

## 疱疹康喷雾剂提取工艺考察

吴桂芳<sup>1</sup>, 冯素香<sup>2</sup>, 黄天山<sup>1</sup>, 牛德兴<sup>3</sup>, 梁生旺<sup>1\*</sup>

(1. 广东药学院 中药学院, 广州 510006; 2. 河南中医学院 药学院, 郑州 450008;  
3. 郑州德兴保健品公司, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 优选疱疹康喷雾剂的提取工艺。方法: 以盐酸小檗碱含量和出膏率的综合评分为指标, 通过正交试验考察提取时间、提取次数、加水量对水提工艺的影响。以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚总含量和出膏率的综合评分为指标, 利用正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、提取次数、乙醇用量对醇提工艺的影响。采用 HPLC 测定盐酸小檗碱及 5 个大黄苷元的含量。结果: 最佳水提工艺为加 12 倍量水提取 3 次, 每次 75 min; 盐酸小檗碱质量分数 6.07%。最佳醇提工艺为加 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次, 每次 75 min; 5 个大黄苷元总质量分数 1.96%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 适用于疱疹康喷雾剂的工业化生产。

**[关键词]** 疱疹康喷雾剂; 盐酸小檗碱; 芦荟大黄素; 大黄苷元; 综合评分

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0030-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100030

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150401.0918.003.html>

**[网络出版时间]** 2015-04-01 9:18

**Optimization of Extraction Process for Paozhenkang Spray** WU Gui-fang<sup>1</sup>, FENG Su-xiang<sup>2</sup>, HUANG Tian-shan<sup>1</sup>, NIU De-xing<sup>3</sup>, LIANG Sheng-wang<sup>1\*</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 3. Zhengzhou Dexing Health Care Products Company, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Paozhenkang spray. **Method:** Taking composite score of the content of berberine hydrochloride and dry extract rate as index, orthogonal test was adopted to investigate influence of extraction time, extraction times, the amount of water on water extraction process. With composite score of the total content of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion and dry extract rate as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol extraction process by taking ethanol concentration, alcohol amount, extraction time and times as factors. Contents of berberine hydrochloride and five aglycones from Rhei Radix et Rhizoma were determined by HPLC. **Result:** Optimun water extraction process consisted of adding 12-fold of waters, decocting 3 times, 90 min for each time, the content of berberine hydrochloride was 6.07%. Optimun alcohol extraction process was as following: refluxing extracted twice with 10-fold of 75% ethanol, 75 min for each time; the total content of five aglycones was 1.96%. **Conclusion:** These optimized extraction processes are stable and feasible for industrial production of Paozhenkang spray.

**[Key words]** Paozhenkang spray; berberine hydrochloride; aloe-emodin; aglycones from Rhei Radix et Rhizoma; composite score

疱疹康喷雾剂处方源于临床经验方, 由大黄、黄连、白芷、五倍子等 11 味中药组成, 具有抗带状疱疹病毒作用, 能促进带状疱疹、褥疮和湿疹康复, 并缓

解由此引起的神经痛<sup>[1]</sup>。方中大黄的主要疗效成分为蒽醌类衍生物, 取其抗病原微生物及抗炎作用。研究表明大黄对流感、风疹、肝炎等病毒均具有抗病

**[收稿日期]** 20140804(003)

**[第一作者]** 吴桂芳, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 15975477170, E-mail: keeptime2012@sina.com

**[通讯作者]** \* 梁生旺, 教授, 从事中药质量控制研究, Tel: 020-39352172, E-mail: swliang371@163.com

毒作用<sup>[2]</sup>,对幽门螺杆菌、白色念球菌、新生隐球菌、曲霉菌、青春型双歧杆菌等有很好的抗菌作用<sup>[3-5]</sup>。最新研究发现大黄素在体内外均具有显著的抗单纯疱疹病毒作用<sup>[6]</sup>。方中黄连作为古老抗菌药,抗菌谱广,对很多病毒有抑制作用<sup>[7]</sup>。根据方中各药材的药效成分性质等,将处方药材分为水提部分和醇提部分,水提部分以盐酸小檗碱含量为指标,醇提部分以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚5个大黄苷元的含量为指标,采用正交试验优选疱疹康喷雾剂水提部分及醇提部分的提取工艺,为该制剂的工业化生产提供参考。

