

正交试验优选百清凝胶的提取工艺

陈军霞*, 卞凌

(南京医科大学附属南京妇幼保健院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 优选百清凝胶的提取工艺。方法: 以丹皮酚含量为指标, 单因素试验考察徐长卿的蒸馏提取工艺; 以苦参碱、盐酸小檗碱含量和浸膏得率的综合评分为指标, 选取浸泡时间、加水量, 回流次数和时间作为考察因素, 采用正交试验优选百清凝胶的提取工艺。结果: 收集 10 倍量徐长卿质量的蒸馏液, 蒸馏后药渣与苦参、黄柏等药材饮片加 10 倍量水提取 3 次, 每次 1.5 h。结论: 优选工艺的合理、稳定、且提取率高。

[关键词] 百清凝胶; 提取工艺; 丹皮酚; 苦参碱; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0040-04

Optimization of Extraction Technology for Baiqing Gel by Orthogonal Test

CHEN Jun-xia*, BIAN Ling

(Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Baiqing gel. **Method:** With the content of paeonol as index, distillation extraction technology of *Cynanchum paniculatum* was investigated by single factor test; With the content of matrine, berberine hydrochloride and extract yield as comprehensive index, soaking time, the amount of water reflux times and time were chosen as factors, extraction technology of Baiqing gel was optimized by orthogonal test. **Result:** Distillate was collected with 10 times the amount of *C. paniculatum*, dregs (after distillation), *Phellodendron chinense*, *Sophora flavescens* and other herbal pieces were extracted 3 times with 10 times the amount of water, 1.5 h each time. **Conclusion:** This optimized technology was rational and stable with high extraction rate.

[Key words] Baiqing gel; extraction process; paeonol; matrine; berberine hydrochloride

百清凝胶制剂处方来源于医院临床制剂百清洗液, 由徐长卿、苦参、黄柏等 8 味中药组成, 具有祛风止痒、燥湿杀虫之功效, 原制剂临床上长期用于老年性阴道炎, 临床有效率 98%, 受到广大患者的欢迎。本试验拟采用正交试验优选百清凝胶的提取工艺, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

Shimadzu LC-20AB 型高液相色谱系统(日本岛津公司), BS2242S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 盐酸小檗碱、苦参碱、丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110713-

200609, 110805-200508, 10708-200506), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯, 药材饮片均购于南京海源中药饮片公司, 经南京海昌中药集团有限公司姚仲青主任中药师鉴定, 均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求。

2 方法与结果

2.1 徐长卿蒸馏提取工艺考察^[1-3] 徐长卿主要药效成分为丹皮酚(熔点 49.5 ~ 50.5 °C), 采用蒸馏法提取。以丹皮酚质量为指标, 考察不同体积馏出液析出的丹皮酚质量差异。称取处方量徐长卿 100 g, 加 25 倍量水浸泡 30 min, 蒸馏, 接收蒸馏液, 2.5 倍体积为 1 份收集液, 置冰箱中 4 °C 冷藏, 静置 24 h, 过滤, 将析出的丹皮酚晶体置于滤纸上, < 40 °C 低温干燥至恒重, 精密称定丹皮酚晶体质量, 结果见表 1。

[收稿日期] 20120823(001)

[基金项目] 南京市卫生局医学科技发展课题(YKK10042)

[通讯作者] * 陈军霞, 主任中药师, 本科, 从事中药制剂研究, Tel: 025-52226272, E-mail: 13851622528@139.com

