

# 三虎痛风颗粒的提取工艺优选

王岩<sup>1</sup>, 林钦贤<sup>1</sup>, 颜婷<sup>1</sup>, 王婴<sup>1</sup>, 唐业建<sup>2\*</sup>

(1. 广东药学院, 广州 510006; 2. 广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023)

**[摘要]** 目的: 优选三虎痛风颗粒的提取工艺。方法: 采用正交试验, 考察加水量、提取次数、提取时间 3 个因素对提取工艺的影响, 以虎杖苷、大黄素含量及浸膏得率为指标, 采用 RP-HPLC 测定虎杖苷、大黄素含量, 烘干法测定浸膏得率。结果: 最佳提取工艺为药材加 10 倍量水加热回流提取 2 次, 每次 1 h。结论: 该工艺设计合理, 稳定可行, 适用于工业化生产。

**[关键词]** 三虎痛风颗粒; 虎杖苷; 大黄素; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0037-03

## Optimization of Extraction Process of Sanhu Tongfeng Granule

WANG Yan<sup>1</sup>, LIN Qin-xian<sup>1</sup>, YAN Ting<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, TANG Ye-jian<sup>2\*</sup>

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese medicine, Nanning 530023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Sanhu Tongfeng granule. **Method:** Orthogonal design was used to investigate the amount of water, extraction times and extraction time with the content of polydatin, emodin and yield of extract as indexes. The content of polydatin and emodin were determined by RP-HPLC, yield of extract was determined by drying method. **Result:** The best extraction conditions were as follows: refluxing extracted 2 times with 10-fold water, 1 h for each time. **Conclusion:** This optimized extraction process was reasonable, stable, feasible and applicable to industrial production.

**[Key words]** Sanhu Tongfeng granule; polydatin; emodin; orthogonal test

三虎痛风颗粒由虎杖、土牛膝、蒲公英等 12 味中药组成, 是来自广西中医学院第一附属医院临床应用多年的经验方, 具有活血通络、散瘀止痛等功效, 用于治疗各类风湿病, 临床疗效稳定。处方中虎杖为君药, 本研究以其中有效成分虎杖苷、大黄素含量及浸膏得率为指标, 采用正交试验法对其水提工艺进行筛选, 为该制剂生产工艺参数的确定提供实验依据。

### 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津), 虎杖、土牛膝、蒲公英等药材均购自广东省药材公司中

药饮片厂, 经笔者鉴定符合《中国药典》2010 年版一部的规定, 虎杖苷、大黄素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 1535-200001, 110756-200110), 水为超纯水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 水提液样品的制备** 选用  $L_9(3^4)$  正交表进行试验<sup>[1]</sup>, 以虎杖苷、大黄素含量及浸膏得率为指标, 考察加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)3 个因素对提取效果影响。因素水平见表 1。

表 1 三虎痛风颗粒提取工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/min	C 提取数/次
1	6	60	1
2	8	90	2
3	10	120	3

### 2.2 虎杖苷的含量测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[2-3]</sup> 以十八烷基硅烷键合硅胶为

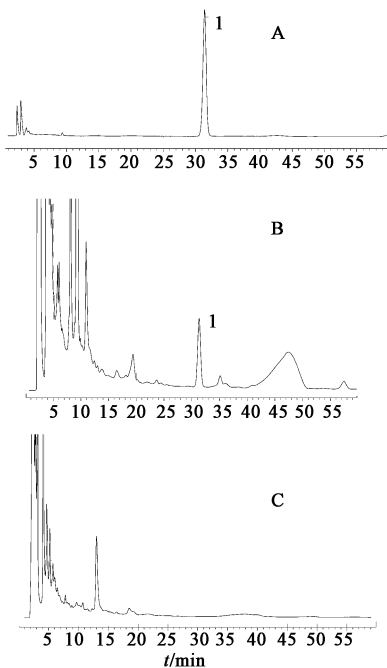
[收稿日期] 20120103(009)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻-10124008-5)