### 1 材料

1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),MS105DU型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司)。大黄、黄连、白芷、五倍子等药材(郑州德兴保健品公司,经河南中医学院陈随清教授鉴定均符合2010年版《中国药典》一部相关项下规定),盐酸小檗碱、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110713-201212,110795-201007,110757-200206,110756-200110,110796-201118,110758-201114),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 盐酸小檗碱的含量测定<sup>[8]</sup>

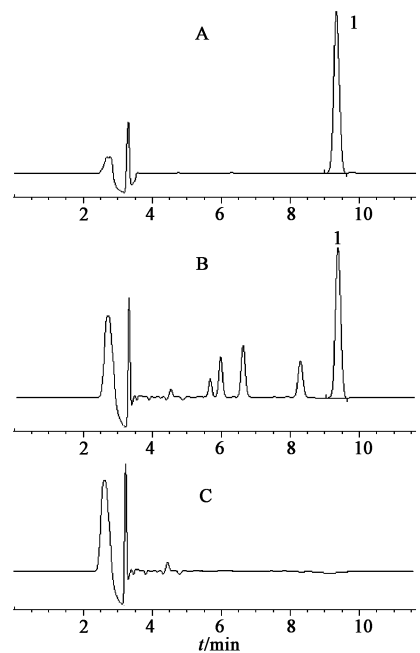
**2.1.1 色谱条件** 博纳艾杰尔 XBP C<sub>18</sub>(L)色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,流动相乙腈-水-冰乙酸-三乙胺(28:70:1:1),检测波长 265 nm,见图 1。

**2.1.2 标准曲线的制备** 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,分别加甲醇制成 79.07 mg · L<sup>-1</sup>对照品溶液。精密吸取该溶液 2, 6, 10, 14, 16, 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程  $Y = 28.037X - 0.137$  ( $R^2 = 1.000$ ),线性范围 0.158 ~ 1.581 μg。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密吸取水提液 5 mL 至 50 mL 量瓶中,用 1% 盐酸甲醇溶液定容至刻度,混匀后用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.1.4 精密度试验** 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,计算盐酸小檗碱峰面积积分值的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 精密吸取 10 μL 按 2.1.1 项下色谱条



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 盐酸小檗碱

图 1 疱疹康喷雾剂水提液 HPLC

Fig. 1 HPLC for water extract of Paozhenkang spray

件测定,计算盐酸小檗碱峰面积积分值的 RSD 1.1%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.1.6 加样回收率试验** 精密吸取已知含量的水提液 6 份,每份 1 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加入 79.07 mg · L<sup>-1</sup> 盐酸小檗碱对照品溶液 5 mL,加 1% 盐酸甲醇溶液定容至刻度,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率 101.3%,RSD 1.2%,表明该方法准确度较好。

**2.2 水提工艺优选<sup>[9]</sup>** 选择提取时间、提取次数、加水量为考察因素,以盐酸小檗碱质量分数和出膏率的综合评分为指标,权重系数分别为 60, 40。按处方比例称取各药材 9 份,每份 48 g,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,加一定量水回流提取,提取液定容至 2 L 量瓶中,得 1~9 号水提液。精密吸取 1~9 号水提液各 10 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算出膏率。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素影响水提工艺的顺序为 B > A > C。方差分析表明因素 B 具有显著性影响,因素 A, C 均无显著性差异,故选择最佳水提工艺组合 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即加 12 倍量水回流提取 3 次,每次 75 min。称取水提部分药材 4 份,每份约 48 g,按最佳提取工艺条件进行验证试验,结果盐酸小檗碱平均质量分数 6.07%,表明该工艺合理可行。

表 1 疱疹康喷雾剂水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of water extraction process of Paozhenkang spray

No.	A 加水量 /倍	B 煎煮数 /次	C 煎煮 时间 /min	盐酸小檗碱 (W)/%	出膏率 (Y)/%	综合 评分 /分
1	8	2	45	3.991	38.750	69.025
2	8	2	60	4.137	40.188	71.586
3	8	3	75	5.701	56.125	99.180
4	10	2	60	4.658	45.250	80.602
5	10	2	75	4.848	47.104	83.896
6	10	3	45	5.506	52.917	94.869
7	12	2	75	5.448	53.500	94.683
8	12	2	45	4.723	45.813	81.678
9	12	3	60	5.783	55.354	99.482

