

平脂胶囊水提工艺优选及其总蒽醌含量的测定

杨 辉, 黄亦琦*, 罗友华
(厦门市医药研究所, 福建 厦门 361003)

[摘要] 目的: 优选平脂胶囊最佳水提工艺, 建立其总蒽醌含量的紫外分光光度测定方法。方法: 以总蒽醌含量和干膏得率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验方法优选平脂胶囊水提工艺。利用蒽醌类化合物遇碱显红色或紫红色反应, 524 nm 波长处直接测定试样的吸收度。结果: 最佳水提工艺: 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.5 h。对照品 1, 8-二羟基蒽醌浓度在 $3.2 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内吸收度与浓度呈良好的线性关系, $r = 0.999 6$, 样品平均回收率 99.17%, RSD 为 2.01%。结论: 该工艺稳定、可行, 紫外分光光度法灵敏、快速、准确、成本低, 适用于平脂胶囊中总蒽醌的测定。

[关键词] 平脂胶囊; 蒽醌类; 提取工艺; 正交设计; 分光光度法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0048-04

Optimization the Water Extracting Technology for Pingzhi Capsule and determination of Total Anthraquinones in it

YANG Hui, HUANG Yi-qi*, LUO You-hua
(Xiamen medical institute, Xiamen 361003, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the water extracting technology for Pingzhi capsule and establish a ultraviolet spectrophotometric method for the determination of total anthraquinones in Pingzhi capsule. **Method:** The extracting technology of Pingzhi Capsule was optimized by orthogonal experiment with total anthraquinones and the yield of extrac as the markers. Color reaction(Borntragers reaction) occurs sensitively when anthraquinones are in the albaline solution, producing stably red or purple-red color. The absorption value of the colored sample solution was measured at 524 nm. **Results** The optimum extracting condition was adding 10 times water and extracting 1.5h/time for 3 times. The calibration curve indicated that the absorptivity was linearly correlated with the concentration of 1, 8-dihydroxy anthraquinone in the range of $3.2 \sim 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.999 6$). The average recovery of 1, 8-dihydroxy anthraquinone was 99.17% and RSD was 2.01%. **Conclusion:** The technology is stable and easy to be operated. The method of direct ultraviolet spectrophotometry is accurate, sensitive, quick and cost effective and it can be used to determine total anthraquinones in Pingzhi capsule.

[Key words] Pingzhi capsule; anthraquinones; extracting technology; orthogonal design; spectrophotometry

平脂胶囊是由决明子、葛根、制首乌等组成。配方中以决明子为君药, 其降血脂主要活性成分为蒽醌类成分, 另方中制首乌亦含蒽醌类成分, 方中蒽醌

类化合物主要包括大黄素、大黄酸、大黄酚以及与葡萄糖形成的苷等^[1], 易溶于水。本文以出膏率和总蒽醌含量为考察指标, 采用正交设计对决明子、制首乌水提工艺进行优选研究。目前蒽醌类成分测定方法有分光光度法、高效液相色谱法、毛细管电泳法、毛细管电色谱法、气质谱法联用法等, 因上述高效液相色谱法等的分析成本较高, 故本实验选用紫外分光光度法对产品中总蒽醌进行测定, 并对其方法学

[收稿日期] 2009-05-25

[基金项目] 厦门市科技计划资助项目(20021011)

[通讯作者] * 黄亦琦, Tel: (0592) 2050262; E-mail: ykszyyf@163.com

进行考察。

1 仪器与材料

UV-2501PC 紫外分光光度计(日本岛津)、BP211D 电子天平(德国赛多利斯)。

决明子、制首乌等药材购自厦门市鹭燕制药有限公司。1,8-二羟基蒽醌对照品(中国药品生物制品检定所,0829-9702)。乙醇、盐酸、三氯甲烷、氢氧化钠、氨水均为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 正交试验水提液总蒽醌的测定^[2-4]

