

逆向连续循环低温提取金莲花口服液工艺研究

任桂玲^{1,2}, 李沈明^{2*}, 郭艳玲², 董晓强²

1. 承德医学院, 河北 承德 067000

2. 颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000

摘要: **目的** 探讨金莲花口服液提取工艺。**方法** 采用 HPLC 法测定金莲花口服液提取液中的荭草苷和牡荆苷, 以二者提取质量浓度为考察指标, $L_{18}(3^7)$ 正交试验法逆向连续循环低温提取金莲花, 确定最佳提取工艺, 并与现行金莲花口服液制备标准中的提取工艺比较。**结果** 逆向连续循环低温提取最佳提取工艺条件: 提取温度 90 °C, 提取时间 2 h, 药材粒径 10 目, 加水倍数 20 倍。荭草苷的线性范围 18.46~295.37 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), 牡荆苷的线性范围 5.84~93.44 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), 荭草苷平均回收率为 96.07%, RSD 为 0.74% ($n=6$), 牡荆苷平均回收率 97.73%, RSD 为 1.42% ($n=6$)。**结论** 逆向连续循环低温提取方法稳定可行, 提取率高; 测定方法准确、灵敏、简便、稳定性和重复性良好, 该提取工艺和测定方法可作为金莲花口服液生产工艺及质量控制的参考。

关键词: 金莲花口服液; 逆向连续循环低温提取; 正交试验; 荭草苷; 牡荆苷

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)14-2022-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.14.012

Research on reverse continuous cycle cryogenic extraction process of *Trollii Flos* Oral Liquid

REN Gui-ling^{1,2}, LI Shen-ming², GUO Yan-ling², DONG Xiao-qiang²

1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China

Abstract: Objective To explore the extraction process of *Trollii Flos* Oral Liquid (TFOL). **Methods** HPLC was used to determine orientin and vitexin in liquid extract of TFOL, using mass concentration of both as index. The orthogonal design $L_{18}(3^7)$ and reverse continuous cycle cryogenic extraction were used to extract *Trollii Flos*, the optimum extraction was determined, compared with the current standard of TFOL extraction process. **Results** The optimum extraction conditions of reverse continuous cycle cryogenic extraction were as follows: extraction temperature 90 °C, extraction time 2 h, powder type 10 mesh, added of 20 times water. The linear ranges of orientin and vitexin were 18.46—295.37 ($r=0.999\ 9$) and 5.84—93.44 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999\ 9$), the average recoveries of orientin and vitexin were 96.07%, RSD = 0.74% ($n=6$), and 97.73%, RSD = 1.42% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The technology of reverse continuous cycle cryogenic extraction is stable and feasible, and the extraction rate is high; The measurement method is accurate, sensitive, simple, and stability, and has good reproducibility. The extraction and determination methods could be used as production process and quality control reference of TFOL.

Key words: *Trollii Flos* Oral Liquid; reverse continuous cycle cryogenic extraction; orthogonal test; orientin; vitexin

金莲花口服液是以金莲花 *Trollii Flos* 药材经提
取制剂加工制成的口服液, 金莲花为毛茛科植物金
莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花, 目前发现的
金莲花中的化学成分主要有 3 类, 包括黄酮类、酚
酸类和生物碱类^[1-2]。金莲花中黄酮类为碳苷类化合

物, 以荭草苷和牡荆苷的量最高。现代药理研究表
明, 金莲花总黄酮、荭草苷和牡荆苷对金黄色葡萄
球菌、表皮葡萄球菌具有较强的抑制作用, 牡荆苷
在三者中的抑菌效果最好^[3]。金莲花中荭草苷和牡荆
苷对 *D*-半乳糖致衰老小鼠脑损伤具有保护作用^[4]。

