

# 单因素和正交试验结合优化当乌分散片中乌药的提取工艺

陈金玉, 尹蓉莉\*, 陈海亭, 李东芬, 王宝才, 梅汝槐  
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:探讨当乌分散片中的药材乌药的最佳提取工艺。方法:以乌药醚内酯质量分数为考察指标,选择提取方法、提取溶剂、提取次数,用单因素考察方法确定因素水平;再以乙醇体积分数、料液比、提取温度、提取时间为考察因素,以乌药醚内酯质量分数为指标,同时考虑收膏率,用正交试验方法对其最佳工艺进行优化。结果:最佳提取工艺:超声提取,90%乙醇,50℃的提取温度,提取2次,每次20min,每次6倍量的提取溶剂。结论:采用超声提取法具有提取快速,有效成分提取率高等优点,此工艺合理可行。

**[关键词]** 乌药;乌药醚内酯;单因素考察;正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0033-03

## Optimization of Extract Technology of Radix Linderae from Dangwu Dispersible Tablet by Single-factor Test and Orthogonal Experiment

CHEN Jin-yu, YIN Rong-li\*, CHEN Hai-ting, LI Dong-fen, WANG Bao-cai, MEI Ru-huai  
(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the optional extraction method of Radix Linderae from Dangwu Dispersible Tablet. **Method:** Extracting method, extraction solvent and extraction times were selected to determine the factors and levels by single-factor test method with the content of linderane as index. Then content of linderane was used as index to evaluate the technologies based on orthogonal design, considering ointment rate at the same time, in which 4 factors considered were the concentration of ethanol, solvent consumption, extraction temperature and extracting time. **Result:** The optimum extraction processes was ultrasonic extraction technique, 50℃, adding 6 times amount of 90% ethanol, extracting for two times with 20 min each time. **Conclusion:** The method has the advantage of speediness, higher extraction rate etc. This process is stable and reliable.

**[Key words]** Radix Linderae; linderane; single-factor test; orthogonal experiment

乌药系樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm 的干燥块根,味辛性温,气微香,入肺、脾、肾、膀胱经,辛香走窜,顺气止痛<sup>[1]</sup>。《内经》有“百病皆生于气也”的概论,事实是气为诸病之首,乌药功擅走气顺气,气行则诸疾向愈。目前,已知乌药中

化学成分主要为挥发油、异喹啉生物碱及呋喃倍半萜及其内酯3大类,其内酯类成分为其指标性成分。现代药理学研究表明乌药具有广泛的药理活性:包括抗菌、抗病毒作用;对消化系统的影响;对心血管系统的作用;促进血凝作用;抗凝血酶作用等<sup>[2-3]</sup>。关于乌药提取方法的报道还很少,故本实验以乌药醚内酯为指标,结合单因素和正交试验法对乌药的提取工艺做优化,能为当乌分散片的制备奠定基础,也为乌药的进一步开发提供参考。

### 1 仪器和试剂

LC-20AT, SPD-20A 高效液相色谱仪(岛津); FZ102 微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业仪器有

**[收稿日期]** 20101030(001)

**[第一作者]** 陈金玉,硕士研究生,研究方向为中药新制剂研究, Tel:13730611564, E-mail:c\_j\_y\_234@163.com

**[通讯作者]** \*尹蓉莉,教授,博导,从事中药新制剂,新剂型,新技术研究, Tel:028-88000762. E-mail:yinronglili@163.com

限公司)。

乌药购于成都市新荷花中药材市场,经生药实验室卢先明教授鉴定符合 2010 年版《中国药典》相关规定;乌药醚内酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111568-200603,供含量测定用);高效液相用乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 乌药醚内酯含量测定

