

瑶族药风湿骨痛外擦酒的提取工艺和质量标准

游燕¹, 庞宇舟², 潘智¹, 黄丁英¹, 刘圆圆^{1*}, 易春霞¹

(1. 桂林市中医医院, 广西 桂林 541002; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:** 优选风湿骨痛外擦酒的提取工艺并制定其质量标准。**方法:** 采用 HPLC 测定姜黄素含量, 流动相乙腈-4% 冰乙酸溶液 (48:52), 检测波长 430 nm。以总固体量和姜黄素提取量的综合评分为指标, 通过正交试验考察浸泡时间、乙醇体积分数及用量对风湿骨痛外擦酒提取工艺的影响。采用 TLC 对方中当归、血风藤、姜黄、香加皮进行定性鉴别。**结果:** 姜黄素在 0.021 2~0.106 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率 97.81%。最佳提取工艺为加 10 倍 50% 乙醇浸泡 30 d。TLC 分离效果好, 斑点清晰, 阴性对照无干扰。**结论:** 该工艺稳定可行, 指标成分提取量高, 适用于风湿骨痛外擦酒的生产。建立的 TLC 能有效控制该产品质量。

[关键词] 瑶族药; 风湿骨痛外擦酒; 姜黄素; 质量标准

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0017-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010017

Extraction Technology and Quality Standard for Rheumatism Ostalgia Alcohols YOU Yan¹, PANG Yu-zhou², PAN Zhi¹, HUANG Ding-ying¹, LIU Yuan-yuan^{1*}, YI Chun-xia¹ (1. Guilin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guilin 541002, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of rheumatism ostalgia alcohols and establish its quality standard. **Method:** HPLC was adopted to determine the content of curcumin with mobile phase consisting of 4% glacial acetic acid-acetonitrile (52:48) and detection wavelength at 430 nm. With composite score of amounts of general solid and curcumin as index, orthogonal design was employed to optimize extraction technology of rheumatism ostalgia alcohols with soaking time, ethanol concentration and amount as factors. Angelicae Sinensis Radix, Ventilago Leiocarpae Radix et Caulis, Curcumae Longae Rhizoma and Acanthopanax Cortex were identified by TLC. **Result:** Curcumin showed a good linear relationship at a range of 0.021 2-0.106 μg with r of 0.999 8 and average recovery of 97.81%. Optimal extracting technology was: soaked 30 days with 10 times the amount of 50% ethanol. TLC spots were clear and the blank test showed no interference. **Conclusion:** This technology is stable feasible with high extraction amount of index ingredient, which is available for industrial production of rheumatism ostalgia alcohols. This established TLC can control quality of this preparation effectively.

[Key words] Yao medicine; rheumatism ostalgia alcohols; curcumin; quality standard

风湿骨痛外擦酒源自金秀瑶医医院的协定处方, 由下山虎、入山虎、紫九牛、小钻、双钩钻、鸭仔风、小散骨风、姜黄、桂枝等共 28 味药组成, 方中包括瑶药传统老班药中的两虎一牛两钻八风^[1-2], 功能祛风除湿、舒筋活络、消肿止痛, 用于治疗风湿骨痛、风湿痹症引起的各种腰腿痛, 疗效确切, 但由于缺乏制备工艺和质量标准的系统研究, 致使该制剂

一直未取得批准文号, 难以推广使用。处方中主药——姜黄的主要成分为姜黄素, 具有破气行血、通经止痛的功效, 治疗风湿痹痛效果明显^[3]。故本实验以姜黄素含量和总固体量为综合评价指标, 采用正交试验优选风湿骨痛外擦酒的提取工艺, 建立方中当归、血风藤、姜黄和香加皮的 TLC 检测, 以有效地控制该制剂质量, 保证临床用药安全, 为瑶族药的

[收稿日期] 20140418(018)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅中医药制剂类课题 (GZYZ-10-33)

[第一作者] 游燕, 硕士, 副主任中药师, 从事药品质量控制研究, Tel:0773-3603731, E-mail:1260803@qq.com

[通讯作者] * 刘圆圆, 硕士, 药师, 从事临床药学研究, Tel:0773-3603731, E-mail:275189113@qq.com

成方制剂注册提供实验资料。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),2XZ-2 型旋片真空泵(浙江黄岩求精真空泵厂),AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),101A-3B 型电热鼓风干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),SP-I 型手动点样器(上海科哲生化科技有限公司)。

