

复方雪莲风湿凝胶膏提取工艺研究

薛桂蓬¹, 邢建国¹, 赵媛¹, 刘桂花¹, 孙文娟² (1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.新疆医科大学中药学院, 乌鲁木齐 830002)

摘要: 目的 优选复方雪莲风湿凝胶膏提取工艺。方法 采用正交试验设计, 分别以蛇床子素含量、姜黄素含量和浸膏收率为指标, 优化雪莲等 7 味药材的提取工艺; 以没食子酸含量和浸膏收率为指标, 优选土元和五倍子 2 味药的提取工艺。结果 7 味药最佳提取工艺为 10 倍量 80%乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h; 2 味药最佳提取工艺为 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 2.5 h。结论 优选的提取工艺稳定、可行。

关键词: 蛇床子素; 姜黄素; 没食子酸; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)02-0129-05

Study on Extraction Process of Compound Xuelian Catapasm

XUE Guipeng¹, XING Jianguo¹, ZHAO Yuan¹, LIU Guihua¹, SUN Wenjuan² (1.Xinjiang Institute of Meteria Medica, Urumqi 830004, China; 2.Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process of Compound Xuelian Catapasm. **METHODS** Orthogonal experimental design was used for the optimization, the extract yield, the content of osthole and curcumin were taken as the indexes in extracting process of seven herb medicines; the extract yield and the content of gallic acid were taken as the indexes in extracting process of two herb medicines. **RESULTS** The optimum extraction progress was as follows: seven herb medicines were extracted 3 times for 1 hour with 10 times amount of 80% alcohol; two herb medicines were extracted 3 times for 2.5 hour with 10 times amount of water. **CONCLUSION** The optimum extraction process was stable and feasible.

KEY WORDS: osthole; curcumin; gallic acid; orthogonal test; extraction technique

复方雪莲风湿凝胶膏是由雪莲、川芎、姜黄、五倍子等 12 味药^[1]组成的复方制剂, 该方具有祛风燥湿、活血化淤、舒经活络等功效, 主要用于急、慢性风湿性关节炎、类风湿性关节炎及骨关节炎引起的关节疼痛等症。本实验采用正交试验设计, 以多种有效成分为指标优选出最佳提取工艺条件, 为研究复方雪莲风湿凝胶膏的质量控制提供基础, 为其临床应用提供理论依据。

1 仪器与材料

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津制造所); Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司); BP211D 型电子天平(sartorius); DZKW-型电热恒温水浴锅(北京市光明医疗仪器厂)。

本实验中所用的药材均由安徽亳州提供(由新疆维吾尔自治区药物研究所助理研究员何江鉴定); 姜黄素、蛇床子素和没食子酸对照品均由中国药品生物制品检定所提供(批号分别为 0823-9802、110822-200406、0831-9501, 供含量测定用)。甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司, 批号:

081495), 磷酸为分析纯(西安化学试剂厂, 批号: 0807021), 乙腈为色谱纯(天津市化学试剂三厂, 批号: 10071743), 冰醋酸为分析纯(天津市博迪化工有限公司), 水为超纯水。

2 方法与结果

采用正交试验设计, 对方中雪莲、独活、姜黄、川芎等 7 味药进行乙醇提取工艺研究, 以蛇床子素含量、姜黄素含量和浸出物得率为指标进行优选; 对土元和五倍子进行水提取工艺研究, 以没食子酸含量和浸膏得率为指标进行优选。

2.1 蛇床子素的含量测定^[2]

2.1.1 蛇床子素对照品溶液的制备 取蛇床子素对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 95%乙醇配制成蛇床子素质量浓度为 170 mg·L⁻¹的储备液, 吸取储备液 3.0 mL 至 25 mL 量瓶中, 加 95%乙醇稀释至刻度, 即得质量浓度为 20.40 mg·L⁻¹的蛇床子素对照品溶液。

2.1.2 色谱条件 Shimadzu VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(70:30);

基金项目: 自治区科技援疆项目(201091155)

