

大黄通气口服液的提取纯化工艺优选

刘光斌^{1*}, 谢六生¹, 隆旭红², 李怀彪²

(1. 甘肃省酒钢医院, 甘肃 嘉峪关 735100; 2. 嘉峪关市药品检验所, 甘肃 嘉峪关 735100)

[摘要] **目的:** 优选大黄通气口服液的提取纯化工艺。**方法:** 以挥发油提出量为指标, 对木香、枳实等药材中挥发油提取工艺进行正交试验优化, 考察因素为加水量、浸泡时间及提取时间; 以水提取物得率和大黄酸、大黄素、大黄酚总量为考察指标, 采用正交设计法考察煮提时间、煮提次数和加水量等因素对大黄通气口服液水提取工艺的影响; 以干浸膏得率与总大黄酸、大黄素、大黄酚总提取率为考察指标, 采用正交试验法考察药液相对密度、乙醇体积分数及醇沉时间等因素对大黄通气口服液乙醇沉淀工艺的影响。**结果:** 优选的挥发油提取工艺为加4倍量水蒸馏2h; 最佳水提取工艺为加8倍量水煎煮2次, 每次2h; 优选醇沉工艺为浓缩至相对密度1.20(80℃), 加入95%乙醇使药液含醇量为50%, 醇沉时间为24h。**结论:** 该提取纯化工艺合理、可行, 适合工业生产的需要。

[关键词] 大黄通气口服液; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 提取工艺; 正交设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0067-04

Optimization of Extraction and Purification Technology for Dahuang Tongqi Oral Liquid

LIU Guang-bin^{1*}, XIE Liu-sheng¹, LONG Xu-hong², LI Huai-biao²

(1. Jiugang Hospital of Gansu Province, Jiayuguan 735100, China;

2. Jiayuguan Institute for Drug Control, Jiayuguan 735100, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification technology for Dahuang Tongqi oral liquid.

Method: With volume of volatile oil as index, orthogonal test was used to optimize extraction technology of volatile oil from *Aucklandia lappa*, *Citrus sinensis* and so on with soaking time, extraction times, the amount of water as factors; With yield of water extract, total content of rhein, emodin and chrysophanol as indexes, orthogonal test was used to investigate factors of water extraction process for Dahuang Tongqi oral liquid, such as extraction time, extraction times and the amount of water; With yield of dry extract, total extraction ratio of rhein, emodin and chrysophanol as indexes, orthogonal test was used to investigate factors of ethanol precipitation process for Dahuang Tongqi oral liquid, such as relative density of liquid, the concentration of ethanol and alcohol precipitation time.

Result: Optimized extraction technology of volatile oil was: distilling 2 h with 4 times the amount of water; optimum water extraction technology was: boiling 2 h with 8 times the amount of water, 2 h per time; optimized alcohol precipitation process was: concentrated to relative density of 1.20 (80℃), 95% ethanol was added to liquid contained ethanol of 50%, alcohol precipitation time 24 h. **Conclusion:** Optimized extraction and purification technology for Dahuang Tongqi oral liquid was reasonable and feasible, it was suitable for requirements of industrial production.

[Key words] Dahuang Tongqi oral liquid; rhein; emodin; chrysophanol; extraction technology; orthogonal test

大黄通气口服液是我院自行研制的中药制剂, 具补气益脾、理气止痛、行气通便、活血化痰、清热解

[收稿日期] 20120118(011)

[通讯作者] * 刘光斌, 本科, 副主任药师, 从事临床药学及医院制剂研究, Tel: 0937-6712956, E-mail: jgyylgb@sina.com

毒之功效,临床用于治疗腹部术后排气。本处方已在医院使用 10 余年,疗效显著,副作用小,安全可靠。处方中木香、枳实、陈皮、川芎、白术、火麻仁等药材中均含有挥发性成分,故宜先进行挥发油提取工艺优选,药渣与其他药材合并水煎煮。为保证该制剂的内在质量和临床疗效的稳定性,本文采用正交试验设计考察其挥发油提取工艺、水提取工艺及醇沉工艺,综合考虑优选大黄通气口服液的提取纯化工艺。

1 材料

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(岛津 LC solution 工作站,日本岛津),AUW120D 型 1/10 万电子分析天平(日本岛津),TLHS-R0/70 型超纯水仪(杭州天创净水设备有限公司)。

