

多指标综合评分法优选敷胸巴布贴醇提工艺

韩毅, 于艳, 王雪峰*, 吴振起, 马明悦, 周旭
(辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 优选敷胸巴布贴的醇提工艺。方法: 以大黄素、黄芩苷、桑辛素含量及浸膏得率的综合评分为指标, 利用正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间及提取次数对敷胸巴布贴醇提工艺的影响。采用 HPLC 测定大黄素及黄芩苷含量, 流动相分别为甲醇-0.4% 磷酸溶液(80:20), 甲醇-0.4% 磷酸溶液(47:53), 检测波长分别为 254, 280 nm。采用紫外分光光度法测定桑辛素含量。结果: 最佳醇提工艺为加 6 倍量 75% 乙醇提取 2 次, 每次 3 h。大黄素、黄芩苷、桑辛素质量分数及浸膏得率分别为 0.19%, 3.61%, 0.51%, 31.19%。结论: 优选的提取工艺合理可行, 有效成分提取效率高。

[关键词] 敷胸巴布贴; 大黄素; 黄芩苷; 桑辛素; 多指标综合评分法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120005

Optimization of Ethanol Extraction Process for Fuxiong Cataplasms by Multi-index Comprehensive Scoring Method HAN Yi, YU Yan, WANG Xue-feng*, WU Zhen-qi, MA Ming-yue, ZHOU Xu (The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol extraction process of Fuxiong cataplasms. **Method:** With dry extract yield and contents of emodin, baicalin, morusin as indexes, orthogonal design was carried out for optimizing extraction process by taking the concentration and amount of ethanol, extracting time and times as factors, optimum process was determined by taking composite score for condition. Contents of emodin and baicalin were determined by HPLC, mobile phases were consisted of methanol-0.4% phosphoric acid (80:20) and (47:53), detection wavelengths were 254 nm and 280 nm, respectively. The content of morusin was determined by UV spectrophotometry. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: extracted twice with 6 times the amount of 75% ethanol for 3 h of each time. Dry extract yield and contents of emodin, baicalin, morusin were 31.19%, 0.19%, 3.61% and 0.51%, respectively. **Conclusion:** This optimized extraction technology is rational with high extraction rates of active components.

[Key words] Fuxiong cataplasms; emodin; baicalin; morusin; multi-index comprehensive scoring method

敷胸巴布贴是辽宁中医药大学附属医院根据“内病外治”、“脏病治腹”的中医理论,在敷胸散的基础上,研制而成的巴布贴剂。巴布贴剂克服了原外敷散存在的有效成分利用率低、易过敏、制备工艺不规范、无统一质量标准等问题。该方由大黄、黄芩、桑白皮、芒硝等 6 味中药组成,用于治疗肺炎迁延不愈、肺部啰音不易吸收等^[1]。大黄主要含有蒽醌类成分,黄芩和桑白皮主要含有黄酮类成分,这 2

种有效成分都具有明显的抗病毒、抑菌、抗炎作用^[2-3],而且均主要以脂溶性为主^[4-5]。本实验以大黄中大黄素、黄芩中黄芩苷、桑白皮中桑辛素含量及浸膏得率为综合评价指标,选取乙醇为溶媒,通过正交设计优化敷胸巴布贴的提取工艺,为该制剂的工业化生产提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

[收稿日期] 20141010(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273800)

[第一作者] 韩毅,副主任药师,从事中药制药技术研究, Tel:024-31961931, E-mail:hanye260150@sina.com

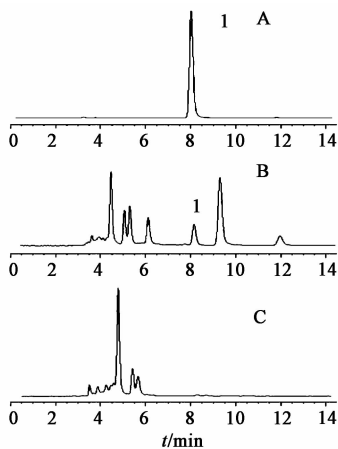
[通讯作者] *王雪峰,教授,博士生导师,从事病毒性疾病及瘫痪性疾病防治, Tel:024-31961480, E-mail:lnzywxf@163.com