作者简介: 薛桂蓬, 女, 助理研究员 Tel: (0991)2318172 E-mail: 667889116_xue@163.com

检测波长为 322 nm; 柱温为 30 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。分别测定样品、对照品和阴性样品(缺蛇床子), 色谱图见图 1。结果表明, 在此色谱条件下样品中其他成分对蛇床子素的测定无干扰。

2.1.3 蛇床子素标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mL, 依法稀释得系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件分别测定分析, 以对照品浓度为横坐标 *X*, 峰面积为纵坐标 *Y*, 得蛇床子素标准曲线, 结果见表 1。

2.2 姜黄素的含量测定^[3]

2.2.1 姜黄素对照品溶液的制备 取姜黄素对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成姜黄素质量浓度为 108 mg·L⁻¹ 的储备液, 吸取储备

液 5.0 mL 至 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得质量浓度为 21.60 mg·L⁻¹ 的姜黄素对照品溶液。

2.2.2 色谱条件 Shimadzu VP-ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-4%冰醋酸(48:52); 检测波长为 430 nm; 柱温为 30 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。分别测定样品、对照品和阴性样品(缺姜黄), 色谱图见图 1。结果表明, 在此色谱条件下样品中其他成分对姜黄素的测定无干扰。

2.2.3 姜黄素标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 10 mL, 依法稀释得系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10 μL, 按“2.2.3”项下色谱条件分别测定分析, 以对照品浓度为横坐标 *X*, 峰面积为纵坐标 *Y*, 得姜黄素标准曲线, 结果见表 1。

