

密闭性中药复合敷料的提取工艺优选

蔡文智¹, 潘永毅¹, 刘志刚², 谢文鸿³, 黎莉莉², 刘强^{2*}, 蔡保塔^{4*}

(1. 南方医科大学护理学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515;
3. 南方医科大学南方医院, 广州 510515; 4. 南方医科大学珠江医院, 广州 510280)

[摘要] 目的: 优选密闭性中药复合敷料的提取工艺。方法: 以人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 含量和浸膏得率为评价指标, 通过单因素试验优选提取次数, 利用正交试验考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间对密闭性中药复合敷料提取工艺的影响。采用 HPLC 测定人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 含量, 流动相(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min, 81% A; 10~38 min, 81%~79% A; 38~90 min, 79%~66% A), 检测波长 203 nm。结果: 各因素对提取工艺的影响顺序为乙醇体积分数>提取时间>乙醇用量。最佳提取工艺条件为加 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h; 平均浸膏得率 25.45%, 人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 平均质量浓度分别为 0.46, 0.37 g·L⁻¹。结论: 建立的含量测定方法准确、重复性好, 优选的提取工艺稳定、合理、可行, 为民间外伤验方的二次开发提供参考。

[关键词] 人参皂苷; 浸膏得率; 正交试验; 高效液相色谱法; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0028-04

[doi] 10.11653/syjf201324028

Optimization of Extraction Process of Airtight Chinese Medicine Composite Dressings

CAI Wen-zhi¹, PAN Yong-yi¹, LIU Zhi-gang², XIE Wen-hong³, LI Li-li², LIU Qiang^{2*}, CAI Bao-ta^{4*}

(1. School of Nursing, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

3. Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

4. Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280, China)

[收稿日期] 20130601(008)

[基金项目] 广东省教育部产学研结合项目(2011B090400578); 广州市白云区科技基金项目(2009-st-01)

[第一作者] 蔡文智, 博士, 教授, 从事临床医学及创伤修复治疗研究, Tel: 02061648761, E-mail: caiwenzhi2002@hotmail.com

[通讯作者] * 刘强, 博士, 教授, 从事中药新药及制剂开发研究, Tel: 02061648264, E-mail: lq@fimmu.com;

* 蔡保塔, 硕士, 主治医师, 从事临床医学及创伤骨科治疗研究, Tel: 13527641180, E-mail: Cbt3a@163.com

[3] 吕秋石, 姜永军, 郭芮兵, 等. 提高经鼻给药效率的研究进展[J]. 国际脑血管病杂志, 2011, 19(11): 872.

[4] 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: 54.

[5] 王信, 李凌军, 代龙. HPLC 同时测定天钩胶囊中 4 种有效成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 868.

[6] 王晓颖, 张金俊, 叶梦屏. 3 种促透剂对天麻体外透皮吸收的影响[J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(1): 33.

[7] 刘亚琴. 盐酸纳洛酮鼻腔喷雾剂的研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2004.

[8] 陈新梅, 朱家璧, 孙卫东, 等. 冰片对人参皂苷 Rg₁ 鼻腔吸收的促进作用及鼻腔纤毛毒性研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(4): 261.

[9] 程怡, 高幼衡, 王利胜, 等. 冰片在不同溶剂载体中透皮速率的动力学特征[J]. 医学教育探索, 2000, 31(8): 607.

[10] 刘煜德, 余玲, 陈巧玲, 等. 冰片鼻黏膜刺激性实验观察[J]. 中国民族民间医药杂志, 2010, 19(16): 33.

[11] 洪燕龙, 徐德生, 冯怡, 等. 天麻提取物的提取、纯化工艺研究[J]. 中成药, 2008, 30(2): 204.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of airtight Chinese medicine composite dressings. **Method:** With contents of ginsenoside Rg₁ and Rb₁, extract yield as evaluation indexes, extraction times was optimized by single factor test, orthogonal design was adopted to optimize extraction technology of airtight Chinese medicine composite dressings by taking the amount and content of ethanol, extraction time as factors. Contents of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ were determined by HPLC, mobile phase of water (A) -acetonitrile (B) with a gradient elution program (0-10 min, 81% A; 10-38 min, 81%-79% A; 38-90 min, 79%-66% A), detection wavelength 203 nm. **Result:** Effect of each factor on extraction technology was in order of ethanol concentration > extraction time > ethanol amount. Optimum extraction process were as follows: extracted 2 times with 8-fold the amount of 70% ethanol, 2 hours per time; Average extract yield was 25.45%, average concentration of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ were 0.46, 0.37 g · L⁻¹. **Conclusion:** This established method was accurate and reproducible, optimized extraction process was stable, reasonable and practicable, this study could provide a reference for secondary development of clinical prescriptions.

