

正交试验法优选安神颗粒的醇提工艺

杨人泽, 钟美兴, 严金玲*

(赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 优选安神颗粒的醇提工艺。方法: 以酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲为指标, 以 HPLC 测定, 用 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 酸枣仁皂苷 A 流动相乙腈-水(30.5:69.5), 检测波长 204 nm; 五味子醇甲流动相甲醇-水溶液(13:7), 检测波长 250 nm。采用正交试验法, 优选醇提工艺。结果: 乙醇用量与提取次数对方中五味子醇甲的提取有显著性影响。此复方中五味子、酸枣仁药物最佳醇提工艺为每次用 10 倍药材量的 85% 乙醇提取 2 次, 每次 1.0 h。结论: 该提取工艺合理, 生产实际操作简单, 适合于大生产。

[关键词] 酸枣仁皂苷 A; 五味子醇甲; 提取工艺; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0041-04

Optimization of Alcohol Extraction Technology for Anshen Granules by Orthogonal Test

YANG Ren-ze, ZHONG Mei-xing, YAN Jin-ling*

(First Affiliated Hospital, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol extraction process of Anshen granules. **Method:** The optimum alcohol extraction conditions were investigated by orthogonal design with the content of jujuboside A and schizandrin as indexes. Determined by HPLC, using Lichrospher C₁₈ column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature was 30 °C, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; Determined jujuboside A with CH₃CN-water(30.5:69.5) as mobile phase, the UV detection wavelength was 204 nm; Schizandrin were investigated with methanol-water(13:7) as mobile phase, the UV detection wavelength was 250 nm. **Result:** The amount of ethanol and extracting time had significant effect on extraction of schizandrin. The optimum alcohol extraction technology of Schisandrae Chinensis Fructus and Ziziphi Spinosa Semen from complex prescription was as follows; extracted 2 times with 10 times amount of 85% ethanol for 1.0 h per time. **Conclusion:** This extraction technology is reasonable, simple and suitable for mass production.

[Key words] jujuboside A; schizandrin; extraction process; orthogonal test

安神颗粒是赣南医学院第一附属医院中医科临床验方, 由酸枣仁和五味子 2 味中药组成, 具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效, 在临床实践中广泛应用于虚烦失眠。本文以乙醇体积分数、乙醇用

量、提取时间、提取次数等工艺条件为考察因素, 以酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲的含量为考察指标, 对方中酸枣仁、五味子药 2 味药物醇提工艺进行正交优化试验。

1 材料

FA1104N 型电子分析天平(成都一科仪器设备有限公司), 1100LC 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。乙腈、甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸水, 其他试剂均为分析纯。酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲对照品(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号

[收稿日期] 20110522(002)

[第一作者] 杨人泽, 副主任药师, 学士, 从事医院药学、临床药理学研究, Tel: 13979738268, E-mail: yrz626@163.com

[通讯作者] * 严金玲, 主任药师, 学士, 从事医院药学研究, Tel: 13767785566, E-mail: gzyanjinling@163.com

分别为 110734-200510, 112706-200524)。酸枣仁、五味子药材均购自江西省药材公司, 经本院鉴定教研室彭绵林副主任中药师分别鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* 的干燥成熟种子和木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 提取工艺的优化

2.1.1 正交试验设计 按处方比例称取药材共 60 g, 加乙醇回流提取, 以乙醇体积分数, 乙醇用量, 提取时间, 提取次数为考查因素, 设计 3 个水平, 以酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲的含量作为考查指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 平行操作, 因素水平见表 1。

表 1 安神颗粒的醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取次数 /次	D 提取时间 /h
1	65	6	1	1.0
2	75	8	2	1.5
3	85	10	3	2.0

2.1.2 样品提取工艺 称取酸枣仁 36 g、五味子 24 g 共 2 份, 按表 1 相应的因素水平回流提取, 提取液过滤, 合并, 水浴浓缩至无醇味, 继续浓缩成稠膏状, 取样测定浸膏中酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲的含量, 进行方差分析。

2.1.3 酸枣仁皂苷 A 含量测定

2.1.3.1 色谱条件与系统适用性试验 酸枣仁皂苷 A 含量测定采用高效液相色谱法(《中国药典》2010 年版附录 VI D), Lichrospher C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-水(30.5:69.5), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 204 nm, 理论板数按酸枣仁皂苷 A 峰计算应不低于 2 000。

2.1.3.2 酸枣仁皂苷 A 对照品溶液的配制 精密称取酸枣仁皂苷 A 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成 0.93 g·L⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.3.3 线性范围的考察 精密量取上述对照品溶液适量, 分别配置成 0.093, 0.186, 0.372, 0.558, 0.744, 0.93 g·L⁻¹。在上述色谱条件下重复进样 2 次, 每次 15 μ L, 测定峰面积值, 以峰面积平均值和浓度进行回归处理, 得回归方程 $Y = 4\ 208.8X + 171.28$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明酸枣仁皂苷 A 在 0.093 ~ 0.93 g·L⁻¹ 线性良好。

