

正交试验优选橘红贴膏的乙醇渗漉提取工艺

汪兰芳, 方优妮, 韩建伟*, 缪刘萍

(湖北中医药大学中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 武汉 430061)

[摘要] 目的: 优选橘红贴膏的乙醇渗漉提取工艺条件。方法: 以化橘红中柚皮苷提取量为考察指标, 采用高效液相色谱法测定其含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行优选。结果: 优选工艺为: 15 倍量 80% 乙醇, 浸润 24 h, 渗漉速度 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。3 批验证试验化橘红中柚皮苷平均转移率为 79.0%。结论: 优选的提取工艺合理, 转移率较高。

[关键词] 正交试验; 渗漉提取工艺; 化橘红; 柚皮苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0038-03

Study on Optimum Technology of Ethanol Percolation Extraction for Citri Grandis Exocarpium Plaster by Orthogonal Test

WANG Lan-fang, FANG You-ni, HAN Jian-wei*, MIAO Liu-ping

(Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription Ministry of Education, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technical conditions of ethanol percolation extraction for Citri Grandis Exocarpium Plaster. **Method:** The content of naringin extracted from Citri Grandis Exocarpium, which was regarded as the marker of detection, was determined by high performance liquid chromatography and was used to optimize the extraction processing conditions by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** The optimum extraction condition was that the concentration of ethanol was 80%, the volume of solvent was 15 times of medicinal materials, the soaking time was 24 hours and the percolating speed was $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. The average transferring rate of naringin in 3 batches of samples was 79.0%. **Conclusion:** The optimum extraction process is reasonable and the transferring rate of naringin is higher.

[Key words] orthogonal test; percolation extraction process; Citri Grandis Exocarpium; naringin; high performance liquid chromatography

[收稿日期] 20101108(010)

[第一作者] 汪兰芳, 在读硕士, 新药开发与研究, E-mail: lanfangwang@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 韩建伟, 副研究员, Tel: 027-68889065

3 讨论

中药炮制和制药、临床应用关系密切, 大部分药材需经过炮制才能用于临床和制剂的生产。2010 年版《中国药典》基本上所有药材都有饮片方面的信息, 但是其中黄芩的炮制工艺没有具体的炮制工艺因素说明, 只是注明采用蒸制法对其进行炮制加工, 并未说明其具体的蒸制影响因素, 所以使黄芩加工炮制没有一定的标准, 致使黄芩饮片质量差异很大。黄芩蒸制, 主要的目的在于杀酶保苷, 提高黄芩苷含量, 使临床应用, 工业生产更科学合理。

采用正交试验设计法对黄芩炮制工艺进行优化筛选, 确定沸水投药 200°C 蒸制 50min 炮制工艺简便, 科学, 符合生产要求。

[参考文献]

- [1] 刘雄, 高建德. 黄芩研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2007, 24(2): 46.
- [2] 孙华芳, 李洁. 正交试验法优选南五味子的炮制工艺[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(5): 369.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010: 282.

[责任编辑 全燕]

橘红贴膏是我院在研的一种外用膏贴制剂,由化橘红、女贞子当归等5味中药组成,化橘红是方中的君药。为了优选其乙醇提取工艺,我们以化橘红药材中柚皮苷的提取量作为考察指标,利用 $L_9(3^4)$ 正交试验对橘红贴膏处方药材的乙醇渗漉提取工艺进行了优选。有关实验研究报道如下。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国);柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110722-200610);化橘红饮片(购于武汉龙泰药业有限责任公司),其他所用试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 提取工艺正交设计 根据文献资料及预试验结果,选择乙醇体积分数、溶剂用量、浸润时间、渗漉速度4个影响因素,每个因素设3个水平,正交试验设计见表1。

表 1 乙醇渗漉提取工艺因素水平

No	A 乙醇体积 分数/%	B 溶剂 用量/倍	C 浸润 时间/h	D 渗漉速度 /mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹
1	50	10	12	3
2	65	15	24	4
3	80	20	36	5

2.2 柚皮苷的含量测定

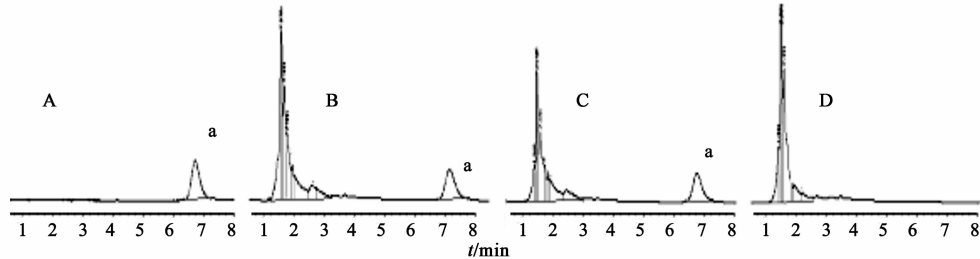


图 1 橘红贴膏乙醇提取液 HPLC

A. 对照品;B. 化橘红药材;C. 供试品;D. 缺化橘红阴性对照;a. 柚皮苷

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液1, 2,4,6,8,10 μL ,进样检测,以进样量为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y=1\,714.4X-38$, $r=0.999\,8$ 。结果表明柚皮苷在0.066~0.66 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 吸取对照品溶液5 μL ,连续进样6次,计算,RSD 0.74%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,每间隔一段时间进样10 μL 测定,时间为0,4,8,12,24,48 h,计算 RSD 1.25%,结果表明,供试品溶液在48 h内保

