

复方必清片的提取工艺优选

常占瑛¹, 刘桂花², 高晓黎^{1*}, 周湘龙¹

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

[摘要] **目的:** 优选复方必清片的提取工艺。**方法:** 在单因素试验基础上, 以薯蓣皂苷元、秋水仙碱含量和浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验优选菝葜等7味药材的乙醇提取工艺; 以总多酚含量和浸膏得率为综合评价指标, 通过正交试验优选余甘子等5味药材的水提取工艺。采用HPLC测定薯蓣皂苷元和秋水仙碱的含量, 色谱条件为Cosmosil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温35 ℃, 流速1.0 mL · min⁻¹, 进样量10 μL, 检测波长分别为203, 350 nm, 流动相分别为甲醇-水(90:10), 甲醇-水(37:63); 采用紫外分光光度法测定总多酚含量。**结果:** 菝葜等7味药材的最佳提取工艺为加10倍量70%乙醇提取2次, 每次1.0 h; 余甘子等5味药材的最佳提取工艺为加10倍量水提取3次, 每次1.0 h。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 为复方必清片的质量控制提供实验依据。

[关键词] 薯蓣皂苷元; 秋水仙碱; 总多酚; 正交试验; 提取工艺; 高效液相色谱; 紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0051-05

[doi] 10.11653/syfy2013220051

Optimization of Extraction Technology for Compound Biqing Tablets

CHANG Zhan-ying¹, LIU Gui-hua², GAO Xiao-li^{1*}, ZHOU Xiang-long¹

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of compound Biqing tablets. **Method:** Based on single factor tests, orthogonal design was adopted to optimize ethanol extraction technology of Smilacis Chinae Rhizoma and other six herbs with composite score of diosgenin content, colchicine content and extract yield as index; With extract yield and the content of total polyphenols as comprehensive evaluation index, water extraction technology of Phyllanthi Fructus and other five herbs was optimized by orthogonal test. The contents of diosgenin and colchicine were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Cosmosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), column temperature 35 ℃, flow rate 1.0 mL · min⁻¹, injection volume 10 μL, detection wavelength at 203, 350 nm, mobile phase with methanol-water (90:10) and methanol-water (37:63); The

[收稿日期] 20130503(001)

[第一作者] 常占瑛, 硕士, 助教, 从事中药民族药的开发研究, Tel:0991-4362442, E-mail: changzhanying1983@163.com

[通讯作者] *高晓黎, 博士, 教授, 从事新药及民族药的开发研究, Tel:0991-4362442, E-mail: xli_g@sina.com

[5] Kiho T, Оокив К, Usui S, et al. Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the culture mycelium of cordyceps sinensis[J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22(9):966.

[6] Gamal-Eldeen A M, Ahmed E F, Abo-Zeid M A. In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium* [J].

Food Chem Toxicol, 2009, 47(6):1378.

[7] 樊亚鸣, 黄晓兰, 陈永亨, 等. 春砂仁多糖的提取及组分分析[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2006, 5(4):30.

[8] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3):91.

[责任编辑 全燕]

content of total polyphenols was determined by UV. **Result:** Optimum ethanol extraction technology was as following: extracted 2 times with 10 times the amount of 70% ethanol, 1 h per time; Optimum water extraction technology was: extracted 3 times with 10 times the amount of water, 1 h each time. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, it could provide an experimental basis for quality control of compound Biqing tablets.

[**Key words**] diosgenin; colchicine; total polyphenols; orthogonal test; extraction technology; HPLC; UV

复方必清片处方来源于新疆维吾尔族医院,由菝葜、天山堇菜、秋水仙、余甘子、西青果、诃子肉等 12 味药组成,具有清血、消炎止痛的功效,主要用于治疗子宫颈炎、宫颈糜烂、附件炎、前列腺炎等。方中菝葜具有消肿解毒、活血化瘀、祛风利湿、抗炎镇痛及抗肿瘤等作用^[1],临床常用于治疗各种妇科炎症,疗效显著^[2];文献报道菝葜的总皂苷部位具有明显的抗炎效果,并且对细菌生长具有明显的抑制作用^[3-4],其中薯蓣皂苷元为主要有效成分,具有降血脂、抗菌、消炎、抗肿瘤等作用。秋水仙中有效成分为秋水仙碱,具有解毒散结、抗炎、消肿止痛的功效^[5]。西青果具有清血开窍的功效,可清除异常黑胆质,临床常用于风热感冒引起的咽喉肿痛、咽炎等症。文献报道余甘子、西青果和诃子肉均含有大量的鞣质类成分^[6]。本实验采用正交试验设计,以多种有效成分为指标优选复方必清片的提取工艺条件,为该制剂的质量控制和综合开发提供新思路。