2.1.3.4 供试品溶液的制备 取相当于 5 g 酸枣仁

药材的稠膏, 加蒸馏水 25 mL 超声溶解(完全溶解), 离心, 取上清液, 加石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 萃取 3 次, 每次 15 mL, 弃去石油醚层, 水层加入 5% 的氢氧化钾 30 mL, 用水饱和正丁醇萃取(每次 20 mL 萃取 3 次), 合并正丁醇层, 用正丁醇饱和的氨水溶液(浓氨水 40 mL 加蒸馏水至 100 mL, 用正丁醇饱和, 取氨水层) 洗涤 2 次, 每次 10 mL, 洗液弃去。挥干正丁醇, 残渣加 2 mL 甲醇定容, 过 0.45 μ m 滤膜, 蒸去部分甲醇, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中。分别精密吸取各供试品溶液各 15 μ L 注入液相色谱仪, 重复 2 次, 测定其峰面积值, 计算正交样品中酸枣仁皂苷 A 含量。结果及方差分析见表 2 ~ 4。

2.1.4 五味子醇甲含量测定

2.1.4.1 高效液相色谱条件 五味子醇甲含量测定采用高效液相色谱法(《中国药典》2010 年版附录 VI D), Lichrospher C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水(13:7), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 250 nm, 理论板数按酸枣仁皂苷 A 峰计算应不低于 2 000。

2.1.4.2 五味子醇甲对照品溶液的配制 取五味子醇甲对照品适量, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成 0.365 4 g·L⁻¹ 的标准溶液。

2.1.4.3 线性关系的考察 精密量取上述对照品溶液适量, 分别配置成 0.036 54, 0.054 81, 0.073 08, 0.091 35, 0.109 62, 0.127 89 g·L⁻¹ 的标准品溶液。在上述色谱条件下重复进样 2 次, 每次 10 μ L, 测定峰面积值, 以峰面积平均值和对照品量进行回归处理, 得回归方程 $Y = 21\ 179X + 127.18$ ($r = 0.999\ 5$)。结果表明酸枣仁皂苷 A 在 0.036 54 ~ 0.126 89 g·L⁻¹ 线性良好。

2.1.4.4 样品溶液的制备 取相当于 0.2 g 五味子药材的正交样品稠膏, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加稀乙醇 20 mL。超声处理(功率为 240 W、频率 45 kHz) 30 min, 放冷, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液备用。

五味子醇甲方差分析以因素 D 为误差项, 因素 B, C 对五味子醇甲的含量有显著性影响, 酸枣仁皂苷 A 方差分析因素 B 为误差项, A, C, D 均无显著性影响。综合方差分析结果, 结合实际生产, 确定最佳醇提工艺条件为 $A_3B_3C_2D_1$, 即加总量 10 倍量 85% 乙醇分 2 次提取, 每次 1 h。

表2 安神颗粒的醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	五味子醇甲提出量 /mg	酸枣仁皂苷 A 提出量 /mg
1	1	1	1	1	69.37	4.76
2	1	2	2	2	104.89	5.2
3	1	3	3	3	112.33	6.19
4	2	1	2	3	93.75	6.68
5	2	2	3	1	104.24	6.24
6	2	3	1	2	96.7	4.84
7	3	1	3	2	88.19	5.65
8	3	2	1	3	90.97	4.52
9	3	3	2	1	130.79	5.93
五味子	K_1	286.59	251.31	257.04	304.4	
醇甲	K_2	294.69	300.1	329.43	289.78	
	K_3	309.95	339.82	304.76	297.05	
	R	23.36	88.51	72.39	14.62	
酸枣仁	K_1	16.15	17.09	14.12	16.93	
皂苷	K_2	17.76	15.96	17.81	15.69	
A	K_3	16.10	16.96	18.08	17.39	
	R	1.66	1.13	3.96	1.70	

表3 五味子醇甲方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	93.8	2	46.9	2.63	
B	1310.2	2	655.1	36.78	<0.05
C	902.9	2	451.45	25.35	<0.05
D(误差)	35.62	2	17.81		

注: $F_{1-0.05}(2, 2) = 19.0$, $F_{1-0.01}(2, 2) = 99.0$ (表6同)。

表4 酸枣仁皂苷 A 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.59	2	0.30	2.33	
C	3.26	2	1.63	12.80	
D	0.52	2	0.26	2.02	
B(误差)	0.25	2.00	0.13		

