

正交试验优选伤科熏洗汤剂的水提取工艺研究

谢林¹, 韩建伟¹, 付聪¹, 汪雅琴¹, 熊昌源^{2*}

(1. 湖北中医药大学中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 武汉 430061;
2. 湖北省中医院, 武汉 430061)

[摘要] 目的: 优选伤科熏洗汤剂的水提取工艺条件。方法: 以挥发油提取率、升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的提取量为考察指标, HPLC 测定升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行优选。结果: 优选提取工艺: 加 10 倍量水提取 3 次, 每次 20 min。结论: 优选的提取工艺为伤科熏洗汤的临床应用提供了参考依据。

[关键词] 正交试验; 伤科熏洗汤; 水提取工艺; 升麻素苷; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0017-04

Study on Optimizing Technological Condition of Water Extraction for Shangke Fumigant Decoction by Orthogonal Design

XIE Lin¹, HAN Jian-wei¹, FU Cong¹, WANG Ya-qin¹, XIONG Chang-yuan^{2*}

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Wuhan 430061, China;
2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] Objective: To optimize the technological condition of water extraction for Shangke Fumigant decoction. **Method:** The content of prim-*O*-glucosylcimifugin and 4-*O*-*D*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol extracted, which was determined by HPLC, and the content of the volatile oil extracted were regarded as the marker of detection to optimize the technological condition of water extraction by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Result:** The optimum extraction condition was that the medicinal materials were extracted 3 times with 10 times amount of water and for 20 minutes per time. **Conclusion:** The optimum extraction condition will provide a reference for the clinical application of the Shangke fumigant decoction.

[Key words] orthogonal test; shangke fumigant decoction; water extraction process; prim-*O*-glucosylcimifugin; 4-*O*-*D*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol

伤科熏洗汤为湖北省中医院骨科的临床经验方, 处方由川芎、防风、羌活、独活、桂枝、桑枝、艾叶等 10 多味中药组成。临床治疗膝关节骨性关节炎疗效确切^[1]。伤科熏洗汤使用方法: 药材置锅中加

水煎煮至产生药气时, 将膝盖置于锅上约 30 cm 处, 以支架、毛巾遮盖严实, 熏蒸膝盖, 同时膝盖做主动屈伸运动, 约 20 min 后停止加热。待药液降温后, 以纱布蘸取药液擦洗膝盖处。药渣留待下次加适量水后继续使用。为了对临床治疗, 及患者在家中自煎自用提供合理的提取工艺的参考依据。我们以处方药材的挥发油提取率、防风药材中升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的提取量为考察指标, 以 HPLC 测定升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对伤科熏洗汤剂的水提取工艺

[收稿日期] 20100520(004)

[第一作者] 谢林, 硕士研究生, Tel: 13545166984, E-mail: xie_lin88@163.com

[通讯作者] * 熊昌源: 主任医师, 中医骨科专业, Tel: 027-62802209, E-mail: changyuanxiong@163.com

进行了优选。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);升麻素苷对照品和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111522-200607, 111523-200405);药材(购自湖北龙泰药业有限公司);乙腈(进口色谱纯);其它试剂均为分析纯;水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 参照伤科熏洗汤临床使用情况以及中药汤剂煎煮常规方法,综合考虑,设计正交试验因素水平,见表 1。

表 1 提取工艺正交因素水平设计

水平	A	B	C	D
	空白	提取时间/min	提取次数	加水量/倍
1	-	20	1	6
2	-	30	2	8
3	-	40	3	10

2.2 正交试验 按处方称取药材 101.5 g,共 9 份,采用电热套加挥发油提取器加水回流,按表 1 方案提取。收集挥发油和提取液,计算挥发油提取率,测定提取液中升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-水(12:10:78);流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 254 nm;柱温 30 。

2.3.2 溶液制备

2.3.2.1 对照品溶液 精密称取升麻素苷对照品和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品,加甲醇制成每 1 mL 含升麻素苷 35 μg, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷

37 μg 的溶液。

2.3.2.2 供试品溶液^[2] 量取 9 份正交试验的滤液(滤液减压浓缩至 400 mL,加 95% 乙醇 100 mL,摇匀,使其乙醇体积分数为 19%,便于保存及计算,)各 20 mL,蒸干,残渣加甲醇 20 mL 分次转移至带塞锥形瓶中,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10 mL 分次使溶解,转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 10 mL,合并正丁醇提取液,蒸干,残渣加少许甲醇使溶解,加入中性氧化铝 0.5 g 拌样,挥尽甲醇,将吸附样品的氧化铝置中性氧化铝柱(100~200 目,2 g,内径 1 cm)上,用丙酮 10 mL 洗脱,再用甲醇 20 mL 洗脱,收集甲醇洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解定容至 2 mL 量瓶中,即得。