[第一作者] 王岩, 博士, 从事药物新剂型与质量控制研究, E-mail: gdpwy@126.com

[通讯作者] \* 唐业建, 主任医师, 从事风湿痛症临床诊治及研究, E-mail: jhywe@sina.com

填充剂,流动相乙腈-水(22:78),检测波长 306 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。理论板数按虎杖苷峰计算不低于 3 000。阴性对照样品在虎杖苷保留时间附近不出峰,说明该法具有良好的专属性。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 虎杖苷  
图 1 三虎痛风颗粒中虎杖苷 HPLC

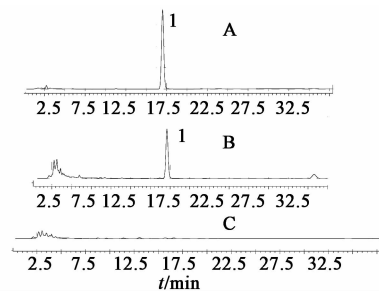
**2.2.2 标准曲线的制备** 精密称取虎杖苷对照品 1.98 mg, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成质量浓度 19.8 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液, 作为贮备液。精密量取 1, 2, 4, 6, 8 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 另精密量取 5 mL 至 100 mL 棕色量瓶中, 分别加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 精密吸取 20 μL 续滤液进样测定。以峰面积对进样量进行回归, 得线性方程  $Y = 177\,493X (r = 0.999\,8)$ , 虎杖苷在 0.99 ~ 19.8 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.3 精密度试验** 精密吸取 7.92 mg·L<sup>-1</sup> 的虎杖苷对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 1.41%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.4 供试品溶液的制备** 精密量取 9 份正交试验样品各 1 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇约 9 mL, 超声处理(功率 100 W, 频率 40 Hz) 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 大黄素的含量测定

**2.3.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 流动相甲腈-0.1% 磷酸溶液(80:20), 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。理论板数按大黄素峰计算不低于 3 000<sup>[4]</sup>。阴性对照样品在大黄素保留时间附近不出峰, 说明该法具有良好的专属性。色谱图见图 2。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 大黄素  
图 2 三虎痛风颗粒中大黄素 HPLC

**2.3.2 标准曲线的制备** 精密称取大黄素对照品 2.43 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成质量浓度 48.6 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液, 作为贮备液。精密量取 1, 2, 4, 6, 8 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 精密吸取 20 μL 续滤液进样测定。以峰面积对进样量进行回归, 得线性回归方程  $Y = 92\,850X (r = 0.999\,7)$ , 大黄素在 4.86 ~ 48.6 μg 呈良好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取 19.44 mg·L<sup>-1</sup> 的大黄素对照品溶液 20 μL, 按上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, 结果 RSD 0.59%, 说明仪器精密度良好。

**2.3.4 供试品溶液的制备** 精密量取 9 份正交试验样品各 1 mL, 置圆底烧瓶中, 加 2.5 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸溶液 10 mL, 加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1 h, 取出, 放冷, 置分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液用三氯甲烷洗涤 2 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.4 干膏得率的测定** 分别精密量取正交试验 1~9 号样品液 25 mL, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后, 于 105 ℃ 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 精密称定质量, 于 105 ℃ 干燥 1 h, 同法冷却后称定质量, 至 2 次质量的差异不超过 0.3 mg 为止, 记录各样品液的干膏质量, 计算干膏得率<sup>[5]</sup>。

**2.5 正交试验优选** 称取 3 倍处方量药材 18 份, 每份 390 g, 置圆底烧瓶中, 按正交表条件进行加热回流提取试验, 合并提取液, 浓缩, 放冷, 加水定容至 100 mL。试验安排见表 2, 方差分析见表 3。

表2 三虎痛风颗粒提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	虎杖苷 /%	大黄素 /%	干膏 得率 /%
1	1	1	1	1	0.039	0.095	12.48
2	1	2	2	2	0.123	0.351	21.63
3	1	3	3	3	0.085	0.295	18.72
4	2	1	2	3	0.121	0.433	22.64
5	2	2	3	1	0.122	0.380	21.28
6	2	3	1	2	0.037	0.186	16.10
7	3	1	3	2	0.091	0.441	22.69
8	3	2	1	3	0.075	0.320	16.80
9	3	3	2	1	0.100	0.497	24.58
虎杖苷	$K_1$	0.083	0.084	0.050	0.087		
	$K_2$	0.094	0.107	0.115	0.084		
	$K_3$	0.089	0.074	0.099	0.094		
	R	0.011	0.034	0.065	0.010		
大黄素	$K_1$	0.247	0.323	0.201	0.324		
	$K_2$	0.333	0.351	0.427	0.326		
	$K_3$	0.420	0.326	0.372	0.349		
	R	0.173	0.028	0.227	0.025		
干膏得率	$K_1$	17.610	19.270	15.127	19.447		
	$K_2$	20.007	19.903	22.950	20.140		
	$K_3$	21.357	19.800	20.897	19.387		
	R	3.747	0.633	7.823	0.753		

