

鲜地黄中梓醇及水苏糖的闪式提取工艺优选

郭建华¹, 田成旺², 张铁军^{2*}, 张科¹

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

〔摘要〕 目的: 优选鲜地黄中梓醇及水苏糖的提取工艺。方法: 以梓醇和水苏糖提取率为指标, 采用 HPLC 进行含量测定, 比较不同提取方法所得梓醇及水苏糖含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选提取工艺条件。结果: 与传统方法相比, 闪式提取法效率更高, 其最佳提取工艺为 6 倍量 20% 乙醇闪式提取 3 次, 每次 1 min。结论: 闪式提取法是一种高效、快速提取鲜地黄中梓醇及水苏糖的方法。

〔关键词〕 鲜地黄; 闪式提取; 梓醇; 水苏糖; 高效液相色谱法

〔中图分类号〕 R283.6 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)11-0013-04

Optimization of Flash-Type Extraction Process for Catalpol and Stachyose from Fresh *Rehmannia glutinosa*

GUO Jian-hua¹, TIAN Cheng-wang², ZHANG Tie-jun^{2*}, ZHANG Ke¹

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 3000702, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize extraction process of catalpol and stachyose from fresh *Rehmannia glutinosa*. **Method:** With extraction rate of catalpol and stachyose as indexes, the content of catalpol and stachyose were determined by HPLC. The content of catalpol and stachyose in different extraction methods were compared, and then extraction technology was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** Compared traditional extraction method, flash-type extraction method had higher efficiency, optimal flash-type extraction technology was as follows: extracted 3 times with 6 times the amount of 20% ethanol, each time 1 min. **Conclusion:** Flash-type extraction process was an efficient and rapid method for extraction catalpol and stachyose from fresh *R. glutinosa*.

〔Key words〕 fresh *Rehmannia glutinosa*; flash-type extraction; catalpol; stachyose; HPLC

鲜地黄现收载于 2010 年版《中国药典》一部, 性寒、味甘苦, 归心、肝、肾经, 以清热生津、凉血止血为主。鲜地黄中主要活性成分包括 2 大类^[1], 一为环烯醚萜类成分, 代表成分有梓醇、桃叶珊瑚苷; 二为低聚糖, 代表成分为水苏糖, 其中影响环烯醚萜类成分稳定性的主要因素为 β -葡萄糖苷酶酶解、酸碱

度和温度, 影响低聚糖类成分稳定性的主要因素为 α -葡萄糖苷酶酶解和温度^[2-4]。因此低温且有效降低葡萄糖苷酶的活性是提取活性成分的主要考察点。目前鲜地黄中梓醇的提取多采用传统的加热回流提取及浸提法^[5-6], 水苏糖多采用热回流提取^[7], 此类提取方法需经高温或长时间放置处理, 对梓醇及水苏糖的稳定极为不利。故本试验首次采用闪式提取技术同时提取鲜地黄中梓醇及水苏糖, 采用 HPLC 建立鲜地黄中梓醇及水苏糖的含量测定方法, 并以此二者提取率为指标对闪式提取工艺进行优化。闪式提取法^[8-9]由植物组织破碎提取法原理设计而来, 具有高速搅拌、振动、负压渗滤等外力的最佳组合, 达到充分提高提取效率的目的。

〔收稿日期〕 20120106(013)

〔第一作者〕 郭建华, 硕士研究生, 从事中药鲜药的研究, Tel: 022-23006843, E-mail: guojianhua27630083 @ 163. com

〔通讯作者〕 * 张铁军, 学士, 研究员, 从事中药新药的研究, Tel: 022-23006848, E-mail: tiejunzh2000 @ yahoo. com. cn

1 材料

Lab Alliance 型高效液相色谱仪 (Series II 二元泵系统, Lab Alliance 色谱工作站, PL-ELS2100 蒸发光检测器, 美国 Waters), JHBE-50S 型闪式提取器 (河南金鼎科技发展有限公司), AB204-N 型 1/10 万电子天平 (Sartorius 公司), BP211D-N 型 1/万天平 (METTLER TOLEDO 公司), AS3120 型超声仪 (奥特宝恩斯仪器有限公司)。

