

正交试验法优化赤芍总苷闪式提取工艺

刘玉峰,王程程,刘宇,高飞,陈立江*
(辽宁大学药学院,沈阳 110036)

[摘要] 目的:优化赤芍总苷闪式提取工艺。方法:利用闪式提取器对赤芍总苷进行提取,HPLC 测定含量,并以芍药苷和芍药内酯苷的提取量作为主要指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,考察总苷闪式提取的最佳工艺。结果:闪式提取赤芍总苷的最佳提取工艺为用 30 倍量的水浸泡 6 h,并采用 70 V 电压提取 2 min。结论:闪式提取法可应用于赤芍总苷的提取,该工艺简单,迅速,具有良好的应用前景。

[关键词] 赤芍总苷;芍药苷;芍药内酯苷;闪式提取;正交试验;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(2012)02-0012-04

Optimization of Smashing Tissue Extraction Process of Total Paeony Glycoside by Orthogonal Test

LIU Yu-feng, WANG Cheng-cheng, LIU Yu, GAO Fei, CHEN Li-jiang*
(College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

[Abstract] **Objective:** To study and optimize smashing tissue extraction technology of total paeony glycoside. **Method:** Total paeony glycoside was extracted by smashing tissue extractor, the content of paeoniflorin and albiflorin were determined by HPLC, and used it as main indexes. Optimum smashing tissue technology was investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** Optimum smashing tissue extraction conditions were as follows: *Radix paeoniae* was dipped in 30 times the amount of water for 6 hours and extracted by smashing tissue extraction for 2 minutes with voltage of 70 V. **Conclusion:** Smashing tissue extraction method could be used to extract of total paeony glycoside, and it was feasible, simple and rapid and had good application prospect.

[Key words] total paeony glycoside; paeoniflorin; albiflorin; smashing tissue extraction; orthogonal test; HPLC

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的干燥根^[0], 主要有效成分有芍药苷, 芍药内酯苷, 羟基芍药苷等单萜苷类化合物, 统称为赤芍总苷, 具有清热凉血、散瘀止痛之功效^[2], 其中芍药苷、芍药内酯苷含量较高^[3]。赤芍总苷在治疗心血管疾病及抗肿瘤方面具有很好的疗效^[4-5]。有关赤芍总苷提取工艺的研究报道^[6-7]多采用有机溶剂加热回流方法, 存在能耗高、耗时长、有效成分损失大等不足。闪式提取法^[8-9]是一种依靠高速机械剪切力和超动力分子渗透的技术, 在室温及较少溶剂存在下, 数秒内可使有效成分达到组织内外平衡, 再通过过滤达到提取的目的。同时多级闪蒸器可使溶剂快速蒸发, 最大限度保护植物有效成分不会因受热破坏, 可节约大量时间、溶剂和能源, 具有快速、完全、高效等特点^[10], 因此以水为溶剂时, 特别适合单萜苷类强极性成分的提取。

[收稿日期] 20110905(003)

[基金项目] 辽宁省自然基金项目(20092015);沈阳市科技项目(F10-205-1-28);辽宁大学青年科研基金项目(2009LDQN-KJ-11);辽宁大学“211 工程”三期建设-天然产物化学制药项目

[第一作者] 刘玉峰, 博士, 副教授, 从事天然产物活性化学成分的研究, Tel: 15998107929, E-mail: liuyufeng@bjmu. edu. cn

[通讯作者] * 陈立江, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药新剂型及其机制研究, Tel: 13998896973, E-mail: chljl6@163. com

本研究建立了芍药苷、芍药内酯苷的 HPLC 含量测定方法,采用双指标考察闪式提取工艺,通过正交试验设计确定闪式提取的最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

莱比伦 3500G 高效液相色谱仪(EZChrom Elite 色谱工作站,500 型紫外-可见可变波长检测器),JMF-320 型系列多级闪蒸器,JHBE-50T 型 闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司),TB-114 型 精密电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),RE52-99 型 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),KQ5200DB 型 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DZF-6020 型真空干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司),DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司),GZX-9246 MBE 型电热恒温鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

