

# 蒲公英凝胶剂的最佳提取工艺

张红梅<sup>1\*</sup>, 金永新<sup>1</sup>, 包振倩<sup>2</sup>

(1. 甘肃省第二人民医院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 为保证蒲公英凝胶剂最佳疗效, 对该方剂的水提部分工艺进行研究, 以确定最佳提取工艺。方法: 采用正交实验法, 以蒲公英与金银花合提的水提液的抑菌效果和绿原酸含量作为水提效果的考核指标, 考察浸泡时间 A、加水倍数 B、提取时间 C, 确定最佳工艺路线。结果: 蒲公英与金银花合提的最佳工艺为在室温条件下, 金银花和蒲公英浸泡 0.5 h, 煎煮 2 次, 分别加入 15 和 10 倍的水, 提取时间分别为 1 h 和 0.5 h。结论: 采用该水提工艺, 水提液的抑菌效果最好, 稳定性好。

**[关键词]** 蒲公英凝胶剂; 正交试验法; 绿原酸; 水提工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0008-03

蒲公英凝胶剂处方是由蒲公英、金银花、冰片等组成。方中蒲公英为君药, 金银花为臣药, 将其有效成分提取, 与冰片, 珍珠粉合理配伍后, 制成凝胶剂, 可用于热毒疮疡, 乳痈肿痛, 消痈散结及放射灼伤的皮肤修复的治疗。为使该方中有效成分获得良好的提取效果, 本实验采用正交实验法以抑菌效果、绿原酸含量为指标成分综合分析, 对水提液工艺进行优选<sup>[1-2]</sup>。

## 1 仪器与材料

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪; SPD-二极管阵列检测器; LC-10AT 二元泵, CLASS-LC10A 色谱工作站; 色谱柱: Phenomenex-C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); BRANSON1210 型超声机(美国); FA1604S 型电子天平(上海天平仪器厂); RX-95 热空气消毒箱(连云港市医疗设备厂); TN 型托盘式扭力天平(上海第二天平仪器厂); 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂); LRH-150B 生化培养箱(广州市医疗器械厂); MO-2 调温型电热套(河北省黄马市新兴电器厂); 手提式压力蒸汽灭菌器(江苏省江阴市东方医疗器械厂); XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂); 净化台(苏州净化设备厂)

蒲公英、金银花均购于青海保罗公司; 绿原酸对照品(批号为 110753-200413, 购自中国药品生物制品检定所); 甲醇(天津市光复精细化工所)、乙腈

(天津西化特种试剂厂)均为色谱纯, 其他试剂为分析纯; 水为重蒸馏水; 培养皿(扬州市邗江创新医疗器械厂)

金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌均由甘肃省第二人民医院微生物实验室提供。

营养琼脂培养基(中国药品生物制品检定所); 营养肉汤培养基(杭州微生物厂)

## 2 方法

**2.1 正交实验设计** 通过平行试验, 初步确定了最佳提取工艺的单因素条件是: 提取溶剂为水, 提取方法为水煎, 提取次数为 2 次。在平行试验的基础上采用正交试验法, 以绿原酸含量和抑菌圈直径为评价指标, 选择浸泡时间(A)、加水量(B)和提取时间(C)为考察因素, 设计采用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交试验设计进行试验, 因素水平安排见表 1。

按 1/3 处方量称取药材, 共 9 份, 按正交试验方案进行浸渍提取, 合并提取液, 浓缩至 1 gml<sup>-1</sup> 的蒲公英浓缩液。分别测定绿原酸含量和抑菌试验。正交试验结果见表 2、表 4。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素		
	浸泡时间 A(h)	加水倍数 B(倍)	提取时间 C(min)
1	0.5	15/10	1/0.5
2	1	20/15	1.5/1
3	1.5	25/20	2/1.5

## 2.2 绿原酸含量测定<sup>[3-4]</sup>

**2.2.1 对照品溶液的配制** 精密称取绿原酸适量,

[收稿日期] 2009-03-12

[通讯作者] \* 张红梅, (0931)4929497-8000; E-mail: zhzm6969@163.com

加甲醇制成  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 摇匀即得。

**2.2.2 样品溶液的配制** 精密吸取蒲金提取浓缩液 ( $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1 mL, 置于 25 mL 的容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 静置, 精取上清液 2 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度即得。

**2.2.3 色谱条件与适应性试验** 色谱柱: phenomenex- $\text{C}_{18}$  (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-0.1 mol  $\cdot \text{L}^{-1}$  磷酸溶液 (15:85); 检测波长 327 nm; 流速 1.0 ml  $\cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温室温, 精密量取对照品溶液、供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果显示供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 有相同保留时间的色谱峰, 证明本法可行, 见图 1。

