

复方四黄栓提取工艺优选

黄斌¹, 黄松^{1,2*}, 王杰¹, 朱德全¹, 王培培¹, 赖小平^{1,2}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 优选复方四黄栓的提取工艺。方法: 为提高有效成分的提取率, 工艺分为醇提组 I 与醇提组 II, 同时采用单因素结合正交设计法, 优选出 70% 乙醇为提取溶媒, 醇提组 I 以盐酸小檗碱含量为指标, 醇提组 II 以黄芩苷的含量为指标, 优选提取工艺。结果: 醇提组 I 中最佳工艺为 70% 乙醇共提取 3 次, 每次 1.0 h, 溶媒倍量为 8, 6, 6 倍。醇提组 II 中最佳工艺为 8 倍量 70% 乙醇, 提取温度为 80 ℃, 提取 3 次, 每次 1.0 h。结论: 此提取工艺合理可行, 有效成分提取率高, 为生产复方四黄栓提供参考。

[关键词] 复方四黄栓; 正交设计; 盐酸小檗碱; 黄芩苷; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0023-03

Optimization of Extraction Technology for Fufang Sihuang Suppository

HUANG Bin¹, HUANG Song^{1,2*}, WANG Jie¹, ZHU De-quan¹, WANG Pei-pei¹, LAI Xiao-ping^{1,2}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Research Institute of Mathematical Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of Fufang Sihuang suppository. **Method:** To improve extraction rate of active ingredients, technology was divided into alcohol extraction I and alcohol extraction II, while single-factor test and orthogonal test was adopted to optimize preparation conditions which 70% ethanol used as extraction solvent, by using berberine as qualitycontrol criteria of alcohol extraction I and baicalin as qualitycontrol criteria of alcohol extraction II to optimize extraction technology. **Result:** Optimum technology for alcohol extraction I was as follows: extracted 3 times with 8, 6, 6 times the amount of 70% ethanol, extracted 1 h each time. Optimum technology for alcohol extraction II was as follows: extracted three times with adding 8 times the amount of 70% ethanol for 1 h each time at 80 ℃. **Conclusion:** This extraction process was reasonable, practicable, high extraction rate of active ingredients, it could provide a reference for production of Fufang Sihuang suppository.

[Key words] Fufang Sihuang suppository; orthogonal test; berberine; baicalin; extraction technology

复方四黄栓由广州中医药大学新药开发中心研制, 来源于广东省某中医院临床验方, 由大黄、黄芩、黄连、黄柏、五倍子、白及、冰片等 7 味中药组成。主要适用于炎性混合痔、血栓外痔、早期肛裂、肛窦炎以及术后肛门病换药, 在临床使用中具有良好的治

疗效果, 为无数肛门病患者解除了病痛^[1-5]。根据处方药材组成, 本文建立了盐酸小檗碱和黄芩苷的含量测定方法, 采用正交试验法优选提取工艺, 为本制剂的规范化加工提供技术参数。

1 仪器与试剂

P580 高效液相色谱仪 (戴安中国有限公司), 安捷伦 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 盐酸小檗碱 (批号 110713-200208), 黄芩苷 (批号 110715-200514) 对照品均购于中国药品生物制品检定所。大黄药材均购自广州杏园春大药房, 其他药材均购自广州采芝林药业有限公司 (由广州中医药大学赖小平研究员鉴定均为正品)。甲醇、乙腈为色谱纯,

[收稿日期] 20110802(004)

[基金项目] 广东省中医药管理局项目(2008117)

[第一作者] 黄斌, 硕士研究生, 从事中药新药研究与开发, Tel: 15915854506, E-mail: huangbinsg@163.com

[通讯作者] * 黄松, 副研究员, 博士, 从事新药研究开发与植物化研究, Tel: 020-32503212, E-mail: hsl318@yahoo.com.cn

其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 醇提工艺 I

2.1.1 色谱条件 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (50:50) (每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g), 检测波长 265 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL。在该色谱条件下, 盐酸小檗碱可与其他成分基线分离, 结果见图 1。

