

地锦草提取物制备工艺及质量控制研究

高迎春, 杨修镇, 魏秀丽, 苏梅

(山东省兽药质量检验所, 济南 250022)

[收稿日期] 2010-03-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)06-0023-04 [中图分类号] S853.72

[摘要] 以槲皮素提取率、提取物干粉状态和能耗为指标采用正交试验, 优化了地锦草提取物制备工艺。以高效液相色谱方法测定提取物中槲皮素的含量确定了提取物的质量标准, 并进行了方法学验证。结果显示, 最佳工艺为 8 倍量 70% 乙醇提取 3 h 2 次, 该工艺简单、可行, 符合工业化大生产。

[关键词] 地锦草提取物; 工艺优选; 质量控制

Optimization and Quality Control of Preparation Technology of *Euphorbia humifusa* Willd Extractum

GAO Ying-chun, YANG Xiu-zhen, WEI Xiu-li, SU Mei

(Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute, Jinan 250022, China)

Abstract Orthogonal experiment was done to optimize the best preparation technology of *Euphorbia humifusa* willd extractum, and the content of quercetin was detected by HPLC. The results showed that the best technology was extracting twice by eight times as great as 70% ethanol solution for three hours. This technology was simple, feasible and fit for industrial large-scale production.

Key words *Euphorbia humifusa* Willd extractum; optimization of technology; quality control

地锦草为大戟科大戟属地锦 (*Euphorbia humifusa* Willd) 的干燥全草。地锦草是《中国药典》《中国兽药典》收载的中药材, 也是一种维吾尔药材和蒙药材, 具有清热解毒、凉血止血之功能^[1]。主治下痢、肠黄、便血、尿血、咳血、痈肿恶疮^[2]。初步药理试验证明地锦草提取物对耐药性禽源大肠杆菌具有一定的消除作用。以地锦草提取物为基础, 进一步研究开发其组方产品具有重要意义。目前《中国兽药典》上尚未收载其提取物, 为保证地锦草提取物质量的均一性和可控性, 本文优化了地锦草提取物的制备工艺并对其质量标准进行研究。

1 地锦草提取物制备工艺优选

1.1 仪器与材料 地锦草购自济南市建联中药有限公司中药饮片厂, 产地为山东; 热回流机组, 型号

RTZ-2 温州南大轻工机械有限公司; 快装式酒精回收塔, 型号 JH-20Q 瑞安凯迪药化机械有限公司; 高速离心喷雾干燥机, 型号 LPG25 常州市震华干燥设备有限公司。提取用乙醇为食用乙醇, 甲醇、磷酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 地锦草提取工艺的优选 地锦草抗菌、止血的有效成分主要是槲皮素、山素苷、地锦草素, 为黄酮及其苷类化合物。根据黄酮及其苷类化合物的性质选择乙醇为提取溶剂, 本部分设计正交试验以槲皮素提取率为指标, 对乙醇浓度、乙醇用量、提取次数、提取时间进行考察以优选最佳提取工艺。槲皮素提取率 = 提取物中槲皮素含量 × 出膏率 / 药材中槲皮素含量。

1.2.1 因素及水平设计 如表 1 所示。

表 1 因素及水平设计表

水平	因素			
	乙醇浓度	乙醇用量 (倍数)	提取次数	提取时间 (h)
1	50%	6	1	1
2	70%	8	2	2
3	90%	10	3	3

1.2.2 试验 安排计划 如表 2所示。

表 2 正交试验安排计划表

试验号	1	2	3	4	槲皮素提 取率 (%)
	乙醇 浓度	乙醇用量 (倍数)	提取 次数	提取时 间 (h)	
1	50%	6	1	1	50.08
2	50%	8	2	2	73.32
3	50%	10	3	3	74.59
4	70%	6	2	3	85.26
5	70%	8	3	1	86.43
6	70%	10	1	2	75.19
7	90%	6	3	2	85.42
8	90%	8	1	3	78.31
9	90%	10	2	1	86.17
均值 1	65.997	75.587	67.860	74.227	
均值 2	82.293	79.353	81.583	77.977	
均值 3	83.300	78.650	82.147	79.387	
极差	17.303	5.766	14.287	5.160	