**2.1.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱为 Diakmonsil- $C_{18}$  柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈-水(50:50);柱温 35  $^{\circ}$ C,检测波长 235 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。理论板数按乌药醚内酯峰计算应不低于 2 000。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取乌药醚内酯对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 10 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取本品粉末 20 g(过 20 目筛),按下述提取方法提取。提取液减压回收乙醇定容至 250 mL 量瓶中。精密吸取 12.5 mL,挥干溶剂,残渣用甲醇分次溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.4 线性范围的考察** 精密量取乌药醚内酯对照品溶液 1,4,8,12,16,20,24  $\mu$ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,测定其峰面积,并以峰面积值( $Y$ )对进样量( $X$ )进行回归,得回归方程  $Y = 10^6 X - 0.3683$ ,  $R^2 = 1$ ,表明乌药醚内酯在 0.035 ~ 0.959 呈良好的线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取同一对照品 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪,连续进样 6 次,测得乌药醚内酯峰面积的相对标准差为 0.29%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取同一对照品溶液和供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12,24 h 连续进样 3 次,各 20  $\mu$ L,测乌药醚内酯峰面积。结果表明 RSD 分别为 0.31%,0.8%,表明对照品溶液和供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.1.7 重复性试验** 按拟定的含量测定方法,对同一批号药材,同时制备 6 份样品供试品溶液,精密吸取 20  $\mu$ L 注入液相色谱仪,计算乌药醚内酯质量分数,RSD 1.24%。表明该方法重复性良好。

**2.1.8 加样回收率实验** 取已知含量的供试品 6 份,分别精密加入一定量的乌药醚内酯对照品,照上述拟定的供试品制备方法制备加样回收供试品溶液,精密吸取 20  $\mu$ L 注入色谱仪中,测定峰面积,计算回收率。结果表明 6 次加样回收率均在 95% ~ 105%,其平均值 99.29%,RSD 1.59%,表明该方法可靠性良好。

**2.1.9 测定法** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20  $\mu$ L,注入液相色谱仪,测定,即得。对照品和供试品的 HPLC 图见图 1。

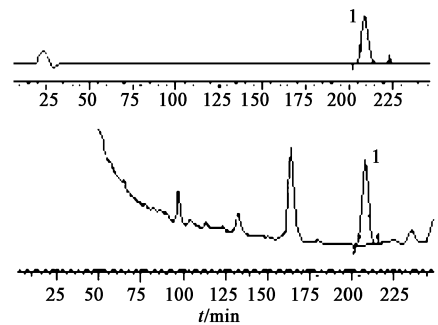


图 1 乌药 HPLC

A. 对照品; B. 乌药药材; 1. 乌药醚内酯

## 2.2 试验结果

**2.2.1 提取方法考察** 选择 70% 乙醇为提取溶媒,提取 2 次,第 1 次 10 倍量溶剂,第 2 次 8 倍量溶剂,用 2.1.3 和 2.1.9 的方法制备供试品溶液并进样,比较超声法(110 kHz,30  $^{\circ}$ C,0.5 h/次);渗漉法(浸泡 24 h,流速 2 mL·min<sup>-1</sup>,直至无色);回流法(1.5 h/次)的提取效果,乌药醚内酯质量分数分别为 0.070 6%,0.059 6%,0.047 2%。乌药以超声提取为佳。

**2.2.2 提取溶剂初步考察** 取乌药粉末 20 g,共 3 份,分别以纯水,50% 乙醇,90% 乙醇,按 2.2.1 所述超声提取方法提取 2 次,测定乌药醚内酯质量分数,结果分别为 0.019 1%,0.066 7%,0.116 2%,乙醇提取时,含量升高明显。故确定后面的正交试验为醇提,乙醇体积分数范围为 50%,70%,90%。

**2.2.3 提取次数考察** 取乌药粉末 20 g,共 3 份,分别以 2.2.1 的超声方法:18 倍 90% 乙醇提取 1 次,10 + 8 倍 90% 乙醇提取 2 次,6 + 6 + 6 倍 90% 乙醇提取 3 次,测定乌药醚内酯质量分数,分别为 0.0923%,0.1154%,0.1108%。由前述数据可知,用超声法提取 2 次,乌药醚内酯质量分数最高,故确定提取次数为 2 次。

**2.2.4 正交实验优选乌药的醇提工艺** 根据相关文献报道及前面的实验结果,以乌药醚内酯质量分数为考察指标,采用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验,考察乙醇体积分数,料液比,提取温度,提取时间 4 个因素,提取次数各 2 次。因素水平表和试验结果分别见表 1~2,方差分析见表 3。

表 1 乌药醇提工艺因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 提取温度/℃	D 提取时间/min
1	50	1:6	30	20
2	70	1:8	50	30
3	90	1:10	70	40