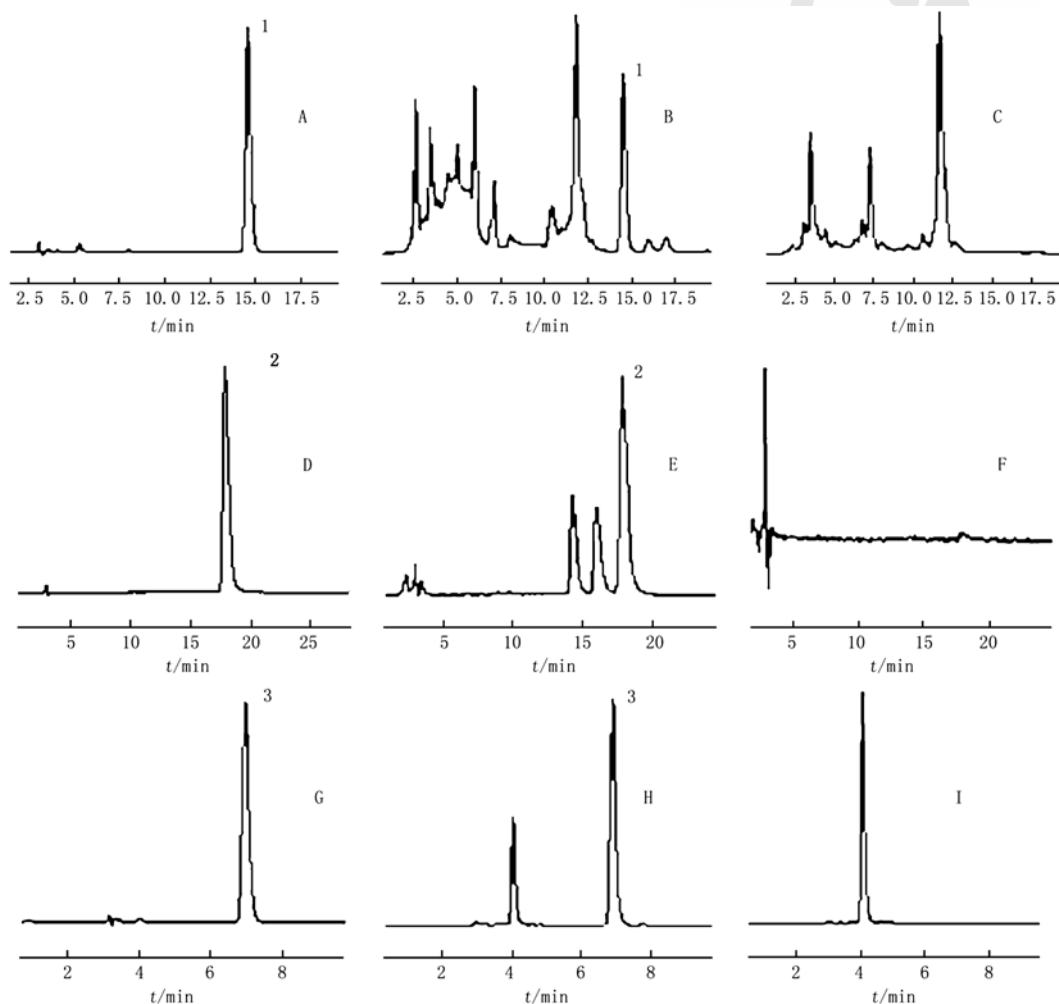


图 1 复方雪莲风湿凝胶膏中对照品、样品及阴性样品的 HPLC 图

A-蛇床子素对照; B、E、H-供试品; C-阴性(缺蛇床子); D-姜黄素对照; F-阴性(缺姜黄); G-没食子酸对照; I-阴性(缺五倍子); 1-蛇床子素; 2-姜黄素; 3-没食子酸。

Fig 1 HPLC chromatograms

A-osthole control; B, E, H-sample; C-negative control (without osthole); D-curcumin control; F-negative control (without curcumin); G-gallic acid control; I-negative control (without gallic acid); 1-osthole; 2-curcumin; 3-gallic acid

2.3 没食子酸的含量测定^[4-6]

2.3.1 没食子酸对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇制成没食子酸质量浓度为 491 mg·L⁻¹ 的储备液,吸取储备液 2.0 mL 至 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,即得质量浓度为 39.28 mg·L⁻¹ 的没食子酸对照品溶液。

2.3.2 色谱条件 Shim-pack ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸(15:85); 检测波长为 273 nm; 柱温为 30 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。分别测定样品、对照品和阴性样品(缺五倍子), 色谱图见图 1。结果表明, 在此色谱条件下样品中其他成分对没食子酸的测定无干扰。

2.3.3 没食子酸标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液 1, 3, 5, 7, 10 mL, 依法稀释得系列对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10 μL, 按“2.3.2”项下色谱条件分别测定分析, 以对照品浓度为横坐标 X, 峰面积为纵坐标 Y, 得没食子酸标准曲线, 结果见表 1。

表 1 各指标标准曲线方程(n=5)

Tab 1 Standard curve equations(n=5)

对照品	标准曲线方程	线性范围/mg·L ⁻¹	r
蛇床子素	$Y=3.59 \times 10^4 X + 1.3 \times 10^3$	2.040~20.40	0.999 7
姜黄素	$Y=7.76 \times 10^4 X + 8.4 \times 10^3$	2.160~21.60	0.999 8
没食子酸	$Y=4.13 \times 10^4 X - 4.3 \times 10^3$	3.928~39.28	0.999 7

2.4 浸膏收率的测定

精密量取各个正交试验号的醇提液 50 mL, 置蒸发皿中干燥至恒重, 水浴挥干, 于 105 ℃干燥至恒重后于干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称重。

2.5 供试品溶液的制备

分别按 L₉(3⁴)正交设计表对样品进行提取, 提取液稀释后过 0.45 μm 滤膜, 即得供试品的测定溶液。

2.6 7 味药提取工艺的优选

2.6.1 正交试验设计^[7-8] 根据处方 7 味药材的有效成分的作用, 选取蛇床子素和姜黄素含量及浸膏得率为考察指标, 在单因素试验基础上确定提取次数为 3 次, 进一步采用 L₉(3⁴)正交表进行试验, 试验因素水平见表 2。

