

金银花不同提取工艺及优选条件探讨

何德贵, 周芳勇, 李仕先, 马 静
(贵州长寿长乐医药研究所, 遵义 563000)

关键词: 金银花; 绿原酸; 均匀设计法

中图分类号: R283.6 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)01-0006-02

金银花为常用抗菌抗炎药, 是忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。绿原酸 (chlorogenic acid) 和异绿原酸 (isochlorogenic acid) 是金银花的抗菌有效成分^[1,2]。在中药制剂中金银花常采用水提法、水提醇沉法或醇提法等提取^[3~5]。为了综合评价各工艺的优劣以及提高金银花有效成分的利用率, 本文以金银花提取物中绿原酸为测定指标优选工艺, 并通过均匀设计法^[6]探讨了优选工艺的最佳条件。

1 仪器与试药

岛津 UV-3000 紫外分光光度仪 (日本); 金银花 (购自山东密县); 绿原酸标准品 (购于中国药品生物制品检定所); 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺

2.1.1 水煎煮法 样品 20g, 加水煎煮 3 次, 水量分别为药材量的 15 倍、10 倍、8 倍; 煎煮时间: 60min、40min、30min。合并滤液, 冷藏过夜, 离心 25min (3500r/min), 上清液浓缩至稠膏, 真空干燥, 浸膏粉碎, 过 60 目筛, 备用。

2.1.2 碱水冷浸法 样品 20g, 碎成粗粉, 用 20 倍碱水 (pH8~9) 浸泡 24h, 抽滤, 滤液浓缩, 干燥, 浸膏粉碎, 过 60 目筛, 备用。

2.1.3 碱水渗漉法 样品 20g, 碎成粗粉, 用 5 倍碱水 (pH8~9) 浸泡 30min, 再加入 15 倍碱水, 加盖浸渍 24h 后渗漉, 收尽滤液, 浓缩、干燥、浸膏粉碎, 过 60 目筛, 备用。

2.1.4 酸醇回流法 样品 20g, 碎成粗粉, 用 70% 乙醇 (pH3~4) 回流 2 次, 溶媒量: 8 倍、7 倍, 回流时间: 2h、1h。合并滤液, 浓缩、干燥, 浸膏粉碎, 过 60 目筛, 备用。

2.1.5 酸醇渗漉法 样品 20g, 碎成粗粉, 用 5 倍量 70% 乙醇 (pH3~4) 浸润 30min, 再加入 15 倍溶媒加盖浸渍 24h 后渗漉, 收尽滤液, 浓缩、干燥、浸膏粉碎后过 60 目筛, 备用。

2.1.6 酸醇冷浸法 样品 20g, 碎成粗粉, 用 20 倍乙醇 (pH3~4) 冷浸 24h, 滤液浓缩, 干燥, 浸膏粉碎后过 60 目筛, 备用。

2.1.7 稀醇回流法 方法同 2.1.4。溶媒: 70% 乙醇; 用量: 8 倍、7 倍; 回流时间: 2h、1h。所得浸膏粉碎后过 60 目筛, 备用。

2.1.8 稀醇渗漉法 方法同 2.1.5。溶媒: 70% 乙醇; 用量: 20 倍。所得浸膏粉碎后过 60 目筛, 备用。

2.1.9 稀醇冷浸法 方法同 2.1.6。溶媒: 70% 乙醇; 用量: 20 倍, 所得浸膏粉碎后过 60 目筛, 备用。

2.2 含量测定

2.2.1 绘制标准曲线 精密称取绿原酸标准品 3.0mg, 用甲醇溶解并定容于 100ml 容量瓶中, 吸取 1、2、4、5、8、10ml 分别置于 10ml 容量瓶中, 甲醇定容, 此为 3、6、12、15、24、30 μ g/ml 标准品溶液浓度系列。以甲醇作空白对照, 于 200~400nm 间扫描。结果: 绿原酸标准溶液在 $\lambda=324$ nm 处有最大吸收度。在此波长处测定各标准品溶液吸收度, 数据经处理得回归方程: $Y = 0.0463x + 0.0009$, $r = 0.9999$ 。

2.2.2 生药含量测定 生药 3.0g, 碎成粗粉, 甲醇回流提取 2 次。每次溶媒量 200ml, 回流 5h。合并滤液, 用甲醇定容于 500ml 容量瓶中。取出 10ml 离心 30min (4000r/min), 吸取上清液 0.5ml 三份, 用甲醇分别定容于 10ml 容量瓶中, 于 $\lambda=324$ nm 处测其绿原酸含量。重复试验三次。生药中绿原酸的含量: $\bar{x} = 7.12 \pm 0.07\%$, $RSD = 1.97\%$ 。

2.2.3 供试品含量测定 精密称取不同浸膏粉, 用甲醇溶解并分别定溶于 50ml 容量瓶中。各吸取

1.0ml 溶液于不同的 10ml 容量瓶中, 甲醇定容, 测量。结果见表 1、表 2。

表 1 金银花不同提取工艺实验结果($n = 4$)