赤芍购自辽宁大连普兰店,经辽宁省药品检验所王维宁副主任药师鉴定为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* 的干燥根,凭证标本(20090301)存于辽宁大学药学院药物化学二室,芍药苷对照品(本实验室自制,经 HPLC 检测,纯度 >98%),芍药内酯苷对照品(本实验室自制,经 HPLC 检测,纯度 >98%),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

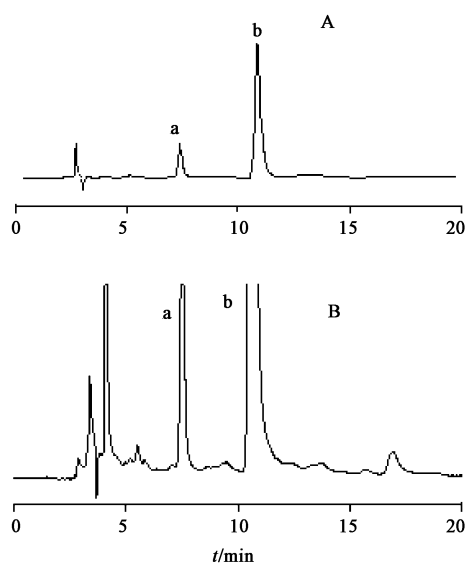
2 方法与结果

2.1 赤芍总苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Diamonsil-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.05% 甲酸水(35:65),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 230 nm。该条件下对照品和供试品色谱图中对照品与其他色谱峰分离良好,且与相邻色谱峰分离度均 >1.5,各检测峰理论塔板数均 >5 000,拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷 20 mg 置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成 0.4 g·L⁻¹的芍药苷对照品溶液。精密称取芍药内酯苷约 10.0 mg 置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再从中精密量取 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀即得 0.04 g·L⁻¹的芍药内酯苷对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取赤芍药材粗粉(粒径 <2.8 cm)50 g,以蒸馏水为溶剂,进行闪式提取。破碎提取后静置 0.5 h,减压抽滤除去滤渣,滤液用多级闪蒸器浓缩后,加蒸馏水定容到 100 mL,再用同体积正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇层,浓缩至



A. 对照品; B. 供试品; a. 芍药内酯苷; b. 芍药苷

图 1 赤芍 HPLC

干,用甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,精密吸取 0.1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,再从中精密吸取 0.5 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密量取上述芍药苷对照品溶液,加甲醇稀释配制成 0.02, 0.08, 0.12, 0.20, 0.24, 0.32 g·L⁻¹的一系列溶液,进样 20 μL,记录峰面积;精密量取上述芍药内酯苷对照品溶液,加甲醇稀释配制成 0.002, 0.004, 0.006, 0.010, 0.014 g·L⁻¹的一系列溶液,分别注入液相色谱仪 20 μL,测定相应峰面积值。以色谱峰面积为纵坐标 *Y*,进样量为横坐标 *X*,计算回归方程,芍药苷 $Y = 1\,103\,027 X - 23\,262 (r = 0.999\,9)$,线性范围 0.4 ~ 6.4 μg;芍药内酯苷 $Y = 1\,374\,497 X - 11\,220 (r = 0.999\,8)$,线性范围 0.04 ~ 0.28 μg。

2.1.5 精密度 在上述色谱条件下,精密吸取芍药苷对照品溶液 4 μL,芍药内酯苷对照品溶液 5 μL,分别重复进样 5 次,测定芍药苷与芍药内酯苷峰面积积分值。其 RSD 分别为 1.88%, 1.24%,表明本法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 在上述色谱条件下,精密吸取供试品溶液 20 μL,于 0, 2, 4, 8, 12 h 分别进样测定,得芍药苷与芍药内酯苷峰面积积分值的 RSD 分别为 1.42%, 1.78%,表明供试品溶液至少在 12 h 内测定结果稳定。

2.1.7 重复性 分别称取赤芍药材 5 份各 50 g,并按 2.1.3 项下方法处理 5 份样品,分别进样 20 μL 测定。重复性试验结果表明供试品中芍药苷的平均