梓醇对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110808-200508, 纯度 99%), 水苏糖对照品 (天津一方科技有限公司, 批号 010502-201104, 纯度 99%), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

鲜地黄药材购自河南焦作, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定来源为 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜块根。

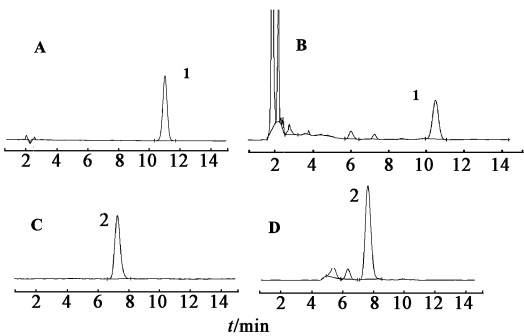
2 方法与结果

2.1 鲜地黄中梓醇及水苏糖的含量测定方法

2.1.1 色谱条件

2.1.1.1 梓醇色谱条件

Diomonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水 (1:99), 检测波长 210 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 理论塔板数按梓醇峰计不少于 4 000。见图 1。



A. 梓醇对照品; B. 梓醇样品; C. 水苏糖对照品;
D. 水苏糖样品; 1. 梓醇; 2. 水苏糖

图 1 鲜地黄 HPLC

2.1.1.2 水苏糖色谱条件

Ultimate 氨基色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (90:10), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 蒸发温度 85 ℃, 漂移管温度 45 ℃, 载气流速 2 L·min⁻¹, 柱温 35 ℃。理论塔板数按水苏糖计不少于 3 000。色谱图见图 1。

2.1.2 线性关系的考察

精密称取梓醇及水苏糖对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加相应流动相稀释至刻度, 摇匀, 得对照品溶液, 梓醇、水苏糖质量浓度分别为 0.19, 5.45 g·L⁻¹。取梓醇及水苏糖对

照品溶液, 依次精密吸取 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 μL 按上述色谱条件进样检测分析, 以样品中梓醇及水苏糖的峰面积值为纵坐标 (Y), 其质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得梓醇回归方程为 $Y = 43\,700X + 2\,749.2$ ($r = 0.999\,8$), 线性范围为 0.19 ~ 2.375 μg; 水苏糖回归方程为 $Y = 81.384X - 24.566$ ($r = 0.999\,5$), 线性范围为 5.45 ~ 58.125 μg。

2.1.3 供试品的制备

精密称取同批次鲜地黄药材 20 g, 按 L₉ (3⁴) 正交试验表安排试验, 合并提取液, 浓缩至干, 残渣用 20% 乙醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 取 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 加 20% 乙醇稀释至刻度, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.1.4 精密度试验

精密吸取梓醇及水苏糖对照品溶液, 重复进样 6 次, 梓醇 10 μL, 水苏糖 7.5 μL, 分别测定峰面积, 结果梓醇峰面积 RSD 1.38%; 水苏糖峰面积 RSD 2.45%。说明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验

取同一份样品溶液分别在配置后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 记录峰面积, 结果梓醇峰面积 RSD 1.91%; 水苏糖峰面积 RSD 1.41%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.6 重复性试验

取同一鲜地黄药材按供试品制备方法平行制备 6 份, 分别进行测定, 计算其质量分数, 求得梓醇和水苏糖的 RSD 分别为 1.38%, 1.77%。说明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验

取已知梓醇及水苏糖质量分数的鲜地黄药材 6 份, 加入相应对照品溶液适量, 制备供试品溶液, 并按上述色谱条件进行测定, 结果梓醇及水苏糖的 RSD 分别为 1.65%, 1.70%; 平均加样回收率分别为 99.31%, 99.56%。

2.2 不同提取工艺比较

2.2.1 回流提取^[10]

将鲜地黄洗净后切成细丝, 精密称取药材细丝 20 g, 3 倍量甲醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 减压回收干燥。

2.2.2 浸提^[6]

将鲜地黄洗净后切成细丝, 精密称取药材细丝 20 g, 8 倍量 20% 乙醇浸提 2 h, 提取液减压回收干燥。

2.2.3 闪式提取

将鲜地黄洗净后切成小块, 精密称取 20 g, 8 倍量 20% 乙醇闪式提取 3 次, 第 1 次 2 min, 后 2 次均 1 min, 合并提取液, 抽滤, 减压回收干燥。

