

正交试验优化复方南蛇藤胶囊水提取工艺

侯悦翰, 林华庆*, 邓红, 张蜀, 余楚钦, 林的仕

(广东药学院药物研究所, 广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选出复方南蛇藤胶囊的最佳水提工艺。方法: 采用正交设计法, 通过高效液相色谱法测定卫矛醇和原儿茶酸的含量为指标综合评价, 优化提取工艺。结果: 最佳水提工艺为加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次 2 h。结论: 优选的提取工艺稳定, 可行。

[关键词] 复方南蛇藤胶囊; 正交设计; 水提工艺; 卫矛醇; 原儿茶酸

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0035-04

Water Extraction Technology of Compound *Celastrus orbiculatus* Capsule by Orthogonal Test

HOU Yue-han, LIN Hua-qing*, DENG Hong, ZHANG Shu, YU Chu-qin, LIN Di-shi

(Institute of Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize water extraction process of compound *Celastrus orbiculatus* capsule. **Method:** Extraction technology was optimized by orthogonal test with the content of dulcitol and protocatechuic acid determined by HPLC as index. **Result:** Optimum extraction technology was that extracted 3 times with 12 times the amount of water with 2 h each time. **Conclusion:** Optimized extraction process was scientific, stable and feasible.

[Key words] compound *Celastrus orbiculatus* capsule; orthogonal test; water extraction process; dulcitol; protocatechuic acid

复方南蛇藤胶囊是在中医药理论指导下结合现代药理学研究而研制的复方中药制剂, 用于治疗强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS), 由南蛇藤、鸡血藤 2 味药材组成。南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb, 有很好的抗肿瘤、抗炎和免疫抑制作用^[1]; 鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn 系传统活血化瘀中药, 有补血、活血、通络的功效, 用于治疗血虚萎黄、麻木瘫痪、风湿痹痛等^[2]。前期药理药效试验研究中发现, 南蛇藤配伍鸡血藤水提物在治疗 AS 方面有很好的疗效, 本试验将南蛇藤、鸡血藤合并提取, 以 HPLC 测定药效成分含量为指标, 采用正交试

验设计, 对其水提工艺进行考察, 为新药开发提供实验依据。

1 仪器与试剂

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(PDA-3000 型检测器, Chromeleon 6.80 Version 工作站, 日本岛津), Waters 2695 高效液相色谱仪(Waters 2420 蒸发光散射检测器 ELSD, Waters), CP225D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

卫矛醇对照品(批号 111781-200901, 供含量测定用)、原儿茶酸对照品(批号 110809-200604, 供含量测定用)均购自中国药品生物制品检定所, 南蛇藤、鸡血藤购自广州致信中药饮片有限公司, 经本所中药分析室何伟教授鉴定均为正品。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 卫矛醇含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 取卫矛醇对照品适量,

[收稿日期] 20110920(011)

[第一作者] 侯悦翰, 硕士研究生, 从事中药新剂型研究, Tel: 020-39352512, E-mail: houyuehan123@163.com

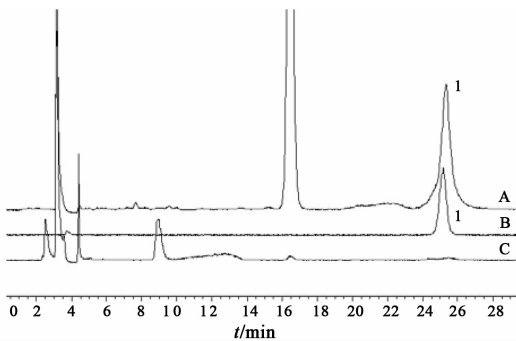
[通讯作者] * 林华庆, 教授, 从事中药新剂型研究, Tel: 020-39352518, E-mail: huaqing_@163.net

精密称定,置 10 mL 量瓶中,加入 50% 乙腈适量,超声使溶解,静置至室温,用 50% 乙腈定容至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含卫矛醇 1.00 mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 从提取液中精密量取 100 mL 置于 250 mL 分液漏斗中,依次用乙酸乙酯(120,120,60 mL)萃取 3 次,分取水层,置于 250 mL 蒸发皿中,100 °C 水浴蒸干,用甲醇适量溶解,超声 10 min,转移进 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,得供试品溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 按处方比例提取制备不含南蛇藤药材的阴性溶液,按 2.1.2 项方法制成阴性对照溶液。