含量为 939.29 mg (即 18.79 mg · g⁻¹ 生药), RSD 1.84% ; 芍药内酯苷的平均含量为 96.91 mg (即 1.94 mg · g⁻¹ 生药), RSD 1.91% , 说明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率 取已测定含量的赤芍药材 6 份, 分别加入一定量芍药苷与芍药内酯苷对照品, 并按上述色谱条件进行测定。得芍药苷平均回收率为 99.67% , RSD 1.86% ; 芍药内酯苷平均回收率为 98.68% , RSD 1.60% , 表明本方法测定结果准确。

2.1.9 样品含量测定 按 **2.1.3** 项下方法处理样品, 在上述色谱条件下, 进样 20 μL, 分别测定芍药苷与芍药内酯苷峰面积, 代入标准曲线方程计算含量。

2.2 正交试验设计 在参照文献报道及单因素考察的基础上, 设计正交试验。采用芍药苷、芍药内酯苷 HPLC 含量测定的双指标考察对闪式提取工艺进行深入研究, 选择提取水量、浸泡时间、提取电压、提取时间为考察因素, 每个因素设置 3 个水平, 采用 L₉(3⁴) 进行试验, 分别称取赤芍药材各 50 g, 按 **2.1.3** 项下方法处理样品, 正交试验的因素水平表见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 赤芍总苷的闪式提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取水量/倍	B 浸泡时间/h	C 提取电压/V	D 提取时间/min
1	10	0	50	2
2	20	6	70	4
3	30	12	100	6

由表 2 数据中极差可以看出, 以芍药苷、芍药内酯苷的总提取量为指标, 影响提取效果的各因素作用主次为: 提取电压 > 浸泡时间 > 提取时间 > 提取水量。因素 C 的极差最大, 是影响提取量的主要因素, 其次是 B, A 的极差最小, 是次要因素。对芍药苷与芍药内酯苷提取总量进行方差分析 (以 A 因素为误差项进行方差估算), 因素 B, C 对试验结果有显著影响, 而因素 D 的影响不显著。最佳组合是 A₃B₂C₂D₁, 即用 30 倍量的水浸泡 6 h, 提取电压为 70 V, 提取 2 min。

2.3 验证试验 由于 A₃B₂C₂D₁ 是正交试验中没有的组合, 为了保证提取工艺的重现性和可行性, 对优选的方案进行验证试验。称取赤芍药材 3 份各 50 g, 按最佳提取条件进行 3 次平行操作, 测定芍药苷、芍药内酯苷含量的平均值分别为 941.91, 98.57 mg, 总量为 1 040.48 mg, 明显高于实验组中的最大

表 2 赤芍总苷的闪式提取工艺 L₉(3⁴) 正交试验安排

No.	A	B	C	D	芍药苷 /mg	芍药内 酯苷/mg	总量 /mg
1	1	1	1	1	706.30	79.98	786.28
2	1	2	2	2	882.58	98.50	981.08
3	1	3	3	3	544.45	59.43	603.88
4	2	1	2	3	796.21	97.58	893.79
5	2	2	3	1	727.16	88.21	815.37
6	2	3	1	2	589.66	69.44	659.10
7	3	1	3	2	580.38	75.97	656.35
8	3	2	1	3	810.55	102.92	913.47
9	3	3	2	1	770.45	95.53	865.98
K ₁	790.41	778.81	786.28	822.54			
K ₂	789.42	903.31	913.61	765.51			
K ₃	811.93	709.65	691.87	803.71			
R	22.51	193.66	221.75	57.03			

表 3 芍药苷与芍药内酯苷总提取量的方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A(误差)	971.050	2	1	
B	57 784.623	2	59.507	<0.05
C	74 299.423	2	76.515	<0.05
D	5 067.078	2	5.218	

注: F_{0.05}(2, 2) = 19.00。

值, 结果表明该工艺稳定可行, 重现性较好。

3 讨论

闪式提取器适用于植物软、硬材料的快速提取。该仪器提取时间短, 能最大限度保护植物有效成分, 不会因受热而被破坏, 而且溶剂用量小, 操作简便, 效率高, 节约能源, 因此特别适合本试验中单萜苷类成分的提取, 本研究首次将闪式提取法应用于赤芍总苷的提取, 为赤芍总苷提取方法的研究提供了新手段。