收稿日期: 2014-03-20

作者简介: 任桂玲 (1989—), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂工艺及质量标准。

Tel: (0314)2292101 E-mail: renguilin2008@163.com

*通信作者 李沈明, 男, 正高级工程师, 硕士研究生导师。Tel: (0314)2151678 E-mail: lishenming@cdjfk.com.cn

金莲花口服液在生产制备过程中,传统的提取工艺由立式静态提取罐采用高温煎煮方法,杂质浸出多,且药材在多次、长时间高温煎煮过程中,沉降至提取罐底部滤网上,造成滤网堵塞致使提取液与药渣分离困难,同时不利于有效成分浸出;另外花类药材密度较小,吸收溶剂后膨胀幅度大,所需提取溶剂多,后续蒸发浓缩时间长。为优化金莲花口服液提取工艺和解决工业生产中的实际问题,本实验在静态提取设备基础上基于动态逆流提取工艺^[5]研究出一种可应用于静态提取罐提取花类和叶类药材的提取工艺——逆向连续循环低温提取。逆向连续循环低温提取是指在较低温度、较少的溶剂、适宜粒径条件下,利用机械手段采用强制循环方式,使浸出液自下而上连续循环流动,促使固、液两相产生较高的相对运动速度的提取方法,具有药材与溶媒有效接触面积大,浸出溶液不断更新并持续保持较大的浓度差等特点。而低温提取,避免了淀粉、鞣质、蛋白质等大分子物质的浸出,为后续口服液制剂加工减少杂质处理量。本研究对照《中国药典》2010年版第二增补本制备工艺^[6],采用正交试验设计,对金莲花口服液的逆向连续循环低温提取工艺参数进行优化,以荜草苷和牡荆苷的量为优化目标,考察提取温度、提取时间、药材粒径和加水倍数等关键因素对优化指标的影响,获得最佳工艺参数。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, VWD 检测器; KQ—500DE 型数控超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; AE240 十万分之一电子分析天平, 瑞士梅特勒; 逆向连续循环低温提取设备, 自制, 提取罐容积 50 L; RE—5286A 旋转蒸发仪, 上海雅荣生化设备仪器有限公司。

金莲花药材, 颈复康药业集团有限公司提供, 批号 130601, 由颈复康药业集团有限公司工程师中药鉴别师商春丽鉴定为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花; 荜草苷对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 111777-200801, 质量分数 96.4%; 牡荆苷对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 111687-200602, 经 HPLC 检测质量分数为 98.8%; 甲醇、乙腈, 色谱纯; 磷酸, 分析纯。

2 方法与结果

2.1 荜草苷和牡荆苷的 HPLC 定量测定法^[2]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A) -乙腈

(B) -0.1%磷酸水溶液 (C), 采用线性梯度洗脱程序: 0~45 min, 4% A~12% B~84% C; 45~60 min, 10% A~20% B~70% C; 检测波长 349 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 5 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取荜草苷和牡荆苷对照品适量, 分别置 10、25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理使溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取 4 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成含荜草苷 295.37 μg/mL 和牡荆苷 93.44 μg/mL 的混合对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取样品 2.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇 40 mL, 超声处理 (功率 400 W, 频率 40 kHz) 10 min, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 弃去初滤液, 精密量取滤液 10 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 线性关系的考察 混合对照品储备液作为 1 号溶液, 采用倍比稀释法制成系列质量浓度溶液, 得 2~5 号混合对照品溶液, 荜草苷质量浓度分别为 147.68、73.84、36.92、18.46 μg/mL, 牡荆苷质量浓度分别为 46.72、23.36、11.68、5.84 μg/mL, 在“2.1.1”项色谱条件下, 取 5 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 以色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 回归方程为荜草苷 $Y=9\ 512.0 X+0.257\ 5$, $r=0.999\ 9$; 牡荆苷 $Y=11\ 615 X+3.200\ 0$, $r=0.999\ 9$ 。荜草苷在 18.46~295.37 μg/mL 呈良好线性关系; 牡荆苷在 5.84~93.44 μg/mL 呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 将“2.1.4”项线性 3 号混合对照品溶液和按照“2.1.3”项方法制备的供试品溶液 1 份, 各重复进样 6 次, 每次 5 μL, 记录色谱峰面积, 混合对照品溶液色谱峰面积的 RSD 值分别为荜草苷 1.14%、牡荆苷 1.27%; 供试品溶液色谱峰面积的 RSD 值分别为荜草苷 1.55%、牡荆苷 0.51%, 表明精密度良好。

