

正交试验法优选蛇床子渗漉提取的工艺条件

张璐, 翁立冬, 刘莉, 郑飞, 刘强*

(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 优选蛇床子中蛇床子素的渗漉提取工艺条件。方法: 以蛇床子素含量为指标, 采用正交试验法确定蛇床子素的提取最佳工艺。最佳工艺为药材粒度为中粉, 乙醇用量为 500 mL, 乙醇浓度为 80%。结论: 渗漉提取法是一种简单、实用、可大量提取的方法。

[关键词] 蛇床子; 蛇床子素; 渗漉提取; 正交实验

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0012-02

蛇床子为伞形科一年生草本植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的果实。其主要成分蛇床子素 (osthole) 是一种香豆素化合物, 其含量约 1%。蛇床子素具有解痉、降血压、抗心律失常、增强免疫功能及广谱抗菌作用^[1]; 目前蛇床子素提取大都采用醇提加热法, 但因加热时间长, 蛇床子素受热不稳定, 易分解, 导致生产效率低。本文探讨了蛇床子素渗漉提取的工艺。

1 试剂与仪器

蛇床子购于广州广弘中药材有限公司, 经南方医科大学中药鉴定教研室鉴定为伞形科一年生草本植物蛇床 *C. monnieri* 的果实; 蛇床子素对照品购于中国药品生物制品检定所, 批号 110822-200305; 渗漉管提取器 (高 50 cm, 内径 8 cm); 高效液相色谱仪 (Agilent G1311A 泵、Agilent G1316A 紫外检测器、Agilent G1313A 自动进样器); 乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯, 水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2] 色谱柱 Agilent HC-C₁₈ 柱, (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (65:35); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 322 nm; 温度 30 ℃。理论塔板数按蛇床子素峰计应不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取蛇床子素对照

品适量, 加入乙醇溶解制成 0.2 g·L⁻¹ 的蛇床子素对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取蛇床子粉末 (过三号筛) 约 0.1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入无水乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 放置 2 h, 超声处理 30 min, 放冷, 用无水乙醇补足减失的质量, 摇匀, 即得。

2.4 高效液相色谱图 对照品溶液和供试品溶液各过 0.45 μm 滤膜并分别以 5 μL 进样一次, 按上述

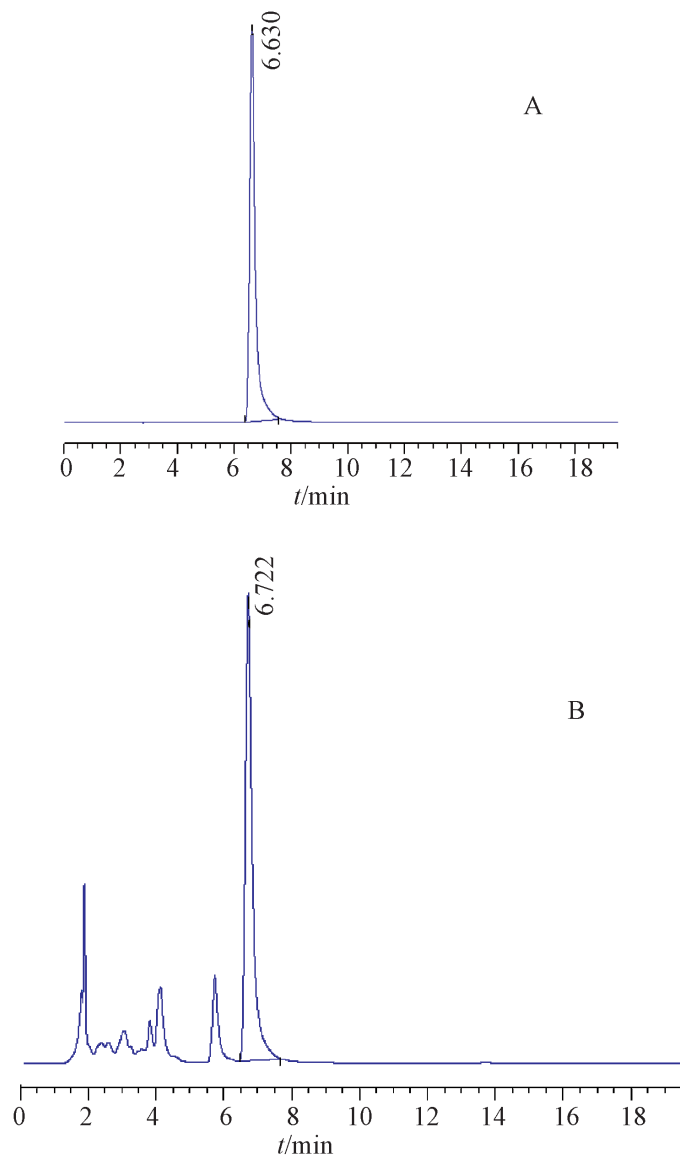


图 1 蛇床子素含量测定 HPLC 图
A. 蛇床子素对照品; B. 供试品

[收稿日期] 2010-01-04

[第一作者] 张璐, 实验师, 研究方向: 主要从事中药及其制剂有效成分的提取分离研究工作, Tel: 020-61648263, E-mail: ulgnahz@163.com

