

# 硫磺熏蒸怀牛膝工艺筛选

仇立志<sup>1</sup>, 赵海霞<sup>2\*</sup>, 李宝国<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

**[摘要]** 目的: 研究硫磺熏蒸对怀牛膝中蜕皮甾酮的影响。方法: 采用高效液相色谱法测定硫磺熏蒸后蜕皮甾酮的含量, XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (15: 85), 检测波长 250 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL · min<sup>-1</sup>。结果: 硫磺用量 100 g · m<sup>-3</sup>, 熏蒸 1 次, 熏蒸 2 h, 此时蜕皮甾酮的量最高; 蜕皮甾酮在 0.408 ~ 2.448 μg 线性关系良好, 回归方程为  $Y = 34.167X + 61$  ( $r = 0.9996$ )。结论: 硫磺熏蒸对怀牛膝中蜕皮甾酮含量有一定影响, 随硫磺用量增加、熏蒸时间延长、熏蒸次数增加而呈减少趋势。

**[关键词]** 怀牛膝; 硫磺熏蒸; 蜕皮甾酮; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0035-03

## Screening of Sulfur Fumigation Technology for *Achyranthes bidentata*

QIU Li-zhi<sup>1</sup>, ZHAO Hai-xia<sup>2\*</sup>, LI Bao-guo<sup>1</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate influence of sulfur fumigation on ecdysterone from *Achyranthes bidentata*. **Method:** The content changes of ecdysterone after fumigation of sulfur was determined by HPLC, XB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase acetonitrile-water (15: 85), detection wavelength 250 nm, column temperature 25 °C, flow rate 0.8 mL · min<sup>-1</sup>. **Result:** Conditions of maximum amount of ecdysterone was: the amount of sulfur 100 g · m<sup>-3</sup>, fumigation once for 2 h; Linear relationship of ecdysterone in the range of 0.408-2.448 μg was good, the regression equation was  $Y = 34.167X + 61$  ( $r = 0.9996$ ).

**[收稿日期]** 20110624(004)

**[基金项目]** 山东省科技厅重大科技专项(2008GG3002008)

**[第一作者]** 仇立志, 硕士, 从事中药新药开发及中药炮制原理研究, Tel: 18906449162, E-mail: qiulizhi0@163.com

**[通讯作者]** \* 赵海霞, 主任药师, 博士后, 从事中药新药开发及中药炮制原理的研究, Tel: 13793188011, E-mail: zhaohx1115@126.com

整, 平均粒径在 1 μm 左右, 粒径分布在肝靶向微球要求范围内, 关于汉黄芩素白蛋白微球在动物体内的组织分布将进一步进行评价。

### [参考文献]

- [1] 杨莉, 尤启冬, 杨勇, 等. 汉黄芩素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药科大学, 2009, 40(6): 576.
- [2] 任晓东, 符伟, 张晓芸, 等. 天然产物汉黄芩素的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 777.
- [3] 柯学, 许颖, 严菲, 等. 汉黄芩素脂质体的制备及大鼠

体内药动学[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 502.

- [4] 邓树海. 现代药物制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 217.
- [5] 许颖, 柯学, 平其能. HPLC 法测定大鼠静脉注射汉黄芩素的血药浓度及其药动学研究[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 35.
- [6] 邹东娜, 张典瑞, 张学顺, 等. 苦参碱白蛋白微球的制备及性质[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(12): 824.

[责任编辑 全燕]

**Conclusion:** Sulfur fumigation of ecdysterone from *A. bidentata* had a certain influence, the content of ecdysterone had a decreasing trends with increasing the amount of sulfur, prolonging exposure time and increasing fumigation times.

