

多指标正交试验优选复方溃疡膏最佳超临界 二氧化碳萃取工艺

李静¹, 杨博华², 杨丽娟³, 张玉杰^{3*}

(1. 北京积水潭医院中药房, 北京 100035; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 优选复方溃疡膏药材超临界二氧化碳(SFE-CO₂)萃取工艺条件。方法: 以出膏率、总蒽醌、欧前胡素、阿魏酸的含量为评价指标, 采用正交试验法, 考察温度、压力、时间对 SFE-CO₂ 萃取复方溃疡膏药材成分的影响, 优化提取工艺。结果: 萃取温度为最明显的影响因素, 其次为萃取压力和萃取时间; 最佳萃取温度 55 ℃, 萃取压力 30 MPa, 萃取时间 1 h。结论: SFE-CO₂ 萃取法提取复方溃疡膏工艺稳定、可行且操作简单。

[关键词] SFE-CO₂ 萃取; 复方溃疡膏; 多指标; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0033-04

Optimizing SFE-CO₂ Technique for Fufang Kuiyang Gao by Orthogonal Design Using Multi-Index

LI Jing¹, YANG Bo-hua², YANG Li-juan³, ZHANG Yu-jie^{3*}

(1. Beijing Jishuitan Hospital Pharmacy, Beijing 100035, China;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

3. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize SFE-CO₂ technique for Fufang Kuiyang Gao. **Method:** Using the paste rate, the contents of total anthraquinones, imperatorin and ferulic acid as composite index, the effect of condition including temperature, pressure, extraction time on SFE-CO₂ extraction was investigated by orthogonal design. **Result:** The influencing sequence of factors on SFE-CO₂ for composite index was temperature > pressure > extraction time, and temperature was the most remarkable factor. The optimized extraction condition was as follows: temperature at 55 ℃, pressure at 30 MPa and extraction time 1 h. **Conclusion:** The optimized extraction technology was stable, feasible and simple.

[Key words] SFE-CO₂; Fufang Kuiyang Gao; composite index; orthogonal design

复方溃疡膏为临床经验方, 主要由大黄、白芷、川芎组成, 具有清热解毒、生肌收口、滋润肌肤之功效; 用于溃疡久不收口、皮肤干燥皲裂。原药材提取

采用传统麻油炸枯法, 存在着提取率不高、时间火候不易掌控、洁净程度低以及对后续剂改困难等问题。超临界萃取技术具有提取温度低、保证提取物质的稳定、提取完全、无溶剂残留等特点, 被广泛应用于食品、药品、化妆品等工业原料药材的提取。据报道, 游离蒽醌成分为大黄中的主要药效成分^[1], 药典载欧前胡素为白芷的主要定量指标性成分^[2], 阿魏酸亦是川芎中的主要成分^[3], 本研究以总蒽醌、欧前胡素、阿魏酸的转移率以及出膏率作为试验指标, 采

[收稿日期] 20100718(002)

[第一作者] 李静, 硕士, 药师, 从事中药制剂技术研究

[通讯作者] * 张玉杰, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物制剂新技术及体内外评价, Tel: 010-84738618, Fax: 86-10-84738611, E-mail: zhyj227@126.com

用正交实验法、利用超临界 CO₂ 流体(SFE-CO)萃取技术,对复方溃疡膏药材进行提取,优选最佳工艺。

1 仪器与试剂

HA121-50-01 型超临界萃取装置(江苏南通华安超临界萃取有限公司),岛津 LC-20A 型高效液相色谱系统(配有四元泵、UV 检测器、自动进样器和色谱工作站),JJ500 型电子分析天平(G&G 公司),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

大黄素(批号 110756-200110)、欧前胡素(批号 110826-200712)、阿魏酸(批号 110773-200611)对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。

药材经北京中医药大学张贵君教授鉴定。大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎,白芷为伞形科植物杭白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根;川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎。以上药材均购自河北康派饮片厂。

