

正交试验法优选益母草口服液提取工艺的研究

吕定刚 (广西兴安县人民医院, 兴安 541300)

摘要: 以总生物碱含量为指标, 采用正交试验法优选益母草口服液提取工艺。结果最佳提取工艺为加药材 12 倍量的水, 煎煮提取 3 次, 每次 90min, 水提液浓缩至相对密度为 1.05, 醇沉浓度为 70%, 室温(20℃)静置 24h。该优选工艺稳定可行。

关键词: 益母草口服液; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0010-03

Study on Optimizing Extraction Technology of *Leonurus Japonicus* Houtt. Oral Liquid With Orthogonal Experiment

Lü Ding-gang

(Xingan County People's Hospital of Guangxi Province, Xingan 541300)

Abstract Using total alkaloidal content as a marker, the optimum extraction technology of *Leonurus japonicus* Houtt. Oral liquid was selected with the orthogonal experiment. The best extraction technology is as follows: adding 12 times water, decocting 3 times, 90min for each time, the relative density is 1.05, 70% alcohol-precipitation concentration, and keeping still for 24h. The Optimized extraction technology is stable and high efficient.

Key words: *Leonurus japonicus* Houtt oral liquid; extraction technology; orthogonal experiment

益母草口服液系由唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 加工制备而成。为 2000 年版中国药典新增设的单味制剂。具有清热凉血、化瘀调经之功能, 临床主要用于热结血瘀、月经过多、产后子宫出血及复原不全等见上述证候者^[1]。益母草中的益母草碱(Leonurine)、水苏碱(Stachydrine)等生物碱类成分被认为是其有效成分^[2], 药典采用水醇法提取。为避免提取工艺的盲目性与随意性, 在提高总生物碱得率的同时, 又能改善和提高制剂的外观质量及稳定性, 笔者采用正交试验法对其提取工艺进行优选, 为优化该制剂的制备工艺提供了科学的实验依据。

1 仪器与试剂

7520 型分光光度计(上海分析仪器厂); 益母草(为益母草 *L. japonicus* Houtt. 营养期和花初期之地上部分。采割后及时净制, 切段, 干燥); 盐酸水苏碱对照品(中国药品生物制品检定所); 雷氏盐、乙醇、丙酮、盐酸等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

益母草口服液的提取工艺路线可大致分为水提取与乙醇沉淀两大部分。根据水提醇沉法工艺特

点, 本文采用正交试验设计法, 以总生物碱含量为测定指标, 分别对水提和醇沉工艺进行优选, 以求获取最佳工艺条件。

2.1 水提工艺条件的优选

2.1.1 因素水平的确定 以总生物碱含量为指标, 重点考察提取溶媒的用量、提取次数和提取时间 3 个因素, 每个因素选择 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验。因素水平见表 1。

表 1 因素-水平表

因素	A	B	C	D
	加水量(倍)	提取次数	提取时间(min)	
水平 1	8	1	60	
水平 2	10	2	90	
水平 3	12	3	120	

2.1.2 样品溶液的制备^[1] 取混合均匀之益母草, 每份称取 500g, 按正交试验表所设条件煎煮提取, 得 9 份煎液。分别将煎液滤过, 浓缩至适量, 室温静置 24h, 滤过, 滤液再适当浓缩, 冷藏 24h, 滤过, 滤液加入糖精钠 0.4g, 调 pH 值, 加蒸馏水调整药液总量至 1000ml, 搅匀, 滤过, 灌装(10ml/支), 灭菌, 即得 9 份样品液。