[ **Key words** ] *Achyranthes bidentata*; sulfur fumigation; ecdysterone; HPLC

怀牛膝为苋科多年生草本植物牛膝的干燥根,始载于《神农本草经》,列为上品,具有补肝肾、强筋骨等功效,主产于河南武陟、泌阳等地<sup>[1]</sup>。怀牛膝含有多种化学成分,其中蜕皮甾酮<sup>[2]</sup>是其活性成分之一。蜕皮甾酮作用于人体有促进蛋白质合成、排除体内胆固醇、降血脂以及抑制血糖上升等生理活性。其传统加工炮制采用硫磺熏蒸法,有利于贮存保藏,但硫磺具一定毒性,且硫磺熏蒸后中药成分可能会被破坏或改变。为保证临床用药安全,本实验以蜕皮甾酮为指标,对硫磺熏蒸怀牛膝的影响因素进行了探讨。

### 1 仪器与试药

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent), FA2104 型电子天平(上海留韵试验仪器制造有限公司), Toledo AB135-S 型电子分析天平(瑞士 Mettler)。

蜕皮甾酮对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111638-200402),乙腈为色谱纯,正丁醇、甲醇为分析纯,水为娃哈哈纯净水,硫磺(药用硫磺,山东信通化工有限公司),怀牛膝购于河南省武陟县,经山东中医药大学李宝国副教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 的干燥根。

### 2 方法与结果

**2.1 样品的制备**<sup>[3]</sup> 采用有机玻璃材料自制熏箱,熏箱内容积 0.04 m<sup>3</sup>,内设一层网状隔板,熏箱顶部和底部各开一窗口,并且在 4 个侧面共留 8 个小孔。试验时将 250 g 牛膝饮片均匀摆放于网状隔板上,称取规定量药用硫磺置于搪瓷盘中,并放入熏箱底部,点燃硫磺,关闭熏箱门,待硫磺形成明显蓝色火焰时,用胶带将熏箱门封闭。熏至规定时间后,开启通风橱并且将 8 个小孔打开,抽气 1 h,最后开启熏箱门。

**2.2 正交试验法优选** 选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 试验设计,以蜕皮甾酮为指标,结合实际生产,选择硫磺用量(A)、熏蒸次数(B)、熏蒸时间(C)作为考察因素。各因素水平见表 1,结果见表 2,3。

结果表明,因素 A 和 B 对硫磺熏蒸怀牛膝后蜕皮甾酮有显著影响,因素 C 无显著影响,并确定怀牛膝硫磺熏制的最佳工艺为硫磺用量 100 g·m<sup>-3</sup>,

表 1 怀牛膝硫磺熏制正交试验因素水平

水平	A 硫磺用量 /g·m <sup>-3</sup>	B 熏蒸时间 /h	C 熏蒸次数 /次
1	100	2	1
2	140	4	2
3	180	6	3

表 2 怀牛膝硫磺熏制正交试验安排

No.	A	B	C	D	蜕皮甾酮/%
1	1	1	1	1	0.054 29
2	1	2	2	2	0.046 86
3	1	3	3	3	0.047 06
4	2	1	2	3	0.051 99
5	2	2	3	1	0.041 83
6	2	3	1	2	0.045 12
7	3	1	3	2	0.043 07
8	3	2	1	3	0.038 07
9	3	3	2	1	0.035 95
K <sub>1</sub>	1.482 1	1.493 5	1.374 8	1.320 7	
K <sub>2</sub>	1.369 4	1.267 6	1.348 0	1.350 5	
K <sub>3</sub>	1.170 9	1.281 3	1.319 6	1.371 2	
R	0.103 7	0.075 3	0.018 4	0.016 8	

表 3 怀牛膝硫磺熏制蜕皮甾酮方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.017 02	2	0.008 27	39.61	>0.05
B	0.010 69	2	0.005 83	24.89	>0.05
C	0.000 51	2	0.000 12	1.18	<0.05
D(误差)	0.000 43	2	0.000 24	1.00	

注: F<sub>0.01</sub>(1,2) = 99, F<sub>0.05</sub>(1,2) = 19。

熏蒸 1 次,熏蒸 2 h。

### 2.3 蜕皮甾酮测定方法的建立<sup>[4-6]</sup>

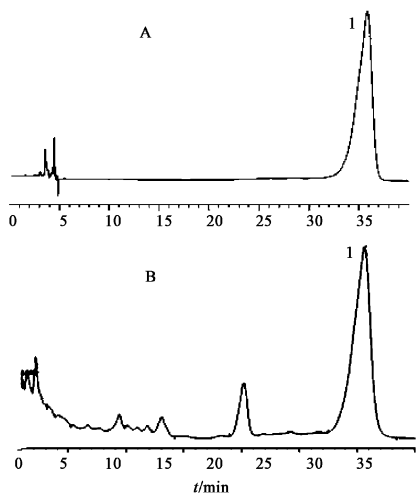
**2.3.1 色谱条件** XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(15:85), 检测波长 250 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 理论板数按 β-蜕皮甾酮峰计算应不低于 4 000。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取 β-蜕皮甾酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成含 β-蜕皮甾酮 0.204 g·