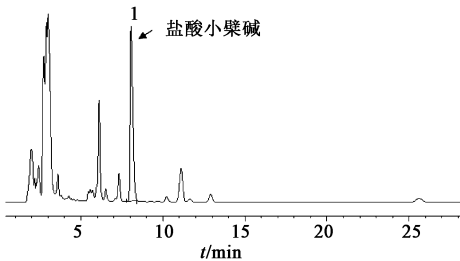


图 1 提取液盐酸小檗碱 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 取盐酸小檗碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 110 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.1.3 线性关系考察 精密量取盐酸小檗碱对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL 分别进样, 测得峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 得标准曲线 $Y = 27.037X - 1.485$ ($R^2 = 0.9993$), 进样量在 0.22 ~ 1.10 μg 线性关系良好。

2.1.4 供试品溶液的制备 准确称取黄连、黄柏药材粗粉 (过 20 目筛) 5 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.0 h, 滤过, 洗涤药渣, 合并滤液和洗涤液, 70% 乙醇定容于 500 mL 量瓶中。精密移取上述提取液 1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.5 正交试验 在固定 70% 乙醇为提取溶剂的基础上, 以提取次数、提取时间、提取倍量为考察因素, 盐酸小檗碱含量为评价指标, 用 L₉(3⁴) 正交表安排试验, 因素水平见表 1, 结果及方差分析见表 2, 3。

表 1 复方四黄栓醇提组 I 正交试验因素水平

水平	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 乙醇用量/倍
1	1	0.5	12, 10, 10
2	2	1.0	10, 8, 8
3	3	1.5	8, 6, 6

由表中极值 *R* 可知, 各因素对盐酸小檗碱提取

表 2 复方四黄栓醇提组 I 正交试验安排

No.	A	B	C	D	盐酸小檗碱 提取率/%
1	1	1	1	1	42.12
2	1	2	2	2	52.19
3	1	3	3	3	48.45
4	2	1	2	3	70.34
5	2	2	3	1	86.52
6	2	3	1	2	67.56
7	3	1	3	2	93.32
8	3	2	1	3	80.56
9	3	3	2	1	92.27
<i>K</i> ₁	142.76	212.11	196.57	227.24	
<i>K</i> ₂	224.42	219.27	214.80	213.07	
<i>K</i> ₃	266.15	208.28	228.29	199.35	
<i>R</i>	123.39	10.99	31.72	27.89	

表 3 复方四黄栓醇提组 I 方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
A	2 626.09	2	1 313.05	33.08	<0.05
B	79.39	2	39.70	0.43	
C	248.11	2	124.05	3.13	
D(误差)	34.33	2	17.17	1.00	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0, F_{0.01}(2, 2) = 99.0$ (表 6 同)。

率影响顺序为 $A > C > B$; 方差分析结果表明, A 因素的影响有显著性意义, 以 A_3 为佳。B, C 因素的影响无显著性意义, 考虑生产成本, 选择 B_2C_3 。综上分析, 以 $A_3B_2C_3$ 为提取条件, 即提取 3 次, 每次 1.0 h, 溶媒倍量为 8, 6, 6 倍。

2.1.6 验证试验 称取处方药材, 按上述结果分析中的各条件下提取, 测定供试品溶液中盐酸小檗碱的含量, 结果盐酸小檗碱平均提取率为 87.28%, RSD 0.69%。验证样品中各指标与正交试验优选结果相近, 说明优选的工艺条件稳定可行。

2.2 醇提工艺 II

2.2.1 色谱条件 流动相甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2), 检测波长 280 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL。在该色谱条件下, 黄芩苷可与其他成分基线分离, 结果见图 2。

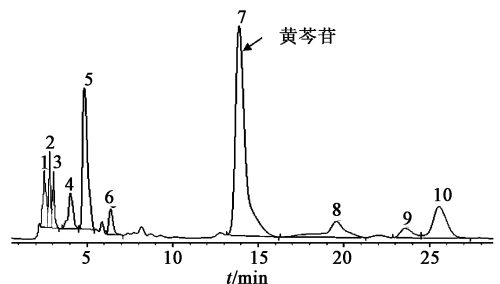


图 2 提取液黄芩苷 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取在 60 ℃ 减压干燥 4.0 h 的黄芩苷对照品适量,加甲醇制成 59.8 mg·L⁻¹ 的黄芩苷对照品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密移取黄芩苷对照品溶液 2,4,6,8,10 μL 分别进样,测得峰面积,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,所得回归方程 $Y = 241.07X - 0.2728 (R^2 = 0.9998)$,进样量在 0.120 ~ 0.598 μg 线性良好。