2.1.3 总生物碱含量的测定^[3,4] 标准曲线的制备: 精密称取在 105℃干燥至恒重的盐酸水苏碱对照

品 25.0mg, 置 25ml 量瓶中, 加 0.1mol 盐酸稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液(每 1ml 含盐酸水苏碱 1mg)。精密吸取上述对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0ml 分别置烧杯中, 顺次加入 0.1mol 盐酸使成 10ml, 各加活性炭 0.5g, 置沸水浴中加热并搅拌 0.5min, 滤至 25ml 烧杯中, 用 0.1mol 盐酸适量分次洗涤烧杯和滤器, 然后于每个烧杯中缓慢加入新配制的 2% 硫氰酸铬氨溶液 6ml, 摇匀, 置冰箱中过夜, 抽滤, 沉淀用冰蒸馏水 10ml 分次洗涤至滤液无色, 抽干, 再用丙酮将沉淀移溶于 10ml 量杯中并稀释至刻度, 摇匀, 以丙酮为空白, 于最大吸收波长 $\lambda_{\max} = 525\text{nm} \pm 1$ 处测定吸收度。以浓度为横坐标, 吸收度为纵坐标, 绘制标准曲线。结果盐酸水苏碱浓度在 2.0~ 10.0mg/ml 范围内符合 Bree 定律, 线性回归方程 $Y = 0.066X + 0.004$, 相关系数 $r = 0.9995$ 。

样品含量测定: 精密吸取装量项下的样品液 10ml, 置 25ml 量瓶中, 加 0.1mol 盐酸稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 6ml 置烧杯中, 余下按标准曲线制备项下方法, 自“加活性炭 0.5g ……”起同法操作测定。9 批样品液中益母草总生物碱含量测定结果及正交试验数据的直观分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 正交试验设计及结果表

试验号	因素				总生物碱含量 (mg/ml)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.746
2	1	2	2	2	1.018
3	1	3	3	3	1.178
4	2	1	2	3	0.904
5	2	2	3	1	1.073
6	2	3	1	2	1.162
7	3	1	3	2	1.009
8	3	2	1	3	1.080
9	3	3	2	1	1.297
K_1	2.942	2.659	2.988	3.116	
K_2	3.139	3.171	3.219	3.189	$G = \sum_{i=1}^9 Y_i = 9.467$
K_3	3.386	3.637	3.260	3.162	$G^2 = (\sum Y_i)^2 = 89.624$
\bar{K}_1	0.981	0.886	0.996	1.039	$CT = G^2/N = 9.958$
\bar{K}_2	1.046	1.057	1.073	1.063	
\bar{K}_3	1.129	1.212	1.087	1.054	
R	0.148	0.326	0.091	0.024	

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	0.033	2	0.0170	33.00	< 0.05
B	0.160	2	0.0805	160.00	< 0.01
C	0.015	2	0.0075	15.00	< 0.10
D(误差)	0.001	2	0.0005		

注: $F_{1-0.10}(2, 2) = 9.00$; $F_{1-0.05}(2, 2) = 19.00$; $F_{1-0.01}(2, 2) = 99.00$

2.1.4 结果分析 从表 2 及表 3 可以看出, 3 种因素的影响程度依次为 $B > A > C$ 。其中 B 因素的影响有非常显著性意义; A 因素的影响有显著性意义; C 因素的影响无显著性意义。相对而言, 由于 C 为不显著因素, 且 $\bar{K}_{c_2} - \bar{K}_{c_1} > \bar{K}_{c_3} - \bar{K}_{c_2}$, 说明煎煮 90min 与 120min 没有多大差别。从节约能源及工时考虑, 每次煎煮时间可控制在 90min 左右。最佳水提工艺条件应为 $A_3B_3C_2$ 。

2.2 醇沉工艺条件的优选

2.2.1 因素水平的确定 在水提工艺正交试验的基础上, 进一步优选醇沉工艺最佳条件。仍以总生物碱含量为检测指标, 选定醇沉前水提液浓缩程度(以相对密度表示)、醇沉浓度及在室温(20℃)下静置时间 3 个因素, 每个因素选择 3 个水平。因素水平见表 4。

表 4 因素水平表

因素	E	F	G	H
	相对密度	醇沉浓度(%)	静置时间(h)	
水平 1	1.05	50	24	
水平 2	1.10	60	48	
水平 3	1.15	70	72	

2.2.2 样品溶液的制备 取混合均匀之益母草, 每份称取 500g, 按上述水提工艺最佳条件煎煮提取, 得 9 份煎液, 然后按正交试验表所设条件浓缩, 醇沉, 静置。滤过, 滤液减压回收乙醇并浓缩至稠膏状, 加水稀释至 500ml, 冷藏 24h, 以下同 2.1.2 项下操作。