大黄酸、大黄素及大黄酚对照品(均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为 0757-200206, 110756-200210, 110796-200310)。甲醇为色谱醇,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。药材均购自甘肃省酒泉市培丰中药材生态种植加工公司,经嘉峪关药品检验所中药室李怀虎副主任药师鉴定符合 2010 年版《中国药典》相应药材项下标准规定。

2 方法与结果

2.1 干浸膏收率的测定 按处方量称取大黄等 6 味药材共 525 g,与提取挥发油后的药渣混合,按试验设计要求提取,4 层纱布过滤,合并滤液。将滤液浓缩于 250 mL 量瓶定容,精密量取 10 mL 置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴浓缩至干,在电热恒温干燥箱中 105 ℃ 干燥 3 h,放入干燥器中冷却至室温,迅速精密称定质量,计算水提取物得率[水提取物率 = 10 mL 提取液的干浸膏平均质量 × 25/6 味药材与提取挥发油后的药渣质量 × 100%]。

2.2 大黄酸、大黄素和大黄酚的含量测定^[2]

2.2.1 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(72:28),柱温 25 ℃,检测波长 440 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚等对照品 8.4, 7.8, 8.4 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成分别含大黄酸、大黄素及大黄酚 168.0, 156.0, 168.0 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液,置冰箱保存。精密量取对照品储备液 3 mL,置 20 mL 量瓶中,加甲醇制成分别含大黄酸、大黄素及大黄酚 25.2, 23.4, 25.2 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密吸取大黄通气口服液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 3 mL 置水浴加热 1 h,加甲醇至近刻度,超声 20 min,放冷、加甲醇至刻度摇匀。高速离心(4 000 min⁻¹, 20 min),上清液用 0.45 μm 微孔膜滤过,即得。

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品储备液 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL,置 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀即得不同质量浓度的对照品溶液,分别吸取 10 μL,注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件进行测定。以峰面积(A)为纵坐标,对照品质量浓度(C)为横坐标,进行线性回归。得线性方程为大黄酸 $A = 2.0 \times 10^7 C - 6.1 \times 10^3$ ($r = 0.9999$); 大黄素 $A = 2.0 \times 10^7 C - 4.9 \times 10^3$ ($r = 0.9997$); 大黄酚 $A = 3.6 \times 10^7 C - 7.9 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)。结果表明大黄酸在 4.2 ~ 50.4 mg·L⁻¹, 大黄素在 3.9 ~ 46.8 mg·L⁻¹, 大黄酚在 4.2 ~ 50.4 mg·L⁻¹ 均具有良好线性关系。

2.2.5 样品测定 取供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪,按外标法计算大黄通气口服液中大黄酸、大黄素和大黄酚的含量。其含量之和乘以水提取物质量即为大黄酸、大黄素和大黄酚总量。

2.3 挥发油提取工艺优化 在预试验及生产实际基础上,称取处方量木香、枳实、陈皮、川芎、白术、火麻仁等药材共 495 g,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,影响提取效果的主要因素为浸泡时间、提取时间和加水量^[1]。以挥发油提出量为指标,采用正交试验考察浸泡时间(A)、提取时间(B)、加水量(C)等因素,每因素选择 3 个水平进行 L₉(3⁴) 正交试验,各因素水平见表 1,正交试验安排见表 2,采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析(表 3)。

表 1 大黄通气口服液中含挥发性成分药材挥发油提取工艺正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间/h	B 提取时间/h	C 加水量/倍
1	0.5	1	4
2	1.0	2	5
3	1.5	4	6

由表 2 结果可知,3 个因素对挥发油提取量的影响顺序为 B > A > C。由表 3 可知,因素 B 对挥发油的提取量有显著影响;因素 A, C 无显著影响。结合生产实际,确定最佳工艺条件为 A₁B₂C₁。即浸泡 0.5 h,加 4 倍量水提取 2 h。按此提取工艺进行 3 次验证试验,结果挥发油平均提取量为 0.88 mL。说明优选工艺稳定、可行。