赤芍总苷为赤芍中主要活性物质, 易溶于水、甲醇、乙醇、正丁醇等强极性溶剂, 本试验以水作为提取溶剂对赤芍进行提取, 可避免传统醇水加热回流法中溶剂量消耗大、耗时长、回收困难且易燃等缺点, 从而达到安全、绿色、环保、经济的目的, 是传统回流提取法无法相比的。

赤芍总苷提取工艺的研究, 大多以芍药苷单一成分为指标, 采用 HPLC 来测定其含量, 但有文献报道^[3], 赤芍总苷的指纹图谱分析中, 特征峰达 22 个之多, 仅以芍药苷作为指标, 并不能完全、真实地反

断血流皂苷微球的制备及体外释药

陈娇婷,孙湘婷,张道英,曾靖*
(赣南医学院,江西 赣州 341000)

[摘要] 目的:以丙烯酸树脂Ⅱ为囊材制备断血流皂苷微球及评价其体外释药情况。方法:用喷雾干燥法制备断血流皂苷微球,以微球的外观形态、收率及包封率为优化指标,用正交试验设计优化制备条件,并对微球进行 2 种不同介质(人工胃液、人工肠液)中的体外释放度评价。结果:制得的断血流皂苷微球在电镜下,球形表面圆整,粒径分布适宜,收率(97.53±2.39)%,包封率(92.87±4.2)%。断血流皂苷微球在人工胃液中 3 h 不释药;在人工肠液中 1 h 内释放不到 30%,3 h 释药接近 60%;此后释药趋于缓慢,8 h 释药>80%。结论:所制备断血流皂苷微球有良好的外观形态、较高的收率及包封率。

[关键词] 断血流皂苷;微球;制备;释药

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)02-0015-03

Preparation and *in vitro* Release of Clinopodii Saponin Microspheres

CHEN Jiao-ting, SUN Xiang-ting, ZHANG Dao-ying, ZENG Jing*
(Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] Objective: To prepare clinopodii saponin microspheres with acrylic acid resin Ⅱ as material and evaluate its release *in vitro*. Method: Clinopodii saponin microspheres were prepared by spray drying technique. Preparation technology was optimized by orthogonal test design with appearances, yield and entrapment efficiency as indexes. *In vitro* drug release of microspheres were carried out in two different media of artificial gastric juice and artificial intestinal fluid. Result: Clinopodii saponin microspheres showed good spherical geometry, smooth surface

[收稿日期] 20110411(003)
[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研项目(2008A123)
[第一作者] 陈娇婷, 硕士, 讲师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0797-8169775, E-mail:chenjiaoting80119@126.com
[通讯作者] * 曾靖, 教授, 硕士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0797-8169775, E-mail:zengjing61@hotmail.com

映赤芍总苷的提取量。本研究建立了芍药苷、芍药内酯苷的 HPLC 双指标含量测定方法,对赤芍总苷闪式提取工艺进行研究,可以更准确地反映赤芍总苷的提取量。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010; 147.

[2] 冀兰鑫, 黄浩, 李长志, 等. 赤芍药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 233.

[3] 邹忠梅, 徐丽珍, 杨世林. 芍药总苷高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 药学报, 2003, 38(1): 46.

[4] 黄海霞, 莫晓燕, 杜晓阳, 等. 赤芍总苷对培养鼠心肌细胞损伤后细胞凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(10): 963.

[5] 孙英莲, 王英军, 许嘉新, 等. 赤芍总苷对大鼠急性心肌缺血的影响[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1961.

[6] 黄群莲, 王利国, 唐灿. 赤芍提取工艺条件优选[J]. 中成药, 2010, 32(2): 303.

[7] 徐先祥, 周丽, 马燕. 正交实验优选赤芍提取工艺研究[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 27(5): 41.

[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] 刘静, 荣永海, 王志滨, 等. 罗汉果有效成分的连续提取与分离[J]. 中药材, 2010, 33(4): 629.

[10] 刘振洋, 刘延泽, 刘改岚, 等. 绞股蓝总皂苷的闪式提取和纯化工艺研究[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1071.

[责任编辑 全燕]