2.3.2.3 阴性对照溶液 称取缺防风的其余药材,加 10 倍量水提取 3 次,每次 20 min,量取滤液,按供试品溶液制法制备,即得。

2.3.2.4 防风药材对照溶液^[3] 取防风药材细粉约 0.25 g 精密称定,置平底烧瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,水浴回流 2 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 方法专属性 吸取对照品溶液 5 μL、供试品、阴性对照溶液、防风药材对照溶液各 2 μL 进样,对照品、供试品、防风药材对照溶液分别在 16 min 和 64 min 左右出现升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷吸收峰,阴性对照无干扰,见图 1。

2.3.4 线性关系考察 吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL,进样测定,以峰面积(*Y*)为纵坐标,进样量(*X*)为横坐标,经线性回归得升麻素苷回归方程: $Y=3\ 014.2, X-25.673, r=0.999\ 9(n=6)$; 5-*O*-甲

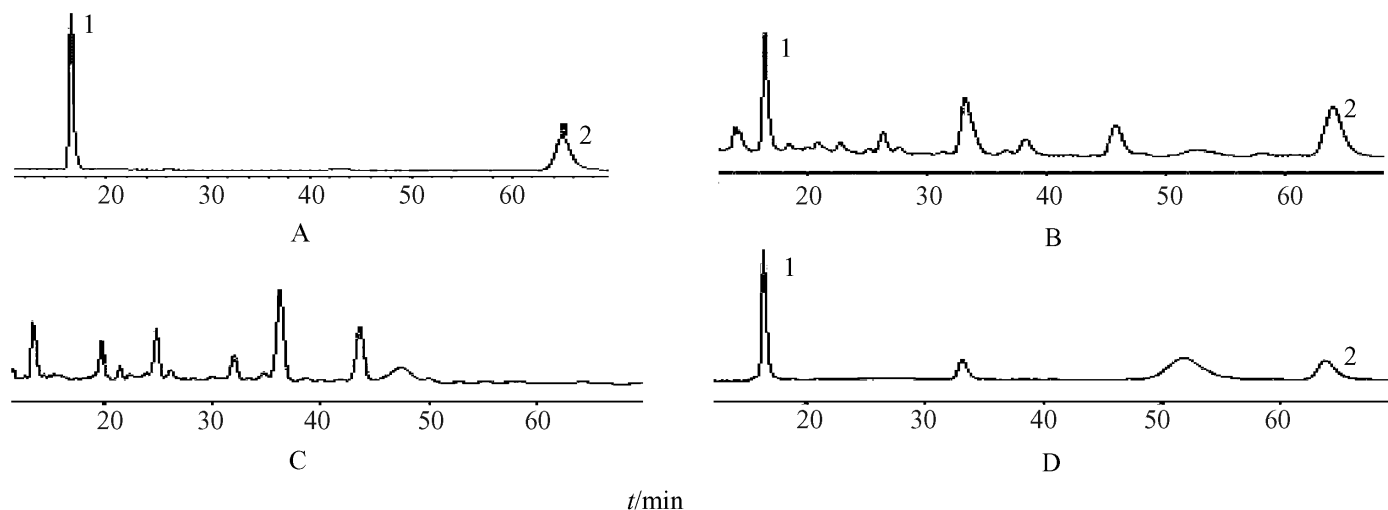


图 1 防风中升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量测定 HPLC 图

A. 对照品; B. 供试品; C. 防风阴性对照; D. 防风药材对照; 1. 升麻素苷; 2. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷

基维斯阿米醇苷的回归方程: $Y = 1\ 864.7, X - 23.579, r = 0.999\ 8 (n = 6)$ 。表明: 升麻素苷在 $0.035 \sim 0.350\ \mu\text{g}$, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷在 $0.037 \sim 0.370\ \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 $5\ \mu\text{L}$, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 升麻素苷 RSD 1.89%, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 RSD 1.12%。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品, 分别在 0, 2, 4,

8, 12, 24 h 进样, 测定峰面积, 升麻素苷 RSD 1.94%, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 RSD 1.10%。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一滤液, 共 6 份, 制成供试品, 进样测定, 平均质量分数: 升麻素苷 0.481×10^{-3} , RSD 1.76%, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.963×10^{-3} , RSD 1.04%。

2.4 正交试验结果 见表 2 ~5。

表 2 提取工艺正交试验直观分析表

试验序号	A	B	C	D	挥发油提取率 / % (a)	二苷总质量分数 / 10^{-3} (b)
1	1	1	1	1	0.098	0.39
2	1	2	2	2	0.195	0.92
3	1	3	3	3	0.197	1.31
4	2	1	2	3	0.147	1.28
5	2	2	3	1	0.177	0.98
6	2	3	1	2	0.147	0.36
7	3	1	3	2	0.196	0.98
8	3	2	1	3	0.108	0.65
9	3	3	2	1	0.197	0.65
<i>aK</i> ₁	0.163	0.147	0.118	0.157		
<i>aK</i> ₂	0.157	0.160	0.180	0.179		
<i>aK</i> ₃	0.167	0.180	0.190	0.151		
<i>R</i>	0.010	0.033	0.072	0.028		
<i>bK</i> ₁	0.873	0.883	0.467	0.673		
<i>bK</i> ₂	0.873	0.850	0.950	0.753		
<i>bK</i> ₃	0.760	0.773	1.090	1.080		
<i>R</i>	0.113	0.110	0.623	0.407		