2 方法与结果

2.1 复方溃疡膏药材 SFE-CO₂ 萃取方法 按处方比例取各药材饮片,粉碎(过 40 目筛),混合均匀,称取 350 g 装入萃取釜;设定萃取温度及分离温度;当萃取温度及分离温度达到设定温度后,通入 CO₂ 气,等压力平稳时,打开阀门,使 CO₂ 与药材粉末充分接触。打开高压泵,微调压力到萃取釜及分离釜至设定值;一定时间后,从分离釜 1 和分离釜 2 中收集萃取液。

2.2 萃取物多指标含量分析

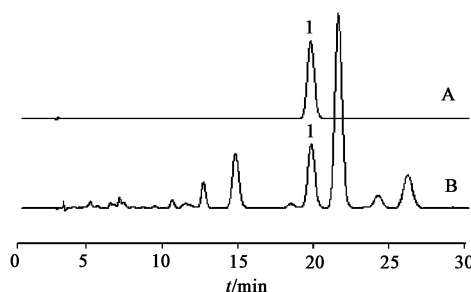
2.2.1 供试品溶液的制备 取药材超临界萃取物 1 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,以乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.2.2 超临界萃取物中游离蒽醌的测定^[4] 精密吸取大黄素对照品溶液(0.101 g·L⁻¹)0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6 mL,分别置 10 mL 量瓶中,分别加入 0.5% 醋酸镁乙醇溶液 5 mL,95% 乙醇定容,摇匀,得到 4.04,6.06,8.08,10.1,12.12,14.14,16.16 mg·L⁻¹ 的系列溶液。于波长 518 nm 处测定吸光度。以吸光度(Y)与对照品质量浓度(X)进行回归,得回归方程 $Y = 5.9 \times 10^{-2} X + 4.9 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9997$),线性范围 4.04 ~ 16.16 mg·L⁻¹。

高、中、低 3 个质量浓度对照品重复测定精密度的 RSD 分别为 0.238%,0.541%,0.197%;供试品于显色后 2 h 内稳定;平均加样回收率为 100.8%,RSD 1.65%。

2.2.3 欧前胡素的含量测定

2.2.3.1 色谱条件 迪马(钻石)C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(65:35),检测波长 310 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。在此色谱条件下供试品中欧前胡素与杂质可实现基线分离,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 欧前胡素

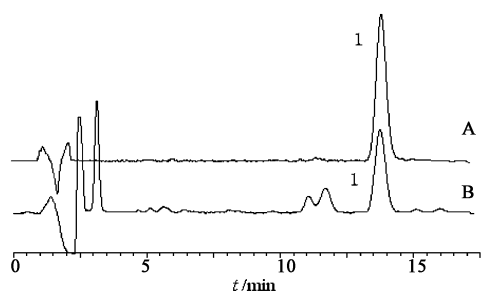
图 1 欧前胡素和超临界萃取物 HPLC

2.2.3.2 方法学考察 精密吸取欧前胡素对照品溶液(0.123 g·L⁻¹)1,3,5,7,9 μL,按上述色谱条件分别进样,测定。以峰面积(Y)与对照品的质量(X)进行回归,得回归方程 $Y = 2.6 \times 10^6 X - 3.5 \times 10^3$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.123 ~ 1.11 μg。对照品重复测定精密度的 RSD 0.14%;供试品于制备后 12 h 内稳定;平均加样回收率为 101.8%,RSD 2.42% ($n = 6$)。

2.2.4 总阿魏酸的含量测定^[6] 通过预试验发现,处方中川芎、大黄和白芷中均含有阿魏酸,因此就药材中总阿魏酸含量进行测定。

2.2.4.1 色谱条件 迪马(钻石)C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.54% 冰醋酸(23:77),检测波长 320 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。在此色谱条件下供试品中阿魏酸与杂质峰可实现基线分离,见图 2。

