

3 讨论

蚕沙叶绿素提取方法包括传统的有机溶剂萃取-索式法、碱液法及新近发展的超临界 CO₂ 流体萃取法、超声或微波辅助提取法。提取的一般工艺流程为蚕沙除杂-软化-萃取-过滤-浓缩-提取-合成叶绿素衍生物^[10]。国内学者王章阳、潘慧娟等对提取工艺进行研究发现蚕沙软化用水量、提取溶剂丙酮含量对提取蚕沙中叶绿素及其制备脱镁叶绿酸有较大影响^[9,11]。溶剂浸取叶绿素的过程是溶剂将蚕沙中叶绿素溶解出来的过程,为保证溶剂能顺利进到蚕沙内部,需要先将蚕沙用水软化,软化好的蚕沙用手轻捏就散,但挤不出水来。本研究首先探讨了蚕沙软化时间对叶绿素提取率的影响。随着软化时间延长,蚕沙的含水量逐渐提高,叶绿素的提取率也随之增加。用本试验中最佳软化条件,即软化 2 h 的蚕沙(含水量在 26%左右),进行叶绿素提取,考察提取溶剂丙酮含量对提取叶绿素的影响,当丙酮:乙醇=1:1 时,叶绿素提取率提高到 1.43%,比近年来报道的超声或微波辅助等方法进一步提高^[12-13]。

在制备脱镁叶绿酸的过程中,卟啉环中心的 Mg²⁺在强酸性条件下被 H⁺从叶绿素分子中取代而游离在水溶液中,EDTA 是良好的 Mg²⁺络合剂,用铬黑 T 作终点指示剂,配位滴定方法测定取代的 Mg²⁺量可间接反映脱镁叶绿酸的产率。本研究中发现随着浓盐酸脱镁时间的延长,脱镁叶绿酸产率逐渐增加,故可通过适当延长脱镁时间提高脱镁叶绿酸的产量。

REFERENCES

[1] LIM D S, KO S H, LEE W Y. Silkworm-pheophorbide alpha

- mediated photodynamic therapy against B16F10 pigmented melanoma [J]. J Photochem Photobiol B, 2004, 74(1): 1-6.
- [2] NAOKI A, ROBERT J N, RUSSELL J M, et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2000, 11(8): 1645-1680.
- [3] ZHENG G D, OU Y W, YAN M, et al. Advanced research on the pharmacology of chlorophyll and its derivatives [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2006, 4(2): 146-148.
- [4] KAMAT J P, BOLOOR K K, DEVASAGAYAM T P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1487(2/3): 113-127.
- [5] Bloor K K, Kamat J P, Devasagayam T P. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization [J]. Toxicology, 2000, 155(1-3): 63-71.
- [6] XU X Q. Research on pigment extracted from the byproduct of silkworm and applied to dye silk fabrics [D]. Soochow: Soochow University, 2007.
- [7] SUN B, LI Y, WU H L, et al. Progress in study of extracting process of silkworm excrement [J]. China Sericulture(中国蚕业), 2009, 31(4): 18-21.
- [8] ARNON D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in Beta vulgaris [J]. Plant Physiol, 1949, 24(1): 1-15.
- [9] WANG ZH Y, ZHOU Y. Study on the preparation technic of pheophorbide from silkworm excrement [J]. J China Pharm(中国药房), 2001, 12(3): 148-149.
- [10] ZHANG J H, SHENG M G, CHU D B. Analysis on exploitation and multipurpose use of silkworm excrement resource [J]. Resource Develop Market(资源开发与市场), 2007, 23(10): 924-926.
- [11] PANG H. Effects of different solvent on extraction of chlorophyll from silkworm excrement [J]. J Hangzhou Teachers Coll(Nat Sci Ed)(杭州师范学院学报:自然科学版), 2006, 5(1): 50-52.
- [12] WANG K, HAI H, JIN W Y, et al. Study on microwave-assisted extraction of chlorophyll from silkworm feces [J]. Food Science(食品科学), 2009, 30(6): 76-79.
- [13] LIU T B, PENG Y F. Extracting chlorophyll from silkworm litter assisted with ultrasonic [J]. Sci Sericulture(蚕业科学), 2007, 33(4): 698-700.

