

多指标综合评分法优选青防痛瘀散提取工艺

姜雷,郭玉岩,吕少娃,李秀岩,李永吉*
(黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:优选青防痛瘀散的提取工艺。方法:在单因素考察的基础上采用正交试验,以青藤碱、粉防己碱的含量及固形物量为指标,优选青防痛瘀散的提取工艺。结果:最佳提取工艺为 8 倍量的 70% 乙醇加热回流 2 次,每次 1.5 h。结论:该提取工艺稳定,安全,简便易行。

[关键词] 青防痛瘀散;青藤碱;粉防己碱;正交试验;综合评分法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0026-03

Optimization of Extraction Technology for Qingfang Tongyu Powder
by Multiple Guidelines Grading Method

JIANG Lei, GUO Yu-yan, LV Shao-wa, LI Xiu-yan, LI Yong-ji*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction technology of Qingfang Tongyu powder. Method: Based on single factor experiment, used the content of sinomenine and tetrandrine, the amount of solids as indexes, extraction technology of Qingfang Tongyu powder was optimized by orthogonal experiment. Result: Optimum extraction technology was: refluxing extracted 2 times with 8 times of the amount of 70% ethanol with 1.5 h each time. Conclusion: This optimum extraction technology was stable, safe, simple and easy.

[Key words] Qingfang Tongyu powder; sinomenine; tetrandrine; orthogonal test; composite scoring method

青防痛瘀散是根据《普济方》^[1]风湿痹门中的古方制成的一种外用散剂,由青风藤和防己 2 味药材组成,常用于风湿痹痛、关节肿胀等症,中医用其单味及复方内服或外用治疗风湿性疾病已有 1 000 多年的历史。本试验对古方进行剂型改革制成外用散剂,采用正交试验法,以青藤碱、粉防己碱和固形物量为指标进行综合评分优选青防痛瘀散的提取工艺,为将其研发为中药新药提供技术支持。

1 仪器与试剂

U3000 型高效液相色谱仪(戴安),DZF6090 型真空干燥箱(上海恒科技术有限公司),DELTA 320 型 pH 计(梅特勒-托利多),CP225D 型分析天平

(Sartorius)等。

青风藤及防己饮片均购自哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司,经吕少娃副教授鉴定青风藤为防己科植物青藤或毛青藤 *Sinomenium acutum* 的干燥藤茎,防己为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根。青藤碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0774-200206),粉防己碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110711-200708)甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青藤碱及粉防己碱含量测定^[4]

2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-磷酸盐缓冲液(0.005 mol·L⁻¹磷酸氢二钠调 pH 8.0,再以 1% 三乙胺调 pH 9.0)为流动相,检测波长青藤碱为 262 nm,粉防己碱为 280 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。进样梯度见表 1。

[收稿日期] 20110908(003)
[基金项目] 黑龙江中医药大学新药研究基金(X200903)
[第一作者] 姜雷,硕士研究生,从事药剂学研究,Tel:0451-82196339,E-mail:jianglei0453@163.com
[通讯作者] *李永吉,博士,教授,从事药剂及新药研究,Tel:0451-82196331,E-mail:liyongji2009@163.com