2.1.1 标准溶液的制备 精密称取 1,8-二羟基蒽醌 16 mg, 置 200 mL 容量瓶, 加氯仿溶解并稀释至刻度($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 供试液的制备 精密吸取正交试验水提液 10 mL, 水浴蒸干, 加 30% 乙醇-盐酸(6:1) 35 mL 溶解, 在沸水浴回流水解 1.5 h, 冷却, 氯仿 20, 20, 20, 10 mL 分次萃取, 合并氯仿萃取液于 100 mL 容量瓶中, 加氯仿至刻度, 摇匀, 备用。

2.1.3 空白对照液的制备 取水 10 mL, 同 2.1.2 操作制备空白对照液。

2.1.4 检测波长的选择 精密吸取 1,8-二羟基蒽醌标准溶液、供试液及空白对照液各 5 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 沸水浴蒸干, 冷却, 加入 15 mL 混合碱溶液(10% 氢氧化钠 4% 氨溶液等量混合, 必要时滤过), 沸水浴加热 5 min, 立即冷却, 混合碱溶液定容至 25 mL。以水为空白, 在 400~700 nm 波长范围内扫描, 结果 1,8-二羟基蒽醌与供试液最大吸收峰波长为 524 nm, 空白对照液于此处无吸收, 选择 524 nm 波长作为总蒽醌含量的测定波长。

2.1.5 标准曲线的制备 精密吸取 1,8-二羟基蒽醌标准溶液($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置 25 mL 容量瓶, 同 2.1.4 操作, 水为空白, 在 524 nm 波长处测定吸光度, 以浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为: $A = 0.0447C + 0.0083$, $r = 0.9996$ 。结果表明 1,8-二羟基蒽醌浓度在 $3.2\sim 16.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.1.6 时间稳定性试验 精密吸取 1,8-二羟基蒽醌标准溶液 2 mL 及供试液 5 mL, 操作方法同前, 分别于 0.50, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 h 测定吸光度, 结果表明, 显色产物的颜色在 1 h 内稳定, RSD 分别为 0.38% 和 0.82%。

2.1.7 精密度试验 精密吸取 1,8-二羟基蒽醌标准溶液 2 mL, 按 2.1.4 操作, 连续测定 6 次, 测得吸光度值为: 0.316, 0.316, 0.315, 0.316, 0.316, 0.315, RSD 为 0.17% ($n = 6$)。

2.1.8 重复性试验 精密吸取同一编号水提液 6 份 10 mL, 按 2.1.2 操作制备供试液, 取供试液 5 mL, 按 2.1.4 操作, 测得吸光度值为: 0.432, 0.427, 0.434, 0.436, 0.426, 0.432, RSD 为: 0.97% ($n = 6$)。

2.1.9 加样回收率试验 精密吸取已知含量水提液 5 mL, 加入一定量 1,8-二羟基蒽醌对照品, 按 2.1.2 操作, 结果见表 1。

表 1 平脂胶囊水提液加样回收率试验 ($n = 6$)

样品号	样品总蒽醌量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得总蒽醌量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	2.369	1.25	3.574	97.20		
2	2.369	1.26	3.578	98.29		
3	2.369	2.50	4.796	98.40	99.15	1.70
4	2.369	2.51	4.804	98.46		
5	2.369	5.01	7.475	101.3		
6	2.369	5.11	7.571	101.23		

2.1.10 水提液总蒽醌含量测定 精密吸取各编号水提液 10 mL, 同上操作, 计算总蒽醌量, 结果见表 3。

2.2 正交试验设计^[5] 采用正交试验法, 以总蒽醌含量和干膏率作为考察指标进行优选。以加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)作为考察因素, 设计 3 个水平, 因素水平见表 2。考虑到空白栏预留作误差分析, 实验采用 $L_9(3^4)$ 水平的正交设计表。取决明子、制首乌药材 3 日处方量提取, 合并提取液, 浓缩至 200 mL, 提取具体方案及正交试验结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 2 平脂胶囊水提工艺考察因素水平表