提取工艺	出膏率 (%)	绿原酸提出率 X_i (%)				$\bar{x}$ (%)
		1	2	3	4	
水煎	43.58	4.92	5.11	5.04	5.08	5.0375
碱水冷浸	34.83	2.01	1.92	1.92	1.96	1.9525
碱水渗漉	34.67	0.64	0.68	0.50	0.58	0.6000
酸醇回流	33.17	6.00	5.47	5.96	5.73	5.7900
酸醇渗漉	35.67	5.15	5.11	4.78	4.96	4.9975
酸醇冷浸	33.75	3.86	3.96	3.94	3.92	3.9250
稀醇回流	35.17	5.58	5.32	5.24	5.42	5.3900
稀醇渗漉	33.50	3.63	3.84	3.71	3.78	3.7400
稀醇冷浸	31.33	3.97	4.22	3.55	3.87	3.9000

表 2 单因素方差分析表 $F_{0.005}(8, 27) = 3.69$

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	结论
组间	91.9955	8	11.4994	489.96	$F \gg F_{0.005}(8, 27)$
组内	0.6336	27	0.0235		差异极显著

由表 2 说明各工艺间有极显著性差异。其中, 选用绿原酸提出率最高的酸醇回流法为最佳工艺。

2.3 均匀设计法优选工艺条件 以酸醇回流法中影响绿原酸提出率的三大因素: 乙醇浓度(60%~80%) pH(1~6)、回流时间(0.5~2.5h) 作为考察对象, 将各因素的考察范围等分为 5 个水平。因素水平表见表 3。

表 3 均匀设计因素水平表

因素	水平素				
	1	2	3	4	5
乙醇浓度(%)	60	65	70	75	80
pH 值	1.5	2.5	3.5	4.5	5.5
回流时间(h)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5

按 $U_5(5^4)$ 表安排试验方案, 分别称样 20g, 溶媒量为原药材的 10 倍, 按前述酸醇回流法提取, 结果见表 4。实验结果经计算机多元统计处理, 得回归方程:

$$Y = 3.4066 + 0.0275X_1 - 0.0231X_2 - 0.1631X_3$$

$$r = 0.9863 \quad S = 0.2552 \quad F = 12.41$$

$F > F_{0.005}(8, 27) = 3.69$, 方程可信。分析回归方程, 选取最优条件: $X_1 = 80$, $X_2 = 1.5$, $X_3 = 0.5$, 代入上方程, 得预测值 $Y = 5.4904\%$ 。按最优条件进行试验, 将实测值 $Y = 5.3087\%$, 两数值接近, 说明所选最优条件合理。

3 结果与讨论

3.1 由表 1 可知 样品量相等, 酸醇回流法所得绿原酸提出率最高, 而且出膏率低, 说明此工艺提取物

纯度较高, 杂质少。

表 4 均匀设计实验方案及结果($n = 5$)

因素 试验号	乙醇浓度 (%)	pH 值	回流时间 (h)	提出率 $\bar{x}$ (%)
1	60	2.5	2.0	4.7473
2	65	4.5	1.5	4.9791
3	70	1.5	1.0	5.4219
4	75	3.5	0.5	5.3250
5	80	5.5	2.5	5.0499
优化条件	80	1.5	0.5	预测值 5.4904 实测值 5.3087

3.2 由回归方程得 乙醇浓度越大 pH 值越低、回流时间越短, 绿原酸提出率越大, 其中乙醇浓度对提出率影响最大。根据方程选择乙醇浓度 80%, pH1.5, 回流时间 0.5h 为最佳条件。

3.3 本实验优选酸醇回流工艺条件在实验中可行, 但作为工业生产, 不宜提倡。从结果表 5 中可看出: 降低乙醇酸度、回流时间相应延长, 所得绿原酸提出率与最优条件下试验结果接近。所以, 从工业生产角度可考虑相应减弱乙醇酸度、延长回流时间, 以减少绿原酸的损失, 从而合理可行地设计提取工艺。

3.4 均匀设计因素水平表中未考虑提取次数这一因素, 水平数均定为一次。由实验结果可知: 按酸醇回流法最优条件一次提取所得绿原酸含量达 5.3087%(预测值 $Y = 5.4904\%$), 占其生药含量的 73.8%, 已说明该工艺条件的优越性。为尽量将绿原酸提取完全, 可考虑按最佳工艺条件再提取一次, 所加溶媒量及回流时间应合理安排。

参考文献:

- [1] 丁济, 李志和, 龚秀珍. 14 种金银花中异绿原酸、绿原酸的测定比较[J]. 中草药, 1981, 12(1): 10~14.
- [2] 上海医药工艺研究院中药、分析室, 上海中药制药一厂. 金银花有效成分的初步研究[J]. 医药工业, 1975, (7): 24~27.
- [3] 林缎嫦, 宋劲诗, 吴应熊. 金银花中绿原酸提取工艺探讨[J]. 中成药, 1994, 16(7): 2~3.
- [4] 张文政. 金银花中绿原酸提取工艺的改进[J]. 中草药, 1982, 13(12): 14.
- [5] 阎东海. 提取三要素在金银花提取过程中对绿原酸提出率及稳定性的相关性研究[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 545~547.
- [6] 王鹏, 王玉珠, 沈建明. 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 沈阳药学院学报, 1989, 6(4): 297~306.