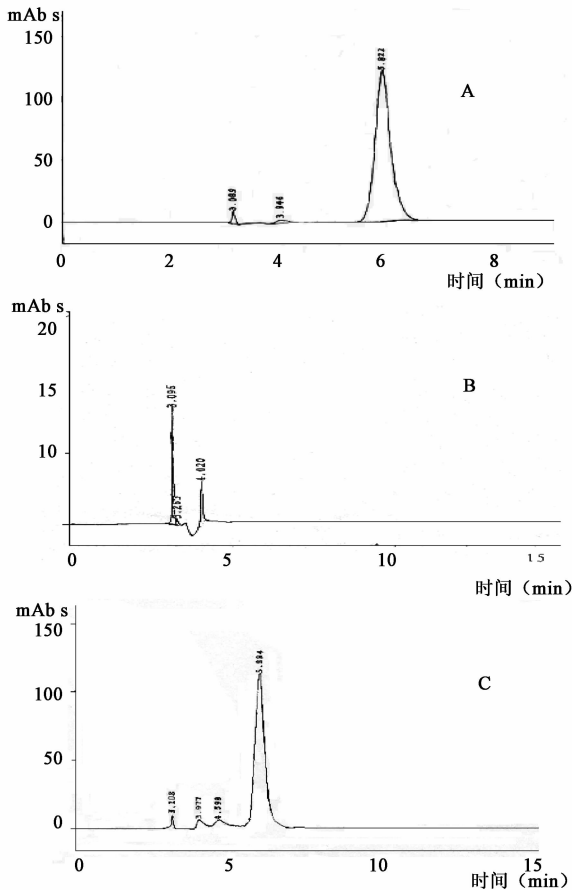


图 1 高效液相色谱图

A: 绿原酸对照品溶液; B: 阴性对照溶液; C: 供试品溶液

**2.2.4 标准曲线的绘制** 精密吸取对照品储备液 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 均进样 20  $\mu\text{L}$  (定量管), 平行操作 3 次, 记

录峰面积。以峰面积值 ( $A$ ) 对进样量 ( $C$ ) 进行回归处理, 其回归方程为:  $A = 2.83 \times 10^6 C + 3.46 \times 10^4$ ,  $r = 0.9996$  ( $n = 5$ ), 结果表明绿原酸含量在 0.2 ~ 1.2  $\mu\text{g}$  范围内, 线性关系良好。

### 2.3 抑菌试验<sup>[5]</sup>

**2.3.1 菌悬液的制备** 试验前从保存菌种斜面上沾取微量的菌苔, 接种在普通肉汤培养基中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16 ~ 18 h, 取出作为原菌液。把原菌液用生理盐水稀释 10 000 倍, 备用。

**2.3.2 药敏纸片的制备** 选用吸水力较强而质地均匀的滤纸, 用打孔机打成直径 6 mm 的圆片, 置洁净干燥试管内, 120  $^{\circ}\text{C}$  干热灭菌 2 h。在无菌的条件下将其放入药液中浸泡 4 h, 取出, 将其单个地摆在干燥的无菌平皿内, 置 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中, 烘干, 备用。

**2.3.3 培养基的制备** 将营养琼脂培养基用蒸馏水溶解, 高压灭菌, 备用。

**2.3.4 药敏纸片法** 分别取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌菌悬液 0.2 mL, 分别注入无菌培养皿内, 再倾入 15 mL 琼脂培养基, 混匀后冷却成含菌平板。然后再将已制好的药敏纸片, 用无菌镊子贴在含菌平板上, 每个平板贴 4 片, 各纸片中心相距 24 mm, 纸片距平皿边缘约 15 mm, 各纸片间距相等。将平皿放入恒温培养箱, 细菌置培养箱中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 霉菌置培养箱中 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 36 h。观察结果, 测定抑菌圈直径。

## 3 结果

**3.1 正交试验结果分析** 表 2、表 4 直观分析表明, 绿原酸含量极差大小为  $C > A > B$ , 较好工艺组合为  $A_1 B_3 C_1$ 。抑菌圈直径极差大小为  $C > A > B$ , 较好工艺组合为  $A_1 B_1 C_1$ 。表 3、表 5 方差分析的结果表明, 因素 C 对整个实验结果影响最大, 依次为 A, B。因素 C, A 对试验结果有显著意义,  $C_1, A_1$  抑菌效果最好, 宜选择  $C_1, A_1$ ; B 对绿原酸和抑菌圈直径无显著影响。故从绿原酸和抑菌圈直径两方面考虑, 确定蒲金凝胶剂的最佳提取工艺为  $A_1 B_1 C_1$ , 即浸泡时间为 0.5 h, 加水倍数分别为 15/10 倍, 提取时间为 1/0.5 h。

**3.2 验证实验** 根据将工艺  $A_1 B_3 C_1$  和  $A_1 B_1 C_1$  进行比较实验, 结果表明两者绿原酸平均含量和抑菌效果差异无显著性。因此选择  $A_1 B_1 C_1$  作为蒲金凝胶剂的最佳水提工艺。