分别按上述 3 种方法提取, 按梓醇与水苏糖的含量测定方法进行测定, 分别计算梓醇与水苏糖的质量。结果梓醇提取率分别为 66.3%, 82.3%, 90.5%; 水苏糖提取率分别为 71.6%, 83.8%,

93.6%。由结果可知,采用浸提与闪式提取法,梓醇与水苏糖提取率均较高;回流提取时温度为 60 ℃,浸提与闪式提取提取则在常温下进行,可避免高温对梓醇及水苏糖的破坏;结合提取时间考虑,浸提需 120 min,闪式提取器提取仅需 4 min。故确定采用闪式提取鲜地黄中梓醇及水苏糖。

2.3 正交试验设计 在单因素考察的基础上,设计正交试验,以梓醇和水苏糖提取率为考察指标,采用闪式提取法,选择溶剂倍数、提取时间、提取次数为考察因素,每个因素考察 3 个水平,选择 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表 1,试验安排见表 2,方差分析见表 3,4。

表 1 鲜地黄中梓醇和水苏糖闪式提取正交试验因素水平

水平	A 溶剂倍数/倍	B 提取时间/min	C 提取数/次
1	6	1	1
2	8	2	2
3	10	3	3

表 2 鲜地黄中梓醇和水苏糖闪式提取正交试验安排

No.	A	B	C	D	提取率/%	
					梓醇	水苏糖
1	1	1	1	1	72.60	73.45
2	1	2	2	2	84.51	83.62
3	1	3	3	3	90.01	91.80
4	2	1	2	3	80.30	82.90
5	2	2	3	1	90.23	92.63
6	2	3	1	2	70.54	74.61
7	3	1	3	2	89.51	91.60
8	3	2	1	3	71.21	72.31
9	3	3	2	1	81.23	82.20
梓醇	K_1	82.400	80.800	71.433	81.333	
	K_2	80.333	81.967	82.000	81.500	
	K_3	80.633	80.600	89.933	80.533	
	R	2.067	1.367	18.500	0.967	
水苏糖	K_1	82.933	82.633	73.433	82.733	
	K_2	83.367	82.833	82.900	82.267	
	K_3	82.033	82.867	92.900	82.333	
	R	1.334	0.234	18.567	0.934	

由结果可知,各因素影响顺序为 $C > A > B$,以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果发现提取次数对试验结果有显著影响,因素 A, B 影响不显著。综合考虑,最后确定最佳组合 $A_1B_1C_3$,即最佳提取工艺为 6 倍量 20% 乙醇闪式提取 3 次,每

表 3 梓醇提取率方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A	7.482	2	0.043	
B	3.269	2	0.019	
C	516.842	2	3.421	<0.05
D(误差)	527.59	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 4 同)。

表 4 水苏糖提取率方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A	2.776	2	0.016	
B	0.096	2	0.001	
C	517.149	2	3.510	<0.05
D(误差)	525.62	2		

次 1 min。

2.4 验证试验 取供试品 3 份,每份 20 g,按优化工艺条件,取样量重复 3 次进行验证试验,结果梓醇及水苏糖平均提取率分别为 90.2%,92.1%,RSD 均 <2%。表明该工艺稳定可行,重复性好。

3 讨论

梓醇及水苏糖极易溶于水,但易受酶和温度的影响。本研究中考察了水,20% 乙醇,50% 乙醇及 70% 乙醇 4 种溶剂进行闪式提取,提取液滤过,作为供试品溶液,进样,测定梓醇及水苏糖的峰面积,结果 20% 乙醇提取下二者含量均最高。同时发现水为提取溶剂时,测得梓醇含量迅速降低并且提取液颜色变深,故采用 20% 乙醇作为提取溶剂,可能由于稀醇对酶有一定的抑制作用。

目前关于地黄中水苏糖的含量测定方法主要为高效液相色谱法示差折光检测器测定,但该方法灵敏度低且受温度影响大,无法准确反映出地黄中水苏糖的真实含量。本试验首次采用高效液相色谱法蒸发光检测器对地黄中水苏糖进行了含量测定,所建立的方法简单、准确,可作为地黄及其炮制品质量控制的定量测定方法。