注:综合评分 =  $W/W_{max} \times 60 + Y/Y_{max} \times 40$  (表 3 同)。

表 2 水提工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of water extraction process

方差来源	SS	MS	F	P
A	217.044	108.522	12.364	>0.05
B	627.816	313.908	35.765	<0.05
C	194.721	97.361	11.093	>0.05
D(误差)	17.55	8.775		

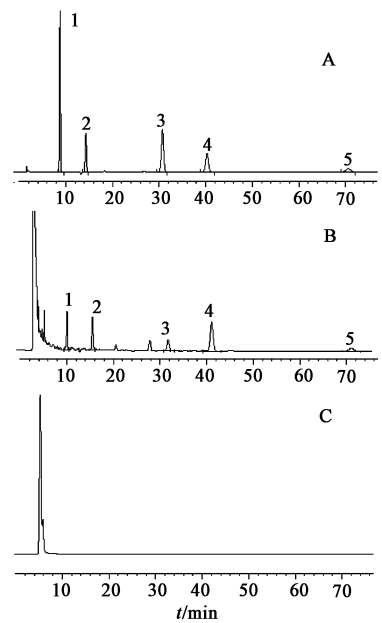
注: $F_{0.05}(2,2) = 19$  (表 4 同)。

### 2.3 醇提液中指标成分的含量测定<sup>[8]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 博纳艾杰尔 XBP C<sub>18</sub> (L) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 流动相甲醇-0.1% 磷酸水 (68:32), 检测波长 254 nm, 见图 2, 各色谱峰的分离度均 > 1.6。

**2.3.2 标准曲线的制备** 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 分别加甲醇制成单一对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液各 2 mL, 混匀, 得每 1 mL 分别含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 17.88, 17.20, 16.56, 7.999 8, 8.862 2 μg 的混合对照品溶液。精密吸取该混合对照品溶液 2, 6, 10, 14, 16, 20 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以峰面积积分为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程分别为  $Y = 6.233X - 23.952$  ( $r = 0.999 6$ ),  $Y = 2.392X - 2.844$  ( $r = 0.999 6$ ),  $Y = 5.103X - 35.369$  ( $r = 0.999 6$ ),  $Y = 5.914X - 23.266$  ( $r = 0.999 5$ ),  $Y = 1.510X - 1.332$  ( $r = 0.999 6$ ), 线性范围依次为 0.035 8 ~ 0.358, 0.034 4 ~ 0.344, 0.033 1 ~ 0.331, 0.016 ~ 0.160, 0.017 7 ~ 0.177 μg。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密吸取醇提液 10 mL 至平底烧瓶中, 蒸干, 加 10% 盐酸溶液 20 mL 使溶解, 超声 5 min, 加入乙酸乙酯 20 mL, 加热回流



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄酚; 5. 大黄素甲醚

图 2 疱疹康喷雾剂醇提液中指标成分 HPLC

Fig. 2 HPLC for five aglycones from Rhei Radix et Rhizoma in alcohol extract of Paozhenkang spray

75 min, 放冷, 置分液漏斗中, 加乙酸乙酯 40 mL 洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取乙酸乙酯层, 酸液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.3.4 精密度试验** 精密吸取 5 个大黄苷元混合对照品溶液各 10 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件进样, 重复 6 次, 计算 5 个大黄苷元总峰面积积分值的 RSD 均 < 2.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.5 稳定性试验** 取同一醇提液, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 取 10 μL 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算 5 个大黄苷元峰面积积分值的 RSD 均 < 1.2%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.3.6 加样回收率试验** 精密吸取同一醇提液 6 份, 每份 5 mL, 各加入 5 个大黄苷元的混合对照品溶液 2 mL, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算 5 个苷元总含量的平均回收率 99.6%, RSD 1.0%, 表明该方法准确度良好。

**2.4 醇提工艺优选<sup>[9]</sup>** 以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的总质量分数和出膏率的综合评分为指标, 选择乙醇体积分数、提取时间、提取次数、乙醇用量为考察因素, 按 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交表进