1 材料

SPD-10AVP 型高效液相色谱仪(LC-10ATVP 型二元高压泵,SPD-10AVP 型紫外检测器,日本岛津公司),UV9100D 紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司),AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),WP-UP-IV-10 型实验室专用超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司),KDM 型调温电热套(山东省鄄城永兴仪器厂),FW-177 型摇摆式粉碎机(上海隆拓仪器设备有限公司)。

菝葜、天山堇菜、秋水仙等药材(均由新疆麦迪森维药有限公司饮片厂提供,经新疆医科大学药学院天药生药教研室帕丽达教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》和 1999 年版《卫生部药品标准·维吾尔药分册》相关项下规定),没食子酸、薯蓣皂苷元对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110831-200803,111539-200001),秋水仙碱对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号 100516),甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,乙醇为国产药用级,其余试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 薯蓣皂苷元的含量测定^[7]

2.1.1 对照品溶液的制备 取薯蓣皂苷元对照品适量,精密称定,加乙腈制成 $220.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液;精密量取贮备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 色谱条件 Cosmosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(90:10),检测波长 203 nm,柱温 35 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL,见图 1。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液,按 2.1.2 项下色谱条件分别测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 69\ 602X + 6\ 733.1 (r = 0.999\ 7)$,线性范围 11.01 ~ 88.09 mg · L⁻¹。

2.2 秋水仙碱的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取秋水仙碱对照品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加甲醇制成 $330.848 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;精密量取储备液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

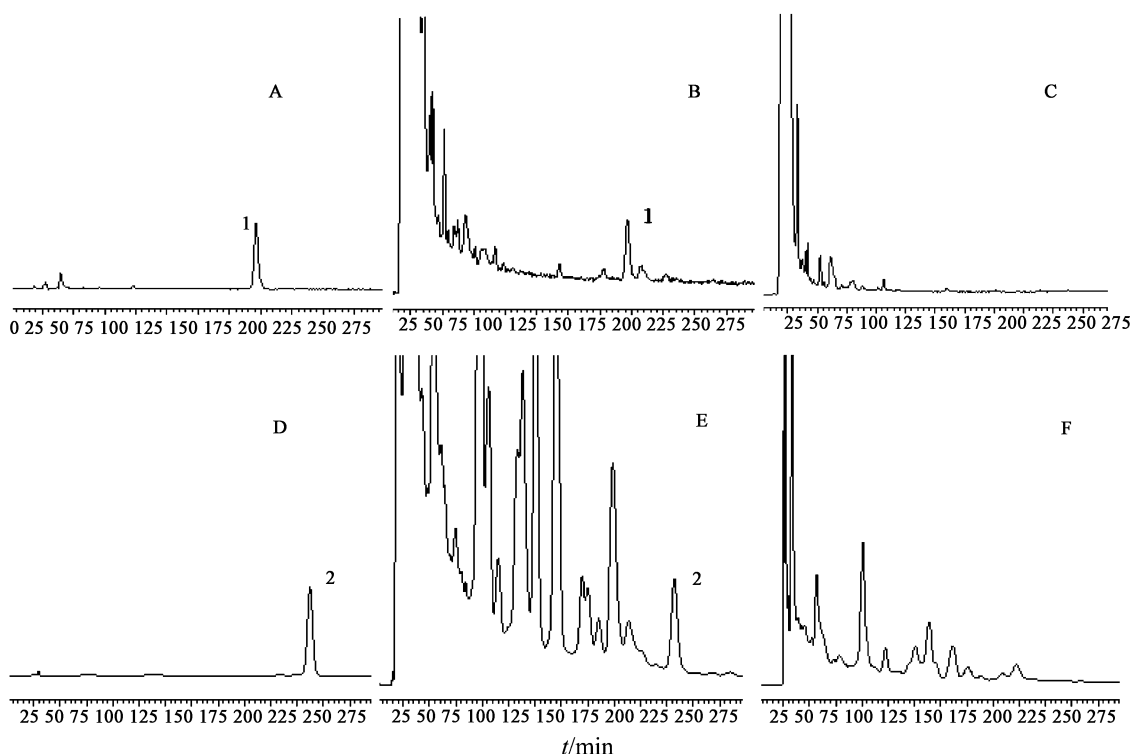
2.2.2 色谱条件 Cosmosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(37:63),检测波长 350 nm,柱温 35 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL,见图 1。