2.1.4 色谱条件及系统适用性试验 Luna NH₂ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相乙腈-水(85:15),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,柱温 30 °C,ELSD 检测条件漂移管温度 45 °C,雾化器温度 36 °C,增益 50,气体压力 30 psi。分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,按上述条件进行测定,可见阴性无干扰,理论塔板数以卫矛醇峰计算不低于 1 万。见图 1。



A. 供试品; B. 对照品; C. 缺南蛇藤阴性样品; 1. 卫矛醇

图 1 复方南蛇藤胶囊卫矛醇 HPLC

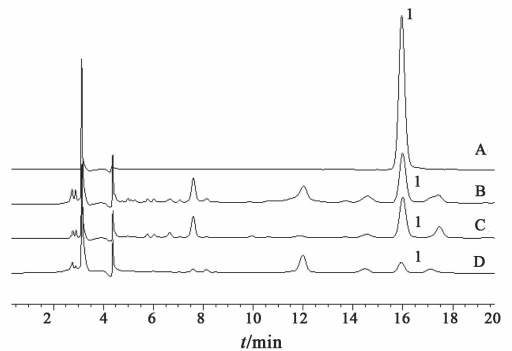
2.2 原儿茶酸含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取原儿茶酸对照品适量,精密称取,置 20 mL 量瓶中,加甲醇-水(1:1)适量超声溶解,静置至室温,定容至刻度,摇匀,再精密吸取 1 mL 至 25 mL 量瓶中,用甲醇-水(1:1)稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含原儿茶酸 24.0 μg 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 从提取液中精密移取 100 mL 置于 250 mL 分液漏斗中,依次用乙酸乙酯(120,120,60 mL)萃取 3 次,分取乙酸乙酯层,置于 250 mL 蒸发皿中,100 °C 水浴蒸干,用甲醇适量溶解,超声 10 min,转移进 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻

度,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件及系统适用性试验 Kromat C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(6:94),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,柱温 30 °C,检测波长 260 nm。分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,按上述条件进行测定,理论塔板数以原儿茶酸峰计算不低于 2 000,见图 2。



A. 对照品; B. 合提供试品; C. 缺南蛇藤阴性样品; D. 缺鸡血藤阴性样品; 1. 原儿茶酸

图 2 复方南蛇藤胶囊原儿茶酸 HPLC

2.3 单因素试验 选取药材粉碎粒径、药材浸泡时间、加水倍量、提取时间和提取次数等 5 个可能对提取效果有影响的因素做单因素试验,以确定相关因素对药材提取物中药效成分的含量的影响。

2.3.1 药材粉碎粒径的考察 选取药材粒径分别为过 10 目筛、0.5 cm 粗颗粒和 1~2 cm 药材小段,进行考察。称取上述 3 种粒径的南蛇藤、鸡血藤药材各 15 g,加 10 倍量的水,提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液,并定容至 1 000 mL 量瓶。按 2.1 项及 2.2 项方法,测定卫矛醇和原儿茶酸的含量,综合评分,考察粒径对药材药效成分提取量的影响,结果见表 1。

表 1 药材粒径对提取效果的影响

药材粒径	原儿茶酸 /mg·g ⁻¹	卫矛醇 /mg·g ⁻¹	综合评分
过 10 目筛	0.034	4.296	45.88
0.5 cm 粗颗粒	0.062	8.472	87.62
1~2 cm 药材小段	0.056	10.465	96.82

试验结果采用加权综合评分,即原儿茶酸(I, 权重系数 0.35)、卫矛醇(II, 权重系数 0.65)来分析,综合评分 = (I / I_{最大值} × 0.35 + II / II_{最大值} × 0.65) × 100。