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(40:60),流速1.0 mL·min⁻¹,波长283 nm,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液制备 称取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成66 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.2.2 供试品溶液制备 吸取正交试验9份提取液适量,加50%乙醇稀释至10 mL量瓶.,即得。

2.2.2.3 化橘红阴性对照溶液制备 称取不含化橘红的其余饮片,80%乙醇浸泡24 h,加15倍量80%乙醇以5 mL·min⁻¹·kg⁻¹渗漉提取。取提取液按供试品制法制备,即得。

2.2.2.4 化橘红药材对照溶液制备^[1] 称取化橘红粉末(过二号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,水浴加热回流1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5 mL,至50 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3 方法专属性考察 吸取对照品溶液5 μL 、供试品、化橘红阴性对照溶液、化橘红药材对照溶液各10 μL 进样,检测,柚皮苷对照品、供试品、药材对照溶液均在13 min左右出现柚皮苷吸收峰,化橘红阴性对照无干扰,结果见图1。

持稳定。

2.7 重复性试验 吸取正交试验2号提取液,共6份,分别制成供试品溶液,进样测定柚皮苷含量,计算平均质量分数为2.32%,RSD 1.58%。

2.8 回收率试验 取已知含量的正交试验2号样品,精密量取6份,每份5 mL,分别加入相当于含柚皮苷对照品335.8 μg ,加50%乙醇稀释至10 mL量瓶,制成加样回收样品,检测,计算回收率分别为101.82%,99.26%,102.38%,101.61%,103.10%,101.70%,平均回收率101.65%,RSD 1.27%。

2.9 含量测定及正交试验结果 按处方比例称取化橘红等饮片各 18 g,共 9 份,过 60 目筛,按正交试验设计进行提取,收集提取液,取适量提取液稀释后制成供试品,进样 10 μ L,测定柚皮苷含量,计算正交试验结果,见表 2,3。

表 2 乙醇渗滤提取工艺结果

No.	A	B	C	D	柚皮苷提取量/%
1	1	1	1	1	1.84
2	1	2	2	2	2.37
3	1	3	3	3	2.17
4	2	1	2	3	2.34
5	2	2	3	1	2.60
6	2	3	1	2	2.25
7	3	1	3	2	2.29
8	3	2	1	3	2.54
9	3	3	2	1	2.54
K_1	2.127	2.157	2.210	2.327	
K_2	2.397	2.503	2.417	2.303	
K_3	2.457	2.320	2.353	2.350	
R	0.330	0.346	0.207	0.047	

注:柚皮苷提取量指投料的化橘红药材质量的百分比。

表 3 柚皮苷提出量方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	0.185	2	61.667	<0.05
B	0.180	2	60.000	<0.05
C	0.067	2	22.333	<0.05
D(误差)	0.003	2	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2)=19$

从表 2 直观分析可知,因素的影响大小顺序为 $B>A>C>D$,影响柚皮苷提取率的主要因素为溶剂用量,其次为乙醇体积分数和浸润时间,以 D 因素为误差项,进行方差估算,结果溶剂用量、乙醇体积分数和浸润时间对化橘红中柚皮苷的提取率均有显著性影响。综合考虑,优选提取工艺为 $A_3B_2C_2D_3$,即

用 80% 乙醇浸润药材 24 h,以 15 倍量,渗漉速度 5 mL $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ kg $^{-1}$ 提取。

2.10 优选提取工艺的验证和重复试验 称取化橘红等药材各 18 g,共 3 份。按优选工艺进行提取,测得化橘红药材中柚皮苷提取量分别 2.62%、2.63%、2.64%,平均提取量 2.63%,化橘红药材中柚皮苷质量分数为 3.33% (以干燥品计),计算柚皮苷转移率为 79.0%。重复上述正交试验,结果基本一致。

3 小结

《中国药典》2010 年版中 HPLC 测定化橘红中柚皮苷含量所使用的流动相为甲醇-乙酸-水(35:4:61),但在试验中发现流动相中不加乙酸,也能得到较好的色谱峰,因此选择以甲醇-水(40:60)作为流动相,可以减少对色谱柱的损伤。

含量测定中发现 65% 乙醇以及 80% 乙醇所得供试品图谱中柚皮苷峰有前沿峰,尤其 80% 乙醇较明显,经反复试验,改用 50% 乙醇稀释制备化橘红供试品溶液,供试品图谱中柚皮苷吸收峰对称性良好。推测可能原因是 65%、80% 乙醇作溶剂与流动相极性相差较大所致。

曾做过化橘红贴膏处方药材的乙醇回流提取工艺 $L_9(3^4)$ 正交试验,优选工艺结果为 6 倍量 65% 的乙醇,回流提取 3 次,每次 1 h。两者比较,渗漉提取工艺中柚皮苷平均提取量 2.63%,较乙醇回流提取柚皮苷平均提取量 2.15% 高约 22%。回流提取平均浸膏得率为 35.42%,渗漉提取平均浸膏得率为 38.94%。渗漉提取工艺柚皮苷转移率为 79.0%,回流提取工艺柚皮苷转移率为 64.4%。推测可能原因是乙醇回流提取时加热温度较高,造成有效成分损失。试验证明:优选的乙醇渗漉提取工艺合理,君药化橘红中柚皮苷成分转移率高。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S]. 2010:69.

[责任编辑 全燕]