表2 大黄通气口服液中含挥发性成分药材挥发油提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	挥发油提取量/mL
1	1	1	1	1	0.42
2	1	2	2	2	0.78
3	1	3	3	3	0.75
4	2	1	2	3	0.39
5	2	2	3	1	0.87
6	2	3	1	2	0.81
7	3	1	3	2	0.45
8	3	2	1	3	0.68
9	3	3	2	1	0.71
K_1	1.95	1.26	1.91	2.00	
K_2	2.07	2.33	1.88	2.04	
K_3	1.84	2.27	2.07	1.82	
R	0.23	1.07	0.19	0.22	

表3 挥发油提取量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.008 8	2	0.004 4	0.96	
B	0.241 0	2	0.120 5	26.32	<0.05
C	0.007 0	2	0.003 5	0.76	
D(误差)	0.009 2	2	0.004 6		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表6,7,10,11同)。

2.4 水煎煮提取条件优化 预试验结果显示,影响水煎煮法提取工艺的主要因素为加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)等,本试验样量总量均为525 g以水提取物得率和大黄酸、大黄素、大黄酚总量为考察指标,每因素选择3个水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,因素水平表见表4。试验安排见表5。采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析(表6,7)。

表4 大黄通气口服液水煎煮提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 煎煮时间/h	C 煎煮数/次
1	8	1	1
2	10	2	2
3	12	3	3

由表5结果可知,各因素对水提取物得率及大黄酸、大黄素、大黄酚总量的影响大小分别均为 $C > B > A$ 。表6结果表明,A,B,C 3个因素对水提取物得率的影响均无显著意义,故初步确定最佳提取工艺为 $A_1B_2C_2$;由表7结果可知,C因素对水提取物中大黄酸、大黄素、大黄酚总量的影响有显著意义,B,A因素对观察指标的无显著性影响,故初步确定最

表5 大黄通气口服液水煎煮提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	干膏得率/%	大黄酸、大黄素和大黄酚总量/mg
1	1	1	1	1	14.17	5.8
2	1	2	2	2	27.64	11.6
3	1	3	3	3	26.66	11.2
4	2	1	2	3	19.68	9.4
5	2	2	3	1	27.74	12.5
6	2	3	1	2	16.28	7.8
7	3	1	3	2	17.65	8.5
8	3	2	1	3	16.64	8.0
9	3	3	2	1	28.58	12.0
干膏得率	K_1 68.47	51.50	47.09	70.49		
	K_2 63.70	72.02	75.90	61.57		
	K_3 62.87	71.52	72.05	62.98		
	R 5.6	20.52	28.81	8.92		
大黄酸、大黄素和大黄酚总量	K_1 28.6	23.7	21.6	30.3		
	K_2 29.7	32.1	33.0	27.9		
	K_3 28.5	31.0	32.2	28.6		
	R 1.2	8.4	11.4	2.4		

表6 水煎煮提取干浸膏得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F
A	6.089	2	3.045	0.40
B	91.347	2	45.673	5.96
C	163.093	2	81.547	10.64
D(误差)	15.328	2	7.664	

表7 水煎煮工艺大黄酸、大黄素和大黄酚总量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.296	2	0.148	0.29	
B	13.896	2	6.948	13.68	
C	26.996	2	13.498	26.58	<0.05
D(误差)	1.016	2	0.508		

佳提取工艺为 $A_2B_2C_2$ 。综合平衡各因素对水提取物得率和大黄酸、大黄素、大黄酚总量的影响,从提高生产效率和节约资源的角度,最终确定大黄通气口服液的水提取工艺为 $A_1B_2C_2$,即加8倍量水提取2次,每次提取2h。

2.5 乙醇沉淀工艺优选^[3] 根据处方中有效成分的性质,以醇沉后滤液的干浸膏得率与大黄酸、大黄素、大黄酚总提取率为考察指标,以滤液浓缩的相对密度,醇沉体积分数,醇沉时间3个因素为主要影响

因素,每个因素选择 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,因素水平表见表 8。

表 8 大黄通气口服液醇沉工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	相对密度/倍	醇沉体积分数/%	醇沉时间/h
1	1.10	50	12
2	1.20	60	24
3	1.30	70	36