L的溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取本品粉末(过3号筛)约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水饱和和正丁醇60 mL,密塞,浸泡过夜,超声处理(功率200 W,频率59 kHz)40 min,滤过,用甲醇20 mL数次洗涤容器及残渣,合并滤液和洗液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

**2.3.4 线性关系考察** 依次精密吸取对照品溶液0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,对照品质量浓度分别为20.4,40.8,61.2,81.6,102.0,122.4 mg·L<sup>-1</sup>。进样量20 μL,以质量浓度对峰面积积分值回归计算,结果在0.408~2.448 μg线性关系良好,回归方程为 $Y=34.167X+61$ ( $r=0.9996$ )。见图1。



A. 对照品;B. 样品;1. 蜕皮甾酮

图1 怀牛膝 HPLC

**2.3.5 精密密度试验** 取同一份供试品溶液,连续进样6次,分别测出蜕皮甾酮峰面积并记录,计算RSD 1.74%,说明精密密度良好,符合指纹图谱技术要求。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一份供试品溶液20 μL,每隔1 h进样1次,测得蜕皮甾酮峰面积的RSD 1.74%,说明样品溶液基本稳定。

**2.3.7 重复性试验** 取同一样品精密称取6份,同法制备试样,分别依次进行测定,按外标法计算蜕皮

甾酮质量分数,RSD 2.26%,说明样品溶液重复性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 取已知蜕皮甾酮含量的供试品细粉(过3号筛)适量,精密称定约1 g,共6份,分别精密加入0.49 mg蜕皮甾酮对照品,按含量测定方法测定,计算,结果平均回收率为97.65%,RSD 2.37%,表明测定方法的回收率较好。

**2.4 验证试验** 取怀牛膝饮片3批,各250 g,按优选出的熏蒸工艺条件进行熏蒸,并测定蜕皮甾酮的质量分数,分别为0.052 2%,0.053 6%,0.054 3%,表明优选出的工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

硫磺熏蒸对怀牛膝中的蜕皮甾酮有一定的影响,并且有随着硫磺用量增加、熏蒸时间延长、次数增加而呈减少的趋势。硫磺熏蒸怀牛膝工艺的选择除以怀牛膝中蜕皮甾酮为指标外,同时应考虑残留二氧化硫的量。怀牛膝经硫磺熏蒸后,颜色美白光亮、不易生虫、大大延长其贮存保质的时间;但研究发现怀牛膝经熏蒸后对其有效成分有影响,而且会产生对人体有害的二氧化硫。综上所述,怀牛膝硫磺熏弊多利少,因此选择既能保持怀牛膝较好的外观和防腐,又能保证其质量及用药安全的新的加工工艺势在必行。

### [参考文献]

- [1] 任重伦. 怀牛膝研究概况[J]. 基层中药杂志, 1996, 10(4): 46.
- [2] 孟大利,李锐. 中药牛膝化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(2): 120.
- [3] 赵海霞,刘伟. 硫磺熏蒸对山药中尿囊素的影响[J]. 中草药, 2009, 40(6): 904.
- [4] 刘姣,周亚球,彭超. 怀牛膝蜕皮甾酮的含量测定[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(3): 43.
- [5] 舒元瑜,邹昭明,扬安东. 六种牛膝中蜕皮激素的高效液相色谱测定[J]. 中草药, 2000, 31(10): 762.
- [6] 李文莉,汪文涛,雷玉萍,等. RP-HPLC测定脉络宁注射液中蜕皮甾酮的含量[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(4): 382.

[责任编辑 全燕]