表1 青藤碱及粉防己碱含量测定流动相梯度

t/min	甲醇-磷酸盐缓冲液
0 ~ 10	53:47
10 ~ 13	82:78 ~ 53:47
13 ~ 26	82:78
26 ~ 30	53:47

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取已干燥恒重的青藤碱及粉防己碱对照品,加甲醇制成每 mL 含青藤碱 0.5 mg、粉防己碱 0.1 mg 的溶液,作为储备液(青藤碱 $0.565\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,粉防己碱 $0.130\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密移取药材提取液适量,蒸干,残渣加甲醇定容,以 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 标准曲线的制备 精密移取 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mL 储备液,置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得到含青藤碱 0.057,0.113,0.170,0.226,0.283,0.565 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、粉防己碱 0.013,0.026,0.039,0.052,0.065,0.130 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的粉防己碱对照品溶液,分别进样 10 μL 。以对照品质量浓度(X)对峰面积(Y)进行线性回归,得到 $Y_{\text{青藤碱}} = 1.8727 \times 10^6 X + 4218.2951$ ($r = 0.9999$); $Y_{\text{粉防己碱}} = 1.4220 \times 10^6 X + 1851.9016$ ($r = 0.9997$)。结果表明,青藤碱进样量在 0.565 ~ 5.650 μg ,粉防己碱进样量在 0.130 ~ 1.300 μg 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 用混合对照品溶液,连续进样 5 次,每次 10 μL ,按上述色谱条件测定。结果青藤碱的 RSD 0.22%,粉防己碱的 RSD 0.17%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取适量供试品溶液于 0,1,2,4,6,8,12 h 内按 2.1.1 项下测定,结果青藤碱的 RSD 0.17%,粉防己碱的 RSD 0.16%,供试品溶液在 0 ~ 12 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验 取 2.1.3 下的同一供试品溶液,重复进样 6 次,结果青藤碱的 RSD 1.90%,粉防己碱的 RSD 1.61%,重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取 6 份 2.1.3 项下的同一样品溶液 3 mL,分别精密加入 2.1.2 项下溶液 1 mL,按 2.1.3 项下制备,按 2.1.1 项下测定方法,计算回收率,结果青藤碱平均回收率为 99.99%,RSD 2.85%;粉防己碱平均回收率为 99.19%,RSD 1.54%。

2.1.9 样品含量测定 分别取混合对照品溶液供试品溶液进样 10 μL ,计算每克固形物中所含的青

藤碱和粉防己碱含量。

2.1.10 固形物的测定 精密量取各提取液或精制后的药液 50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h,移置干燥器中冷却 30 min,立即精密称定质量,计算固形物的量。

2.2 提取溶媒的选择 青风藤和防己的主要成分均为生物碱类物质,分别为青藤碱和粉防己碱。对生物碱的提取主要有酸水提取和乙醇提取,为了充分提高生物碱的利用率,首先对提取溶媒进行考察。

2.2.1 酸水提取法 称取青风藤 90 g,防己 30 g,置圆底烧瓶中,加入 10 倍量 2% HCl 溶液 1 200 mL,加热回流 2 次,每次 1.5 h,滤过。取滤液 10 mL 蒸干,甲醇定容到 10 mL,HPLC 测定青藤碱及粉防己碱的质量分数分别为 13.72,9.54 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;测定固形物质量为 21.90 g。

2.2.2 乙醇回流法 称取青风藤 90 g,防己 30 g,置圆底烧瓶中,加入 10 倍量 70% 乙醇 1 200 mL,加热回流 2 次,每次 1.5 h,滤过。取滤液 10 mL 蒸干,甲醇定容到 10 mL,用 HPLC 测定青藤碱及粉防己碱的质量分数分别为 49.01,13.36 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;测定固形物质量为 10.62 g。结果可知乙醇作为提取溶剂,青藤碱及粉防己碱的含量均明显优于酸水提取,固形物的含量则明显低于酸水提取。为了得到较多的有效成分且满足制剂的生产要求得到较少的固形物,乙醇为较优提取溶剂。

2.3 乙醇体积分数考察 为确定乙醇的最优提取体积分数,按 2.2.2 项下的方法分别用 50% 乙醇,70% 乙醇,90% 乙醇为溶剂进行考察,用 HPLC 测定青藤碱质量分数分别为 35.71,49.01,48.03 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;粉防己碱质量分数分别为 9.81,13.36,11.70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$;测定固形物的质量分别为 12.22,10.62,6.66 g。结果显示 70% 乙醇为提取溶剂时得到的有效成分及固形物的量明显优于 50% 乙醇,90% 乙醇为提取溶剂时虽然在固形物的量上明显优于 70% 乙醇,但其得到的有效成分略低于 70% 乙醇,且考虑到工业生产中的成本问题,70% 乙醇为最佳提取溶剂。