表 2 绿原酸含量正交试验及结果

列号	浸泡时间	加水倍量	提取时间	空列	绿原酸含量 (mg · g <sup>-1</sup> )
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.664 5
2	1	2	2	2	0.603 2
3	1	3	3	3	0.564 7
4	2	1	2	3	0.573 8
5	2	2	3	1	0.435 9
6	2	3	1	2	0.681 3
7	3	1	3	2	0.462 3
8	3	2	1	3	0.678 8
9	3	3	2	1	0.592 7
K <sub>1</sub>	1.832 4	1.700 6	2.024 6	1.693 1	
K <sub>2</sub>	1.691 0	1.717 9	1.769 7	1.746 8	
K <sub>3</sub>	1.733 8	1.838 7	1.462 9	1.679 2	
k <sub>1</sub>	0.610 8	0.566 9	0.674 9	0.584 4	
k <sub>2</sub>	0.563 7	0.572 6	0.589 9	0.582 3	
k <sub>3</sub>	0.577 9	0.612 9	0.487 6	0.559 4	
R	0.047 1	0.046	0.187 3	0.025	

注: K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> 该因素分别在 1, 2, 3 水平下 3 个试验结果之和; k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub> 该因素分别在 1, 2, 3 水平下 3 个试验结果的平均值。R 为该因素下 3 个水平的极差值。

表 3 方差分析表

源	离均差平方和 ss	自由度 f	方差 s	F 值
A	0.003 5	2.00	0.001 8	0.67
B	0.003 8	2.00	0.001 9	0.70
C	0.029 2	2.00	0.014 6	5.40
D(误差)	0.005 4	2.00	0.002 7	1.00

F(1, 2)<sub>0.05</sub> = 19

#### 4 讨论

平行实验单因素条件的确定 分别设计 3 种方法提取金银花和蒲公英中的绿原酸:微波, 超声和煎煮水提, 就几种提取物的抑菌效果进行比较, 发现煎煮水提的效果较好, 再设计正交试验, 确定最佳提取工艺。

表 4 抑菌试验正交试验表及结果

列号	浸泡时间 A(h)	加水 倍数 B(倍)	提取 时间 C(h)	抑菌圈直径(cm)					总和
				金黄色 葡萄球菌	大肠 杆菌	绿脓 杆菌	枯草芽 孢杆菌	白色 念珠菌	
				1	1	1	1	1.345 8	
2	1	2	2	0.568 8	0.719 0	1.334 2	1.381 8	1.999 8	6.003 6
3	1	3	3	1.005 5	1.300 2	1.358 2	1.244 5	0.981 0	5.889 4
4	2	1	2	0.735 8	1.446 8	1.523 8	1.025 0	0.196 8	5.928 2
5	2	2	3	0.625 2	1.095 2	1.001 0	1.589 0	0.904 8	5.215 2
6	2	3	1	1.430 5	1.309 8	1.115 0	1.210 5	1.077 0	6.142 8
7	3	1	3	0.796 5	1.563 0	1.074 2	1.299 7	0.809 8	5.543 2
8	3	2	1	0.801 5	1.700 8	1.243 2	1.436 8	1.030 0	6.212 3
9	3	3	2	0.599 2	0.987 5	1.139 8	1.442 0	0.995 7	5.164 2
K <sub>1</sub>	19.179 2	16.921 2	17.519 3						
K <sub>2</sub>	16.307 6	19.287 5	18.365 8						
K <sub>3</sub>	17.759 1	17.057 2	17.360 8						
k <sub>1</sub>	6.393 1	5.633 7	5.839 8						
k <sub>2</sub>	5.435 9	6.429 2	6.121 9						
k <sub>3</sub>	5.919 7	5.685 7	5.786 9						
R	0.957 2	0.795 5	0.335 0						

表 5 方差分析表

误差来源	离均差平方和 ss	自由度 f	方差 s	F 值	P 值
A	0.856 2	2.00	0.428 1	19.46	P < 0.05
B	0.387 2	2.00	0.193 6	8.80	P > 0.05
C	1.438 4	2.00	0.719 2	32.69	P < 0.05
D(误差)	0.044 0	2.00	0.022	1.00	

F(1, 2)<sub>0.05</sub> = 19

#### [参考文献]

- [1] 史克莉, 孔一凡. 正交法优选金银花微波提取工艺的研究[J]. 湖北中医杂志, 2007, 29(12): 54.
- [2] 宋德花, 李继昌, 梁运霞, 等. 正交试验法优选金银花中绿原酸水提工艺研究[J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(5): 5.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一)部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 177, 289.
- [4] 史克莉, 许蜡英. 不同提取方法对金银花中绿原酸含量测定的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 820.
- [5] 郑钧镛, 王光宝. 药品微生物学及检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 350.