由数据分析可知,各因素的影响情况:乙醇浓度>提取次数>乙醇用量>提取时间,最优工艺为 8 倍量 90%乙醇提取 3 h 3 次。由数据分析不难看出 70%乙醇的均值与 90%乙醇均值接近,提取 2 次与提取 3 次的均值接近,考虑到实际生产过程中的成本及安全问题,确定工艺为 8 倍量 70%乙醇提取 3 h 2 次。

1.3 地锦草提取液浓缩工艺的优选

1.3.1 由于提取溶剂为 70%乙醇,其沸点较低,故浓缩工艺采用常压浓缩工艺。根据浓缩需要的时间及浓缩液状态考察浓缩温度,结果如表 3 所示。

取相同提取工艺下提取的提取液 500 L,3 份,分置 2 吨浓缩罐中,分别控制提取罐内提取液温度为 80℃、90℃、100℃进行浓缩,浓缩至相对密度为 1.025 为止。记录浓缩过程消耗的时间及浓缩液状态(浓缩液状态是指浓缩液在浓缩过程中是否爆沸、浓缩完后罐壁上是否糊化、浓缩液中是否存在焦渣等)。

表 3 浓缩温度考察试验表

项目	温度 (℃)		
	80	90	100
耗时 (h)	10	8	6
浓缩液状态	好	好	有焦渣

根据试验结果,选择最佳的浓缩温度为 90℃。

1.3.2 根据浓缩液状态及喷雾干燥耗时考察浓缩液浓缩程度。取相同提取工艺下提取的提取液 500 L,3 份,分置 2 吨浓缩罐中,控制提取罐内提取液温度为 90℃,分别浓缩至相对密度 1.000、1.025、1.050 观察浓缩液状态、相同参数下喷雾干燥耗时及干粉状态,结果如表 4 所示。

表 4 浓缩程度考察试验表

项目	浓缩液相对密度		
	1.000	1.025	1.050
浓缩液状态	稀、流动性好	适中、流动性好	较多沉淀析出、流动性差
喷雾干燥耗时 (h)	8	4	5
干粉状态	微有粘连	流动性好	流动性好

根据试验结果,选择最佳浓缩程度为浓缩至相对密度 1.025。

1.4 地锦草浓缩液的喷雾干燥工艺优选

1.4.1 进风口温度的优选 取相对密度为 1.025 的地锦草浓缩液 100 L,3 份,分别控制进风口温度为 150℃、165℃、180℃,固定出风口温度 60℃~70℃进行喷雾干燥,根据干燥过程耗时及干粉状态考察进风口温度,结果如表 5 所示。

表 5 进风口温度考察试验表

项目	进风口温度 (℃)		
	150	165	180
干燥耗时 (h)	4	3	2
干粉状态	微有粘连	流动性好	流动性好

根据试验结果,选择最佳进风口温度为 180℃。

1.4.2 出风口温度的优选 取相对密度为 1.025 的地锦草浓缩液 100 L,3 份,固定进风口温度 180℃,控制出风口温度分别为 50℃~60℃、60℃~70℃、80℃~90℃,进行喷雾干燥,根据干燥过程耗时及干粉状态考察出风口温度,结果如表 6 所示。

表 6 出风口温度考察试验表

项目	出风口温度 (℃)		
	50~ 60	60~ 70	80~ 90
干燥耗时 (h)	4	2	1.5
干粉状态	流动性好	流动性好	微有粘连

根据试验结果,选择最佳出风口温度为 60℃~70℃。

1.5 地锦草提取、浓缩、干燥工艺三批放大验证试验 为考察上述优选工艺的稳定性,取同批次地锦草药材 300 kg 三份,按照优选后的工艺进行提取、浓缩、干燥,依据自制地锦草提取物质量标准进行

检验,结果如表 7 所示。结果表明该工艺稳定可行,可用于工业化生产。

表 7 三批放大工艺验证试验结果

批次	提取率(%)	平均提取率(%)
1	86.35	84.75
2	82.93	
3	84.96	

通过四因素三水平正交试验,确定最佳提取工艺为 8 倍量 70% 乙醇提取 3 h 2 次,并通过三批放大试验,对工艺进行了验证以确定工艺的稳定性。

2 地锦草提取物定性、定量方法研究

2.1 定性鉴别 取提取物粉末 0.1 g 加 80% 甲醇 50 mL 超声提取 5 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水-乙醚(1:1) 60 mL 使溶解,静置分层,弃去乙醚液,水液加乙醚提取 2 次,每次 20 mL,弃去乙醚液,水液加盐酸 5 mL,置水浴中水解 1 h,取出,迅速放冷,用乙醚提取 2 次,每次 20 mL,合并乙醚液,用水 30 mL 洗涤,弃去水液,乙醚液挥干,残渣加乙醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液^[3]。另取槲皮素对照品,加乙醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。吸取上述供试品溶液 10 μL、对照品溶液 2 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:4.5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷 3% 三氯化铝乙醇溶液,在 105℃ 加热数分钟,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品在对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