2.1.6 重复性试验 平行取样品 6 份, 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 记录色谱峰面积, 荜草苷和牡荆苷峰面积的 RSD 值分别为 1.49% 和 1.00%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.4”项线性 3 号混合对照品溶液和按照“2.1.3”项方法制备的供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 5 μL, 记录色谱峰面积, 对照品溶液色谱峰面积的 RSD 值

分别为荜草苷 0.24%、牡荆苷 0.79%；供试品溶液色谱峰面积的 RSD 值分别为荜草苷 1.63%、牡荆苷 1.39%，表明对照品溶液和供试品溶液均在 12 h 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已测定荜草苷和牡荆苷量的样品 6 份，分别加入对照品适量，按“2.1.3”项方法制备样品溶液，按“2.1.1”项色谱条件进行测定，以样品溶液中绝对质量分数计算加样回收率，结果荜草苷平均回收率为 96.07%，RSD 为 0.74%；牡荆苷平均回收率为 97.73%，RSD 为 1.42%。

2.2 工艺流程

本实验采用逆向连续循环低温提取方法，优化金莲花口服液的提取工艺。逆向连续循环低温提取工艺流程如下：首先在提取罐体下部增设大面积的凸状环型滤网，药材从提取罐顶部的投料口装入提取罐后将溶媒加入提取罐内，将有效成分浸出，浸

出液经气动隔膜泵后，进入提取罐上口，并从罐底下口逆流向上泵回罐内，浸出液自下而上连续循环流动，使固、液两相产生相对运动，提取完全后，提取液从排液口排出，药渣被筛网拦截，排液快且完全。

2.3 逆向连续循环低温提取工艺优化

2.3.1 正交设计因素水平的确定 根据目前生产工艺参数^[6]及单因素预试验结果，本研究确定提取温度 (A)、提取时间 (B)、药材粒径 (C)、加水倍数 (D) 4 个试验因素，每个因素设计 3 个水平。预试验结果表明，A、B、C 影响相对较大，所以将 A 与 B、C 可能发生的交互作用考虑进去，采用 $L_{18}(3^7)$ 正交试验表进行试验^[7]。正交试验的因素和水平安排见表 1。

2.3.2 逆向连续循环低温提取工艺的正交试验设计 准确称取金莲花药材 18 份，各 200 g，分别按照 $L_{18}(3^7)$ 正交设计表进行逆向连续循环低温提取，提

表 1 $L_{18}(3^7)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_{18}(3^7)$ orthogonal test

试验号	A / °C	B / h	A×B	C / 目	A×C	D / 倍	E (空白)	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)		综合评分
								荜草苷	牡荆苷	
1	1 (70)	1 (2.0)	1	1 (50)	1	1 (18)	1	2.67	0.64	1.66
2	1	2 (2.5)	2	2 (10)	2	2 (20)	2	5.81	1.33	3.57
3	1	3 (3.0)	3	3 (不粉碎)	3	3 (25)	3	2.94	0.73	1.84
4	2 (80)	1	1	2	2	3	3	6.67	1.61	4.14
5	2	2	2	3	3	1	1	3.49	0.84	2.17
6	2	3	3	1	1	2	2	5.94	1.40	3.67
7	3 (90)	1	2	1	3	2	3	6.98	1.64	4.31
8	3	2	3	2	1	3	1	8.12	1.88	5.00
9	3	3	1	3	2	1	2	6.42	1.58	4.00
10	1	1	3	3	2	2	1	4.59	1.10	2.85
11	1	2	1	1	3	3	2	4.07	0.97	2.52
12	1	3	2	2	1	1	3	5.05	1.24	3.15
13	2	1	2	3	1	3	2	5.27	1.35	3.31
14	2	2	3	1	2	1	3	6.08	1.45	3.77
15	2	3	1	2	3	2	1	6.24	1.49	3.87
16	3	1	3	2	3	1	2	6.45	1.61	4.03
17	3	2	1	3	1	2	3	5.39	1.28	3.34
18	3	3	2	1	2	3	1	7.22	1.71	4.47
K_1	2.60	3.38	3.25	3.40	3.35	3.13	3.33			
K_2	3.49	3.39	3.49	3.96	3.80	3.60	3.52			
K_3	4.19	3.50	3.52	2.92	3.12	3.55	3.42			
R	1.60	0.12	0.27	1.04	0.68	0.47	0.18			