2.4 最佳醇提工艺验证 按处方比例称取药材共 60 g,按上述条件与方法,对最佳醇提工艺进行验证,结果五味子醇甲含量分别为 128.56, 125.97, 131.12 mg;酸枣仁皂苷 A 含量分别为 10.82, 10.89, 10.76 mg。3 份样品中所测得的酸枣仁皂苷 A、五味子醇甲含量与所确定的最佳醇提工艺所测得的平均含量较相近,从而证明了该工艺的合理性。

3 讨论

对酸枣仁皂苷 A 的提取多为回流和超声波提取,王筱亮等^[1]和朱玲等^[2]均采用一定体积分数的乙醇回流提取;而王旭峰等^[3]考察到酸枣仁皂苷提取最主要的因素是温度,其次是提取溶剂的种类,采用超声提取。笔者考虑到处方中含有五味子,故采用一定体积分数的乙醇提取。

有关文献对五味子的提取报道,其中范晨怡等^[4]的水提醇沉方法可为提取五味子的生产工艺提供参考。实验中多采用乙醇回流提取五味子,如袁胜英^[5]均采用乙醇回流法且考察了溶剂用量、提取时间及提取次数的对提取效率的影响,优选出合理的提取工艺。综合以上文献研究及实际生产条件,将本方中酸枣仁、五味子等药物采用乙醇提取,为优选最佳提取条件。

《中国药典》2010 年版没有收载酸枣仁单味药材的含量检测方法,文献报道酸枣仁皂苷 A 的含量测定也较少,大多为应用高效液相色谱法-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD),采用甲醇-水-冰醋酸(70:30:1)为流动相检测,但在实验过程中发现,试验受天气等外界因素影响较大,且流动相中冰醋酸会对色谱柱造成一定的破坏。另有一些文献报道采用紫外检

制何首乌多糖的超声提取工艺

陈占科¹, 王淑美², 陈静², 梁生旺^{2*}

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选超声提取制何首乌中多糖的最佳工艺。方法: 采用正交设计的方法, 考察提取时间、提取温度、料液比、提取次数对制何首乌多糖得率的影响, 优选出最佳的超声提取工艺, 并与热水浸提法进行比较。结果: 超声提取的最佳条件为用 25 倍的水, 70 ℃ 超声提取, 提取时间 50 min, 提取 2 次, 多糖的得率 20.04%, 与热水浸提法相比提取时间明显减少。结论: 该方法快速、高效、可行。

[关键词] 制何首乌; 多糖; 超声提取; 热水浸提

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0044-03

Ultrasonic Extraction Process of Polysaccharides from Polygoni Multiflori Radix Praeparata

CHEN Zhan-ke¹, WANG Shu-mei², CHEN Jing², LIANG Sheng-wang^{2*}

(1. First Affiliated Hospital of He'nan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the optimal ultrasonic extraction technology of polysaccharides from Polygoni Multiflori Radix Praeparata. **Method:** Extraction time, extraction times, the ratio of sample to solution, and extraction temperature were set as index for orthogonal test, and Compared with hot water extraction method. **Result:** The optimal ultrasonic extraction Process of polysaccharides from Polygoni Multiflori Radix Praeparata was extracted 2 times for 50 min each time at 70 ℃ with the ratio of dry material to water was 1:25, the yield of polysaccharides is 20.04%. Compared with water extraction, the extraction time reduced obviously. **Conclusion:** The optimum ultrasonic extraction process for polysaccharides is rapid, efficient and feasible.

[Key words] Polygoni Multiflori Radix Praeparata; polysaccharides; ultrasonic extraction; hot water extraction

[收稿日期] 20101128(002)

[第一作者] 陈占科, 硕士研究生, 从事中药质量控制研究, E-mail: chen-zhanke@126.com

[通讯作者] * 梁生旺, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制及新药研发研究, Tel: 020-39352172, E-mail: swliang371@163.com

测器, 以乙腈-水为流动相检测, 经过反复调整, 最终确定以乙腈-水 (30.5:69.5) 为流动相, 此方法条件稳定, 分离效果较好, 且对色谱柱损耗较小。

[参考文献]

- [1] 王筱亮, 张玉杰, 陈明霞, 等. 多指标正交试验优选酸枣仁最佳提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30 (10): 753.
- [2] 朱玲, 苑乃香, 刘伟, 等. 正交试验优选酸枣仁中酸枣仁

皂苷 A 提取工艺 [J]. 郑州大学学报, 2003, 38 (1): 111.

- [3] 王旭峰, 何记国, 陈明, 等. 酸枣仁皂苷的提取及改善睡眠功效的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 (4): 226.
- [4] 范晨怡, 章晓焯, 魏惠华, 等. 五味子醇甲的提取纯化工艺研究 [J]. 中国药房, 2007, 18 (12): 896.
- [5] 袁胜英. 正交试验法研究五味子提取工艺 [J]. 天津中医学院学报, 2001, 20 (1): 45.

[责任编辑 全燕]