2.2 含量测定

2.2.1 测定法 色谱条件与系统适用性试验:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-0.4% 磷酸溶液(50:50)为流动相;检测波长 360 nm。

对照品溶液的制备:精密称定槲皮素对照品适量,加 80% 甲醇制成每 1 mL 含 20 μg 的溶液,即得。

供试品溶液的制备:取本品粉末约 0.3 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 50 mL,密封,称定重量,超声提取 5 min,取出,再称定重量,用 80% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 20 mL,精密加入 25% 盐酸 7 mL,置 85℃ 水浴中水解 30 min,取出,迅速放冷,转至 50 mL 容量瓶中,并加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.2.2 方法验证^[3]

2.2.2.1 准确度试验 对照品溶液的制备:按测定法项下对照品溶液制备方法制备对照品溶液。

供试品溶液制备:取本品粉末 6 份,每份约 0.15 g 精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入含槲皮素 17 μg/mL 的 80% 甲醇溶液 50 mL,密封,称定重量,超声提取 5 min,取出,再称定重量,用 80% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 20 mL,精密加入 25% 盐酸 7 mL,置 85℃ 水浴中水解 30 min,取出,迅速放冷,转至 50 mL 容量瓶中,并加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

精密吸取上述供试品溶液及对照品溶液各 10 μL,分别注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积,计算槲皮素的回收率,结果如表 8 所示。结果表明,槲皮素的平均回收率为 96.63% (RSD 为 1.29%),符合要求。

表 8 回收率试验结果

样品编号	取样量(g)	样品中含槲皮素的量(mg)	加入槲皮素的量(mg)	实测槲皮素总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.1550	1.968	0.850	2.784	96.00	96.63	1.29
2	0.1521	1.929	0.850	2.769	98.82		
3	0.1538	1.952	0.850	2.760	95.06		
4	0.1523	1.933	0.850	2.753	96.47		
5	0.1520	1.929	0.850	2.749	96.47		
6	0.1495	1.897	0.850	2.721	96.94		

2.2.2.2 精密度试验

2.2.2.2.1 重复性 供试品溶液的制备:取本品粉末约 0.3 g 精密称定,按测定法项下供试品溶液制备方法制备各供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,共重复进样 6 次,记录色谱图峰面积积分值。结果显示,6 次重复进样峰面积的 RSD 为 0.29%,精密度良好。

2.2.2.2.2 中间精密度 供试品溶液的制备:取本品粉末约 0.3 g 精密称定,按测定法项下供试品溶液制备方法制备各供试品溶液。同一实验室不同时间、不同分析人员、不同设备进行操作,精密吸取供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图峰面积积分值。结果显示,重复进样峰面积的 RSD 为 0.25%,精密度良好。

2.2.2.3 专属性试验 对照品溶液的制备:按测定法项下对照品溶液制备方法制备对照品溶液。按测定法项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液。空白溶液的制备:同法处理不含地锦草提取物的阴性样品,作为空白溶液。分别精密吸取对照品

溶液、供试品溶液、空白溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 记录图谱, 结果如图 1、图 2、图 3 所示。

结果表明, 供试品色谱图中, 在与对照品色谱峰相应的位置上有相同的色谱峰, 主峰与其他色谱峰之间分离关系良好, 阴性供试品与对照品色谱峰相应的位置上没有相同的色谱峰。