取结束后将药渣与提取液分离，每份提取液均浓缩至 250 mL，即为样品液（相当于原生药 0.8 g/mL），备用。

2.3.3 正交试验结果及方差分析 正交试验 2 个评价指标荜草苷和牡荆苷质量浓度，采用综合评分进行数据分析，荜草苷和牡荆苷质量浓度的权重系数均为 0.5 计。综合评分 = 荜草苷质量浓度 × 0.5 + 牡荆苷质量浓度 × 0.5。正交试验结果见表 1，方差分析见表 2。

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	7.67	2	19.71	$P < 0.01$
B	0.05	2	0.12	
A × B	0.27	2	0.68	
C	3.27	2	8.41	$P < 0.05$
A × C	1.42	2	3.65	
D	0.80	2	2.06	
E (误差)	0.97	5		

$F_{0.05}(2, 5) = 5.79$ $F_{0.01}(2, 5) = 13.27$

对正交试验所得荜草苷和牡荆苷质量浓度之和综合评分进行分析，采用空白列 (E) 作为误差来源，从表 1 极差分析可见，各因素对提取效果的影响顺序为：提取温度 (A) > 药材粒径 (C) > 提取温度与药材粒径之间的交互作用 (A × C) > 加水倍数 (D) > 提取温度与提取时间之间的交互作用 (A × B) > 提取时间 (B)，在给定的水平条件下，各因素对提取效果的影响情况为 $A_3 > A_2 > A_1$ ， $B_3 > B_2 > B_1$ ， $C_2 > C_1 > C_3$ ， $D_2 > D_3 > D_1$ 。从表 2 方差分析可见，提取温度 (A) 和药材粒径 (C) 对提取效果的影响有显著性，而提取时间 (B)、加水倍数 (D)、提取温度与提取时间之间的交互 (A × B)、提取温度与药材粒径之间的交互 (A × C) 对提取效果的影响不显著。由于 B 因素 3 个水平之间对指标影响甚小，所以确定最佳提取条件为 $A_3B_1C_2D_2$ ，即提取温度 90 °C，提取时间 2 h，药材粒径 10 目，加水倍

数 20 倍。

2.4 验证试验

按正交设计优选的最佳提取工艺参数制备 3 批样品，分别测定样品中荜草苷、牡荆苷的量。由表 3 可知，此方法稳定可靠，可以作为金莲花口服液的提取工艺。

表 3 最佳工艺下验证试验

Table 3 Varification under optimal condition

试验号	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)		综合评分
	荜草苷	牡荆苷	
1	7.14	1.70	4.42
2	7.20	1.71	4.46
3	7.09	1.69	4.39