水平	因素		
	A 加水量(倍)	B 提取时间(h)	C 提取次数(次)
1	6	1	1
2	8	1.5	2
3	10	2	3

表 2 中以总蒽醌权重系数为 80, 干膏率权重系数为 20, 计算综合得分。由表 2、表 3 可见, 平脂胶囊水提取最佳工艺为 $A_3B_2C_3$, 即用 10 倍水提取 3 次, 每次 1.5 h。由极差 R 值可以看出, 对提取影响

最大的是提取次数(C),其次是加水量(A),最后是提取时间(B)。方差分析结果显示提取次数对提取工艺有显著性影响,故在提取过程中应注意严格控制。

表 3 平脂胶囊水提工艺正交试验结果

试验号	因素				总蒽醌量 (mg)	干膏率 (%)	综合得分
	A	B	C	误差 D			
1	1	1	1	1	36.67	11.18	33.45
2	1	2	2	2	93.85	21.41	80.40
3	1	3	3	3	94.76	26.17	84.47
4	2	1	2	3	66.81	18.78	59.79
5	2	2	3	1	109.47	27.64	95.71
6	2	3	1	2	66.88	16.04	57.86
7	3	1	3	2	115.68	25.03	98.11
8	3	2	1	3	68.55	14.30	63.90
9	3	3	2	1	105.81	23.92	90.48
K_1	66.107	63.783	51.737	73.213			
K_2	71.120	80.003	76.890	78.790			
K_3	84.163	77.603	92.763	69.387			
R	18.056	16.220	41.000	9.403			

表 4 平脂胶囊水提工艺试验方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	521.305 3	2	260.652 6	3.885 5	
B	459.840 8	2	229.920 4	3.4274	
C	2567.840 3	2	1283.920 1	19.1394	< 0.05
误差 D	134.165 3	2	67.082 6		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$, 自由度均为 2; 实验结果采用中国医学百科全书医学统计学软件包(第三版)(PEMS3.1)进行统计分析。

2.3 正交试验水提液干膏率的测定 精密吸取正交试验各水提液 20 mL, 水浴蒸干, 105 °C 烘 3 h, 称重, 计算干膏得率, 结果见表 3。

2.4 验证实验 由正交试验结果筛选的工艺: 取 3 日处方量药材据此进行验证 3 批, 样品处理方法及测定方法同上。结果见表 5。

表 5 平脂胶囊水提最佳工艺验证($n = 3$)

编号	总蒽醌量(mg)	干膏率(%)
1	120.36	26.36
2	119.57	26.77
3	121.06	26.53

由表 5 可见: 优化提取的结果与正交表中的最佳水平比较相近, 说明确定的工艺合理可行, 可操作性强。可以作为平脂胶囊的最佳提取工艺。

2.5 平脂胶囊总蒽醌含量测定

2.5.1 标准溶液的制备 同 2.1.1, 1, 8-二羟基蒽醌 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5.2 供试液的制备 倾取 10 粒胶囊内容物研磨混匀, 精密称取 0.8 g(依样品中总蒽醌的含量确定取样量)加 30% 乙醇-盐酸(6: 1) 35 mL, 操作方法同 2.1.2。

2.5.3 阴性对照液的制备 取按同样工艺制成的除去决明子、制首乌的阴性对照品 0.8 g 按上法操作制备阴性对照液。

2.5.4 检测波长的选择 精密吸取 1, 8-二羟基蒽醌标准溶液、供试液、阴性对照液各 5 mL, 同 2.1.4 操作, 供试品的最大吸收波长与标准溶液相同, 其阴性对照液在此波长处无明显吸收, 选择 524 nm 波长作为总蒽醌含量的测定波长。

2.5.5 标准曲线的制备 与 2.1.5 同法操作, 结果, 回归方程 $A = 0.036C + 0.0431$, $r = 0.999 6$, 1, 8-二羟基蒽醌浓度在 3.2~ 16.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.5.6 重复性试验 精密称取同一批号胶囊内容物 6 份各 0.8 g, 同上操作测定, 吸光度值 RSD 为 0.81% ($n = 6$)。

2.5.7 加样回收率试验 精密称取已知含量样品 6 份各 0.5 g, 加入一定量 1, 8-二羟基蒽醌对照品, 同上操作, 结果见表 6。

表 6 加样回收率试验($n = 6$)