下山虎、入山虎、紫九牛等药材均由金秀瑶医医院提供,经广西桂林食品药品检验所副主任药师钟明诚按药材质量标准^[4-9]项目检查鉴定为合格;风湿骨痛外擦酒(桂林市中医医院制剂室,批号 20121124,20121125,20121126),姜黄素、大黄素对照品及当归、姜黄、香加皮对照药材(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110823-201004,110756-200110,927-200010,121188-200502,121025-200503),硅胶板(青岛海洋化工厂),乙腈、甲醇为色谱醇,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取姜黄素对照品 5.3 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得。

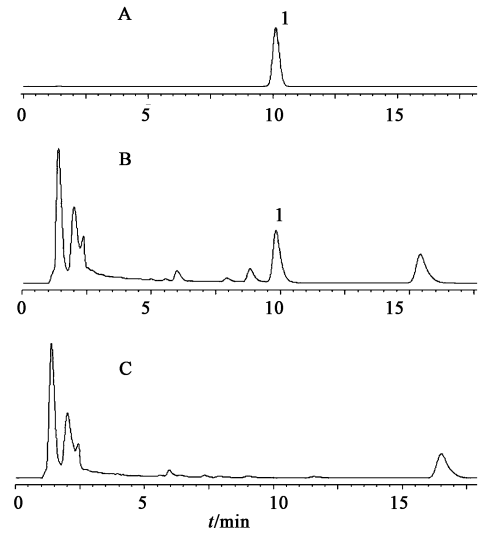
2.1.2 色谱条件 Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,4.6 μm),流动相乙腈-4% 冰乙酸溶液(48:52),检测波长 430 nm,流速 1 mL·min⁻¹,见图 1。

2.1.3 标准曲线制备 精密吸取姜黄素对照品溶液 2,4,6,8,10 μL,按 2.1.2 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 1.017 \times 10^{-5} X + 0.249$ ($r = 0.9998$),线性范围 0.0212 ~ 0.106 μg。

2.1.4 精密度试验 取姜黄素对照品溶液按 2.1.2 项下色谱条件连续进样 6 次,每次 5 μL,计算姜黄素峰面积的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 供试品与阴性样品溶液的制备 取风湿骨痛外擦酒 50 mL,水浴蒸干,残渣加甲醇 20 mL 使溶解,过滤,水浴蒸干,残渣用甲醇定容至 25 mL,得供试品溶液。取缺姜黄的阴性样品,按上述方法制备,得阴性样品溶液。

2.1.6 加样回收率试验 精密量取样品风湿骨痛外擦酒 6 份,每份 25 mL(姜黄素 26.88 mg·L⁻¹),加入 66.9 mg·L⁻¹姜黄素对照品溶液 10 mL,按 2.1.5 项下方法处理,按 2.1.2 项下色谱条件测定,计算回



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 姜黄素

图 1 风湿骨痛外擦酒 HPLC

Fig. 1 HPLC of rheumatism oostalgia alcohols

收率分别为 97.83%,98.76%,97.52%,99.22%,96.52%,96.99%,平均回收率 97.81%,RSD 1.0%。

2.2 总固体量的测定 精密量取供试品溶液 50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,置于 105 °C 干燥 3 h,移置干燥器中,冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算总固体量。

2.3 提取工艺优选 根据实际生产条件,采用乙醇冷浸法提取,选择乙醇体积分数、乙醇用量、浸泡时间为考察因素,称取处方量药材 58 g,共 9 份,以姜黄素含量和总固体量的综合评分为指标,权重系数分别为 0.6 和 0.4,采用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

由直观分析可知,各因素影响提取效果的顺序为 A > B > C。方差分析表明因素 A 对提取效果具有极显著性影响,因素 B 具有显著性影响,因素 C 则无显著性影响。结合实际生产考虑,确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₁,即加 10 倍量 50% 乙醇浸泡 30 d。