2.2.4.2 方法学考察 精密吸取阿魏酸对照品溶液(12.8 mg·L⁻¹)2,6,10,14,18 μL,按上述色谱条件分别进样测定峰面积。以峰面积(Y)与对照品的质量(X)进行回归,得回归方程 $Y = 5.7 \times 10^6 X - 7.5 \times 10^2$ ($r = 0.9999$),线性范围为 0.026 ~ 0.23 μg。对照品重复测定精密度 RSD 0.62% ($n = 5$);供试品于制备后 12 h 内稳定;平均加样回收率为 101.0%,



A. 对照品;B. 供试品;1. 阿魏酸

图2 阿魏酸和超临界萃取物 HPLC

RSD 2.13% ($n = 6$)。

2.3 复方溃疡膏药材 SFE- CO_2 萃取工艺考察

2.3.1 正交试验设计 采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,根据影响超临界萃取的重要因素,选择萃取温度、萃取压力、萃取时间为考察因素,结合所使用的

仪器设备的条件设置范围,同时兼顾工业生产的安全、简便以及适用性,设定各因素水平,见表1。

表1 复方溃疡膏药材超临界萃取工艺正交试验因素水平

水平	A 萃取温度/°C	B 萃取压力/MPa	C 萃取时间/h
1	35	25	0.5
2	45	30	1.0
3	55	35	1.5

2.3.2 正交试验结果及方差分析 根据多指标含量测定方法对正交试验得到的超临界萃取物进行评价,根据原药材的含量,计算转移率。以总游离蒽醌、欧前胡素、阿魏酸的转移率及出膏量为考察指标,进行综合评分,应用 SAS. V8.2 统计软件处理,进行方差分析,正交试验结果见表2。

表2 复方溃疡膏药材超临界萃取正交试验

No.	A	B	C	D	游离蒽醌 转移率/%	欧前胡素 转移率/%	阿魏酸 /转移率%	出膏量/g	综合评分
1	1	1	1	1	11.09	66.62	5.47	8.25	62.69
2	1	2	2	2	15.95	62.02	5.49	9.68	68.84
3	1	3	3	3	14.10	68.58	3.41	8.53	60.61
4	2	1	2	3	14.68	58.71	3.88	8.78	59.82
5	2	2	3	1	17.56	67.84	7.02	11.61	79.71
6	2	3	1	2	17.89	71.00	4.36	9.48	70.52
7	3	1	3	2	16.35	81.64	7.31	10.80	83.15
8	3	2	1	3	21.28	77.08	7.22	11.10	88.17
9	3	3	2	1	22.23	88.05	8.81	12.90	100.00
K_1	64.0	68.6	73.8	80.8					
K_2	70.0	78.9	76.2	74.2					
K_3	90.4	77.0	74.5	69.5					
R	26.4	10.3	2.4	11.3					

注:评分规则:游离蒽醌评分 = $30 \div$ 游离蒽醌最大转移率 \times 游离蒽醌转移率;欧前胡素评分 = $30 \div$ 欧前胡素最大转移率 \times 欧前胡素转移率;阿魏酸评分 = $30 \div$ 阿魏酸最大转移率 \times 阿魏酸转移率;出膏量评分 = $10 \div$ 最大出膏量 \times 出膏量。

以大黄 SFE- CO_2 萃取物中总蒽醌含量作为考察指标进行方差分析法,结果见表3。

方差分析表明,A因素对大黄、白芷、川芎3种药材混合粉末的超临界萃取结果影响显著($0.01 < P < 0.05$),B,C因素对萃取结果影响不显著。极差分析结果表明,在设置水平内,以多指标综合评分对正交试验进行评价,对提取工艺的影响程度依次为 $A > B > C$,即萃取温度为最明显的影响因素,其次是压力、时间。最佳提取条件为 $A_3 B_2 C_2$,即萃

取罐的温度为 55°C 、萃取压力为 30 MPa 、萃取时间为 1 h 。

表3 方差分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
A	2	1 149.36	574.68	5.97	< 0.05
B	2	182.74	91.37	0.95	> 0.05
C	2	9.37	4.68	0.05	> 0.05
误差	6	384.50	64.08		