[通讯作者] * 刘强, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药新制剂与新剂型, Tel: 020-61648264, E-mail: gzlq2002@163.com

色谱条件分离, 分离效果好, 见图 1。

2.5 线性关系的考察 取 2.2 项下的对照品溶液以 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 μL 进样, 以峰面积为横坐标, 进样量为纵坐标, 做线性回归, 得回归方程: $Y = 0.0004X + 0.0186$ ($r = 1$), 线性范围在 0.2 ~ 2.8 μg 呈良好的线性关系。

2.6 精密度实验 取 2.2 项下的对照品溶液 5 μL , 连续进样 5 次, 按上述色谱条件进行分析, 测定蛇床子素峰面积, RSD 0.44%, 说明该方法精密性良好。

2.7 稳定性试验 取 2.3 项下的供试品试液, 分别

在 0, 6, 12, 24 h 进样 5 μL 测定, 测定供试品溶液峰面积的平均值, RSD 0.63%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内较稳定。

2.8 加样回收率实验 精密称取已知含量的样品 0.01 g 6 份于 10 mL 量瓶中, 再分别精密加入蛇床子素对照品适量, 精密加入无水乙醇 10 mL, 密塞, 称定质量, 放置 2 h, 超声处理 30 min, 放冷, 用无水乙醇补足减失的质量, 摇匀, 溶液过 0.45 μm 滤膜并分别以 5 μL 进样, 测得峰面积, 测定回收率 100.3%, RSD 1.48%, 结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果

取样量 /g	蛇床子素含量 /mg	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.010 2	0.408 0	0.400 0	0.801 2	98.3		
0.010 5	0.420 0	0.400 0	0.819 3	99.8		
0.009 8	0.392 0	0.400 0	0.800 2	102.1		
0.010 3	0.412 0	0.400 0	0.812 6	100.2	100.08	1.32
0.010 2	0.408 0	0.400 0	0.811 4	100.9		
0.010 4	0.416 0	0.400 0	0.812 7	99.2		

2.9 正交实验设计及结果

2.9.1 正交实验设计 精密称取蛇床子药材 50 g 共 9 份, 以 A 药材粒度、B 乙醇用量和 C 乙醇体积分数为 3 个因素做正交试验, 见表 2, 实验完毕后过滤收集滤液, 分别定容于 500 mL 量瓶中, 摇匀, 并以 10 μL 分别进样, 测得峰面积, 算得含量, 结果见表 3, 4。

表 2 试验因素水平表

因素	A 药材粒度	B 乙醇用量 / 倍	C 乙醇体积分数 / %
1	最粗粉	6	60
2	粗粉	8	80
3	中粉	10	100

表 3 正交表 $L_9(3)^4$ 实验结果直观分析

No.	A	B	C	空白	蛇床子素含量 / g
1	1	1	1	1	0.653 2
2	1	2	2	2	1.387 6
3	1	3	3	3	1.255 8
4	2	1	2	3	1.654 7
5	2	2	3	1	1.423 5
6	2	3	1	2	0.980 7
7	3	1	3	2	1.534 8
8	3	2	1	3	1.168 3
9	3	3	2	1	1.998 6
K_1	1.099	1.281	0.934	1.358	
K_2	1.353	1.326	1.680	1.301	
K_3	1.567	1.412	1.405	1.360	
R	0.468	0.131	0.746	0.059	

从表 3 和表 4 的直观和方差分析可知, 乙醇体积分数对结果有极其显著性影响, 其次是药材粒度, 最后是乙醇用量, 即是 $C > A > B$, 最佳工艺为 $A_3 B_3 C_2$, 即药材粒度为中粉, 乙醇用量为 500 mL, 乙醇体积分数为 80%。

表 4 方差分析表

因素	SS	f	F	P
A	0.330	2	47.143	< 0.05
B	0.026	2	3.714	
C	0.854	2	122.584	C 0.01
误差	0.01	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$ 。

2.9.2 验证性实验 按最佳的提取条件: 药材粒度为中粉, 乙醇用量为 500 mL, 乙醇体积分数为 80% 进行 3 批实验, 每批药材 50 g, 分别可提取蛇床子素 1.997 6, 2.005 7, 2.003 6 g。

3 讨论

本研究曾对渗漉前浸渍时间进行了考察, 浸渍 24 h 的提取率高于 4 h 和 15 h, 故确定渗漉前应浸渍 24 h; 渗漉的流速对指标成分的提取率也有一定的影响, 经试验研究, 流速为每 1 kg 生药 $40 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 较好, 故正交试验及验证实验均固定这一条件。正交试验以蛇床子素的提取量为指标, 考察并优选了渗漉的工艺参数, 经验证试验表明优选工艺提取率高, 工艺稳定性好。

[参考文献]

- [1] 刘建新, 张文平, 周莉, 等. 蛇床子素对大鼠的抗炎作用与机制[J]. 中药材, 2005, 28(11): 1005.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 219.

[责任编辑 仝燕]