2.4 质量标准

2.4.1 当归 TLC 鉴别 量取风湿骨痛外擦酒 50 mL,加石油醚(60 ~ 90 °C)振摇提取 2 次,每次 50 mL,合并石油醚液,挥干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取缺当归的阴性样品,同法制成阴性样品溶液。取当归对照药材粉末(过 65 目筛)0.5 g,加乙醚 20 mL 超声 10 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。精密量取对照药材溶液 2 μL,供试品溶液和阴

性样品溶液各 5 μL 分别点于同一硅胶板上,以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂,展开,取出,晾干。在紫外光灯(365 nm)下检视,见图 2。结果显示供试

品在与对照药材色谱相应位置显相同颜色的斑点,而阴性样品溶液在此相应位置无斑点显示,说明阴性样品溶液对此鉴别无干扰。

表 1 风湿骨痛外擦酒提取工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis and visual analysis of extraction process of rheumatism ostalgia alcohols

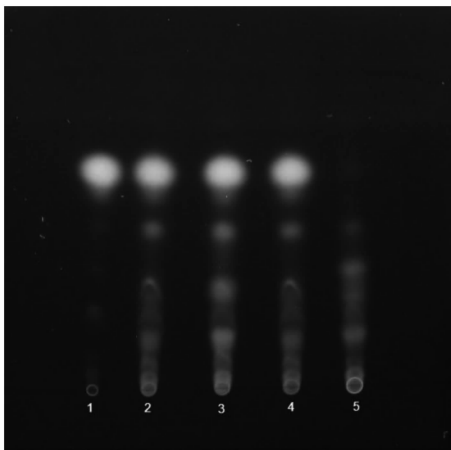
No.	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 浸泡时间/d	D(空白)	姜黄素/mg	总固体量/g	综合评分
1	40	6.5	30	1	7.91	8.06	84.89
2	40	8	45	2	8.56	8.10	90.43
3	40	10	60	3	8.98	8.16	93.31
4	50	6.5	45	3	9.49	7.32	90.70
5	50	8	60	1	9.49	7.50	93.00
6	50	10	30	2	10.12	7.92	97.33
7	60	6.5	60	2	6.05	5.51	61.86
8	60	8	30	3	6.73	5.88	68.68
9	60	10	45	1	7.94	6.22	76.32

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	1 052.28	526.14	288.69	<0.01
B	145.14	72.57	39.82	<0.05
C	15.16	7.58	4.160	>0.05
D(误差)	3.65	1.83		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$; $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。



1. 对照药材;2~4. 供试品;5. 阴性样品

图 2 当归 TLC

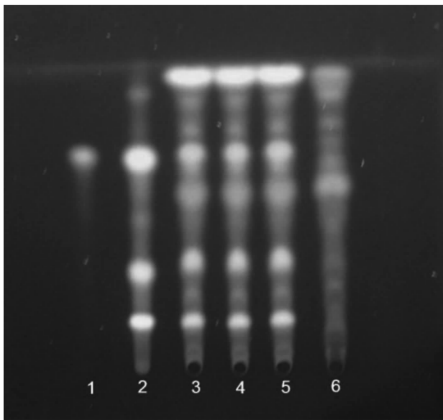
Fig. 2 TLC of Angelicae Sinensis Radix

2.4.2 血风藤 TLC 鉴别 取 2.4.1 项下供试品溶液。取缺血风藤的阴性样品,同法制成阴性样品溶液。精密称取大黄素对照品适量,加甲醇制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。取血风藤对照药材粉末(过 65 目筛)1 g,加甲醇 20 mL 超声处理 30 min,滤

过,作为对照药材溶液。精密量取对照品溶液、对照药材溶液各 2 μL,供试品溶液和阴性样品溶液各 15 μL 分别点于同一硅胶板上,以石油醚(60 ~ 90 °C)-甲酸乙酯-甲酸(15:9:1)为展开剂,展开,取出,晾干。氨蒸气熏后在可见光下观察,结果发现供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应位置显橙色斑点,而阴性样品在此相应位置无斑点显示,说明阴性样品溶液对此鉴别无干扰。