结果显示,药材剪成约 1~2 cm 小段,提取效果较好。粉碎细度太小,提取率降低原因可能是:提

取液难过滤,造成损失;体积较大,提取时溶剂接触不充分,药效成分的溶出受限。故本试验选择将药材剪成约1~2 cm的小段投料。

2.3.2 药材浸泡时间对提取的影响 预试验时发现,药材浸泡时间对药效成分的提取有影响,故选取了药材浸泡时间为1,2,4 h,浸泡过夜进行考察。按

2.3.1项下方法操作,结果见表2。

表2 药材浸泡时间对提取效果的影响

药材浸泡时间/h	原儿茶酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	卫矛醇/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	综合评分
1	0.056	10.465	96.61
2	0.062	9.627	94.80
4	0.052	7.140	73.70
浸泡过夜	0.044	4.295	51.52

结果显示,随着药材浸泡时间的延长,药效成分的提取量有降低的趋势,以浸泡1 h较好,故本试验选择将药材浸泡1 h后开始加热回流提取。

2.4 水提工艺优选

2.4.1 正交试验设计 根据初步筛选结果,选取加水倍数、提取时间和提取次数3个因素为考察因素,运用正交试验设计,以卫矛醇和原儿茶酸含量为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,优选提取工艺。因素水平设计见表3。

表3 复方南蛇藤胶囊提取工艺因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

2.4.2 正交试验优化水提工艺 取南蛇藤、鸡血藤药材各15 g,共称9份,按正交设计表 $L_9(3^4)$ 设计方案进行提取,滤过,合并滤液,定容至1 000 mL量瓶。正交试验结果见表4,方差分析结果见表5。

正交试验的方差分析显示,A因素(加水倍数)、B因素(提取时间)、C因素(提取次数)影响均不显著。比较各因素的极差值可看出,影响提取效果的因素顺序为 $B > C > A$ 。根据正交试验结果,最佳提取工艺条件为 $A_3B_3C_3$,即加水倍量为12倍,提取2 h,提次3次。

2.5 验证试验 卫矛醇为君药南蛇藤的药效成分,含量较高,正交试验结果表明,提取时间对提取效果的影响较其他2个因素大,为验证2 h是否最优,选取提取时间2.5 h的条件和优选出的条件2 h进行比较验证。按**2.1.2**项及**2.2.2**项下方法制备供试

表4 复方南蛇藤胶囊提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	原儿茶酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	卫矛醇/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	综合评分
1	1	1	1	1	0.045	4.445	43.89
2	1	2	2	2	0.060	9.974	79.16
3	1	3	3	3	0.065	12.604	95.5
4	2	1	2	3	0.054	4.537	48.75
5	2	2	3	1	0.069	6.915	67.72
6	2	3	1	2	0.046	9.994	73.02
7	3	1	3	2	0.075	10.077	86.97
8	3	2	1	3	0.047	10.570	76.60
9	3	3	2	1	0.064	8.009	71.08
K_1	72.767	59.870	64.503	60.897			
K_2	63.163	74.493	66.330	79.717			
K_3	78.217	79.783	83.313	73.533			
R	15.054	19.913	18.810	18.820			

表5 提取工艺正交试验综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	348.529	2	0.631	>0.05
B	638.367	2	1.156	>0.05
C	645.586	2	1.169	>0.05
D(误差)	552.110	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.000$ 。

品;按**2.1.4**项及**2.2.3**项下系统条件进行液相色谱法测定,结果见表6。

表6 复方南蛇藤胶囊提取工艺验证试验

方案	加水量/倍	提取时间/h	提取次数/次	原儿茶酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	卫矛醇/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	12	2	3	0.062	10.129
2	12	2.5	3	0.076	9.754

比较验证试验结果与正交优选结果相近,出于缩短提取时间,节省能源工业化生产考虑,选择提取2 h。在正交优选的提取条件下,药材中原儿茶酸的转移率为93.9%,卫矛醇转移率为99.4%(药材中原儿茶酸含量为 $0.066 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$;卫矛醇含量为 $10.190 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。因提取3次药效成分的转移率已达到90%以上,从缩短提取周期考虑,没必要再增加提取次数。加水倍数对提取效果影响最小,在此不再进行考察。综合考虑,选择 $A_3B_3C_3$ 为提取工艺的最佳条件,即加水倍量为12倍,提取2 h,提取3次。