2.6.2 正交试验结果与分析 试验结果采用综合评分法进行分析(权重系数分别为 0.4, 0.4, 0.2), 结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 7 味药材提取正交设计因素水平

Tab 2 Factors and levels for orthogonal test

水平	因素		
	A 乙醇浓度/%	B 提取时间/h	C 加醇量/倍
1	65	1	10
2	80	1.5	12
3	95	2	14

表 3 7 味药材提取工艺的正交试验

Tab 3 Results of orthogonal test

No.	A	B	C	D	蛇床子素	姜黄素	浸膏	综合
					含量/ mg·g ⁻¹	含量/ mg·g ⁻¹	得率/ %	
1	1	1	1	1	5.61	5.80	26.17	85.33
2	1	2	2	2	5.87	6.01	26.57	88.32
3	1	3	3	3	6.05	6.20	26.79	90.60
4	2	1	2	3	6.43	6.47	24.32	92.54
5	2	2	3	1	6.69	6.54	24.57	94.62
6	2	3	1	2	6.61	6.42	24.45	93.41
7	3	1	3	2	6.89	6.98	12.39	89.25
8	3	2	1	3	6.71	6.71	12.52	86.73
9	3	3	2	1	6.87	6.75	12.65	87.98

注: 综合评分=蛇床子素含量/蛇床子素最大含量×40+姜黄素含量/姜黄素最大含量×40+浸膏得率/最大浸膏得率×20

Note: Comprehensive score=content of osthole/maximum osthole content×40+content of curcumin/maximum curcumin content×40+yield of extraction/ maximum extraction×20

表 4 方差分析表

Tab 4 Variance analysis of orthogonal test

变异来源	SS	V	MS	F	P
A	60.28	2	30.14	37.95	<0.05
B	3.96	2	1.98	2.49	
C	13.77	2	6.88	8.67	
D	1.59	2	0.79		
总变异	79.59	8			

注: F_{0.05}(2,2)=19.00

Note: F_{0.05}(2,2)=19.00

由方差分析结果可知, 因素 A 对综合指标的影响有显著性, 结合其极差分析, 选取 A₂ 水平; B、C 对指标影响均无显著性, 水平可任选, 综合分析以 A₂B₁C₁ 组合为佳, 即 10 倍量 80%乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.6.3 验证试验 按优选的工艺条件制备 3 批样品进行验证试验, 结果表明, 蛇床子素含量为 7.32 mg·g⁻¹, RSD 1.6%; 姜黄素含量为 6.31 mg·g⁻¹, RSD 2.2%; 浸膏得率为 24.22%; RSD 1.8%。与正交试验结果吻合, 证明最佳提取工艺合理、稳定可行。

2.7 2味药提取工艺的优选

2.7.1 正交试验设计 根据药物性质及单因素考察结果,以没食子酸含量和浸膏得率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。试验因素水平见表5。

2.7.2 正交试验结果与分析 采用综合评分法分析试验结果(权重系数分别为0.8,0.2),结果见表6,方差分析见表7。

表5 2味药材提取正交设计因素水平

Tab 5 Factors and levels for orthogonal test

水平	因素		
	A 提取时间/h	B 提取次数/次	C 加水量/倍
1	1.5	1	10
2	2.0	2	12
3	2.5	3	14

表6 2味药材提取工艺的正交试验

Tab 6 Results of orthogonal test

No.	A	B	C	D	没食子酸 含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	浸膏得率 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	244.21	45.89	75.01
2	1	2	2	2	252.30	46.14	76.97
3	1	3	3	3	288.21	47.73	85.89
4	2	1	2	3	280.80	45.15	83.12
5	2	2	3	1	317.09	46.43	92.00
6	2	3	1	2	309.36	47.29	90.57
7	3	1	3	2	329.17	47.89	95.37
8	3	2	1	3	320.53	47.46	93.21
9	3	3	2	1	347.80	48.72	100.00