称取处方量木香、枳实、陈皮、川芎、白术、火麻仁总量为 204 g,加 4 倍量水浸泡 0.5 h,蒸馏 2 h,收集挥发油另器储存,药渣备用。按处方量取其余 6 味药材,与提取挥发油后的药渣混合,加 8 倍量水煎煮 2 次,每次煎煮 2 h,合并煎煮液,滤过,按正交设计方案于不同条件下进行正交试验,抽滤,得滤液,浓缩,定容于 250 mL 量瓶中,精密量取 10 mL,水浴浓缩至干,在电热恒温干燥箱中 105 ℃ 干燥 3 h,放入干燥器中冷却至室温,迅速精密称定质量,计算干浸膏得率。按 2.2 项下方法测定大黄酸、大黄素、大黄酚的含量,结果见表 9。以干浸膏得率和大黄酸、大黄素、大黄酚含量为指标,采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析。结果见表 10,11。

表 9 大黄通气口服液醇沉工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	干浸膏得率/%	大黄酸、大黄素和大黄酚总量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	24.5	1.431 6
2	1	2	2	2	22.6	1.410 4
3	1	3	3	3	20.5	1.357 6
4	2	1	2	3	16.2	1.438 0
5	2	2	3	1	18.3	1.412 8
6	2	3	1	2	19.4	1.394 0
7	3	1	3	2	24.6	1.087 6
8	3	2	1	3	26.3	1.194 0
9	3	3	2	1	23.6	1.299 2
干膏得率	K_1	67.6	65.3	70.2	66.4	
	K_2	53.9	67.2	62.4	66.6	
	K_3	74.5	63.5	63.4	63	
	R	20.6	3.7	7.8	3.6	
大黄酸、大黄素和大黄酚含量	K_1	4.199 6	3.957 2	4.019 6	4.143 6	
	K_2	4.244 8	4.017 2	4.147 6	3.892 0	
	K_3	3.580 8	4.050 8	3.858 0	3.989 6	
	R	0.176 0	0.035 0	0.062 4	0.048 5	

由表 9 结果可知,各因素对干浸膏得率及大黄酸、大黄素、大黄酚含量的影响大小分别为 $A > C >$

表 10 醇沉工艺浸膏得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	73.295 6	2	36.647 8	26.859 1	<0.05
B	2.282 2	2	1.141 1	0.836 3	
C	12.008 9	2	6.004 4	4.400 6	
D(误差)	2.728 9	2	1.364 4		

表 11 醇沉工艺大黄酸、大黄素和大黄酚总量方差分析

方差来源	SS	f	MS	F
A	0.091 8	2	0.045 9	8.554 1
B	0.001 5	2	0.000 8	0.139 7
C	0.014 0	2	0.007 0	1.308 9
D(误差)	0.010 7	2	0.005 4	

B。由表 10 结果可知,A 因素对干浸膏得率的影响有显著意义,B、C 因素对观察指标的影响极微。故初步确定醇沉工艺为 $A_2B_3C_2^{[3]}$ 。由表 11 结果可知,A、B、C 3 因素对大黄酸、大黄素、大黄酚含量的影响均无显著意义,故初步确定醇沉工艺为 $A_2B_1C_2$ 。综合实际生产要求,最终确定最佳醇沉工艺为 $A_2B_1C_2$,即减压浓缩至相对密度为 1.20(80 ℃),醇沉至含醇量 50%,醇沉 24 h。按优选的醇沉工艺条件 $A_2B_1C_2$ 进行 3 次验证试验,结果干浸膏平均得率和大黄酸、大黄素、大黄酚平均含量分别为 16.5%,1.45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。说明优选醇沉工艺稳定,可行。

3 讨论

木香、枳实、陈皮、川芎、白术、火麻仁等药材含挥发性成分,为防止提取过程中挥发油损失,故试验确定先进行挥发油提取,药渣与其他药材合并水煎煮。6 味药材粉碎成粗粉后提取挥发油,会出现粘壁且难过滤现象,故采用药材直接浸泡后提取挥发油。

醇沉时应至浸膏冷却后快速搅动药液,缓缓加入 95% 乙醇,使乙醇体积分数为 50%,冷藏静置 24 h 沉淀物分层不佳,应采用离心方法取上清液。

[参考文献]

- [1] 李晓瑞,李奉勤,薛彦朝,等. 中药挥发油提取工艺研究概况[J]. 中医药管理杂志,2006,14(8):66.
- [2] 谢六生,刘光斌,张迅,等. HPLC 测定大黄通气口服液中大黄酸、大黄素及大黄酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):87.
- [3] 侯林中,张熙洁,王玉,等. 正交试验优选宽心口服液醇沉工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):32.

[责任编辑 全燕]