2.2.3 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液各 10 μL,按 2.2.2 项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 30\ 144X + 26\ 500 (r = 0.999\ 8)$,线性范围 16.54 ~ 82.71 mg · L⁻¹。

2.3 总多酚的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取于 105 °C 干燥至恒重的没食子酸对照品 19.43 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;精密吸取 0.5 mL 至 25 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,制成 $38.86 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 标准曲线的制备 精密吸取 2.3.1 项下对



A, D. 对照品; B, E. 供试品; C. 阴性对照(缺菝葜); F. 阴性对照(缺秋水仙); 1. 薯蓣皂苷元; 2. 秋水仙碱

图1 复方必清片 HPLC

照品溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加入磷钼钨酸试液 1 mL, 分别加水 11, 10.5, 10, 9.5, 9, 8.5, 8 mL, 用 29% 碳酸钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 放置 30 min, 以相应试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法于 760 nm 处测定吸光度(A), 以 A 为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.0995X + 0.0854$ ($r = 0.9996$), 线性范围 1.55 ~ 6.21 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 浸膏得率的测定 参照 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法。精密量取提取液 100 mL, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴挥干, 于 105 °C 干燥至恒重后置干燥器中冷却 30 min, 称重, 计算出膏率。

2.5 供试品溶液的制备 称取处方量药材, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行提取, 提取液经稀释后过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.6 提取工艺优选

2.6.1 乙醇提取工艺^[8] 处方中菝葜、天山菝葜和秋水仙等 7 味药材采用乙醇提取。在单因素试验基础上, 确定提取数为 2 次, 以薯蓣皂苷元、秋水仙碱含量及浸膏得率为综合评价指标, 权重系数分别为 0.5, 0.3, 0.2, 综合评分 = (薯蓣皂苷元含量/最大薯蓣皂苷元含量) \times 50 + (秋水仙碱含量/最大秋

秋水仙碱含量) \times 30 + (出膏率/最大出膏率) \times 20, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察乙醇体积分数、提取时间、加醇量对提取工艺的影响, 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 菝葜等 7 味药材乙醇提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 提取时间 /h	C 加醇量 /倍
1	60	1.0	10
2	70	1.5	12
3	80	2.0	14

由直观分析可知, 各因素对乙醇提取工艺的影响顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A 对综合评分的影响有显著性, B, C 因素则无显著性, 结合生产成本等综合考虑, 确定最佳提取工艺为 $A_2B_1C_1$, 即加 10 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.0 h。按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果薯蓣皂苷元、秋水仙碱提取量分别为 0.27 (RSD 1.8%), 0.45 (RSD 1.6%) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 浸膏得率 24.76% (RSD 1.1%), 说明优选的乙醇提取工艺稳定可行。

2.6.2 水提取工艺^[9] 余甘子、西青果、诃子肉等 5 味药材采用水提取。在单因素试验基础上, 选取提取次数、提取时间和加水量为考察因素, 以总多酚

表 2 菝葜等 7 味药材乙醇提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	薯蓣皂苷元提取量/mg·g ⁻¹	秋水仙碱提取量/mg·g ⁻¹	出膏率/%	综合评分
1	1	1	1	1	0.220 3	0.396 3	19.24	81.00
2	1	2	2	2	0.231 8	0.406 1	19.52	83.96
3	1	3	3	3	0.250 1	0.420 3	19.98	88.59
4	2	1	2	3	0.265 2	0.446 9	23.41	95.80
5	2	2	3	1	0.271 6	0.474 7	24.99	100.00
6	2	3	1	2	0.269 2	0.462 1	24.05	98.01
7	3	1	3	2	0.261 8	0.418 4	21.70	92.00
8	3	2	1	3	0.255 7	0.411 2	20.63	89.57
9	3	3	2	1	0.242 1	0.422 7	20.65	87.81
K ₁	253.55	268.80	268.58	268.81				
K ₂	293.81	273.53	267.57	273.97				
K ₃	269.38	274.41	280.60	273.97				
R	40.26	5.61	13.03	5.17				

表 3 乙醇提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	822.59	2	411.30	46.33	<0.05
B	18.19	2	9.10	1.02	>0.05
C	105.09	2	52.54	5.92	>0.05
D(误差)	17.76	2	8.88		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 6 同)。