司),UV-1200型紫外-可见分光光度计(上海美析仪器有限公司),E-240型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。大黄、黄芩、桑白皮等药材均购自辽宁省药材公司,经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,均符合《中国药典》2010年版一部^[6]相应项下规定;大黄素、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为0756-200110,110715-200815),桑辛素对照品(中国科学院成都生物研究所,批号760706,纯度 $\geq 98.0\%$),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大黄素的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.4%磷酸溶液(80:20),检测波长254 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量10 μL,见图1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 大黄素

图1 敷胸巴布贴中大黄素 HPLC

Fig.1 HPLC of emodin in Fuxiong cataplasms

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品适量,加甲醇制成0.162 g·L⁻¹对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取本品浸膏粉约0.1 g,置圆底烧瓶中,精密加入三氯甲烷25 mL和2.5 mol·L⁻¹硫酸溶液20 mL,置80℃水浴中回流2 h,冷却置室温,分取三氯甲烷液,精密量取10 mL,蒸干,残渣加甲醇使溶解,转移至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 称取除大黄外的药材,按一定工艺条件制备不含大黄的浸膏粉,按2.1.3项下方法制备阴性样品溶液。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取大黄素对照品溶液1 mL置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,

分别精密吸取该溶液4,8,12,16,20,24 μL,按2.1.1项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 3\,579.5X - 3.453$ ($r = 0.9999$),线性范围0.0648~0.3888 μg。

2.1.6 精密度试验 精密吸取大黄素对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件连续进样6次,计算峰面积的RSD 0.5%,表明仪器精密度良好。

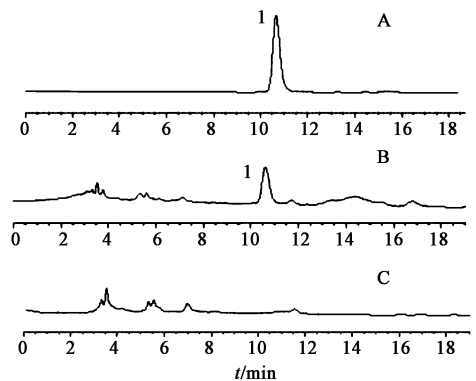
2.1.7 重复性试验 按处方比例称取药材各6份,按处方比例及一定工艺条件制备浸膏粉,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,结果大黄素峰面积的RSD 1.1%,表明该方法重复性较好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在0,6,12,18,24 h后按2.1.1项下色谱条件测定,计算大黄素峰面积的RSD 0.7%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.9 加样回收率试验 分别精密称取已知大黄素含量的浸膏粉9份,每份约0.05 g,均分为3组,按低、中、高3个量级分别精密加入大黄素对照品,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,计算平均加样回收率98.22%,RSD 1.1%。

2.2 黄芩苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.4%磷酸溶液(47:53),检测波长280 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量10 μL。见图2。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 黄芩苷

图2 敷胸巴布贴中黄芩苷的 HPLC

Fig.2 HPLC of baicalin in Fuxiong cataplasms

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取在60℃减压干燥4 h的黄芩苷对照品适量,加甲醇制成0.228 g·L⁻¹对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取本品浸膏粉

约 0.3 g, 加 70% 乙醇 40 mL, 超声 30 min, 放冷, 滤过, 滤液置 100 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇分次洗涤容器和残渣, 洗液滤至同一量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 取除黄芩外的药材, 按处方比例及一定工艺制备不含黄芩的阴性样品, 按 2.2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取黄芩苷对照品溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取该溶液 3, 6, 9, 12, 15, 18 μL , 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3\,741.9X - 2.711\,5$ ($r = 0.999\,8$), 线性范围 0.068 4 ~ 0.410 4 μg 。