表3 提取工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P	
虎杖苷	A	$1.854 \times 10^{-4}$	2	1.188	
	B	$1.701 \times 10^{-3}$	2	10.904	
	C	$6.838 \times 10^{-3}$	2	43.833	<0.05
	D(误差)	$1.560 \times 10^{-4}$	2		
大黄素	A	$4.463 \times 10^{-2}$	2	38.080	<0.05
	B	$1.367 \times 10^{-3}$	2	1.166	
	C	$8.680 \times 10^{-2}$	2	74.061	<0.05
	D(误差)	$1.172 \times 10^{-3}$	2		
干膏得率	A	21.604	2	20.575	<0.05
	B	0.693	2	0.660	
	C	98.714	2	94.013	<0.05
	D(误差)	1.05	2		

由直观分析可见,各因素对虎杖苷的影响效果顺序为  $C > B > A$ , 优选水平组合为  $A_2B_2C_2$ ; 对大黄

素的影响效果顺序为  $C > A > B$ , 优选水平组合为  $A_3B_2C_2$ ; 对干膏得率的影响效果顺序为  $C > A > B$ , 优选水平组合为  $A_3B_2C_2$ 。方差分析结果表明,因素 C 对虎杖苷、大黄素和干膏得率均具有显著影响; 因素 A 对大黄素和干膏得率均具有显著影响; 因素 B 对各指标均无显著影响。为节省成本, 节约能源, 确定最佳工艺确定为  $A_3B_1C_2$ , 即加 10 倍量水提取 2 次, 每次 1 h。

**2.6 工艺验证试验** 称取 3 倍处方量药材 3 份, 每份 390 g, 按优选提取工艺进行验证试验, 操作方法同前, 测得提取物中虎杖苷、大黄素质量分数及干膏得率平均值分别为 0.128%, 0.490%, 22.67%。各项指标均接近正交试验最优水平, 表明该工艺具有良好的稳定性。

### 3 讨论

虎杖苷样品处理时, 曾采用稀乙醇为提取溶剂, 结果以甲醇提取的供试品溶液分离效果最好且峰面积较高, 故采用甲醇制备供试品溶液。本品为复方制剂, 极性相似成分较多, 参照 2010 年版《中国药典》虎杖药材的测定方法<sup>[2]</sup>, 以乙腈-水 (23:77) 为流动相, 虎杖苷峰受到其他成分干扰, 通过调节比例, 改用乙腈-水 (22:78) 为流动相, 分离度得到改善。

由于虎杖苷对光不稳定, 故在含量测定时要求避光操作<sup>[6]</sup>。本实验中发现, 采用棕色瓶装对照品和供试品溶液可有效避免光照分解, 但如果进样过程中不避光亦会造成虎杖苷的分解, 故进样时也应采取有效措施避免光照, 以保证试验的可重复性和准确性。

### [参考文献]

- [1] 张建玲, 贺祝英, 吴红梅. 正交试验优选心衰宁合剂水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 30.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010:195.
- [3] 刘雪梅, 王志萍, 韦慧鲜. 星点设计-效应面法优选妇雅净泡腾片提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 37.
- [4] 徐剑, 张永萍. 苗药痔康宁胶囊中大黄素和虎杖苷的含量测定[J]. 贵阳中医学院学报, 2011, 33(1): 84.
- [5] 王丽惠, 罗旭艳, 杨欣, 等. 蒿鳖养阴颗粒提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 48.
- [6] 余琼, 张玉萍, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方中虎杖苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 821.

[责任编辑 仝燕]