

正交试验研究金银花的水提工艺

余杰, 匡辽红, 林凡胜

(北京源生素源生物科技有限公司, 北京 102212)

摘要: 目的 研究了水提金银花中绿原酸的最佳工艺。**方法** 采用正交试验设计, 考察了加水量、煎煮温度、煎煮时间3个因素对绿原酸提取率的影响。**结果** 确定金银花的最佳提取工艺为: 加入10倍量的水, 75℃煎煮提取1h。**结论** 该工艺条件简单, 稳定, 可行, 绿原酸提取率高, 为改进金银花的煎提工艺提供了依据。

关键词: 金银花; 正交试验; 绿原酸; 提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2010)04-0293-04

Study on extraction method of chlorogenic acid from Honeysuckle

YU Jie, KUANG Liao-hong, LIN Fan-sheng

(Beijing Yuansheng Suyuan Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102212, China)

Abstract: Objective To study the water extraction method of chlorogenic acid in Honeysuckle. **Methods** Orthogonal experiment design was used. Three factors were studied as indexes that might affect the yield rate of chlorogenic acid, including water quantity, extraction temperature and time required. **Results** The best extraction condition was: 10 times amount of water, 1 hour of extraction at 75℃. **Conclusion** This extraction method is convenient and feasible, and can improve the extraction of chlorogenic acid from honeysuckle.

Key words: honeysuckle; orthogonal experiment design; chlorogenic acid; extraction

“复方双花口服液”（主要由金银花、板蓝根、连翘、穿心莲组方）是北京源生素源生物科技有限公司生产的中药制剂, 具有清热解毒、利咽消肿功效, 用于外感风热、咽喉肿痛。绿原酸是该口服液的主要有效成分和控制质量的检测指标。其生产工艺采用4味药合并水提醇沉法^[1], 提取方式为一般加热煮沸, 温度较高, 造成绿原酸的提取率低和不稳定^[2]。金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾, 其主要活性成分为绿原酸^[3-4]。为提高制剂质量, 笔者在保留原水提醇沉工艺的前提下, 将金银花单独进行水提醇沉, 其余3味药合并提取不变。本实验以绿原酸为指标, 采用正交试验对金银花的水提工艺条件进行研究, 为改进“复方双花口服液”的生产工艺提供了科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC—10ATVP 高效液相色谱仪; SPD—10A 检测器; Chromato-solutionlight 色谱工作站; 离心机(上海手术器械厂); 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 材料

绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110753-200212); 金银花购自山东平邑县, 经北京中医药大学孙毅坤博士鉴定为忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的花蕾, 按药典方法测定金银花中的绿原酸为3.5%^[3]; 乙腈为色谱纯(迪马科技公司), 磷酸为分析纯(天津河北化学试剂厂), 水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm,

作者简介 余杰(1965—), 男, 主管药师, 研究方向为中药制剂及质量管理。

Tel: 13717598329, E-mail: jieyuie@126.com

柱号: 99903, 迪马科技公司); 流动相: 0.4%磷酸-乙腈水溶液 (90:10); 检测波长: 327 nm; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μ L。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 2 000。上述色谱条件下, 金银花中绿原酸与其他成分分离良好, 色谱图见图 1。

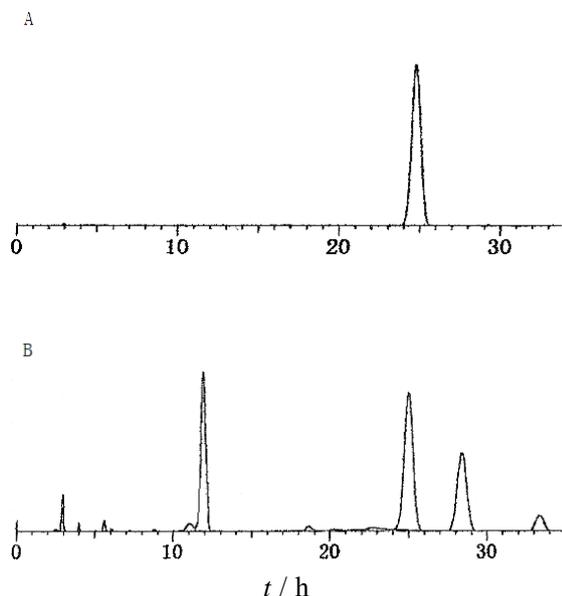


图 1 绿原酸对照品 (A) 及金银花样品 (B) 的 HPLC 图

2.2 方法学考察

2.2.1 供试品溶液制备

精密量取金银花煎煮液 1 mL 置 10 mL 具塞离心管中, 加甲醇 3 mL, 摇匀, 置冰箱中放置过夜, 于 2 000 r/min 离心 10~15 min, 上清液转至 10 mL 量瓶中, 沉淀用约 1 mL 甲醇洗涤, 于 2 000 r/min 离心 5 min, 洗涤液合并同一量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.2 线性关系考察