[Key words] ginsenosides; extract yield; orthogonal design; HPLC; single factor test

密闭性中药复合敷料^[1]是在民间传统外伤验方“三七复方”的基础上,结合性能优秀的高分子海绵载体,开发成功的一种功能敷料。该验方由三七、紫珠草等9味中药组成,具有良好的抗菌消炎、止血化瘀、消肿定痛等功效,主要用于治疗各种急性皮肤损伤、烧伤、压疮、感染性伤口等症^[2-3]。本实验采用正交试验和单因素试验优选密闭性中药复合敷料的提取工艺,为提高该复方利用率和临床疗效提供理论依据。

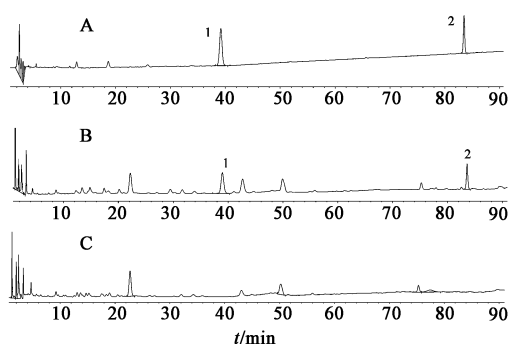
1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(G1316A 型紫外检测器,G1313A 型自动进样器,美国 Agilent 公司),Dikma Technologies C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm,北京迪马科技有限公司),SL4001N 型电子天平(上海民桥精密科技仪器有限公司)。人参皂苷 Rg₁ 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110703-201128),人参皂苷 Rb₁ 对照品(江西本草天工科技有限责任公司,批号 ROG-110523),三七、紫珠草等药材(均购自于广州致信药业有限公司,经南方医科大学中医药学院刘强教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下规定),乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 的含量测定

2.1.1 色谱条件 Dikma Technologies C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0 ~ 10 min, 81% A; 10 ~ 38 min, 81% ~ 79% A; 38 ~ 90 min, 79% ~ 66% A),检测波长 203 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 8 μL,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品;

1. 人参皂苷 Rg₁; 2. 人参皂苷 Rb₁

图 1 密闭性中药复合敷料提取液 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 对照品适量,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇制成 0.514, 0.526 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备^[4] 精密吸取醇提液 15 mL 至蒸发皿中,置于水浴锅中蒸干,浸膏用 15 mL 水分次转移至分液漏斗中,水饱和正丁醇萃取 5 次,每次 10 mL,氨试液洗涤 2 次,每次 20 mL,正丁醇饱和水溶液洗涤 2 次,每次 20 mL,收集正丁醇液蒸干,加甲醇定容于 10 mL 量瓶中,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取各对照品溶液 2.5 mL,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,依次等倍稀释 5 次,配制 6 个不同质量浓度的对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 0.0007X + 0.0018$ ($r = 0.9999$), $Y = 0.0009X + 0.0097$ ($r = 0.9998$),表明人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 进样量分别在 0.1285 ~ 4.112, 0.08 ~

2.63 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定 6 次,结果人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 1.07%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液适量,分别于 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 峰面积的 RSD 分别为 1.09%, 1.24%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 精密吸取供试品溶液 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 峰面积的 RSD 分别为 1.19%, 1.65%, 表明该方法重复性良好。

2.2 提取次数考察 称取 1/2 处方量药材,加 8 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 2 h,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,结果第 1, 2 次煎液浸膏得率之和 93.51%, 人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 提取率之和分别为 92.90%, 91.58%, 三者均 >90%, 结合生产成本考虑,确定提次数为 2 次。

2.3 正交试验优选^[5] 在预试验基础上,选取乙醇体积分数、乙醇用量和提取时间为考察因素,以浸膏得率、人参皂苷 R_{g_1} , R_{b_1} 提取量为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3~5。

表 1 密闭性中药复合敷料醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量 /倍	B 乙醇体积 分数/%	C 提取时间 /h
1	6	70	1.0
2	8	80	1.5
3	10	90	2.0

表 2 密闭性中药复合敷料醇提工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	浸膏得率 /%	人参皂苷 $R_{g_1}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	人参皂苷 $R_{b_1}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	20.41	0.460	0.197
2	1	2	2	2	21.33	0.420	0.352
3	1	3	3	3	18.17	0.475	0.328
4	2	1	2	3	25.00	0.511	0.351
5	2	2	3	1	22.05	0.461	0.379
6	2	3	1	2	17.91	0.370	0.439
7	3	1	3	2	24.67	0.508	0.262
8	3	2	1	3	21.24	0.474	0.380
9	3	3	2	1	18.95	0.382	0.291
浸膏得率	K_1	17.970	23.360	19.853	20.470		
	K_2	21.653	21.540	21.760	21.303		
	K_3	21.620	18.343	21.630	21.470		
	R	1.683	5.017	1.907	1.000		
人参皂苷 R_{g_1}	K_1	0.452	0.493	0.435	0.434		
	K_2	0.447	0.452	0.438	0.433		
	K_3	0.455	0.409	0.481	0.487		
	R	0.008	0.084	0.046	0.054		
人参皂苷 R_{b_1}	K_1	0.344	0.376	0.331	0.377		
	K_2	0.377	0.399	0.333	0.329		
	K_3	0.356	0.301	0.413	0.370		
	R	0.033	0.098	0.082	0.048		