2.2.3 总生物碱含量的测定 按 2.1.3 项下方法操作测定, 9 份样品液中总生物碱含量测定结果及正交试验数据的直观分析见表 5, 方差分析见表 6。

2.2.4 结果分析 从表 5 和表 6 可知, 3 种因素的影响程度顺次为 $E > F > G$ 。其中因素 E 对试验结果有显著性影响; 因素 F 对试验结果有显著性影响; 因素 G 对试验结果无显著性影响。为节约能源及缩短生产周期, 最佳醇沉工艺条件为 $E_1F_3G_1$ 。

表5 正交试验设计及结果

试验号	因素				总生物碱含量 (mg/ml)
	E	F	G	H	
1	1	1	1	1	1.197
2	1	2	2	2	1.269
3	1	3	3	3	1.275
4	2	1	2	3	1.128
5	2	2	3	1	1.184
6	2	3	1	2	1.256
7	3	1	3	2	0.998
8	3	2	1	3	1.094
9	3	3	2	1	1.063
K_1	3.741	3.323	3.547	3.444	
K_2	3.568	3.547	3.460	3.523	$G = \sum_{i=1}^9 Y_i = 10.464$
K_3	3.155	3.594	3.457	3.497	$G^2 = (\sum Y_i)^2 = 109.459$
\bar{K}_1	1.247	1.108	1.182	1.148	$CT = G^2/N = 12.166$
\bar{K}_2	1.189	1.182	1.153	1.174	
\bar{K}_3	1.052	1.198	1.152	1.166	
R	0.195	0.09	0.03	0.026	

表6 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	P值
E	0.061	2	0.0305	38.13	< 0.01
F	0.014	2	0.0070	8.75	< 0.05
G	0.002	2			
H	0.001	2			
误差(G+H)	0.003	4	0.0008		

注: $F_{1-0.10}(2, 4) = 4.32$; $F_{1-0.05}(2, 4) = 6.94$; $F_{1-0.01}(2, 4) = 18.00$

2.3 优先工艺条件的重复性试验 为验证上述优选的水提醇沉工艺最佳条件的稳定性,称取相同重量的益母草3份,分别按最佳条件 $A_3B_3C_2E_1F_3G_1$ 操作,即药材加12倍量的水,煎煮提取3次,每次90min,合并煎液浓缩至相对密度为1.05的浸膏,加

95%乙醇至含醇量为70%,室温静置24h。平行操作,进行3次重复试验。结果见表7。

表7 重复试验结果表

样品	总生物碱含量(mg/ml)	$\bar{x} \pm s$ (mg/ml)	RSD(%)
1	1.258		
2	1.247	1.256 ± 0.0082	0.65
3	1.263		

3 小结与讨论

3.1 本实验通过正交试验法对益母草口服液的水提醇沉工艺分别进行了优选,以口服液中总生物碱含量作为评价指标,优选出最佳水提醇沉工艺条件为 $A_3B_3C_2E_1F_3G_1$ 。按最佳工艺条件进行重复性试验,结果总生物碱含量得率较高,口服液外观质量及稳定性亦很好,制剂质量符合2000年版中国药典的有关规定。

3.2 实验中雷氏盐沉淀完全与否,与反应介质的pH、沉淀温度及时间等因素有关。同时益母草中的生物碱含量受品种、生长环境、采收季节、储存时间、加工方法及入药部位等因素影响较大^[2,5],故应严格控制实验条件的一致,其结果方具可比性。另外,为提高制剂质量,生产时应对益母草原料质量加以控制。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2000.256.
- [2] 晁志,周秀佳.益母草类中药的研究概况和进展[J].中草药,1998,29(6):414.
- [3] 章崇义.益母草注射液的制备及质量控制[J].中成药研究,1984,(9):12.
- [4] 凌锡春.益母草浸膏片总生物碱含量测定[J].中成药研究,1983,(2):12.
- [5] 张飞联,赵任湘,吴爱娟,等.物候对益母草生长和总生物碱积累的影响[J].中草药,2000,31(5):371.