注: $F_{0.05}(2,6) = 3.46$; $F_{0.01}(2,6) = 10.92$ 。

按优化工艺条件 $A_3B_2C_2$ 进行 2 次验证试验,游离蒽醌、欧前胡素、阿魏酸平均得率及出膏率等指标均接近正交试验最优水平,结果较为理想,表明该工艺较为稳定。所得提取物为橙黄色稠膏,色泽鲜艳,具有特殊芳香气味,每克超临界萃取物约含有各生药材 9.05 ~ 14.14 g。

3 讨论

针对溃疡膏原药材大黄、白芷、川芎等混合粉末的提取至今尚无报道,但是对于单味药超临界萃取的工艺较多。姚兰等^[6]使用超临界萃取法对川芎进行提取,得到阿魏酸的最佳超临界萃取工艺条件为萃取温度 70 °C,萃取压力 35 MPa,萃取 2 h。李秋怡等^[7]对超临界萃取川芎挥发油部分的工艺进行了研究,得到超临界 CO₂ 萃取川芎的最佳工艺条件为萃取压力 35 MPa,萃取温度 50 °C,萃取时间 2 h,流量 20 L·min⁻¹。刘红梅等^[8]对白芷中香豆素类成分的提取工艺进行了研究,分别以欧前胡素、氧化前胡素,总香豆素的含量为考察指标。通过研究,确定白芷中香豆素类成分的最佳超临界萃取条件为萃取温度 50 °C,萃取压力 21 MPa,萃取时间 3.5 h。弥宏等^[9]也对白芷超临界萃取产物进行了化学分析,以萃取温度为 35 °C,萃取压力 25 MPa,萃取时间 3 h 为萃取条件,得到白芷精油,进行气相-质谱分析。在研究大黄超临界萃取技术的过程中,多有夹带剂的参与。陈卫林等^[10]使用了夹带剂,并且与未使用夹带剂的提取工艺进行对比考察,结果得到萃取压力 38 MPa,萃取温度 70 °C,萃取时间 60 min,夹带剂用量为乙醇 300 mL 的最有工艺条件。

超临界萃取物体积小、杂质少、无溶剂残留,有利于剂型的设计和改造,具有广泛的发展前景,期待

进一步研究。虽然,在工业化生产上,超临界萃取在设备和成本方面较传统工艺有更高的要求,但随着超临界萃取设备的普及以及对现代制药技术水平要求的提高,超临界萃取的优势会更加突出。

[参考文献]

- [1] 丁玉玲. 大黄蒽醌类的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2005,16(11):1160.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2005:69.
- [3] 舒冰,周重建,马迎辉,等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2006Sep,22(9):1043.
- [4] 刘玉明,靳小青,陆翠琴,等. 速效烧伤油中总蒽醌的含量测定[J]. 国医院药学杂志,2008,28(6):462.
- [5] 李海燕,岑志芳,林玉明,等. 中药新药复方天麻头风胶囊中白芷的含量测定研究[J]. 时珍国医国药, 2006,7(6),965.
- [6] 姚兰,王传芬,蒋文强,等. 超临界萃取法提取川芎中阿魏酸的研究及其 HPLC 测定[J]. 齐鲁药事,2006,25(2):96.
- [7] 李秋怡,王光忠,干国平,等. 超临界 CO₂ 萃取川芎挥发油的工艺研究[J]. 中国药师,2007,10(5):461.
- [8] 刘红梅,张明贤,刘杨平,等. 超临界 CO₂ 萃取白芷中香豆素类成分的工艺优化研究[J]. 中成药,2004,26(2):90.
- [9] 弥宏,于敏,赵东明,等. 白芷超临界 CO₂ 萃取产物化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(3):22.
- [10] 陈卫林,郭玫,赵磊,等. 均匀设计优化超临界 CO₂ 流体萃取大黄蒽醌的研究[J]. 中医药导报,2007,13(2):72.

[责任编辑 全燕]