

正交试验优选蛇黄凝胶提取工艺

汪亚飞¹, 钟希文^{2*}, 梅全喜¹, 张文霞¹, 王贤儿²

(1. 广州中医药大学, 广州 510006;

2. 广州中医药大学附属中山市中医院, 广东 中山 528400)

[摘要] 目的: 优选蛇黄凝胶的提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以三羽新月蕨苷 A、大黄素和干膏得率为评价指标, 在单因素试验基础上, 通过综合评分优选蛇黄凝胶的提取工艺。采用 HPLC 测定三羽新月蕨苷 A、大黄素含量, 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)-水(C)梯度洗脱(0~40 min, 10%~70% A, 10% B, 80%~20% C), 检测波长 226 nm。结果: 最佳提取工艺条件为加 14 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 30 min; 大黄素、三羽新月蕨苷 A 平均提取量依次为 0.37, 0.76 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 对蛇黄凝胶的生产工艺具有一定的指导和参考意义。

[关键词] 蛇黄凝胶; 提取工艺; 正交试验; 三羽新月蕨苷 A; 单因素试验; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0039-04

[doi] 10.11653/syjf2013240039

Optimization of Extraction Technology for Shehuang Gels by Orthogonal Design

WANG Ya-fei¹, ZHONG Xi-wen^{2*}, MEI Quan-xi¹, ZHANG Wen-xia¹, WANG Xian-er²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Guangzhou University
of Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Shehuang gels by orthogonal test. **Method:** $L_9(3^4)$ Orthogonal test was performed with extraction amounts of triphyllin A and emodin, dry extract yield as indexes, based on single factor tests, extraction process of Shehuang gels was optimized by multi-index comprehensive evaluation method. Contents of triphyllin A and emodin were determined by HPLC, mobile phase of acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid (B) -water (C) with a gradient elution program (0-40 min, 10% -70% A, 10% B, 80% -20% C), detection wavelength 226 nm. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: extracted 3 times with 14 times the amount of 70% ethanol, 30 min for each time; Average extraction amounts of triphyllin A and emodin were 0.37, 0.76 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, which had some guidance and reference value for production of Shehuang gels.

[Key words] Shehuang gels; extraction technology; orthogonal design; triphyllin A; single factor test; HPLC

蛇黄凝胶是由蛇黄散(为广州中医药大学附属
中山中医院院内制剂)改制而成的新型凝胶制剂,

由蛇鳞草、大黄、三角草、独行千里等药味组成,具有
清热解毒、祛蛇毒、消肿之功效。现代药理研究证

[收稿日期] 20130531(010)

[基金项目] 广东省中山市科技计划项目(20102A031)

[第一作者] 汪亚飞, 在读硕士, 从事中药药剂学研究, Tel:0760-88815106, E-mail: wgangyafei@163.com

[通讯作者] * 钟希文, 主任中药师, 教授, 硕士生导师, 从事新药开发与中药药理研究, Tel:0760-88815106, E-mail: zszxw@163.com

明,蛇黄散具有抗炎镇痛作用^[1],可用于治疗蛇伤肿痛、虫咬肿痛、初期疮疡等症,疗效确切^[2-4];方中主药蛇鳞草提取液具有一定的抑菌和杀菌活性^[5]。由于蛇黄散存在使用不便、易污染衣物等缺点,故将其剂型改为凝胶剂,以扩大其临床应用范围。蛇鳞草作为方中主药之一,目前尚无相关质量标准,前期已对蛇鳞草进行系统的化学成分研究^[6-7],分离出 6 个化合物并确定了化学结构,其中三羽新月蕨苷 A 为蛇鳞草中相对含量较高且具有一定活性的水溶性黄烷醇苷类化合物,已有报道采用 UV 测定蛇鳞草根茎和叶中总黄烷醇苷的含量^[4]。本实验以三羽新月蕨苷 A、大黄素含量和干膏得率为综合评价指标,通过正交试验优选蛇黄凝胶的提取工艺。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津)。蛇鳞草、三角草均采自中山市五桂山,由广东药学院田素英教授鉴定分别为金星蕨科植物三羽新月蕨 *Prpnephrium triphyllum* (Sw.) Holtt. 的干燥全草,百合科植物三角草 *Chlorophytum laxum* R. Br. 的干燥全草,大黄、独行千里、山芝麻均购自广东省中山市中智药业公司,由广东药学院田素英教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求,三羽新月蕨苷 A 对照品(由中山市中医院提供,经波谱分析鉴定纯度 > 98%),大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110756-200110),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

