可见检测器，日本岛津），DZF-6050 型真空干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）。地龙药材购自河北省安国药材市场，经北京中医药大学张贵君教授鉴定为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥体。次黄嘌呤对照品（中国食品药品检定研究院，批号 140661-200903），甲醇为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

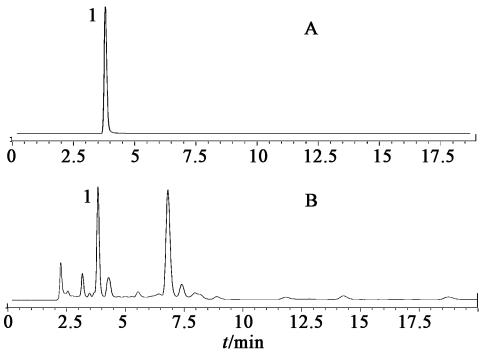
2 方法与结果

2.1 次黄嘌呤含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent Technologies ZORBAX

［收稿日期］ 20120929(007)
［基金项目］ 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队项目(2011-CXTD-13)；中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金项目(SKL2010M0302)；北京中医药大学自主课题(2011-JYBZZ-JS048)
［第一作者］ 贺葵邦，在读硕士，从事中药新剂型与新技术研究，E-mail：hkb0723@126.com
［通讯作者］ * 王英姿，博士，副教授，硕士生导师，从事中药新剂型与新技术研究，Tel：010-84738615，E-mail：wangyzi@sina.com

Extend C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相水-甲醇(95∶5),柱温 35 ℃,进样量 5 μL,流速 1.0 mL·min^{-1},检测波长 254 nm。理论塔板数按次黄嘌呤峰计应不低于 2 000。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 次黄嘌呤

图 1 地龙 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取次黄嘌呤适量,置于量瓶中,加水稀释至 109 mg·L^{-1}。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取地龙药材粗粉 5.0 g,置于圆底烧瓶中,加水浸泡一定时间,加热回流提取,过滤,浓缩,离心并定容至 50 mL。精密量取浓缩液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密移取次黄嘌呤对照品溶液 0.1,0.5,1,2,3,4,6,10 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,分别进样 5 μL,按 **2.1.1** 项下色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标,次黄嘌呤质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 22\ 855X - 9\ 927.8$ ($R^2 = 0.999\ 8$),线性范围 1.09 ~ 109 mg·L^{-1}。

2.1.5 精密度试验 精密量取次黄嘌呤对照品溶液,连续进样 6 次,每次 5 μL,测定峰面积,结果 RSD 0.19%,表明方法精密度良好。

2.1.6 重复性试验 准确称取地龙药材粗粉 5.0 g,平行 5 份,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液,并按 **2.1.1** 项下色谱条件测定,计算次黄嘌呤为 0.664 8 mg·g^{-1},RSD 2.0%。

2.1.7 稳定性试验 精密称取次黄嘌呤对照品适量,按 **2.1.2** 项下方法制备对照品溶液,分别于配制后 0,5,20,24 h 进样,测定峰面积,计算次黄嘌呤含量。结果次黄嘌呤含量 RSD 0.68%,表明对照品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 回收率试验 精密量取已知含量的地龙样品溶液 2 mL,分别加入 26.16 mg·L^{-1}次黄嘌呤对照品溶液 2 mL,混匀,定容至 5 mL,平行操作 6 份,按 **2.1.1** 项下方法测定。结果平均回收率 99.59%,RSD 1.11%(表 1),表明该方法回收率良好。

表 1 次黄嘌呤含量测定加样回收率考察

No.	样品中含量 /μg	加入量 /μg	实测值 /μg	回收率 /%
1	52.02	52.32	103.76	98.891
2	53.12	52.32	105.14	99.427
3	52.14	52.32	103.54	98.242
4	51.25	52.32	103.31	99.503
5	52.23	52.32	104.56	100.019
6	51.98	52.32	105.07	101.472

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取溶剂的考察 分别选取水,50% 乙醇及 70% 乙醇为提取溶剂。称取地龙药材粗粉适量,加 10 倍量溶剂浸泡 30 min,加热回流提取 2 次,每次 1 h,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液,测定次黄嘌呤含量,结果表明提取溶剂为水时,次黄嘌呤含量最高。