2.4 正交试验^[3] 在上述单因素试验考察基础上,选取加醇量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,每个因素设 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,用权重系数确定最佳提取工艺。因素水平见表 2,正交实验设计及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 2 青防痛瘀散提取工艺正交试验因素水平			
水平	A 加醇倍量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	8	1. 0	1
2	10	1. 5	2
3	12	2. 0	3

表 3 青防痛瘀散提取工艺正交试验安排							
No.	A	B	C	青藤碱含量 /mg·g ⁻¹	粉防己碱含量 /mg·g ⁻¹	固形物量 /g	综合得分
1	1	1	1	29. 087 2	9. 446 1	8. 629 9	0. 861 8
2	1	2	2	27. 509 5	11. 520 2	12. 490 2	0. 915 4
3	1	3	3	29. 595 9	11. 230 5	14. 539 2	0. 979 8
4	2	1	2	26. 158 6	9. 351 3	12. 301 8	0. 849 1
5	2	2	3	27. 125 5	11. 883 2	15. 216 1	0. 949 6
6	2	3	1	25. 857 1	9. 994 5	11. 329 9	0. 841 0
7	3	1	3	22. 457 4	10. 747 2	15. 116 4	0. 834 5
8	3	2	1	28. 991 0	11. 903 8	10. 083 8	0. 920 3
9	3	3	2	25. 528 3	10. 836 7	13. 885 2	0. 882 1
K ₁	0. 919	0. 848	0. 874	0. 898			
K ₂	0. 880	0. 928	0. 882	0. 864			
K ₃	0. 879	0. 901	0. 921	0. 916			
R	0. 040	0. 080	0. 047	0. 052			

注:综合得分 = 青藤碱的含量/青藤碱的最大含量 ×0. 6 + 粉防己碱的含量/粉防己碱的最大含量 ×0. 2 + 固形物的量/固形物的最大量 ×0. 2。

表 4 综合得分方差分析					
方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0. 003	2	0. 001 5	0. 750	>0. 05
B	0. 010	2	0. 005	2. 500	>0. 05
C	0. 004	2	0. 500	1. 000	>0. 05
误差	0. 004	2	0. 500	1. 000	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.0$ 。

2. 5 工艺验证试验 取处方药材 3 份,根据筛选得到的提取工艺 $A_1B_2C_2$,进行正交验证试验,得青藤碱质量分数为 $48.26\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 1. 8%;粉防己碱的质量分数为 15. 21,RSD 1. 0%;固形物的量为 10. 41g,RSD 2. 1%。结果表明优选的工艺条件提取,青藤碱、粉防己碱的含量及固形物的量均得到较满意的结果,该工艺稳定可行。

3 讨论

处方中药材主要成分青藤碱和粉防己碱均为生物碱,其性质相近,因此选择将二者共同提取,同时符合古方中的制备要求。通过单因素试验,考察青藤碱、粉防己碱的含量、固形物及工业生产中的成本

直观分析表明最佳提取工艺为 $A_1B_2C_3$,但方差分析表明 3 个因素均为非显著性因素,对于提取次数实际生产中若提取 3 次会加大药厂的生产成本同时加长生产周期,所以我们选取提取次数为 2 次,即选用 $A_1B_2C_2$,确定最佳提取工艺为 8 倍量 70% 乙醇提取 2 次,每次 1. 5 h。

问题确定了 70% 乙醇为最佳提取溶剂,通过正交设计考察了其他 3 个因素对提取的影响,以青藤碱和粉防己碱的含量及固形物进行综合评分,结合实际生产,确定了最佳提取工艺。应用多指标综合评分法时,设置指标的权重,需根据具体情况具体分析。本方剂中青风藤和防己是按照用药量组成,同时考虑制剂生产中固形物的影响,所以将权重系数分别设为 0. 6,0. 2,0. 2,使优选出的工艺条件更加合理。

〔参考文献〕

[1] 朱棣. 普济方[M]. 北京:人民卫生出版社,1959:2420.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:1966.
[3] 高建,李俊,麻兵继,等. 正交试验法优选玉屏风总苷的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (12):15.
[4] 杜弢,陈红刚,林丽,等. 正交试验优化铁棒锤生物碱提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (3):20.

〔责任编辑 全燕〕