含量和浸膏得率的综合评分为指标,权重系数分别为 0.8,0.2,综合评分 = (总多酚含量/最大总

多酚含量) × 80 + (浸膏得率/最大浸膏得率) × 20,采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验,因素水平见表 4,试验安排及结果见表 5,方差分析见表 6。

表 4 余甘子等 5 味药材水提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取数/次	B 加水量/倍	C 煎煮时间/h
1	1	10	1.0
2	2	12	1.5
3	3	14	2.0

表 5 余甘子等 5 味药材水提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	总多酚提取量/mg·g ⁻¹	出膏率/%	综合评分
1	1	1	1	1	186.36	45.06	80.85
2	1	2	2	2	199.94	46.54	86.04
3	1	3	3	3	189.06	45.36	81.88
4	2	1	2	3	217.97	48.29	92.84
5	2	2	3	1	201.21	48.55	87.25
6	2	3	1	2	210.82	49.06	90.72
7	3	1	3	2	202.61	50.47	88.48
8	3	2	1	3	227.99	51.35	97.44
9	3	3	2	1	235.53	50.47	99.66
K ₁	248.77	262.17	269.00	267.76			
K ₂	270.81	270.73	278.54	265.23			
K ₃	285.57	272.26	257.61	272.17			
R	36.80	10.09	20.93	6.94			

表 6 水提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	686.02	2	343.01	27.83	<0.05
B	59.12	2	29.56	2.40	>0.05
C	219.57	2	109.78	8.91	>0.05
D(误差)	24.65	2	12.32		

由直观分析可知,影响提取效果的因素顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A 对综合评分有显著性影响,B,C 因素则无显著性影响,综合考虑,确定最佳提取工艺为 $A_3B_1C_1$,即加 10 倍量水提取 3 次,每次 1.0 h。按优选的工艺条件进行 3 次验证试验,结果测得总多酚提取量 $235.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.5%,浸膏得率 49.22%,RSD 1.3%,证明该提取工艺合理可行。

3 讨论

复方必清片处方由 12 味药材组成,菝葜等 7 味药材的有效成分为秋水仙碱、薯蓣皂苷元及黄酮类等,这些成分均溶于乙醇,因此该 7 味药材采用乙醇提取。余甘子、西青果和诃子肉等 5 味药材中有效成分为总多酚类,该类成分均溶于水,故将这 5 味药进行水煎煮。在秋水仙碱含量测定时,预试验通过参考相关文献尝试改变流动相比例^[10-11],如甲醇-水(45:55)、甲醇-0.1%磷酸(40:60)等系统,发现样品分离度较差,存在拖尾现象,其中流动相甲醇-水(30:70)保留时间太长且峰形较差,而调整流动相甲醇-水(37:63)时,对照品和样品得以较好分离,符合含量测定要求。

[参考文献]

- [1] 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,2010:290.
- [2] 邹健,阮金兰,孙传勇. 菝葜的化学成分、药理作用于临床应用[J]. 中药材,2001,24(6):450.
- [3] 陈东生,吕永宁,吕翼,等. 菝葜总甾体皂苷元的含量测定[J]. 中药材,2001,24(2):111.
- [4] 杨立勇,李雨生,王祥培,等. 菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):104.
- [5] 赵建平. 西青果中没食子酸的含量测定[J]. 广西中医学院学报,2003,6(4):53.
- [6] 邓才彬,谢庆娟,曲中堂. 余甘子化学成分研究[J]. 中国药房,2009,20(27):2120.
- [7] 潘海峰,洪霞,李艳荣. HPLC-ELSD 测定穿山龙中薯蓣皂苷元[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):119.
- [8] 林建原,叶晓阳,汤琳晓,等. 菝葜中薯蓣皂苷元提取工艺的研究[J]. 光谱实验室,2009,27(5):2029.
- [9] 赵谋明,刘晓丽,崔春,等. 余甘子多酚响应面法优化提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技,2007,28(6):117.
- [10] 马兰,李冠儒. 几种测定秋水仙碱方法比较分析[J]. 黑龙江医药,2003,16(5):464.
- [11] 赵建波,张丽慧,邱相君,等. 高效液相色谱质谱检测血浆秋水仙碱及其药动学研究[J]. 杭州师范学院学报:医学版,2007,27(6):349.

[责任编辑 仝燕]

欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,192 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。