2.2.6 精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按处方比例称取药材各 6 份, 平行制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下条件测定, 黄芩苷峰面积的 RSD 1.0%, 表明该方法重复性较好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在 0, 6, 12, 18, 24 h 按 2.2.1 项下条件测定, 结果黄芩苷峰面积的 RSD 0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 分别称取已知含量的浸膏粉 9 份, 每份约 0.15 g, 均分为 3 组, 按低、中、高 3 个量级分别精密加入黄芩苷对照品, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 结果平均加样回收率 98.10%, RSD 1.1%。

2.3 总黄酮的含量测定^[7]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的桑辛素对照品适量, 加甲醇制成 0.285 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取本品浸膏粉约 0.1 g, 加 70% 乙醇 40 mL, 超声 30 min, 放冷, 滤过, 滤液置 50 mL 量瓶中, 用 70% 乙醇分次洗涤容器和残渣, 洗液滤至同一量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.3 检测波长的选择 精密量取对照品溶液、供试品溶液各 2.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化铝溶液 2.0 mL 和 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钠-乙酸溶液 3.0 mL, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 10 min。以空白溶液做参比, 在 200 ~ 700 nm 扫描, 结果显示二者均在 400 nm 处有最大吸收。

2.3.4 标准曲线的制备 精密移取桑辛素对照品

溶液 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 按 2.3.3 项下方法显色, 以空白溶液做参比, 在 400 nm 处测定吸光度 A , 以 A 为横坐标, 质量浓度 (C) 为纵坐标, 得回归方程 $C = 84.726A + 0.409$ ($r = 0.999\,8$)。

2.3.5 精密度试验 精密量取同一对照品溶液, 按 2.3.3 项下方法重复测定 6 次, 计算 A 的 RSD 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 按处方比例称取药材各 6 份, 平行制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下方法处理并显色, 计算 A 的 RSD 1.1%, 表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 精密吸取对照品溶液 1 mL 和供试品溶液 0.2 mL, 分别置于具塞试管中, 挥去溶剂, 放冷, 按 2.3.3 项下方法显色, 分别于 10, 20, 30, 60, 120 min 测定, 结果 RSD 分别为 1.1%, 1.3%, 表明二者显色后在 120 min 内稳定。

2.3.8 加样回收率试验 精密称取已知黄芩苷含量的供试品浸膏粉 9 份, 每份约 0.05 g, 均分为 3 组, 按低、中、高 3 个量级分别精密加入桑辛素对照品, 制备供试品溶液, 按 2.3.3 项下方法显色, 计算平均加样回收率 97.82%, RSD 1.3%。

2.4 提取工艺优选 选择乙醇体积分数、加醇量、提取时间、提取次数为影响因素, 每个因素设置 3 个水平, 以大黄素、黄芩苷、桑辛素含量和浸膏得率的综合评分^[8]为指标, 设定权重系数依次为 0.3, 0.3, 0.3, 0.1, 三者的取值越大越好。按处方比例称取 9 份药材, 每份 14 g, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 提取液滤过, 合并, 浓缩成稠膏, 减压干燥, 得干浸膏, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。精密移取提取液 25 mL, 置 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥 3 h, 移至干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算浸膏得率。

由直观分析可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 C 具有显著性影响, 因素 A, B 则均无显著性影响, 结合实际情况考虑, 确定最佳工艺组合为 $A_2B_1C_3D_2$, 即加 6 倍量 75% 乙醇提取 2 次, 每次 3 h。

2.5 验证试验 按处方比例称取药材各 3 份, 每份 14 g, 按最佳提取工艺进行 3 次验证试验, 测得干浸膏粉中大黄素、黄芩苷、桑辛素平均质量分数分别为 0.19%, 3.61%, 0.51%, RSD 分别为 0.8%, 1.0%, 0.9%, 平均浸膏得率 31.19%, RSD 0.7%, 大黄素、黄芩苷、桑辛素平均转移率分别为 63.75%,