2.6 工艺稳定性 称取南蛇藤、鸡血藤药材各15

g, 共 3 份, 按优选出的提取工艺 $A_3B_3C_3$ 进行提取, 分别测定卫矛醇、原儿茶酸的含量, 结果见表 7。表明优选出的工艺条件稳定, 可行。

表 7 提取工艺稳定性试验

No.	原儿茶酸 /mg·g ⁻¹	卫矛醇 /mg·g ⁻¹	综合评分	RSD /%
1	0.064	10.175	100	
2	0.061	10.115	97.98	1.2
3	0.061	10.096	97.86	

3 讨论

通过单因素试验及正交设计试验, 优选出了最佳水提工艺: 加水倍量为 12 倍, 提取 2 h, 提取 3 次, 通过工艺验证, 表明该工艺重复性好, 提取率高。

选择卫矛醇和原儿茶酸作为指标成分, 是因为本试验为水提工艺, 2 种成分均为水溶性成分。卫矛醇系君药南蛇藤中含量较高的有效成分之一, 约 1% ~ 2%, 易溶于热水, 微溶于乙醇, 不溶于乙醚^[3]。临床试验证实其确实在治疗风湿性关节炎方面的疗效。李颂华副教授^[4]在 1997 年也确定了卫矛醇为南蛇藤的主要有效成分, 并建立其含量测定方法, 同期应用胶原诱导性关节炎小鼠的实验中亦肯定了其疗效。原儿茶酸属于有机酸类, 在酸性条件下稳定, 具有抗菌、抗炎作用, 为鸡血藤中含量较高的有效成分之一, 文献报道较多。

卫矛醇是一种糖醇, 在紫外区无吸收, 采用低波长紫外检测干扰较大^[5]。对糖的直接检测往往利用示差折光检测器 (RID) 来进行, 但 RID 灵敏度较低; 衍生法可以很大程度提高对糖的检测灵敏度, 但操作繁琐且不可避免地会引入误差; 蒸发光散射检测器 (ELSD) 灵敏度远远高于 RID, 可以直接对糖进行检测, 本试验采用 HPLC-ELSD 法测定卫矛醇, 该

方法操作简便, 分离效果好, 结果准确。由于糖醇是强极性的物质, 色谱柱的选择以氨基柱为宜, 本试验中, 对 Luna NH₂ 柱和 Inertsil NH₂ 柱作了比较, 结果发现, Luna NH₂ 柱对本试验的样品分析结果较优。

试验中初步发现, 君药南蛇藤也含有少量的原儿茶酸 (图 2), 鲜有文献报道。南蛇藤单味药材提取制备的供试品 PDA 检测时, 发现其 HPLC 色谱在原儿茶酸对照品出峰位置处也有相同的色谱峰, 并且其保留时间及紫外吸收图谱与原儿茶酸对照品的一致。因此可以初步判断南蛇藤药材也含有原儿茶酸, 但是还需要进一步实验确证。

本试验中, 水提工艺还并未完善, 水提液含有较多水溶性杂质, 出膏率较大, 约为 16%, 故需要最大限度除去杂质, 同时保留卫矛醇等有效成分, 在后续的研究中, 将对提取液进行纯化, 最大程度地富集有效成分, 并对纯化前后提取液进行药效学比较研究, 为这一复方进行深入研究打下基础。

[参考文献]

- [1] 张舰, 刘延庆. 南蛇藤属植物的化学成分与药理作用 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2005, 20(5): 197.
- [2] 黄新炜, 李宝强, 王秀华, 等. 中药鸡血藤的研究概况 [J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2006, 9(1): 25.
- [3] 沈嘉, 李铎, 李颂华, 等. HPLC 法测定卫矛醇及检测复方中药制剂通痹灵中的卫矛醇 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 718.
- [4] 韦文俊, 刘艳平. 星点设计-效应面法优选碧血草中卫矛醇的水提工艺 [J]. 中药材, 2009, 32(6): 972.
- [5] 梁碧燕. 南蛇藤生药学及指纹图谱研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[责任编辑 全燕]