2.5 不同提取方法的比较

准确称取金莲花药材 2 份，各 200 g，1 份按正交设计确定的最佳提取工艺提取：提取温度 90 °C，提取时间 2 h，药材粒径 10 目，加水倍数 20 倍；另 1 份按目前工业生产中金莲花口服液提取（高温煎煮）采用加水煎煮 3 次，加水倍数依次为 10、8、8 倍，每次 1.5 h^[6]，进行提取，提取结束将药渣与提取液分离，每份提取液均浓缩至 250 mL，即为样品液（相当于原生药 0.8 g/mL），取样测荜草苷和牡荆苷的量。剩余样品液浓缩至一定体积，置已干燥至恒定质量的蒸发皿中，在水浴蒸干后，于 105 °C 干燥 3 h，移置干燥器中，冷却 30 min，迅速精密称定质量，即为浸膏量。结果见表 4。可见，逆向连续循环低温提取与目前工业生产中金莲花口服液提取工艺相比，提高了提取率，单位药材的溶剂消耗量减少 23%，提取时间减少 55.6%，浸出率减少 39.43%。

浸膏率 = 浸膏量 / 药材质量

3 讨论

3.1 指标成分的确定

金莲花口服液中主要含黄酮类成分，但黄酮类物质有多种生物活性^[8]，确定黄酮类成分中量较高

表 4 不同提取方法的比较

Table 4 Comparison by different extracting methods

提取方法	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)		综合评分	浸膏率 / %
	荜草苷	牡荆苷		
逆向连续循环低温	7.22	1.71	4.47	23.35
高温煎煮	6.72	1.70	4.21	38.55

且具有活性的荭草苷和牡荆苷为指标成分,可以更全面、综合地评价逆向连续循环低温提取工艺。中药提取液在有效成分明确的前提下,有效成分的量一定时,浸膏量高则质量分数低,逆向连续循环低温提取与目前生产提取工艺(高温煎煮)相比,在保证较高提取率的同时减少浸膏量,为口服液后续制剂加工减少杂质处理量,也符合减小服用剂量、提高疗效要求,可以较好的保证制剂的质量。

3.2 测定方法的选择

在采用 RP-HPLC 法测定指标成分的过程中曾试验了乙腈-水体系和甲醇-乙腈-磷酸体系的不同配比,最后选择甲醇-乙腈-0.1%磷酸水溶液系统在线梯度洗脱,样品分离度好、峰形佳,使金莲花口服液中荭草苷、牡荆苷的测定快速、灵敏、准确可靠。

3.3 提取工艺

逆向连续循环低温提取工艺具以下优势:第一,减少提取溶剂,缩短提取和浓缩时间,降低了提取、过滤、浓缩3个过程的能源消耗;第二,保证有效成分较高提取效率的同时降低杂质的渗出;第三,溶剂的逆向流动解决了提取液与药渣分离时药渣堵塞滤网工业生产实际问题。逆向连续循环低温提取设备,只需在生产较常用的立式静态提取罐上稍做改进即可,并在提取过程中带一定的滤过作用,方便后续的滤过操作。研究表明,比目前工业

生产方法的优势明显,逆向连续循环低温提取工艺是一种值得在以金莲花为代表的花类中药工业生产中大力推广的高效、节能技术,对中药生产具有指导意义。

参考文献

- [1] 刘颖,王如峰,袁铭,等. HPLC 测定金莲花中金莲花苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 75-77.
- [2] 苏连杰,张卫平,赵波,等. 不同采收期金莲花茎叶中总黄酮和荭草苷的动态变化研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2058-2061.
- [3] 王凌云,周艳辉,李药兰,等. 长瓣金莲花中黄酮苷的抑菌活性研究及牡荆苷的含量测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(4): 252-253.
- [4] 蒋伟,屈海琪,袁丹华,等. 金莲花中荭草苷和牡荆苷对 D-半乳糖致衰老小鼠脑损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1376-1380.
- [5] 李希,谢守德,冯建安,等. 动态逆流提取技术在中药提取中的应用 [J]. 实用中医药杂志, 2008, 24(12): 806-808.
- [6] 中国药典 [S]. 第二增补本. 2013.
- [7] 倪永兴,韩可勤. 关于正交表选用和表头设计教学的探讨 [J]. 数理医药学杂志, 1996, 9(1): 33-35.
- [8] 王凌,周艳辉,李药兰,等. 长瓣金莲花中黄酮苷的抑菌活性研究及牡荆苷的含量测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(4): 252-253.