本试验首次应用闪式提取法对鲜地黄中梓醇及水苏糖的提取工艺进行研究,结果表明该方法优于传统的回流提取及浸提法,为同时提取鲜地黄中的梓醇及水苏糖提供了一种高效、简便易操作的方法。闪式提取技术在金钗石斛及淫羊藿药材中活性成分的提取均有应用^[11-12]。梓醇和水苏糖易受酶及温度的影响,闪式提取法能最大限度避免该两种成分

统计过程控制在栀子前处理生产工艺中的应用

周海燕^{1,3}, 徐冰^{1,2}, 史新元^{1,2*}, 乔延江^{1,2*}

- (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;
2. 国家中医药管理局中药信息工程重点研究室, 北京 100102;
3. 亚宝北中大(北京)制药有限公司, 北京 101300)

[摘要] 目的:以清开灵注射液中栀子前处理工艺为载体,研究统计过程控制在中药生产过程中的应用。方法:利用 Shewhart 控制图和 EWMA 控制图对栀子苷提取率进行单变量统计过程控制研究;在主成分分析模型的基础上,建立栀子前处理工艺多变量 Hotelling T² 控制图和 SPE 控制图;利用贡献图对工艺过程进行诊断。结果:Shewhart 控制图与 EWMA 控制图可实现栀子前处理工艺中质量参数的监控;多变量统计过程控制图可实现多个过程参数的监控,结合贡献图可实现工艺分析和故障诊断。结论:单变量统计过程控制与多变量统计过程控制的结合,可更好地监控并理解中药生产过程。

[关键词] 统计过程控制;控制图;栀子;生产工艺;主成分分析;工艺诊断

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0016-05

Application of Statistical Process Control in Pretreatment Production Process of *Gardenia jasminoides*

[收稿日期] 20111202(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09502-002);北京市支持中央在京高校共建项目;北京中医药大学科研基金项目(JYB22-XS034)

[第一作者] 周海燕,在读博士,从事中药质量控制研究, E-mail: zhouhaiyan891@sohu.com

[通讯作者] * 乔延江,教授,博士生导师,从事中药信息工程研究, Tel:010-84738620, E-mail: yjqiao@263.com; * 史新元,副教授,硕士生导师,从事中药过程分析研究, Tel:010-84738621, E-mail: shixinyuan01@163.com

被破坏,提取率高达 90%,适合于大规模生产,可作为鲜地黄药材特有的加工提取方法。

[参考文献]

[1] 刘彦飞,赵羽,温学森,等. 地黄化学成分及其在加工炮制过程中的变化[J]. 国外医药:植物药分册, 2007,22(7):102.

[2] 赵宇,温学森,武卫红. 地黄不同炮制品中梓醇含量分析现状[J]. 中国药学杂志,2007,42(7):486.

[3] 王宏洁,边宝林,杨健. 地黄中梓醇变化条件的探讨[J]. 中国中药杂志,1997,22(7):408.

[4] 赵宇,温学森,崔晶,等. 鲜地黄中 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶的提取与初步纯化[J]. 中药材,2006,29(2):137.

[5] LI G S, LIU C H, WANG H S, et al. Assaying of content of catalpol in *Rehmannia glutinosa* from different origins [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 33 (2): 126.

[6] LUO Y Y, ZHANG S Q, SUO J Z, et al. Determination of catalpol in Radix Rehmanniae by high performance liquid chromatography [J]. Chin Pharm J, 1994, 29 (1): 38.

[7] Tomoda M, Kato S, Onuma M. Water-soluble constituents of Rehmanniae Radix I carbohydrates and acids of Rehmannia Glutinosafhueioh ingensis [J]. Chem Pharm Bull, 1971, 19 (7): 1455.

[8] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007,5(6): 401.

[9] 吴冬梅. 闪式提取器在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006,12(7): 34.

[10] 刘明,李更生. 鲜地黄中梓醇提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 301.

[11] 钱桂敏,王平,郭峰. 金钗石斛鲜品闪式提取方法的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14 (5): 38.

[12] 贺石麟,牛景霞,倪艳. 淫羊藿中淫羊藿苷和总黄酮的闪式提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 38.

[责任编辑 仝燕]