注: 综合评分=没食子酸含量/没食子酸最大含量 $\times 80$ +浸膏得率/最大浸膏得率 $\times 20$

Note: Comprehensive score=content of gallic acid/maximum gallic acid content $\times 80$ +yield of water extraction/maximum water extraction $\times 20$

表7 方差分析

Tab 7 Variance analysis of orthogonal test

变异来源	SS	V	MS	F	P
A	429.98	2	214.99	96.50	<0.05
B	89.53	2	44.77	20.09	<0.05
C	42.68	2	21.34	9.58	
D	4.46	2	2.23		
总变异	566.65	8			

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由方差分析结果可知,因素A、B对综合指标的影响均有显著性,结合其极差分析,选取 A_3 、 B_3 、 C_3 水平;由于C对指标影响无显著性,综合分析以 $A_3B_3C_1$ 组合为佳,即10倍量水,提取3次,每次2.5 h。

2.7.3 验证试验 按优选的工艺条件制备3批样品进行验证试验,结果表明,没食子酸含量为 $331.27 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 1.9%;浸膏得率为48.46%; RSD 2.5%。与正交试验结果吻合,证明最佳提取工艺合理、稳定可行。

3 讨论

本方由12味药组成,剂型为凝胶膏剂,其中部分药材采用打粉后直接入药,而9味药采用不同的溶剂进行提取,根据方中每味药功能主治的有效成分性质进行选择。其中雪莲、独活、姜黄、川芎等7味药的有效成分蛇床子素、姜黄素、川芎嗪和阿魏酸皆溶于乙醇,因此这7味药选择醇提。土元和五倍子中没食子酸等成分为水溶性,因此采用水提取。

蛇床子素的含量测定^[9]首先采用了中国药典2010年版一部蛇床子项下含量测定条件,即流动相为乙腈-水(65:35),检测波长为322 nm,但由于复方中其他成分的影响,出现阴性干扰现象。因此通过参考相关文献尝试了改变流动相比例,更换为甲醇-水系统和甲醇-磷酸系统,最终确定流动相为甲醇-水(70:30),蛇床子素有较好的分离,峰形对称性好,检测方便、准确。在对姜黄素的含量进行测定时,发现姜黄中的有效成分姜黄素性质不稳定,见光易分解,在自然光照射下放置25 d后含量降低20%左右,因此在整个实验中应该避光操作。

本研究在单因素的基础上进一步安排正交试验,将方中有效成分充分提取出来,最终确定了适合工业化生产的提取条件。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典2010年版.一部) [S]. 2010: 295.
- [2] LIU X H, SUN W J, LI T. Determining the content of osthole from *Angelicae Pubescentis Radix* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(2): 212-213.
- [3] SHENG L Q, YAN J Z, LIANG W G. The study progress and general application of curcumin [J]. *West China Sci and Tech*(中国西部科技), 2006, 5(4): 14-15.
- [4] ZHANG D, ZHANG X Y, CAO W G, et al. Content analysis on total phenolic acid and gallic acid in *Ephorbia Helioscopia* L. in Chongqing [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 443-446.
- [5] CHEN M R, WANG H, YUAN H M, et al. Determination of gallic acid in leaf of liquidambar taiwaniana hance in different areas by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2010, 27(9): 840-842.
- [6] CAO W G, YAN X W, ZHANG D, et al. Determination of

- two Tannin compounds in Rheum Tanguticum Maxim. ex Balf. [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(3): 260-262.
- [7] ZHAO Y, XING J G, WANG X C H, et al. Optimization of extraction process for compound kaliziran gel with orthogonal design [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(9): 1130-1133.
- [8] WU F Q, LI L, WANG Z R. Optimization of *Scutellariae baicalensis* Georgi enzyme solution process condition with orthogonal design [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(1): 31-33.
- [9] LI X A, ZHANG J K, SHI M J, et al. Determination of osthole and imperatorin in compound Shajiziyou suppository by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2007, 29(10): 1453-1456.

收稿日期: 2011-05-13