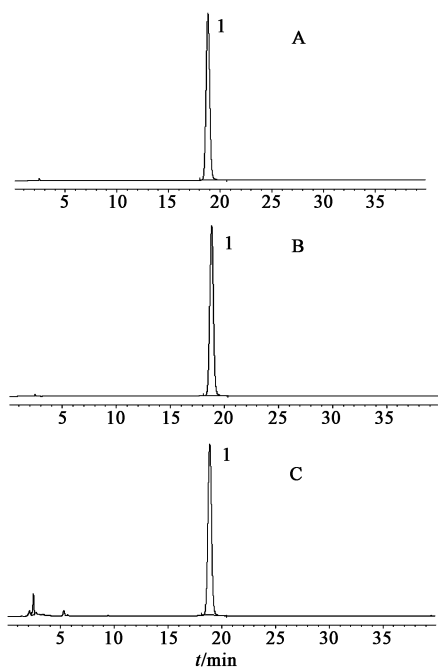
表1 徐长卿蒸馏提取液中丹皮酚质量考察

No.	累计收集体 积量/倍	丹皮酚结晶 质量/g	提取率 /%	累积提取 率/%
1	2.5	0.538 1	33.89	33.89
2	5	0.447 1	28.16	62.05
3	7.5	0.330 5	20.81	82.86
4	10	0.139 7	8.80	91.66
5	12.5	0.092 2	5.81	97.47
6	15	0.04	2.52	100.00

注:每份馏出液均为250 mL。

2.2 丹皮酚含量测定^[4]

2.2.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(45:55),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温35℃,检测波长274 nm,进样体积10 μL。见图1。



A. 对照品;B. 馏出液丹皮酚结晶;C. 饮片;1. 丹皮酚

图1 徐长卿 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品10 mg置50 mL量瓶中,加甲醇溶解后稀释至刻度,摇匀,得对照品储备液;精密移取1 mL对照品储备液至10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取徐长卿馏出液结晶适量,按2.2.2项下方法制备。

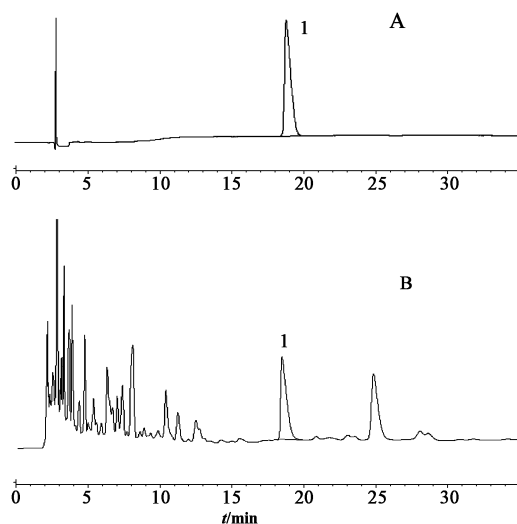
2.2.4 饮片供试品溶液的制备 取徐长卿粗粉约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声处理(功率250 W,频率33 kHz)

30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.5 样品测定 分别取对照品溶液、馏出液结晶供试品及饮片供试品按2.2.1项下色谱法进行测定。分别记录峰面积,采用外表一点法计算丹皮酚质量分数分别为100%,98.51%,1.597%。说明15倍体积的徐长卿馏出液中丹皮酚结晶总质量1.588 g(含量98.51%),10倍量馏出液中丹皮酚转移率>90%,可认为已提取完全。故从降低成本及缩短生产周期考2次,以接收10倍量蒸馏液为宜。

2.3 苦参碱含量测定^[5-8]

2.3.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(含0.03%三乙胺和0.2%磷酸)(3:97),检测波长220 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃。在该色谱条件下,苦参碱可与其他成分基线分离,见图2。