精密称取绿原酸对照品 5.06 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液定容。精密量取对照品溶液 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mL, 分别置于 10 mL 的棕色量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀。其质量浓度分别为 1.01、2.53、5.06、7.59、10.12 μ g/mL。精密吸取上述溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 以绿原酸的质量浓度为横坐标 (X)、峰面积积分为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=13\ 885 X-298.04$, $R^2=0.999\ 9$, 绿原酸对照品质量浓度在 1.01~10.12 μ g/mL 与峰面积线性关系良好。

2.2.3 精密度试验

精密吸取绿原酸对照品溶液 (7.59 μ g/mL) 10 μ L,

注入色谱仪, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 1.39%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.4 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别于配制后 0、2、4、6、8、12 h 进样, 每次 10 μ L, 测定并记录峰面积。结果峰面积的 RSD 为 1.85%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.5 重现性试验

取同一金银花煎煮液 6 份, 制备供试品溶液, 测定绿原酸的量, 求得 RSD 为 1.29%, 表明本方法的重现性良好。

2.2.6 加样回收率试验

精密量取已测定的供试品溶液 (以重现性试验结果确定样品质量浓度为 3.55 μ g/mL) 1 mL, 加入线性关系考察的 3 个量级 (2.53、5.06、7.59 μ g/mL) 绿原酸对照品甲醇溶液各 1 mL, 置 10 mL 具塞离心管中, 同一量级平行操作 3 份, 其余按“2.2.1”项下方法操作, 测定, 计算回收率, 结果平均回收率 99.91%, RSD 为 1.61%。

2.3 正交试验

2.3.1 试验设计

绿原酸溶于水和乙醇、丙酮、甲醇等溶剂, 从绿原酸食用和药用的安全性和提取率方面综合考虑水和乙醇都是理想的提取溶剂^[5], 为不改变复方双花口服液原提取方法即水提醇沉法, 确定以水为溶剂进行煎煮提取。考察加水量 (A)、煎煮温度 (B)、煎煮时间 (C) 3 个因素, 分别取 3 个水平进行考察, 考察因素及水平见表 1。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计试验方案, 以金银花煎煮液中绿原酸的得率为考察指标。

表 1 因素水平表

水 平	因 素		
	A	B	C
1	6	75	0.5
2	8	90	1.0
3	10	100	2.0

2.3.2 绿原酸得率的测定

按正交设计表 (表 2) 规定的试验条件进行试验, 每次取 30 g 金银花药材, 加水, 精密称定质量, 进行煎煮, 温度升到表中所示温度后开始计时, 到时间后, 放凉, 加水补足质量, 收集煎煮液, 按“2.2.1”项下方法操作, 按线性关系的相同条件测定每次试验中绿原酸的量并计算绿原酸的提取率。

提取率 = 煎煮液的绿原酸量 / 药材的绿原酸量 × 100%

记录每次试验绿原酸提取率, 结果见表 2。

2.3.3 方差分析

以表 2 空白列计算出的误差值计算各因子列的

F 值。绿原酸提取率方差分析见表 3。

以绿原酸提取率为考察指标, 对表 3 方差分析结果和表 2 极差值进行分析, 各指标因素的主次顺序为: $B > A > C$, 最佳方案为 $A_3B_1C_2$, 即 10 倍量的水, 75 °C 煎煮提取 1 h。

表 2 正交试验设计表及结果

水 平	因 素				绿原酸提取率/%
	A	B	C	D (空白列)	
1	1	1	1	1	39.69
2	1	2	2	2	44.87
3	1	3	3	3	28.76
4	2	1	2	3	56.53
5	2	2	3	1	50.36
6	2	3	1	2	33.82
7	3	1	3	2	61.35
8	3	2	1	3	57.64
9	3	3	2	1	42.61
K_1	113.32	157.57	131.15		
K_2	140.71	152.87	144.01		
K_3	161.60	105.19	140.47		
\bar{K}_1	37.77	52.52	43.72		
\bar{K}_2	46.90	50.96	48.00		
\bar{K}_3	53.87	35.06	46.82		
R	16.10	17.46	4.28		

表 3 绿原酸提取率方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	390.84	2	195.42	20.90	<0.05
B	559.90	2	279.95	29.94	<0.05
C	29.42	2	14.71	1.57	>0.1
误差	18.70	2	9.35		

2.3.4 验证试验

按最佳工艺条件 $A_3B_1C_2$ 进行验证试验, 3 次试验绿原酸提取率平均结果为 $(65.67 \pm 1.09)\%$, RSD 为 1.66%, 试验结果较为理想, 说明在最佳工艺条件下, 提取稳定、可行。

