

正交试验优选香草固齿酊的提取工艺

王岩,吴淑媛,廖祈祈,林丽珍,郭小媚,谢谦*
(广东药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:优选香草固齿酊的提取工艺。方法:采用乙醇渗漉法,以提取液中 α -香附酮、螞蟥菊内酯的含量及干膏得率为指标,采用 HPLC 测定含量,烘干法测定浸膏得率,正交试验优选提取工艺条件,对乙醇体积分数、浸渍时间等因素进行考察。结果:最佳提取工艺为 60% 乙醇浸渍渗漉 24 h,流速 $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结论:该优选工艺稳定可行,适用于工业化生产。

[关键词] 香草固齿酊; α -香附酮; 螞蟥菊内酯; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0056-04

Optimization of Extraction Technology for Xiangcao Guchi Tincture by Orthogonal Test

WANG Yan, WU Shu-yuan, LIAO Qi-qi, LIN Li-zhen, GUO Xiao-mei, XIE Qian*
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Xiangcao Guchi tincture. **Method:** Using the content of α -cyperone and wedelolactone in extraction liquid and yield of dry extract as indexes, the content of them were determined by HPLC, yield of extract was determined by baking method, ethanol percolation method was

[收稿日期] 20120121(005)

[基金项目] 广东省中医药局科研基金(2010202)

[第一作者] 王岩,博士,从事药物新剂型与质量控制研究,Tel:020-39352169,E-mail: ydpuwy@126.com

[通讯作者] * 谢谦,讲师,从事牙周炎的药物治疗与临床研究,E-mail: xq_zsu@163.com

表 4 红花提取工艺验证及对比

工艺	转移率 /%	干膏率 /%	提取时间 /min	药渣性状
减压提取	86.67	28.01	60	基本完好,少数破烂
常压煎煮	66.79	40.19	60	烂泥状
文献方法	90.72	36.56	960	泥状

3 讨论

减压提取过程中,提取溶媒蒸气可能会被真空泵吸入,故操作时应注意在保证真空参数的条件下,减少溶媒损失,试验中可在接入真空泵的接口处连接一个活塞,当真空稳定在上述范围时关闭,降低接近下限时将其打开。实验室操作参数在应用于大生产前,应根据实际生产设备要求进行中试及验证试验,以确保参数的准确性和可行性。本工艺可用于红花等在提取过程中质碎易烂的药材提取,以降低在大生产过程中药渣堵筛现象的发生率,从而减少

工时,节约生产成本。

[参考文献]

- [1] 张素萍. 中药制药生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,2011:59.
- [2] 徐连明,徐桂红,王振中,等. 金银花减压提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):31.
- [3] 马庆宇,孙红岩. 中药减压提取工艺探讨[J]. 黑龙江科技信息,2009(14):165.
- [4] 陈晓东,肖莹. 中药减压提取的实验方法[J]. 机电信息,2006(17):29.
- [5] 王若菁,杨滨. 红花的化学成分及质量标准研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):65.
- [6] 罗晶,黄宇玫,曾文雪. 红花中羟基红花黄色素 A 的提取工艺及其热稳定性研究[J]. 江西中医学院学报,2009,21(5):39.

[责任编辑 全燕]

used, orthogonal test was used to optimize extraction process conditions with the concentration of ethanol, immersion time and velocity as factors. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: The concentration of ethanol 60%, velocity was $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and impregnated percolation time was 24 h. **Conclusion:** Optimized extraction technology was stable and reasonable, it could apply to industrial production.

[**Key words**] Xiangcao Guchi tincture; α -cyperone; wedelolactone; orthogonal test

香草固齿酞是广东药学院附属第一医院口腔科的临床经验方,由香附、墨旱莲二药组方而成,具有祛风止痛、凉血止血、补肾固齿之功效,本方组方独特精炼,主要用于治疗牙周炎。本研究以 α -香附酮、螞蟥菊内酯含量及干膏得率为指标,采用正交试验法对影响乙醇渗漉效果的主要因素进行优选,以确定其最佳提取工艺。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器,日本岛津),香附酮、螞蟥菊内酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110748-201111,111885-201102),香附、墨旱莲(安徽亳州市永刚饮片厂有限公司),经笔者鉴定分别为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎和菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

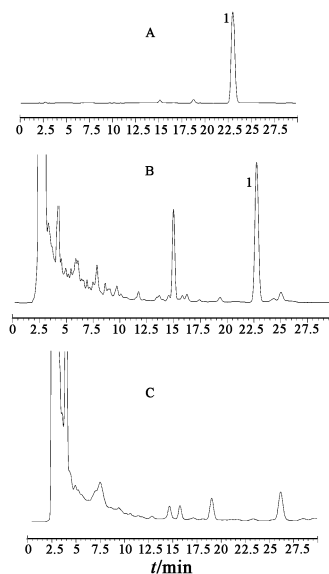
2 方法与结果

2.1 α -香附酮含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适应性试验^[1] Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.5% 乙酸水溶液(75: 25),检测波长 250 nm,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,理论板数按 α -香附酮峰计算应不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 α -香附酮对照品 6.3 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 $0.63 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液。