表 1 敷胸巴布贴醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of alcohol extraction process of Fuxiong cataplasms

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 加醇量 /倍	C 提取时间 /h	D 提取数 /次	大黄素 /%	黄芩苷 /%	桑辛素 /%	浸膏得率 /%	综合评分 /%
1	60	6	1.0	1	0.132	2.591	0.391	20.14	69.45
2	60	8	2.0	2	0.187	3.185	0.481	26.43	89.66
3	60	10	3.0	3	0.174	3.223	0.486	27.50	88.62
4	75	6	2.0	3	0.184	3.365	0.508	23.46	91.25
5	75	8	3.0	1	0.181	3.547	0.541	31.57	96.70
6	75	10	1.0	2	0.149	2.915	0.440	29.93	80.52
7	90	6	3.0	2	0.198	3.437	0.519	25.00	95.07
8	90	8	1.0	3	0.154	2.987	0.451	29.07	82.20
9	90	10	2.0	1	0.193	3.635	0.448	28.71	93.18

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	MS	F	P
A	105.585	52.793	18.043	>0.05
B	27.269	13.635	4.660	>0.05
C	458.016	229.008	78.267	<0.05
D(误差)	5.852	2.926	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

68.13%, 73.78%, RSD 分别为 1.0%, 1.1%, 0.6%, 说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

本文采用综合加权评分法^[9], 大黄中蒽醌类和黄芩、桑白皮中黄酮类成分均为抗菌、抗炎的主要成分, 故权重系数均定为 0.3, 浸膏得率亦是复方制剂提取工艺的重要指标, 设定权重系数 0.1。

文献报道常选择芦丁为指标成分以测定总黄酮含量, 由于黄芩和桑白皮均含黄酮类成分, 故测定芦丁的含量无专属性。桑辛素又称桑根白皮素、桑根皮素、桑黄素, 是桑白皮中含量较高的黄酮类成分, 故选择测定桑辛素的含量^[9-11]。预试验采用 HPLC 测定桑辛素含量, 以乙腈-水(62:38)为流动相时, 出峰时间长且分离效果差, 最终选定紫外分光光度法, 此法操作简便、稳定性强、重复性好。在选择 HPLC 的流动相时, 参考了 2010 年版《中国药典》一部大黄、黄芩项下含量测定方法, 经反复试验, 最终分别选择了甲醇-0.4% 磷酸溶液(80:20)和甲醇-0.4% 磷酸溶液(47:53), 各色谱峰分离度均 > 1.5。

[参考文献]

[1] 胡楠楠, 王雪峰, 赵雪, 等. 敷胸巴布贴制剂对健康家兔皮肤刺激实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1168-1169.

[2] 李广峰. 大黄的药理作用及临床应用分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(16): 317-318.

[3] 延玺, 刘会青, 邹永青, 等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展[J]. 有机化学, 2008, 28(9): 1534-1544.

[4] 修丽丽, 于艳, 于世杰, 等. 正交实验法优选祛瘀清胰颗粒的乙醇提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(10): 1686-1688.

[5] 张蕾, 王术光, 李洪娟, 等. 正交设计法优选桑白皮总黄酮的提取工艺[J]. 滨州医学院学报, 2009, 32(4): 290-292.

[6] 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, 282, 280.

[7] 杨晶, 刘嘉琪, 王宝昌, 等. HP-20 型大孔树脂富集纯化桑白皮总黄酮的工艺优选[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(23): 9610-9611, 9638.

[8] 闫小平, 郭宇洁, 郑蕊, 等. 多指标综合评分法考察肠安 I 号方醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 12-15.

[9] 杨晶, 刘嘉琪, 王宝昌, 等. 正交实验优选桑白皮总黄酮的最佳提取工艺[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 319-321.

[10] 宗玉英, 叶兆波, 董婷霞, 等. 桑白皮中桑辛素的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11): 1038-1040.

[11] 孙文基, 绳金房. 天然活性成分简明手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 6-7.

[责任编辑 刘德文]