3 讨论

3.1 绿原酸最佳提取条件的确定

根据方差分析的结果可看出因素 B 即提取温度对绿原酸的提取率影响最大, 与梅林等^[6]的研究结果相同; 因素 A 即提取的用水量对绿原酸提取

率影响较大。所以认为因素 A、B 为主要因素, 因素 C 煎煮时间不是主要因素。

虽然用水量大为佳, 但在实际生产中, 由于金银花为花蕾, 用大量水煎煮后滤过困难、延长生产时间, 因此不宜过度增加用水量。由于绿原酸是咖啡酸与奎尼酸形成的酯, 其分子结构中有酯键、不饱和双键及多元酚 3 个不稳定部分, 根据文献 [7], 不宜高温、长时间加热, 宜在 75 °C 以下提取。极差分析因素 C 即煎煮时间以 1 h 为佳。

3.2 影响绿原酸提取率的其他因素

为避免第 2 次煎煮、浓缩及醇沉后浓缩等长时

间加热、工序过长等多种不确定因素对绿原酸提取率的综合影响,本实验只考虑1次煎煮对绿原酸提取率的影响,这样能够较准确了解影响绿原酸提取率的各种因素,为确定金银花水煎提的生产条件提供依据。

3.3 新工艺提高了成品中绿原酸的量

成品中绿原酸测定结果显示,原提取工艺的成品中绿原酸质量浓度低,往往在1.3 mg/mL以下,有时低于1.0 mg/mL(标准为质量浓度大于1.0 mg/mL);且相同批号、相同用量金银花原料生产的成品中绿原酸的量波动很大,需要加大金银花药材的投料量才能保证成品质量标准中规定的绿原酸的量。经过对金银花进行单独煎煮提取,由相同批号、相同用量的金银花原料生产的成品中,其绿原酸的质量浓度大多在2.5 mg/mL以上,能够稳定成品的质量。

3.4 单独提取绿原酸的优势

金银花药材单独提取能保证在最佳条件下提取绿原酸,最大限度地减少在提取过程中对绿原酸的破坏,很大程度上提高绿原酸的提取率,平均提取

率达到 $(65.67 \pm 1.09)\%$,为进一步研究控制投入金银花的量,使成品绿原酸的量在一个较合理的范围内,从而提高成品质量及疗效创造条件。这方面的尝试也是今后使中药制剂成分可测、质量浓度可控的研究方向,值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部部标准[S]. WS3-366(Z-52)-97(Z).
- [2] 李志华,许让翻. 不同提取工艺对金银花中绿原酸提取率的影响[J]. 中草药, 2002,33(8): 714-715.
- [3] 段晓颖. 金银花水提工艺中绿原酸变化的研究[J]. 中草药, 2007,38(8): 1189-1190.
- [4] 中国药典[S]. 一部. 北京:化学工业出版社, 2005: 114-115.
- [5] 王利,冉旭. 金银花中绿原酸醇提工艺的研究[J]. 试验报告与理论研究, 2009, 12(1): 18-20.
- [6] 梅林,梅兰,李随丽. 正交试验法优化金银花中绿原酸的水提工艺[J]. 中国药业, 2007, 16(6): 42-43.
- [7] 邓良,袁华,喻中沅. 绿原酸的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2005, 22(7): 4-6.

(收稿日期 2010-03-20)

科学出版社新书介绍(1)

《现代中药质量控制及技术》

由高文远教授编写的《现代中药质量控制及技术》已于2010年3月在科学出版社出版发行,该书从中药质量控制的重要性和必要性出发,叙述了中药质量控制的发展历史、发展趋势;详细介绍了中药的来源鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别和新技术在中药鉴别中的应用;高效液相色谱、超高压液相色谱、高效毛细管电泳、色谱-质谱联用技术等色谱技术在中药质量控制中的应用;还包括中药指纹图谱质量控制技术及生物效价、代谢组学、分子生物学等现代质量控制技术。此外,还专辟章节介绍了含不同类型活性成分中药及不同剂型中药,中药材、中药饮片和中成药,以及中药保健食品的质量控制。既可以供中药和药学相关领域的科研、教学人员使用,也可以作为中药和药学相关领域的研究生、本科生参考。



《中药提取分离新技术》

由周晶、冯淑华教授编写的《中药提取分离新技术》已于2010年3月在科学出版社出版发行,该书介绍了近年发展起来的中药提取与分离纯化新技术,主要包括各技术的历史沿革、发展现状、基本原理、技术特点、工艺参数、应用范围、存在的问题与评价,以及各技术的应用前景展望。本书语言简明,层次清晰,采用大量实例,介绍了各技术在中药生产及制剂等方面的应用,特别是最佳工艺参数的优选方法等。既可以供中药和药学相关领域的科研、教学人员使用,也可以作为中药和药学相关领域的研究生、本科生参考。