收稿日期: 2011-12-27

暑热宁合剂水提醇沉工艺研究

阎雪梅, 李凤丽, 宋洁瑾(天津中医药大学第一附属医院制剂室, 天津 300193)

摘要: 目的 筛选暑热宁合剂水提醇沉最佳工艺条件。方法 采用高效液相色谱法测定水煎液和醇沉液中葛根素的含量;以葛根素提取率和干膏率为评价指标,采用正交试验法考察加水量、煎煮时间、提取次数等因素对水提工艺的影响;同时考察醇沉浓度对醇沉工艺的影响。结果 最佳水提工艺条件为加入 10 倍水,煎煮 3 次,每次 1.5 h;最佳醇沉工艺条件为加入乙醇使含醇量达 65%。结论 优选的方法可为暑热宁合剂提取醇沉工艺提供实验依据。

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项项目(2010ZX09102-201)

作者简介:阎雪梅,女,硕士,副主任药师 Tel: 13512236965 E-mail: ljyxm@126.com

关键词: 正交设计; 水提醇沉工艺; 暑热宁合剂; 葛根素

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)08-0702-03

Study on the Process of Extraction for Shurenine Oral Liquid

YAN Xuemei, LI Fengli, SONG Jiejing(The First Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction and purification process of Shurenine oral liquid by orthogonal design. **METHODS** The content of puerarin of Shurenine oral liquid in water decoction and alcohol deposit fluid were detected by HPLC. The content of puerarin and dry extract rate were used as index; the effects of water volume, boiling time, extraction times and alcohol concentration on process of precipitation were also evaluated by orthogonal design. **RESULTS** The optimum water extraction process was as follows: water as extracting solvent, three times of extracting, 1.5 h for each time, 10 times volume of solvent to the decoction pides; the optimal alcohol concentration for precipitation process was 65%. **CONCLUSION** The experimental results provide the basis for the process of extraction for Shurenine oral liquid.

KEY WORDS: orthogonal design; the water-extraction and alcohol precipitation process; Shurenine oral liquid; puerarin

暑热宁合剂是笔者所在医院儿科主任总结多年临床经验研制而成的医院制剂, 临床上用于治疗儿童急性上呼吸道感染暑湿兼寒证。由于该药临床疗效好, 笔者欲将其开发成新药, 故对其工艺进行研究。该方由葛根、豆豉等药味组成。根据药材成分、药理作用、中药用药习惯和临床疗效。本试验采用水提醇沉工艺提取, 并以干膏收得率及葛根素含量为评价指标, 采用正交试验对暑热宁合剂的水提醇沉工艺进行考察, 优选出最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪: 600E 泵, 2998 二极管阵列检测器, Waters In-Line 脱气机, Water Empor 色谱工作站(美国 Waters 公司); TCQ-250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂); A1104 型分析天平(上海分析仪器厂)。

色谱柱: XTerra C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 葛根素(中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110752-200912); 暑热宁合剂(天津中医药大学第一附属医院制剂室生产); 所用药材均购自天津中药饮片厂, 经天津中医药大学第一附属医院制剂室陈涛主任药师鉴定; 乙腈为色谱纯, 其它所用试剂均为分析纯。水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 水提工艺^[1]

根据提取时间及加水量的单因素考察结果, 暑热宁合剂的水提工艺选用 L₉(3⁴)正交表, 以干膏率和葛根素的含量为考察指标, 因素水平见表 1。

表 1 水提取工艺因素水平表

Tab 1 Factors-levels for water-extraction

水平	因 素		
	A(加水量)/倍	B(煮提时间)/h	C(煮提次数)/次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

2.2 醇沉工艺试验

根据对醇沉前药液浓度及醇沉时间的考察结果, 笔者只对醇沉浓度进行了筛选。取处方中药材 6 倍量按优选工艺提取, 浓缩至一定体积, 放凉, 分成 6 份, 其中 1 份按“2.3.2”项下方法提取测定葛根素含量。另外 5 份加 95%乙醇, 使其含醇量分别达到 60%, 65%, 70%, 75%, 80%静置过夜, 分别取滤液按“2.3”项下方法测定葛根素含量及干膏率。

2.3 干膏收率及葛根素含量测定

2.3.1 干膏收率 取处方量的药材按表 2 的试验方案进行提取, 9 份, 分别浓缩至 445 mL。精密吸取上述浓缩液 20 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 再水浴蒸干后, 于 105℃干燥 3 h, 移至干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定重量, 以浸出物与原生药量之比作为干膏收率。

2.3.2 葛根素含量测定^[2-3]

2.3.2.1 色谱条件 XTerra C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.4%磷酸溶液(10:90)为流动相; 检测波长为 250 nm。理论板数按葛根素峰计算应不低于 3 000。