2.4.3 姜黄 TLC 鉴别 取风湿骨痛外擦酒 50 mL,加乙醚 100 mL 分 2 次萃取,合并乙醚液,水浴蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取缺姜黄的阴性样品,同法制成阴性样品溶液。精密称取姜黄素对照品适量,加甲醇制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。取姜黄对照药材粉末(过 65 目筛)0.2 g,加入无水乙醇 20 mL,振摇,放置 30 min,滤过,水浴蒸干,残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。精密量取对照品溶液 2 μL 和供试品、阴性样品、对照药材溶液各 4 μL 分别点于同一硅胶板上,以三氯甲烷-甲醇-甲酸(96:4:0.7)为展开剂,展开,取出,晾干。在紫外光灯(365 nm)下检视,见图 3。结果显示供试品色谱中,在与对照品和对照药材色谱相应位置显相同颜色的斑点,而阴性样品溶液在此相应位置无斑点显示,说明阴性样品溶液对此鉴别无干扰。

2.4.4 香加皮 TLC 鉴别 取 2.4.1 项下供试品溶液。取缺香加皮的阴性样品,同法制成阴性样品溶液。取香加皮对照药材粉末(过 65 目筛)2 g,用甲醇 30 mL 加热回流 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加



1. 姜黄素对照品;2. 对照药材;3~5. 供试品;6. 阴性样品

图3 姜黄 TLC

Fig. 3 TLC of *Curcuma Longae Rhizoma*

甲醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。取对照药材溶液 2 μ L 和供试品、阴性样品溶液各 15 μ L 分别点于同一硅胶板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯-冰乙酸(20:3:0.5)作为展开剂,展开,取出,晾干,喷二硝基苯肼试液。结果显示供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置显相同颜色斑点,而阴性样品溶液在此相应位置无斑点显示,说明阴性样品溶液对此鉴别无干扰。

3 讨论

目前酒剂的制备常采用浸渍法、回流法和渗漉法^[10]。回流法不适宜提取热不稳定性药材;渗漉法对原材料颗粒有一定要求,颗粒太细,渗漉速度太慢,颗粒太粗,提取效率差。方中多为民族药材,药用部位有根、根茎、藤茎、全草,药材颗粒不好控制,综合考虑,选择冷浸法提取,符合医院制剂的生产实际。

姜黄为方中主药,功能活血行气、通经止痛,临床用于治疗风湿痹证^[11],姜黄素为其主要有效成分^[12]。本文采用 HPLC 测定风湿骨痛外擦酒中姜黄素含量,该方法准确灵敏、无干扰、重复性好,适合作为评价指标。方中多数民族药材的有效成分并不确定,故选取总固体量代表总醇溶性成分含量^[13],

作为制剂的质量控制指标,能更加全面地评价总体提取效率。该制剂处方复杂,干扰成分较多,其中血风藤的活性成分为大黄素^[6],该成分常采用酸水解后提取,本文比较了乙醚萃取法和酸水解法,结果发现直接萃取法简便且分离效果更好。

[参考文献]

- [1] 覃迅云,罗金裕,高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京:民族出版社,2002:37-159.
- [2] 李彤,陈浪,闫国跃,等. 瑶医“老班药”的历史沿革研究[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(4):38-39.
- [3] 李琦,金剑,许颖. 姜黄素的药理作用及其临床应用进展[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(12):1366-1368.
- [4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区中药饮片炮制规范[S]. 南宁:广西科学技术出版社,2007:86-118.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:36-259.
- [6] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准. 一卷[S]. 南宁:广西科学技术出版社,2008:106.
- [7] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准. 二卷[S]. 南宁:广西科学技术出版社,2011:31-312.
- [8] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准. 第2册[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1996:103-105.
- [9] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:6.
- [10] 战渤玉,车绪凤,尉炳超. 中药酒剂的研究进展[J]. 中医药信息,2010,27(3):120-122.
- [11] 涂燕华,孙连娜. 姜黄素与类风湿性关节炎的相关实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):310-314.
- [12] 肖长坤. 姜黄属植物的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):339-347.
- [13] 王伯涛. 含糖、蜜酒剂【总固体】测定方法的讨论[J]. 中国药品标准,2004,5(5):23-24.

[责任编辑 刘德文]