样品号	样品量 (g)	样品中蒽醌量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得总蒽醌量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.502 3	2.451	1.25	3.571	97.20		
2	0.516 5	2.521	1.25	3.676	98.29		
3	0.500 5	2.442	2.52	4.923	98.40	99.15	1.70
4	0.518 9	2.532	2.49	4.933	98.46		
5	0.507 2	2.475	5.12	7.736	101.3		
6	0.512 1	2.499	5.08	7.673	101.23		

2.5.8 含量测定 取连续 5 批平脂胶囊测定其总

蒽醌含量, 测定结果见表 7。

表 7 平脂胶囊总蒽醌含量测定 ($n = 7$)

编号	批号	总蒽醌含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD(%)
1	20070901	4.87	0.40
2	20070902	4.96	0.38
3	20071001	4.88	0.29
4	20080301	4.79	0.42
5	20080302	4.83	0.37

3 讨论

以总蒽醌含量和出干膏率作为正交试验优选平脂胶囊水提工艺指标, 其中总蒽醌权重系数为 80, 干膏率权重系数为 20, 结果, 正交试验确定最佳水提工艺为 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.5 h。经 3 批验证, 证实本工艺合理可行, 可操作性强。

利用蒽醌类化合物遇碱显红色或紫红色 (Borntragers 反应), 直接测定样品中总蒽醌的含量, 从线性、稳定性、精密度、重复性及加样回收率等实验结果可以看出, 紫外分光光度法测定平脂胶囊中蒽醌类成分的含量准确性高, 重复性好, 方法简便易行。

蒽醌类化合物常以葡萄糖苷结合形式存在于植物中, 因此测定总蒽醌必须水解成游离型。本实验开始采用 25% 盐酸-冰乙酸 (1:9) 水解^[2], 结果混合酸与有机试剂难分层, 且水解液颜色过深, 对结果干扰较大。而以硫酸酸水解, 虽水解效果较好, 但显色与标准系列差异较大。部分文献^[3]在酸水解前, 先以甲醇回流提取, 本实验简化水解步骤, 选择 30% 乙醇-盐酸 (6:1) 回流水解 1.5 h, 结果较为满意。

标准溶液配制溶剂的选择, 以冰醋酸配制 1, 8-二羟基蒽醌标准溶液 ($80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[2], 与混合碱液

反应, 所得标准曲线线性好, 但是吸光度值偏低, 在 0.06~0.29 之间, 当标液取量为 2 mL (浓度 $6.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 时出现无色实验, 因标准溶液中的酸中和了混合碱, 至羟基蒽醌不能很好地在碱性环境中产生显色反应, 故使吸光度值降低。本实验改用氯仿配制标准溶液, 测得吸光度值为 0.16~0.78, 避免了酸度带来的影响。

标准品溶液在碱液中显玫瑰红色, 而样品溶液带棕色, 经扫描, 阴性对照液于测定波长处吸收值较低, 可认为此种差异影响不大。碱显色条件, 文献中有加热回流 0.5 h, 水浴加热 5 min, 置暗处 30 min 等不同显色条件^[2-4], 经实验测定吸光度无明显差异, 确定水浴加热 5 min, 操作简便, 用时较短。蒽醌测定时间稳定性试验表明, 显色产物在 1 h 内吸光度值较稳定, 超过 1 h 后, 吸光度值均有所下降。

本文采用的测定方法准确, 重复性好, 省时、快速、成本低, 为其他保健食品中总蒽醌的含量测定及质量标准制定提供了一种简便、实用的方法。

[参考文献]

- [1] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1994: 61, 316, 369.
- [2] 叶碧莎, 赵琳, 宋悦华. 保健食品中总蒽醌的测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(5): 830-831.
- [3] 蔡晓, 李宏. 紫外分光光度法测定保健食品中总蒽醌的含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, (19) 1: 47-48.
- [4] 刘晓燕, 曹祥燃. 保健食品中总蒽醌测定方法的研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(6): 43.
- [5] 钱漪, 许树培. 实用药理学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1983: 374.