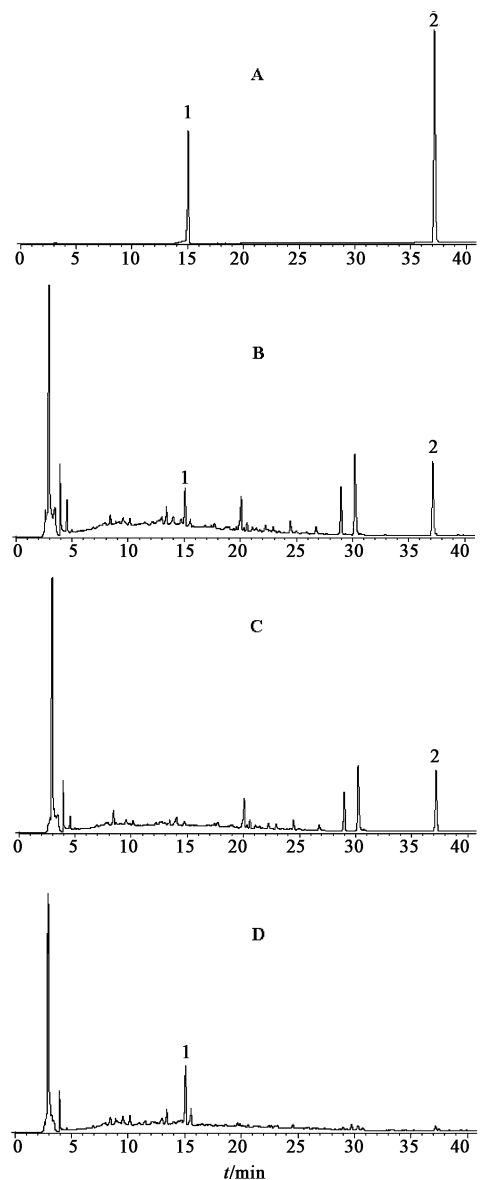
2 方法与结果

2.1 三羽新月蕨苷 A 与大黄素的含量测定

2.1.1 色谱条件 Boston Green ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)-水(C)梯度洗脱(0 ~ 40 min, 10% ~ 70% A, 10% B, 80% ~ 20% C),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 226 nm,进样量 20 μL。理论塔板数按三羽新月蕨苷 A 峰和大黄素峰计算均不低于 3 000,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定三羽新月蕨苷 A 与大黄素对照品适量,加甲醇制成 0.2, 0.12 g · L⁻¹ 的混合对照品溶液,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取药材粗粉(过二号筛)共 1.10 g,精密称定,混匀,加 10 倍量 70% 乙醇加热回流 3 次,每次 60 min,滤过,合



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺蛇鳞草阴性对照;
D. 缺大黄阴性对照; 1. 三羽新月蕨苷 A; 2. 大黄素

图 1 蛇黄凝胶 HPLC

并滤液,水浴蒸干,置 100 °C 烘箱中烘至恒重,称定质量,计算干膏量,残渣加甲醇使溶解并过滤,滤液用甲醇定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔薄膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例称取(除蛇鳞草外)大黄等药材粗粉(过二号筛)共 0.80 g,精密称定,混匀,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,即得缺蛇鳞草阴性对照溶液。同法制备缺大黄阴性对照溶液。

2.1.5 标准曲线的制备 精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 mL,用甲醇稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,

以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得三羽新月蕨苷 A 与大黄素的回归方程分别为 $Y = 33\ 292.203X + 16.944$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 134\ 300.721X + 31.861$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围分别为 $0.005 \sim 0.1$, $0.003 \sim 0.06\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 单因素试验考察 以三羽新月蕨苷 A、大黄素含量及干膏得率为综合评价指标,采用综合加权评分法进行分析,权重系数分别为 0.4,0.4,0.2。

2.2.1 乙醇体积分数 按处方比例精密称取药材粗粉(过二号筛)6份,每份约 1.10 g,混匀,分别加入 10 倍量 10%,30%,50%,70%,90%,100% 的乙醇溶液,加热回流 60 min,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,结果显示当体积分数达 70% 时,综合评分最大,其中大黄素含量随乙醇体积分数的增加而增加,当浓度超过 70% 增加变缓,而三羽新月蕨苷 A 含量及干膏得率在 70% 乙醇时达到最大,超过 70% 含量明显下降。

2.2.2 乙醇用量 按处方比例精密称取药材粗粉(过二号筛)6份,每份约 1.10 g,混匀,分别加入 8,10,12,14,16,18 倍量 70% 乙醇加热回流 60 min,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,结果发现综合评分随乙醇用量增加而增大,用量为 16 倍时综合评分达最大值,之后逐渐减小。

2.2.3 提取时间 按处方比例精密称取药材粗粉

(过二号筛)4份,每份约 1.10 g,混匀,各加入 16 倍量 70% 乙醇,分别加热回流 30,60,90,120 min,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,结果综合评分分别为 98,100,85,55 分。

2.2.4 提取次数 按处方比例精密称取药材粗粉(过二号筛)4份,每份约 1.10 g,混匀,各加入 16 倍量 70% 乙醇加热回流 30 min,分别提取 1,2,3,4 次,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,结果综合评分随提取次数的增加而增大,3 次之后变化曲线已较平缓。

2.3 醇提工艺优选 在单因素试验基础上,以三羽新月蕨苷 A、大黄素含量及干膏得率为综合评价指标,采用综合加权评分法进行分析,权重系数分别为 0.4,0.4,0.2,选取乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数为考察因素。按处方比例精密称取药材粗粉(过二号筛)9份,每份约 1.10 g,混匀,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 蛇黄凝胶醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取数 /次	D 提取时间 /min
1	60	12	1	30
2	70	14	2	60
3	80	16	3	90