2.1.3 线性关系考察 分别精密量取贮备液 1, 1, 2, 3 mL,分别置于 10, 5, 5, 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,依次制成质量浓度为 0.063, 0.126, 0.252, 0.378 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 I, II, III, IV。精密量取溶液 I 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 $0.0063 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 V。精密吸取上述对照品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,以峰面积为纵坐标, α -香附酮质量为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 3\ 329\ 984X$ ($r = 0.9997$)。表明 α -香附酮在 0.126 ~ 7.56 μg 与



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. α -香附酮

图 1 香草固齿酞 HPLC

峰面积呈良好线性关系。

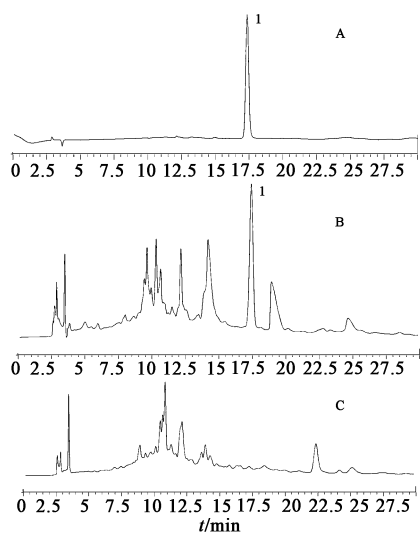
2.1.4 精密度试验 精密吸取质量浓度为 $0.063 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -香附酮对照品溶液 20 μL ,按上述色谱条件连续重复进样 6 次,测定峰面积,计算 α -香附酮峰面积 RSD 0.70%。说明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性考察 取同一供试品溶液,室温放置,分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1.1 项下色谱条件下各进样 20 μL ,测定峰面积,结果 RSD 0.91%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.2 螞蟥菊内酯含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件与系统适应性试验^[2] Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.5% 乙酸溶液(B)梯度洗脱: 0 ~ 5 min (35% ~ 58% A), 5 ~ 20 min (58% A); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 351 nm,进样量 20 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按螞蟥菊内酯峰计算不低于 5 000。色谱图见图 2。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取螞蟥菊内酯对照品 13.6 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度 $0.136 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 蟞蜚菊内酯

图 2 香草固齿酊 HPLC

2.2.3 线性关系考察 精密量取贮备液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度 $0.068 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 I; 分别精密量取溶液 I 1, 1.5 mL, 分别置于 10, 5, 10 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别制成质量浓度 0.006 8, 0.013 6, $0.034 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 II, III, IV; 精密量取溶液 II 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 $0.000 68 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 V。精密吸取上述对照品溶各 20 μL , 注入液相色谱仪, 以峰面积为纵坐标, 蟞蜚菊内酯质量为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 4 370 320X$ ($r = 0.999 9$), 表明蟞蜚菊内酯在 $0.013 6 \sim 2.72 \mu\text{g}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.4 精密度试验 精密吸取质量浓度为 $0.068 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蟞蜚菊内酯对照品溶液 20 μL , 按上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算蟞蜚菊内酯峰面积 RSD 0.60%。说明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件下各进样 20 μL , 测定峰面积, RSD 1.07%, 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.3 供试品溶液的制备 称取 3 倍处方量药材, 共 60 g, 采用混合渗漉法, 照《中国药典》2010 年版一部附录流浸膏剂与浸膏剂项下的渗漉法, 按正交表中所列条件进行渗漉, 收集总药材 5 倍量渗漉液, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 分别精密量取墨旱莲、香附单独渗漉液 5 mL, 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀

释至刻度, 摇匀, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得缺香附及缺墨旱莲阴性对照溶液。

2.5 样品含量测定 精密吸取对照品、供试品与阴性对照溶液各 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 记录峰面积, 计算提取液中 α -香附酮和蟞蜚菊内酯的含量。色谱图见图 1, 2。

2.6 浸膏得率的测定 分别精密吸取样品液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 1 h, 冷却后称定质量, 至两次质量的差异不超过 0.3 mg 为止, 根据各样品液干膏质量计算浸膏得率^[34]。

2.7 正交试验优选 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 以乙醇体积分数(A)、流速(B)、浸渍时间(C)为考察因素, 称取 3 倍处方量药材 18 份, 每份 60 g (每组试验平行操作 2 次), 采用混合渗漉法, 照《中国药典》2010 年版一部附录流浸膏剂与浸膏剂项下的渗漉法, 按正交表中所列条件进行渗漉。因素水平见表 1, 正交试验安排见表 2。方差分析见表 3。

表 1 香草固齿酊渗漉提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C
	乙醇体积分数/%	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	浸渍时间/h
1	60	1	24
2	70	3	36
3	80	5	48

由直观分析结果可见, 以 α -香附酮含量为指标, 影响提取效果的因素顺序为 $C > A > B$, 最佳工艺为 $A_1B_2C_3$; 以蟞蜚菊内酯含量为指标, 影响提取效果的因素顺序为 $C > B > A$, 最佳工艺为 $A_3B_2C_2$ 。