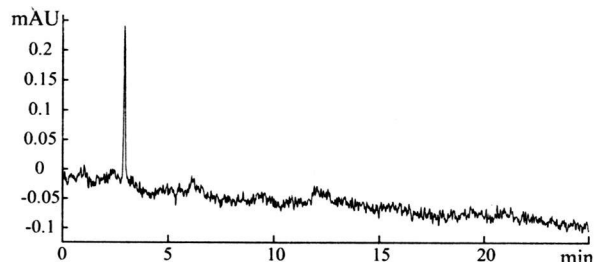


图 1 空白溶液的色谱图

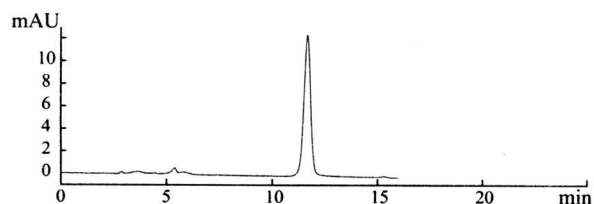


图 2 对照品溶液的色谱图

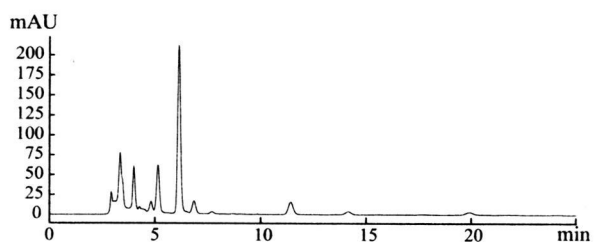


图 3 供试品溶液的色谱图

2.2.2.4 线性考察 对照品储备溶液的制备: 精密称定槲皮素对照品适量, 加 80% 甲醇制成每 1 mL 含 100 μ g 的溶液, 即得。精密吸取对照品储备液 0.5、1、2、4、10 mL, 分置 10 mL 容量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取各溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 测定, 记录图谱, 即得^[4]。以峰面

积积分值为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线 (图 4), 得回归方程为: $y = 27.472x - 70.323$, $R^2 = 0.9991$ 。槲皮素浓度在 5 ~ 100 μ g/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.2.5 耐用性 按测定法项下对照品溶液制备方法制备对照品溶液。供试品溶液制备: 取本品粉末 5 份, 每份约 0.3 g 精密称定, 按测定法项下供试品溶液制备方法制备各供试品溶液。

精密吸取上述供试品溶液及对照品溶液各 10 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图及峰面积, 计算槲皮素的含量 RSD 为 0.18%。

精密吸取其中一份供试品溶液 10 μ L, 注入液相色谱仪, 每隔 2、4、8、16、12、24 h 测定一次, 记录色谱图及峰面积, RSD 为 0.15%, 样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.2.6 系统适用性 经方法学验证, 本方法准确度高、精密度好、专属性强、线性关系良好且方法耐用。本系统适用性可靠, 可以科学有效地控制本品质量。

2.2.3 含量限度 测定 10 批本品含量并结合工艺特点及 2005 年版《中国兽药典》地锦草含量测定项下地锦草药材槲皮素含量限度的要求, 制定本品槲皮素的含量限度为 4.0 mg/g。

按照《中国兽药典》2005 年版二部附录中药质量标准分析方法验证指导原则的要求, 对地锦草提取物鉴别方法、含量测定方法的适用性及含量限度进行试验, 确定了本品的含量限度。

3 结果

地锦草提取工艺以槲皮素提取率为指标, 设计正交试验对乙醇浓度、乙醇用量、提取次数、提取时间进行了考察, 并结合实际生产中的成本、安全问题等确定了较佳的工艺。

为了有效地控制地锦草提取物的质量, 对地锦草中槲皮素的含量测定方法进行了严格的方法学验证。通过测定 10 批本品含量并结合 2005 年版《中国兽药典》地锦草含量测定项下地锦草药材槲皮素含量限度的要求, 制定本品槲皮素的含量限度为 4.0 mg/g。

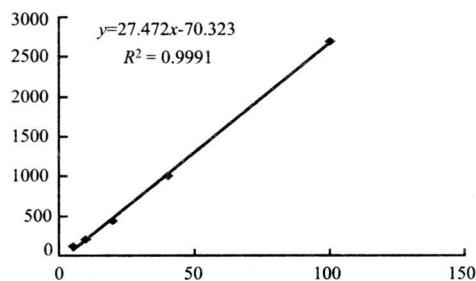


图 4 槲皮素标准曲线

参考文献:

- [1] 买买提江·阿布都瓦克, 龚千锋. 地锦草的研究概况 [J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(4): 78-80.
- [2] 俺惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提. 地锦草的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2866-2868.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2005 年版二部 [S].
- [4] 贾乐陶, 陈进, 张宏业. 地锦草胶囊中槲皮素含量测定 [J]. 中国药业, 2007, 16(13): 28-29.