A. 对照品;B. 供试品;1. 苦参碱

图2 百清凝胶提取液苦参碱 HPLC

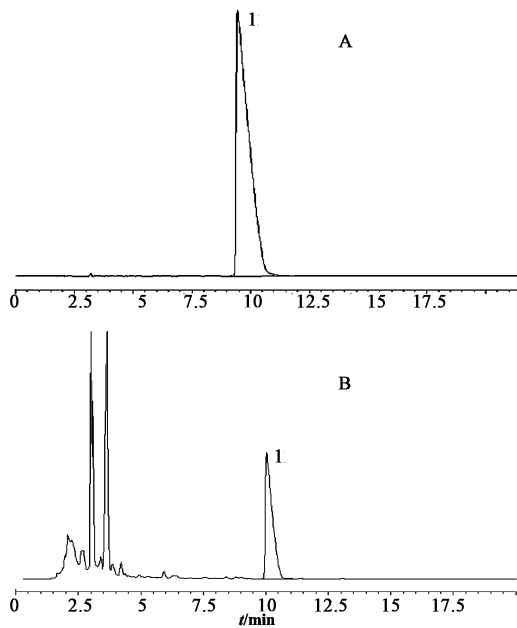
2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取苦参碱对照品(置盛有五氧化二磷的干燥器中干燥48 h)5.0 mg置25 mL量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备与测定 吸取药物提取浓缩液(0.1 g·mL⁻¹)适量,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品液。精密吸取对照品与供试品溶液适量,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算苦参碱含量。

2.4 盐酸小檗碱含量测定^[9-12]

2.4.1 色谱条件 Kromasil 100-5C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸水(磷

酸二氢钠 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (28:72), 检测波长 346 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30 min。在该色谱条件下, 盐酸小檗碱可与其他成分基线分离, 见图 3。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 盐酸小檗碱

图 3 百清凝胶提取液盐酸小檗碱 HPLC

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品 5 mg, 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备与测定 精密吸取药物提取浓缩液适量, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品液。精密吸取对照品与供试品适量, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 计算盐酸小檗碱

含量。

2.5 浸膏得率的测定 精密吸取浓缩液 20 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 置于 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥箱中干燥 3 h, 移至干燥器, 冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算, 即得。

2.6 正交设计优选 按处方比例称取徐长卿、苦参、黄柏等药材饮片, 共 115 g, 徐长卿先水蒸气蒸馏提取得到丹皮酚, 药渣与苦参、黄柏等合并, 加水浸泡后加热煎煮回流, 过滤且合并滤液, 提取液减压浓缩至 1 150 mL, 备用。选择浸泡时间、加水倍量、回流次数和回流时间为考察因素, 每个因素各取 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交设计安排试验, 以苦参碱浸、盐酸小檗碱含量和浸膏得率的综合评分为指标, 优选提取工艺, 苦参碱、盐酸小檗碱含量权重均为 0.4, 浸膏得率的权重系数设为 0.2, 综合评分 $Y = (0.4X_1/25.32 + 0.4X_2/372.02 + 0.2X_3/184.78) \times 100$ 。因素水平安排见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 百清凝胶提取工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	浸泡时间/h	加水量/倍	回流数/次	回流时间/h
1	0	8	1	1
2	0.5	10	2	1.5
3	1	12	3	2

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

表 3 百清凝胶提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	X_1 浸膏得率 /%	X_2 苦参碱质量 分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	X_3 盐酸小檗碱质量 分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	Y 综合 评分
1	1	1	1	1	14.74	197.51	55.00	45.21
2	1	2	2	2	22.32	286.67	133.07	77.12
3	1	3	3	3	25.32	372.02	184.78	100
4	2	1	2	3	22.20	326.34	112.49	78.22
5	2	2	3	1	24.27	291.92	112.17	73.17
6	2	3	1	2	18.03	227.99	76.62	55.16
7	3	1	3	2	23.14	281.83	96.35	69.94
8	3	2	1	3	16.98	243.32	86.48	59.05
9	3	3	2	1	23.20	333.22	126.63	81.74
K_1	74.110	64.457	53.140	66.707				
K_2	68.850	69.780	79.072	67.407				
K_3	70.243	78.967	81.037	79.090				
R	5.260	14.510	27.897	12.383				

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A(误差)	44.560	2	1.000	
B	323.273	2	7.255	>0.05
C	1452.384	2	32.594	<0.05
D	290.337	2	6.516	>0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$ 。