2.2.4 供试品溶液的制备 分别准确称取大黄、黄芩药材粗粉(过 20 目筛)各 5 g,置于 250 mL 锥形瓶中,加入 12 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.0 h,滤过,合并滤液,量取提取液体积。精密移取上述提取液 1.0 mL,置于 5 mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.5 正交试验 固定 70% 乙醇为提取溶媒,选择提取时间、提取温度、料液比、提取次数作为考察因素,以黄芩苷含量为指标,选用 L₉(3⁴) 正交表,因素水平见表 4,试验方案和分析见表 5,6。

表 4 复方四黄栓醇提组 II 正交试验因素水平

水平	A 提取时间/h	B 提取温度 / ℃	C 料液比	D 提取次数 / 次
1	0.5	80	8	1
2	1.0	90	10	2
3	1.5	100	12	3

表 5 复方四黄栓醇提组 II 正交试验安排

No.	A	B	C	D	黄芩苷 /mg
1	1	1	1	1	98.11
2	1	2	2	2	105.17
3	1	3	3	3	116.37
4	2	1	2	3	117.37
5	2	2	3	1	103.60
6	2	3	1	2	105.02
7	3	1	3	2	103.51
8	3	2	1	3	106.40
9	3	3	2	1	96.43
K ₁	319.648	318.988	309.531	298.145	
K ₂	325.984	315.172	318.964	313.700	
K ₃	306.346	317.818	323.483	340.140	
R	13.302	3.816	13.952	41.995	

表 6 复方四黄栓醇提组 II 方差分析

来源	SS	f	MS	F	P
A	66.968	2	33.484	26.277	<0.05
B(误差)	2.549	2	1.274	1.000	
C	33.786	2	16.893	13.257	
D	300.529	2	150.265	117.921	<0.01

以 B 因素为误差项进行方差分析,A,D 为显著性因素,故选择 D₃,A₂。C 因素的影响无显著性意义,考虑生产成本因素,选择 B₁C₁。优选的提取工艺为 A₂B₁C₁D₃,即 8 倍量 70% 乙醇,80 ℃,提取 3 次,每次 1.0 h。

2.2.6 验证试验 称取处方药材,按上述结果分析中的各条件提取,测定供试品溶液中盐酸小檗碱的含量,结果黄芩苷提取率为 84.28%,RSD 1.06%。验证样品中各指标与正交试验优选结果相近,说明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

预试验发现大黄与黄连、黄柏配伍提取时,盐酸小檗碱提取率降低约 35%;黄芩苷与黄连、黄柏配伍提取,盐酸小檗碱提取率略有降低;4 味混合提取时,黄连、黄柏的提取率下降约 55%,提示大黄与黄连、黄柏不宜共同提取。

大黄与黄芩混合提取,对黄芩苷及蒽醌成分的提取率均无影响;黄芩与黄连、黄柏混合提取,黄芩苷提取率下降约 20%;4 味混合提取,黄芩苷提取率下降约 15%,而蒽醌类成分基本丧失;大黄与黄连、黄柏混合提取,有效成分基本全部丧失,提取率仅为 20%。提示盐酸小檗碱与大黄中蒽醌类成分反应较强,与黄芩苷反应缓和;黄芩与大黄混合提取对两者有效成分的提取无影响;故分组设计提取:黄连、黄柏作为醇提组 I,大黄、黄芩作为醇提组 II。

本试验采用正交优化法得出了复方四黄栓处方药材的乙醇回流工艺,使干膏收率、盐酸小檗碱转移率、黄芩苷转移率均达到一定指标、工艺合理、稳定、可为工业生产及复方四黄栓的下一步研制提供理论依据。

[参考文献]

[1] 石焕芝,王丽璞. 肛门直肠疾病流行病学分析[J]. 中国肛肠病杂志,2000,20(3):10.
 [2] 陈宝安. 肛肠病术后疼痛机理及治疗现状[J]. 辽宁中医学院学报,2003,5(4):384.
 [3] 曾凡贞,赵砚霞,侯丰君,等. 长效麻醉剂加长强穴封闭对肛肠病术后止痛效应的观察[J]. 中国中西医结合外科杂志,2000,6(1):23.
 [4] 文小平,李连美,朱沈秋,等. 针刺承山穴对肛裂术后镇痛的疗效观察[J]. 黑龙江医学,1996(1):42.
 [5] 林炳良,金超,徐道昆,等. 肛肠病术后连续硬膜外注药镇痛 104 例报告[J]. 中国医师杂志,2002,4(2):213.

[责任编辑 全燕]