注: 挥发油提取率 = 挥发油提取量 / 处方总质量 $\times 100\%$

升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷总质量分数 = (升麻素苷的含量 + 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量) / 处方中防风的质量 $\times 1\ 000$

表 3 挥发油提取率方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
A	0.000 15	2	0.000 075	1.000	误差
B	0.001 69	2	0.000 845	11.3	>0.05
C	0.009 18	2	0.004 59	61.2	<0.05
D	0.001 35	2	0.001 35	18	>0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ (表 4, 5 同)。

正交试验结果表明, 提取次数对挥发油、升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷总含量的提取有显著性影响, 而加水量也对升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷总含量的提取有显著性影响。由直观及方差分

表 4 二苷总含量方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
A	0.025 68	2	0.012 84	1.000	误差
B	0.019 09	2	0.009 54	0.743 0	>0.05
C	0.641 76	2	0.320 88	24.991	<0.05
D	0.278 49	2	0.139 24	10.844	>0.05

析并结合临床实际应用, 确定优选提取工艺条件为 $A_1 B_1 C_3 D_3$, 即加 10 倍量水提取 3 次, 每次 20 min。

2.5 验证试验 按优选工艺的提取 3 批样品, 测定挥发油提取率、升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的总含量, 结果见表 6。表明该优选工艺稳定可靠。

表 5 二苷总含量合并误差后方差分析表

方差来源	SS	f	MS	F	P
合并误差	0.044 77	4	0.011 19	1.000	误差
提取次数(C)	0.641 76	2	0.320 88	28.676	<0.05
加水量(D)	0.278 49	2	0.139 24	12.443	<0.05

注: $F_{0.05}(2, 4) = 6.940$

表 6 提取工艺验证试验结果

批次	挥发油提取率(1~3煎)/%	二苷总质量分数/ 10^{-3}
1	0.137(0.049, 0.049, 0.039)	1.707
2	0.107(0.049, 0.029, 0.029)	1.556
3	0.146(0.068, 0.039, 0.039)	1.657

3 讨论

3.1 考察指标成分的选定 伤科熏洗汤的临床应用是先以药材水煎煮产生的蒸气熏蒸患处,再以药液搽洗患处。在熏蒸患处过程中,具辛香走窜的药材中的挥发性成分产生着主要作用;搽洗患处过程中,药材中其他有效成分借助温热,渗透皮肤传达到病处达到治疗效果。由于处方药材味数多,药物成分的干扰难以消除等多种原因,我们选择挥发油的提取率和防风中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的提取量作为正交试验的评价指标。因水提液中含有大量水溶性物质,色泽深,黏度大,采用薄层色谱法,对供试品的提取纯化进行了筛选,经反复摸索、比较,所制供试品方法,能除去干扰成分。

3.2 含量测定 参考药典及有关文献^[4,5],对多种流动相进行了摸索比较,选择甲醇-乙腈-水(12:10:78)为流动相,升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷均能达到基线分离。因组分复杂,供试品进样量控制于 2 μL 时分离理想,若进样体积过大,测定的指标

成分不能完全分离。

3.3 提取结论 对含挥发油的药材进行预试验,将挥发油基本提取完全约需 3 h,结合临床应用的实际情况,选择提取时间为 20 min。由 3 次合并提取液的验证试验结果计算,挥发油的平均转移率为 44.4%,升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均转移率为 29.6%,挥发油的转移率不高可能是在煎煮过滤时滤液中含部分挥发油,二苷的转移率不高,可能与其在水中溶解性及其容易分解有一定的关系。在验证试验的煎煮过程中,对第 1, 2, 3 次提取的挥发油及升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的提取量分别进行了测定,结果表明 3 次提取中均有挥发油,而单次提取液中测定的升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的量较少,3 次总和量较合并滤液测定的量少。以上正交试验结果表明,设定的因素水平是合理的,患者在家中自煎使用,至少可以提取使用 3 次,为临床应用提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] 韩冻,张方建. 中药熏洗治疗膝关节骨性关节炎临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(6): 56.
- [2] 曾德成. HPLC 测定荆肤止痒颗粒中 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 中成药, 2004, 26(11): 894.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2005: 102.
- [4] 何巧君,高幼衡,魏志雄. 高效液相色谱法测定鼻炎片中升麻素苷含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 256.
- [5] 黎小伟. HPLC 测定银花感冒颗粒中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量[J]. 中成药, 2006, 28(1): 37.

[责任编辑 仝燕]