表 2 蛇黄凝胶醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	三羽新月蕨苷 A/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	大黄素/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	干膏得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	0.18	0.04	4.45	16.80
2	1	2	2	2	0.50	0.17	15.68	56.02
3	1	3	3	3	0.85	0.20	21.6	81.06
4	2	1	2	3	0.55	0.27	14.81	68.40
5	2	2	3	1	0.79	0.37	22.22	97.18
6	2	3	1	2	0.44	0.20	11.04	52.27
7	3	1	3	2	0.70	0.36	18.35	88.38
8	3	2	1	3	0.42	0.20	9.01	49.49
9	3	3	2	1	0.36	0.37	17.94	73.09
K_1	51.29	57.86	39.52	62.36				
K_2	72.62	67.56	65.84	65.56				
K_3	70.32	68.81	88.87	66.32				
R	21.33	10.95	49.35	3.96				

由直观分析可知,各因素对醇提工艺的影响顺序为 $C > A > B > D$ 。以极值最小的 D 因素为误差项

进行方差分析,结果表明因素 C 对提取效果有显著意义。确定最佳提取条件为 $A_2B_2C_3D_1$,即加 14 倍

量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 30 min。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	869.96	2	29.50	12.19	<0.05
B	313.59	2	17.71	4.39	<0.05
C	2 336.85	2	48.34	32.75	<0.05
D(误差)	71.37	2	5.23	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

2.4 验证试验 按处方比例精密称取药材粗粉(过二号筛)3份,每份约 1.10 g,混匀,按优选的提取工艺进行验证试验,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,结果干膏得率分别为 21.55%, 21.03%, 22.23%, 大黄素提取量依次为 0.37, 0.37, 0.36 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 三羽新月蕨苷 A 提取量分别为 0.78, 0.74, 0.76 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 表明优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

由于三羽新月蕨苷 A 为水溶性的黄烷醇苷类化合物,与大黄素极性相差较大,故选用梯度洗脱。甲醇为流动相时,三羽新月蕨苷 A 拖尾严重,换用乙腈可很好改善拖尾现象;乙腈与水为流动相时,大黄素拖尾,参照 2010 年版《中国药典》,加入 10% 的 0.1% 磷酸水溶液后可消除拖尾,经调整,最终确定流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)-水(C)梯度洗脱(0~40 min, 10%~70% A, 10% B, 80%~20% C),显示峰型及分离效果均较好,且无干扰。

预试验比较水提法、醇渗漉法及醇回流法对蛇黄凝胶中干膏得率及三羽新月蕨苷 A、大黄素含量的影响,结果经 F 检验发现干膏得率 $P > 0.05$, 醇渗漉法与醇回流法中大黄素含量 $P > 0.05$, 三羽新月

蕨苷 A 含量 $P < 0.05$, 表明 3 种提取方法中干膏得率无显著性差异,三羽新月蕨苷 A 及大黄素含量均有显著性差异。以大黄素含量为指标,醇渗漉法 \approx 醇回流法 $>$ 水提法;以三羽新月蕨苷 A 含量为指标,醇回流法 $>$ 醇渗漉法 $>$ 水提法。考虑大黄素极性小,难溶于水,蛇鳞草入药部位多为叶类,质轻易浮,水提较难提取完全,故最终选择醇回流提取法。

在对水浴温度进行考察时发现, $< 80\text{ }^\circ\text{C}$ 时溶液较难沸腾; $> 120\text{ }^\circ\text{C}$ 溶液易暴沸,溶出增多难滤过,且大黄素含量有所下降。原因可能是由于温度过高,杂质溶出增多,占据了大黄素的溶出空间,而水浴温度在 $80\text{ }^\circ\text{C} \sim 120\text{ }^\circ\text{C}$ 对提取效果影响甚小,综合考虑,将乙醇回流水浴温度设定 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 。

[参考文献]

[1] 梅全喜,高玉桥,林慧,等. 蛇黄散抗炎镇痛作用研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(5): 48.

[2] 陈茂潮,缪英年,林棉,等. 蛇黄散治疗蛇伤肿痛 30 例疗效观察[J]. 中国中医急症, 2005, 14(8): 728.

[3] 陈茂潮,林棉,缪英年,等. 蛇黄散治疗虫咬肿痛疗效观察[J]. 吉林中医药, 2006, 26(9): 36.

[4] 钟希文,缪英年,曾聪彦. 蛇黄散的研制及临床疗效观察[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(8): 1826.

[5] 刘敏豪,雷雨彬. 复方蛇鳞草膏体外抑菌作用研究[J]. 今日药学, 2013, 23(2): 74.

[6] 钟希文,张文霞,卢海啸,等. 蛇鳞草化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(9): 1673.

[7] ZHONG X W, ZHANG W X, LU H X, et al. A new flavan-4-ol glycoside from *Pronephrium triphyllum* [J]. Chin Herbal Med, 2011, 3(3): 161.

[责任编辑 全燕]