行试验。按处方比例称取各醇提药材 9 份,每份 72 g,加一定量溶剂回流提取,提取液定容至 2 L 量瓶中,得醇提取液。试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。各因素对醇提工艺影响顺序为  $A > B > C > D$ 。以极差最小的  $D$  因素为误差项进行方差分析,结果发现因素  $A$  具有显著性影响,因素  $B, C$  则均无显著性影响,水平可根据实际情况选取。确定最佳

提取工艺条件为  $A_3B_3C_3D_1$ ,即选取醇提部分药材粗颗粒,加 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 75 min。按处方比例称取醇提部分药材约 72 g,共 4 份,分别按最佳提取工艺条件进行验证试验,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的总质量分数平均值 1.96%,  $RSD < 1.5%$ ,表明优选的醇提工艺合理可行。

表 3 疱疹康喷雾剂醇提工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of alcohol extraction process of Paozhengkang spray

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /min	D 提取数 /次	5 个大黄苷元总量 (W)/%	出膏率 (Y)/%	综合评分 /分
1	45	6	45	2	1.383	42.639	78.544
2	45	8	60	2	1.419	43.750	80.589
3	45	10	75	3	1.566	48.278	88.934
4	60	6	60	3	1.575	48.556	89.446
5	60	8	75	2	1.574	48.528	89.391
6	60	10	45	2	1.617	49.861	91.839
7	75	6	75	2	1.761	53.306	99.284
8	75	8	65	3	1.670	51.500	94.852
9	75	10	45	2	1.729	54.278	98.910

表 4 醇提工艺方差分析

Table 4 Variance analysis of alcohol extraction process

方差来源	SS	MS	F	P
A	337.729	168.864	45.492	<0.05
B	42.291	21.145	5.697	>0.05
C	27.041	13.521	3.642	>0.05
D(误差)	7.424	3.712	1.000	

### 3 讨论

本处方原工艺采用水煎煮法,煎煮液浓缩后加适量乙醇防腐,已取得了一定的临床疗效。本着尽可能将药材有效成分提取出来的原则,将方中药材大致分为水提部分和醇提部分,预试验显示醇提液中黄连中盐酸小檗碱的含量偏低,可能是因为其他成分与盐酸小檗碱会生成沉淀,且水提部分药材中无可进行含量测定的指标性成分,故将黄连调至水提部分,并将盐酸小檗碱作为水提部分的指标成分。

醇提液的供试品原处理方法是采用冰乙酸和 25% 盐酸对样品进行酸水解,利用三氯甲烷萃取,测得样品中 5 个大黄苷元的总含量很低,转移率约 50%,但大黄素含量偏高。参考 2010 年版《中国药典》中大黄药材的供试品处理方法,采用正交试验对盐酸浓度、回流时间、萃取溶剂进行考察,结果发现利用乙酸乙酯作萃取溶剂,5 个大黄苷元的含量较采用三氯甲烷的要高,5 个大黄苷元在选择乙酸乙酯和三氯甲烷作溶剂时的含量亦各有不同。同时盐酸浓度也对 5 个成分的含量具有一定影响。

### [参考文献]

[1] 牛德兴,牛瀚医,薛淑芳. 疱疹康治疗急性带状疱疹 500 例临床总结[J]. 亚太传统医药,2007(6):60-62.

[2] 杨宏博,冯平,李宝才. 大黄抗病毒作用的研究进展[J]. 华西药学杂志,2009,24(4):428-430.

[3] Ibrahim M, Khan A A, Tiwari S K, et al. Antimicrobial activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts against *H pylori*: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(44):7136-7142.

[4] Agarwal S, Singh S S, Verma S, et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi* [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72(1/2):43-46.

[5] Wang J, Zhao H, Kong W, et al. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis* [J]. Phytomedicine, 2010, 17(8/9):684-689.

[6] Xiong H R, Luo J, Hou W, et al. The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of *Rheum tanguticum*, against herpes simplex virus *in vitro* and *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2):718-723.

[7] 李航,李小芳,李娜,等. 星点设计-效应面法优化黄连提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):52-55.

[8] 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,2010:22,285.

[9] 方芳,宋英,李圆圆,等. 正交试验优选糖郁舒颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3):24-27.

[责任编辑 刘德文]