

痹痛消膏的醇提工艺研究

李 耿, 蔡大可, 曾 宝, 赖小平, 苏子仁*
(广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 优选痹痛消膏最佳提取工艺。方法: 采用正交试验法, 以虎杖苷含量为考察指标, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定不同工艺中虎杖苷含量, 对痹痛消膏的提取工艺进行探讨。结果: 提取次数、醇浓度、提取时间为显著性影响因素。最优工艺为: 虎杖、三七、天南星、川乌、续断、辣椒, 用 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1h, 过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 浓缩至质量密度 1.20 (50 ℃), 虎杖苷提取率可达 90% 以上。结论: 本研究建立的虎杖苷测定方法简便可行、重复性好, 可为本制剂建立质量控制方法提供参考。

[关键词] 痹痛消膏; 虎杖; 虎杖苷; 高效液相色谱法; 正交试验法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)11-0006-02

痹痛消膏由虎杖、三七、天南星、川乌、续断、辣椒等组成, 具有行气止痛, 活血化瘀, 祛风通络的功效。本研究采用正交试验设计, 以虎杖苷含量为考察指标, 采用 HPLC 法测定不同工艺中虎杖苷含量变化情况, 对痹痛消膏的提取工艺进行探讨。现将结果报告如下:

1 仪器与试剂

DIONEX SUMMIT 高效液相色谱仪 (配有 UVD170U 检测器、STH585 柱温箱、P680 HPLC 泵、ASF100 自动进样器, Chromeleon 色谱工作站)。KQ3200DE 型医用数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

虎杖药材 (批号: 20040712), 由广州中医药大学新药开发研究中心赖小平研究员鉴定。虎杖苷 (供含量测定用, 111575-200301) 对照品, 由中国药品生物制品检定所提供。乙腈 (色谱纯, Metrack 公司), 超纯水, 甲醇 (分析纯)。

2 虎杖苷的含量测定

2.1 供试品制备 精密量取本品 1mL, 置于 25mL 容量瓶中, 甲醇定容, 密塞, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24h 的虎杖苷对照品适量, 甲醇

溶解定容, 制成浓度为 1mg/mL 的单一对照品贮备液。精密吸取适量储备液于 10mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成 25 μ g/mL 对照品溶液。

2.3 色谱条件 Phenomenex luna C₁₈ 柱, (5 μ m, 250mm × 4.60mm); 乙腈: 水 (23: 77) 为流动相, 检测波长 306nm, 柱温: 35 ℃; 进样量: 10 μ L。结果见图 1。结果显示, 在该色谱条件下, 虎杖苷与其他成分可达基线分离, 其它药材成分对测定无干扰。

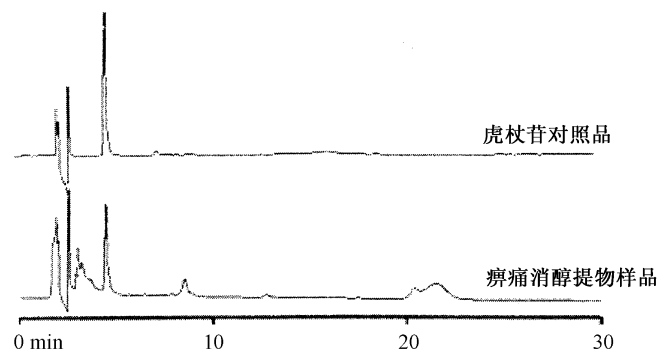


图 1 痹痛消膏醇提物 HPLC 图谱

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 4, 8, 10, 12, 24 μ L 进行色谱测定, 按上述色谱条件测定峰面积, 以各对照品进样量 (Y, μ g) 对峰面积 (X, A) 进行线性回归, 得标准曲线。得回归方程为 $Y = 2.8088X + 1.1052$, $r = 0.9999$, 线性范围: 0.13 μ g~0.5 μ g。

2.5 加样回收率试验 精密量取痹痛消膏提取物 (20040101) 0.5mL, 分别精密加入一定量的虎杖苷对照品, 按供试品溶液制备项下操作, 重复操作 6 份, 按色谱条件测定含量, 计算回收率, 结果见表 1。

[收稿日期] 2006-04-04

[通讯作者] * 苏子仁, Tel: (020) 36585814; E-mail: suziren@yahoo.com.cn

表 1 虎杖苷加样回收率试验结果 (n=6)

序号	样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.275	0.251	0.523	98.8	99.3	1.3
2	0.275	0.251	0.521	98.0		
3	0.275	0.251	0.528	100.8		
4	0.275	0.251	0.522	98.7		
5	0.275	0.251	0.526	100.1		
6	0.275	0.251	0.522	98.7		