2.2.2 提取时间的考察[4] 称取地龙药材粗粉适量,加 10 倍量水浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次提取时间分别为 1,1.5,2,2.5 h,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液,测定次黄嘌呤含量,结果表明提取时间为 1 h 时,次黄嘌呤含量最高。且随提取时间的增加,次黄嘌呤含量逐渐降低。故提取时间选取 0.5,1,1.5 h 3 个水平。

2.2.3 溶剂用量的考察 称取地龙药材粗粉适量,分别加 6,8,10,12,14 倍量水浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次提取 1 h,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液,测定次黄嘌呤含量。结果表明,次黄嘌呤含量随加水量的增加而增加,当加水量为 12 倍量时,次黄嘌呤含量达最高,而增加至 14 倍量时次黄嘌呤含量降低。故加水量选取 8,10,12 倍量 3 个水平进行考察。

2.3 正交试验设计 在单因素试验基础上,以次黄嘌呤含量为指标,选取提取时间、提取次数、加水量为考察因素,每个因素设 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 2。称取地龙粗粉 5.0 g,平行 9 份,按正交表加入相应倍量水浸泡 30 min,回流提取,合并药液,滤过,浓缩,离心并定容至 50 mL,按 **2.1.3** 项下方法制备供试品溶液,测定次黄嘌呤含量,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

由直观分析可知,各因素对次黄嘌呤含量的影响顺序为 $B > A > C$,即提取次数对次黄嘌呤含量的

表 2　地龙水提取工艺正交试验因素水平

水平	*A* 提取时间 /h	*B* 提取数 /次	*C* 加水量 /倍
1	0.5	1	8
2	1.0	2	10
3	1.5	3	12

表 3　地龙水提取工艺正交试验安排

No.	*A*	*B*	*C*	次黄嘌呤 /mg·g^{-1}
1	1	1	1	2.346
2	1	2	2	2.288
3	1	3	3	1.992
4	2	1	2	2.595
5	2	2	3	2.180
6	2	3	1	2.102
7	3	1	3	2.520
8	3	2	1	2.233
9	3	3	2	1.923
K_1	2.209	2.487	2.227	
K_2	2.293	2.233	2.269	
K_3	2.225	2.006	2.231	
R	0.084	0.482	0.041	

表 4　方差分析

方差来源	*SS*	*f*	*MS*	*F*	*P*
A	0.012	2	0.006	0.296	>0.05
B	0.348	2	0.174	8.738	>0.05
C	0.003	2	0.002	0.080	>0.05
D(误差)	0.04	2	0.02		

注:$F_{0.05}(2,2)=19$。

影响较大,方差分析表明各因素对次黄嘌呤含量的影响均无显著性差异。确定最佳水提取工艺为 $B_1A_2C_2$,即加 10 倍量水提取 1 次,提取时间 1 h[5-6]。

2.4　验证试验　精密称取地龙粗粉适量,按优选的水提取工艺进行 3 次验证试验,结果次黄嘌呤质量分数(2.539 ± 1.392) mg·g^{-1}。表明优选的工艺稳定可行、重复性较高。

3　讨论

预试验曾尝试多种流动相,比较流动相水-甲醇的比例(95∶5;92∶8;90∶10),结果表明水-甲醇(95∶5)为流动相时,样品分离较好,且重复性好。

次黄嘌呤的分子结构中含有内酰胺,放置时间较长时会发生分解,因此其对照品溶液和供试品溶液不宜存放过久。在选用地龙药材时,应选用整洁干净的药材,以避免试验结果受泥沙杂质的影响。实验过程中发现,如果地龙水提液未经纯化,会对后续制剂的成型产生明显影响。

[参考文献]

[1] 李勇文. 地龙的研究进展[J]. 广西医学,2004,26(5):699.

[2] 木海鸥,苏孝共. 地龙的药理研究概要[J]. 中国药业,2007,16(1):61.

[3] 刘亚明,郭继龙,刘必旺,等. 中药地龙的活性成分及药理作用研究进展[J]. 山西中医,2011,27(3):44.

[4] 陈可夫,王前新,朱德艳,等. 蚯蚓素 9201 平喘的实验研究和临床试验[J]. 荆门职业技术学院学报,2002,17(6):66.

[5] 李奉勤,田志国,史冬霞,等. 正交试验探讨降香挥发油的最佳提取条件[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(4):23.

[6] 王平,刘善新,单玲玲,等. 正交试验法优选颈痛舒贴膏水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):24.

[责任编辑　仝燕]