表 2 乌药醇提工艺正交试验设计及结果

次数	A	B	C	D	乌药醚内酯提出率/%	收膏率/%
1	1	1	1	1	0.052 3	8.5
2	1	2	2	2	0.070 4	9.6
3	1	3	3	3	0.068 8	10.2
4	2	1	2	3	0.078 5	7.9
5	2	2	3	1	0.075 3	8.1
6	2	3	1	2	0.070 2	7.6
7	3	1	3	2	0.095 2	7.4
8	3	2	1	3	0.096 9	7.2
9	3	3	2	1	0.119 1	7.6
$K_1$	0.192	0.226	0.219	0.247		
$K_2$	0.224	0.243	0.268	0.236		
$K_3$	0.311	0.258	0.239	0.244		
R	0.120	0.032	0.049	0.011		

注: $K_1, K_2, K_3, R$  仅针对乌药醚内酯质量分数进行分析

表 3 乌药醚内酯提出率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.002 55	2	0.001 28	117.514 5	<0.01
B	0.000 17	2	0.000 09	7.904 2	
C	0.000 40	2	0.000 20	18.309 3	
D(误差)	0.000 02	2	0.000 01	1.000 0	

对乌药醚内酯的提取总量(以原药材计)进行分析,结果见表 2,3,可知影响乌药醚内酯质量分数的各因素主次顺序为  $A > C > B > D$ , B, D 的影响无显著性, A 的影响具有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), C 有一定影响 ( $P < 0.1$ ), 故确定最佳提取方案为  $A_3B_1C_2D_1$ 。

在乌药醚内酯质量分数相同的情况下,收膏率越低越好,对收膏率进行直观分析得最佳结果为  $A_3C_1B_1D_1$ , 经方差分析可知,仅 A 因素对实验结果有显著影响 ( $P < 0.05$ )。故综合考虑最终仍以  $A_3B_1C_2D_1$  为最佳,即 90% 乙醇,6 倍量的提取溶剂,50℃ 的提取温度,提取 2 次,每次提取时间为 20 min 为最佳。

**2.2.5 验证试验** 以上述正交试验结果最优组合做 3 次验证试验,结果如表 4,各项指标的 RSD 均 < 2%,乌药醚内酯质量分数较高,而干膏率较低,表明正交试验所筛选的工艺稳定可行。

表 4 正交试验验证结果

No	乌药醚内酯质量分数/%	干膏率/%
1	0.120 0	7.2
2	0.119 4	7.4
3	0.117 1	7.2

### 3 结论和讨论

考察超声提取、回流提取、渗漉提取对指标成分含量的影响,因超声提取方法提取率较高,方法简便,最终采用该法。这与超声提取能产生并传递强大的能量的空化作用,并能产生许多次级作用,如机械运动、乳化、扩散、击碎、化学效应等有关。曾有文献报道乌药干浸膏超声提取 50 min,其指标成分含量不再变化,这与本课题的 20 min 提取 2 次基本符合<sup>[4]</sup>。

乌药中的呋喃倍半萜及其内酯类成分是乌药的特征性成分,具有较强的专属性,也具有一定的活性<sup>[5]</sup>。故本试验采用乌药醚内酯做为乌药提取时指标控制具有重要意义。该法简单、稳定、可靠,可作为乌药提取时的参考标准。

乌药指标成分的 HPLC 测定按药典方法分离度不够,故通过调节流动相的比例,使出峰时间延迟,最后达到了较好的分离度。

《中国药典》2010 年版关于乌药的质量控制还增加了“去甲异波尔定”成分<sup>[1]</sup>,为了更合理的控制提取工艺,在后面的试验中需要进一步对该指标成分也作一定的考察。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:71.
- [2] 王军伟,阮冰.乌药的植化及药理研究概况[J].浙江中医杂志,2006,41(11):675.
- [3] 剑桂新,王峥涛,徐璐珊,等.乌药的化学成分及药理作用[J].中国野生植物资源,1999,18(3):5.
- [4] 田伟,蔡其辉,张光贤,等.乌药干浸膏质量标准研究[J].中南药学,2008,6(5):568.
- [5] 陈敏珠.药理学进展(抗炎免疫药理分册)[M].北京:人民卫生出版社,1982:176.

[责任编辑 全燕]