采用 PEMS 3.1 对实验结果进行方差分析。结果表明, 分别以 α -香附酮含量、蟞蜚菊内酯含量为指标时, 浸渍时间对提取效果的影响均有统计学差异。由直观分析结果可知, 前者表明 C 因素各水平对提取效果的影响为 $C_3 > C_1 > C_2$, 后者为 $C_2 > C_1 > C_3$, 综合考虑确定取 C_1 , 即浸渍时间为 24 h 最佳。故最终确定最佳提取工艺条件为 $A_1B_3C_1$, 即乙醇体积分数 60%, 流速 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 浸渍时间 24 h。

2.8 提取工艺验证试验 为进一步考察所优选提取工艺条件的可靠性及稳定性, 称取 3 倍处方量药材 3 份, 每份 60 g, 采用混合渗漉法, 按最佳工艺 $A_1B_3C_1$ 进行 3 次验证试验, 结果 α -香附酮、蟞蜚菊内酯含量及干膏得率平均值分别为 0.182 5%, 0.047 5%, 0.009 7%, 均接近正交各组试验的最优水平, 表明优选工艺稳定可行, 重复性良好。

表2 香草固齿酊渗漉提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	α -香附酮	蟛蜞菊内酯	干膏
					含量 $\times 10^{-3}$ /%	含量 $\times 10^{-3}$ /%	得率 /%
1	1	1	1	1	185.1	40.91	9.918
2	1	2	2	2	177.2	47.19	9.800
3	1	3	3	3	188.4	25.27	9.944
4	2	1	2	3	174.7	43.44	8.084
5	2	2	3	1	188.6	28.15	8.932
6	2	3	1	2	181.4	41.91	8.448
7	3	1	3	2	184.0	29.98	7.716
8	3	2	1	3	183.5	44.74	7.534
9	3	3	2	1	165.8	44.62	6.370
α -香附酮含量							
K_1	183.6	181.3	183.3	179.8			
K_2	181.6	183.1	172.6	180.9			
K_3	177.8	178.5	187.0	182.2			
R	5.8	4.6	14.4	2.4			
蟛蜞菊内酯含量							
K_1	37.79	38.11	42.52	37.90			
K_2	37.83	40.03	45.09	39.70			
K_3	39.78	37.27	27.80	37.82			
R	1.99	2.76	17.29	1.88			

注:成分的含量 = 提取液中提出总量/药材投料量。

表3 渗漉工艺方差分析

指标	方差来源	SS	f	F	P
α -香附酮含量	A	52.27	2	6.301	
	B	31.50	2	3.795	
	C	339.0	2	40.84	<0.05
	D(误差)	8.265	2		
蟛蜞菊内酯含量	A	7.764	2	1.144	
	B	12.01	2	1.770	
	C	521.9	2	76.91	<0.05
	D(误差)	6.786	2		

3 讨论

香附的主要成分为挥发油,其中所含 α -香附酮

为较强的前列腺素生物合成抑制剂,被认为是镇痛作用的有效成分之一^[5-6]。加热回流法不利于对挥发油成分的保留,故本研究采用渗漉法进行提取。在提取工艺优化时,曾以 α -香附酮、蟛蜞菊内酯含量及浸膏得率为指标,采用单因素试验法考察渗漉方式对提取效果的影响,设定乙醇体积分数 80%,流速 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,浸渍时间 24 h,在此条件下分别进行渗漉。结果表明,混合渗漉液中的各项指标均明显高于单独渗漉液,故试验最终采用混合渗漉法。预试验对渗漉液体积进行优选,分别收集相当于原药材的 4,5,6,7,8 倍量渗漉液,同法进行测定,结果表明,渗滤液体积为原药材 5 倍量时效果最佳。

本研究采用的蟛蜞菊内酯 HPLC 含量测定方法是根据《中国药典》2010 年版一部墨旱莲含量测定法改进而来,原方法流动相甲醇(A)-0.5% 乙酸溶液(B),采用梯度洗脱 0~10 min(35%~59% A),10~20 min(59% A),由于本实验墨旱莲与香附 2 种药材混合提取,蟛蜞菊内酯峰受到其他成分干扰,故分离度较差,通过调节流动相比比例,确定梯度洗脱为 0~5 min(35%~58% A),5~20 min(58% A),分离度较好,色谱系统稳定,适用于蟛蜞菊内酯的定量分析。

[参考文献]

- [1] 贾宜军,莫结丽. HPLC 内标法测定香附中 α -香附酮的含量[J]. 中药材,2005,28(8):722.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:351.
- [3] 王丽惠,罗旭艳,杨欣,等. 乙肝转阴颗粒提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):48.
- [4] 张康,何宇新,吴丽,等. 正交试验优选镇痛贴乙醇提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):37.
- [5] 解宇环,沈映君,纪广亮,等. 香附、藿香挥发油抗炎、镇痛、解热作用的实验研究[J]. 四川生理科学杂志,2005,27(3):731.
- [6] 徐燕,李大祥,凌铁军. 香附化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):214.

[责任编辑 全燕]