由各指标的直观分析可知,各因素对提取工艺的影响主次均为 $B > C > A$ 。以浸膏得率为考察指标,方差分析表明 B 因素的影响具有显著性差异,

因素 A, C 则无显著性影响,以 $A_2B_1C_2$ 为佳;以人参皂苷 R_{g_1} 质量浓度为考察指标,方差分析表明 3 个因素均无显著性差异,以 $A_3B_1C_3$ 为佳;以人参皂苷

表3 浸膏得率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	5.557	2	2.78	3.227	>0.05
B	38.698	2	19.35	22.473	<0.05
C	6.809	2	3.40	3.954	>0.05
D(误差)	1.722	2	0.86	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表4,5同)。

表4 人参皂苷 R_{g1} 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.000	2	0.000	0.000	>0.05
B	0.011	2	0.006	1.833	>0.05
C	0.004	2	0.002	0.667	>0.05
D(误差)	0.006	2	0.003	1.000	

表5 人参皂苷 R_{b1} 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.002	2	0.001	0.500	>0.05
B	0.016	2	0.008	4.000	>0.05
C	0.013	2	0.007	3.250	>0.05
D(误差)	0.004	2	0.002	1.000	

R_{b1} 质量浓度为考察指标,方差分析表明3个因素均无显著性差异,以A₂B₁C₃为佳;综合考虑,最终选择提取工艺组合为A₂B₁C₃,即加8倍量70%乙醇提取2次,每次2h。

2.4 验证试验 称取1/2处方量药材,按优选的工艺进行3次验证试验,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,结果平均浸膏得率25.45%,人参皂苷R_{g1}, R_{b1}平均质量浓度分别为0.46,0.37 g·L⁻¹,表明该工艺提取率高、稳定性好。

3 讨论

预试验显示,提取液直接进样测定,基线漂移严重,杂质峰多且重叠,分离度不佳。曾比较过中性氧化铝柱法^[6]、大孔吸附树脂柱法^[7]及萃取法^[8]的测定效果,结果以萃取法提取分离效果最好且重复

性佳。

三七为本验方的君药,故选择三七中人参皂苷R_{g1},R_{b1}和提取液的浸膏得率作为评价指标,能较全面地评价提取工艺。三七具有显著的活血化瘀、消肿止痛功效,紫珠草具有止血、散瘀、消炎等疗效,二者作为方中君药,相辅相成,协同共奏疗效;但三七复方的传统用药方法主要以粉剂形式直接入药涂敷于外伤伤口,存在剂型较落后、利用率不高、易污染伤口、刷蹭等缺点,制约了该制剂的推广应用;本文选取医用高分子海绵作为药物载体,开发出一种密闭性中药复合敷料,为该验方的二次开发奠定基础。

[参考文献]

- [1] 蔡文智. 密闭性功能敷料的研制[D]. 广州:中国人民解放军第一军医大学,2003.
- [2] 蔡文智,李亚洁,蔡保塔. 筛选野战敷料组方抑菌止血作用的实验研究[J]. 解放军护理杂志,2004,21(12):6.
- [3] 蔡文智,李亚洁,蔡保塔,等. 野战敷料组方镇痛消肿药效的筛选实验[J]. 中国新药杂志,2004,13(9):799.
- [4] 姚曦,何伟,李勇,等. HPLC法测定复方贞术调脂胶囊中三七皂苷R₁和人参皂苷R_{g1},R_{b1}的含量[J]. 中国药房,2011,22(15):1398.
- [5] 史胜娟,段坤元,向梅先. 正交实验法优选血三七药材提取工艺[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,2013,47(1):57.
- [6] 范文成,叶晓红,罗志宏,等. 中性氧化铝柱对绞股蓝总皂苷含量测定结果的影响[J]. 河北医药,2005,27(2):145.
- [7] 全燕,李先端,王锦玉,等. 复方三七脊复康胶囊提取精制工艺的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):1.
- [8] 管庆霞,吕邵娃,崔淑霞,等. HPLC法测定健心片中三七皂苷R₁和人参皂苷R_{g1}的含量[J]. 中医学报,2006,34(1):12.

[责任编辑 全燕]