2.6 样品测定 精密吸取待测样品 1mL, 置于 50mL 容量瓶中, 甲醇定容, 密塞, 摇匀, 过 0.45μm 微孔滤膜, 精密吸取 10μL 供试品溶液注入液相色谱仪中, 测定峰面积, 计算含量。

3 醇提工艺参数的优化试验

3.1 试验因素水平的设计 根据本方主要有效成分为醇溶性化学成分, 选定乙醇浓度, 乙醇用量, 提取时间, 提取次数等 4 个因素, 每个因素取 3 个水平, 选用 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 因素水平安排见表 2。

表 2 因素水平表

水平	因素			
	A 醇浓度	B 乙醇用量	C 提取时间	D 提取次数
	(%)	(倍)	(h)	(次)
1	60	4	0.5	1
2	70	5	1	2
3	80	6	1.5	3

3.2 提取工艺和结果 制法: 取虎杖 25g、三七 20g、天南星 10g、川乌 20g、续断 10g、辣椒 10g, 按正交表设计的条件进行提取, 用数倍量一定浓度的乙醇回流数次, 每次回流一定时间, 过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 真空浓缩至质量密度 1.20(50℃), 用 60% 乙醇稀释至 100mL, 供含量测定用。

依 2.6 中方法测定虎杖苷含量。结果如表 3。

由表 3 结果显示, 影响虎杖苷含量因素顺序为: D> A> C> B, 其中提取次数、醇浓度、提取时间为显著性影响因素。表 4 排除因素 B 进行方差分析, 结果表明: 因素 A、因素 C 和因素 D 对虎杖苷含量有显著影响 (P<0.01 和 P<0.05); 采用 A₂B₃C₂(或 C₃)D₃ 组合最优, 从节省时间考虑, 选择 A₂B₃C₂D₃ 为最优工艺。取虎杖、三七、天南星、川乌、续断、辣椒, 用 6 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1h, 过滤, 合并提取液, 回收乙醇, 浓缩至相对密度 1.20(50℃), 乙醇调整体积至 100mL, 备用。

3.3 最优工艺重复试验 最优工艺试验重复 2 次, 结果如表 5。结果显示, 虎杖药材虎杖苷含量为

0.31%, 符合虎杖苷含量不得少于 0.15% 药典标准, 两次重复工艺虎杖苷的转移率均大于 90%。结果显示, 应用本提取方法提取, 痹痛消膏处方中虎杖苷转移率较高。

表 3 正交试验表及结果

试验号	A	B	C	D	虎杖苷总量(mg)
1	1	1	1	1	34
2	1	2	2	2	56
3	1	3	3	3	65
4	2	1	2	3	71
5	2	2	3	1	45
6	2	3	1	2	62
7	3	1	3	2	66
8	3	2	1	3	69
9	3	3	2	1	48
K ₁	155	171	165	127	
K ₂	178	170	175	184	
K ₃	183	175	176	205	
R	9.33	1.67	3.67	26.00	
SS	148.67	4.67	24.67	1086	

表 4 方差分析表

方差来源	SS	f	MS	F 值	P 值
A	148.67	2	74.33	31.86	< 0.05
B	4.67	2	2.33		
C	24.67	2	12.33	5.29	> 0.05
D	1086	2	543	232.71	< 0.01

表 5 最优工艺重复试验结果

样品	样品量	总固物 (g)	虎杖苷含量		
			含量	总量 mg	提取率%
虎杖药材	25g	—	0.31%	77.5	100
重复工艺 1	100mL	20.967 7	0.705mg/mL	70.5	90.97
重复工艺 2	100mL	21.395 1	0.709mg/mL	70.9	91.48
平均	100mL	21.181 4	0.707mg/mL	70.7	91.23

4 讨论

虎杖中含有大黄素和虎杖苷, 2000 版药典采用 HPLC 法测定虎杖中大黄素的含量^[1], 采用硅胶吸附富集大黄素, 操作复杂; 2005 版药典对虎杖药材进行了修订, 增加了虎杖苷的含量测定。本文采用 HPLC 法测定虎杖苷的含量, 样品制备方法简单, 样品分离效果好, 重现性强, 在 306nm 下检测, 各成分均达到基线分离, 理论塔板数均在 10 000 以上。本测定方法可为建立本产品的质量标准的提供参考。

本文确定的最佳提取工艺, 出膏率为 10% 左右, 相对密度 1.20(50℃), 经中试放大生产, 重现性好。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2000. 17-18.