行方差分析,提取次数影响显著,加水倍量、提取时间和浸泡时间均无明显影响。故确定提取工艺为 $A_1B_2C_3D_2$,即不浸泡,加10倍量水提取3次,每次1.5 h。

3 讨论

百清凝胶原方以水煎煮,由于处方中徐长卿的丹皮酚为其有效抗菌消炎成分之一,能随水蒸气馏出,故本试验采用水蒸气蒸馏法单独提取。由于丹皮酚熔点较低,干燥时温度应相对较低。且收集蒸馏液体积应适宜,以防丹皮酚浓度过低不利于结晶。

苦参碱具有明显的免疫促进、抗过敏作用。苦参在加热和有其他还原物质存在的条件下,氧化苦参碱向苦参碱转变^[5,13]。临床研究表明,氧化苦参碱在体内约70%会被转化为苦参碱,最终起药理作用的是苦参碱。故本试验以苦参碱含量为优选工艺指标,考察Kromasil 100-5C₁₈色谱柱和YMC-Pack ODS-A色谱柱,乙腈-水(0.03%三乙胺)、乙腈-水(0.03%三乙胺和0.2%磷酸)和甲醇-水(0.03%三乙胺和0.2%磷酸)流动相系统,结果发现乙腈-水系统中,苦参碱峰的保留时间比较小,致使其与其他峰混合在一起;苦参碱属于生物碱类成分,流动相中加入峰型改良剂三乙胺后,对苦参碱色谱峰的对称性、分离度有所改善,优化后选择使用Kromasil 100-5C₁₈,以甲醇-水(0.03%三乙胺和0.2%磷酸)为溶剂系统能获得较理想的色谱图^[5]。

盐酸小檗碱具有清热解毒、抗菌消炎的功效,常作为指标成分用于含量测定。通过190~400 nm全波长扫描,盐酸小檗碱在228,264,346 nm处均有较

大吸收峰。通过比较,检测波长在346 nm下基线平稳,峰型较好,且无干扰峰。

[参考文献]

- [1] 付成效,何群,周军,等. 湿疹喷雾剂的蒸馏与水提取工艺研究[J]. 湖南中医学院学报,2005,25(5):24.
- [2] 林雄,褚克丹,林俊禧,等. 醒鼻凝胶剂中丹皮酚的提取工艺研究[J]. 福建中医学院学报,2006,16(4):53.
- [3] 陈忠梁,胡春湘,张正光. 愈胃灵颗粒剂的工艺研究[J]. 中成药,1998,20(5):5.
- [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,2010:268.
- [5] 潘广洲,李峰,李键. 苦参碱和氧化苦参碱的转化对苦参提取工艺的影响[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(2):52.
- [6] 史银基,刘砥威,石雪,等. HPLC测定阿娜尔妇洁液中苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):119.
- [7] 谢辉,毛春芹,狄留庆,等. 护肝拔毒浸膏提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):38.
- [8] 张蕾,陈晓辉,李娟,等. RP-HPLC法测定苦参中苦参碱的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2005,22(1):33.
- [9] 刘丽花,陈天朝,翟来超. 均匀设计优选黄连紫草膏中黄连、黄柏、当归水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):33.
- [10] 杨明荣. 中药制剂中盐酸小檗碱定量分析方法综述[J]. 北方药学,2010,7(2):62.
- [11] 张倩,蔡丽芬,钟国跃. RP-HPLC法同时测定关黄柏中小檗碱、药根碱、巴马汀及黄柏酮含量的方法学研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2061.
- [12] 李喜香,罗燕梅,罗文蓉,等. 养阴生肌膜工艺条件的筛选[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(5):43.
- [13] 郭安. 苦参碱和氧化苦参碱提取纯化工艺研究[J]. 西南林学院学报,2006,26(2):37.

[责任编辑 全燕]