2.3.2.2 供试液的制备 取处方量的药材按表 2 的试验方案进行提取, 分别浓缩至 445 mL。精密量取水提液 10 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 作为供试品溶液。按“2.3.2.1”项下色谱条件方法进行测定。

2.3.2.3 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品 5.6 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇制成 $56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.4 结果

2.4.1 水提工艺结果 选用 $L_9(3)^4$ 正交表安排试验, 以干膏率和葛根素含量以 2:8 加权, 分析结果见表 2 和表 3, 比较表中的 R 值, 各因素的主次顺序为 C>A>B, 相应地选出各因素水平为 C3A2B2, 确定最佳工艺为加 10 倍水煎煮 3 次, 每次 1.5 h。

2.4.2 醇沉工艺结果 根据实验结果, 最终选择 65%醇沉作为最佳醇沉工艺。结果见表 4。

表 2 水提工艺试验方案及结果

Tab 2 Orthogonal test of water-extraction

因素	A	B	C	D (空白)	实验结果 (干膏率)/ %	实验结果 (葛根素)/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	综合 评分
实验 1	1	1	1	1	16.21	0.323	2.908
实验 2	1	2	2	2	23.56	0.691	5.992
实验 3	1	3	3	3	24.80	0.754	6.528
实验 4	2	1	2	3	22.53	0.748	6.436
实验 5	2	2	3	1	25.32	0.921	7.874
实验 6	2	3	1	2	18.42	0.456	4.016
实验 7	3	1	3	2	23.22	0.688	5.968
实验 8	3	2	1	3	17.76	0.443	3.899
实验 9	3	3	2	1	25.04	0.816	7.029
均值 1	5.145	5.104	3.608	5.937			
均值 2	6.109	5.924	6.488	5.328			
均值 3	5.632	5.858	6.790	5.621			
极差	0.964	0.820	3.182	0.609			

表 3 水提工艺方差分析

Tab 3 Variance analysis of water-extraction

因素	偏差 平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
加水量	1.393	2	2.501	19	
煮提时间	1.245	2	2.235	19	
煮提次数	18.515	2	33.241	19	$P<0.05$
误差	0.56	2			

注: $F_{0.05}(2,2)=19$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19$

表 4 醇沉条件选择($n=3$)

Tab 4 Optimization of alcohol-precipitation($n=3$)

醇沉浓度	干膏率/%	葛根素含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	转移率/%
原液	21.6	0.89	82.51
60%	14.6	0.725	70.55
65%	14.5	0.810	75.09
70%	14.6	0.781	72.41
75%	13.2	0.70	64.90
80%	12.0	0.71	65.82

3 讨论

处方中的葛根素为主要有效成分, 故以葛根素的含量为指标通过正交试验优选最佳提取工艺。在水提取工艺筛选中, 分别对加水量和提取时间进行单因素考察, 结果表明 6, 8, 10, 12, 15 倍加水量时, 葛根素含量分别为 0.407, 0.455, 0.625, 0.637, 0.642 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 提取时间是 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h 时, 葛根素含量分别为 0.498, 0.621, 0.621, 0.640, 0.642 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 因此得出加水量为 10 倍和提取时间为 1.5 h 分别拐点, 故以加水量 8, 10, 12 倍和煎煮时间 1, 1.5, 2 h 作为遴选水平。笔者根据葛根素含量和干膏率在工艺中提取中的重要程度, 确定相应的权重系数, 对每个实验进行综合评分。这样, 多指标分析就化为以实验得分为指标的单指标分析了。本正交表中取干膏的权重系数为 2, 葛根素权重系数为 8。

在醇沉条件优选中, 根据实践经验和单因素考察, 浓缩液在 1:1 比例时和醇沉 24 h 效果最好, 所以只考察了醇沉浓度的影响。根据实验结果, 联系生产, 选择 65%做为最佳醇沉浓度。

最佳工艺验证, 按水提醇沉优选工艺进行了 3 次验证实验, 干膏率分别为 14.5%, 14.6%, 14.5%, 葛根素含量分别为 0.82, 0.80, 0.80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

REFERENCES

- [1] XI C. Optimization of extraction process for Gegen Qingchang granules with orthogonal design [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药杂志), 2010, 19(14): 47-51.
- [2] ZHANG H G, WU X M, SUN Z R. Determination of purarin in the Gengmaitong granule by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2011, 31(19): 1654-1655.
- [3] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 312-313.

收稿日期: 2012-12-19