

活血通经消瘀巴布剂组方药物木芙蓉叶等乙醇提取工艺研究

杨一丁¹ 张 伟² 杨文婷³ 高文勇⁴

(1 青岛市市立医院, 青岛, 266071; 2 青岛市海慈医疗集团, 青岛, 266033; 3 山东中医药大学药学院, 济南, 250355; 4 青岛四方嘉兴路街道人民路社区卫生服务站, 青岛, 266033)

摘要 目的:研究活血通经消瘀巴布剂组方药物的乙醇提取工艺。方法:采用正交设计法,以醇浸物和大黄素的含量为考察指标优选醇提取工艺。结果:最佳提取工艺为用浓度为60%的乙醇,提取3次,每次乙醇用量为药材重量的6倍,每次提取时间为40 min。结论:优选的活血通经消瘀巴布剂组方药物的乙醇提取工艺稳定可行。

关键词 醇浸物;大黄素;高效液相色谱法;正交设计

Study on Ethanol Extraction Technology on Components of Huoxue Tongjing Xiaoyu Cataplasma Such as Cottonrose Hibiscus Leaf

Yang Yiding¹, Zhang Wei², Yang Wending³, Gao Wenyong⁴

(1 Department of Traditional Chinese Medicine, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266033, China; 3 College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 4 Community Health Service Station of Qingdao Sifang Jiexing Street, Qingdao 266071, China)

Abstract Objective: To study ethanol extraction of components of Huoxue tongjing xiaoyu cataplasma. **Methods:** By orthogonal design, the ethanol extraction process was optimized with the yield of the contents of alcohol extracts and emodin as indexes. **Results:** The optimum alcohol extraction process was obtained with 60% alcohol, extracting twice for 40 minutes, and the amount of ethanol was six times over the weight of the herbal. **Conclusion:** The optimum extraction process of Huoxue tongjing xiaoyu cataplasma by orthogonal design is stable and feasible.

Key Words Alcohol extracts; Emodin; High-performance capillary electrophoresis; Orthogonal design

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.04.035

我们在本实验以醇浸物和大黄素为指标,对活血通经消瘀巴布剂组方药物中的木芙蓉、紫草和大黄进行乙醇提取工艺正交设计优化实验研究,考察乙醇浓度,乙醇用量(倍),提取时间(h),提取次数等因素,确定最佳工艺条件。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪二元泵 DAD 检测器(美国);JA2003 型电子分析天平(上海);超声波清洗器:KQ100 型(昆山市超声波仪器厂)工作频率 40 kHz,输出超声电功率 100 W;BuchiR215V 型旋转蒸发仪(瑞士)。

1.2 试剂 大黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0756-00110);甲醇为色谱纯(美国天地试剂公司),乙醇为药用,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 药材购自安徽亳州,经青岛市药检所吴爱英主任中药师鉴定,木芙蓉叶为锦葵科植物木芙蓉 *Hibiscus mutabilis* L. 的叶,大黄为 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎,紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst 的干燥根。

2 实验方法

2.1 醇浸物测定方法 量取醇提液 10 mL,精密称重,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,于 105℃ 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称重。计算醇浸物含量 $[(g/g) \times \%]$ 。

2.2 大黄素含量测定方法^[1]

2.2.1 色谱条件 色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Lichrospher, 汉邦科技),流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15),流速 1.0 mL/min;检测波长为 254 nm。理论塔板数按大黄素峰计算应不低于 1500。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取大黄素对照品 1.408 2 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制

得浓度为 5.638 2 $\mu\text{g/mL}$ 的大黄素对照品溶液。分别精密吸取大黄素对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、10.0、15.0 μL , 按 2.1.1 色谱条件测定峰面积积分值, 以峰面积积分值为纵坐标、大黄素量为横坐标, 结果在选定的色谱条件下, 大黄素含量在 0.005 6 ~ 0.084 μg 的范围内均呈现良好的线性关系; 回归方程为 $y = 361658x - 368$, $r = 0.999 5$ 。

2.3 正交方案设计 以醇浸膏和大黄素提取率为指标, 以乙醇浓度, 乙醇用量(倍), 提取时间(h), 提取次数为因素, 进行 $L_9(3^4)$ 的正交试验。正交因素和水平见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素和水平表

因素	1	2	3
乙醇浓度(A)	50	60	70
溶剂量(倍)(B)	6	8	10
提取时间(h)(C)	40	60	80
提取次数(D)	1	2	3

2.4 乙醇提取实验 将木芙蓉叶、紫草和大黄等 3 味药药材细粉(过 40 目筛), 按处方比例量分别称取 9

份, 每份 100 g, 分别按 $L_9(3^4)$ 表中给出的条件进行提取, 提取时间从沸腾开始时记录。提取结束后, 分别合并提取液, 旋转蒸发回收乙醇至适量, 再以无水乙醇定容至 100.00 mL, 得 1-9 号样品液。

3 正交试验结果

1) 分别精密量取“2.4 乙醇提取实验”制得的 1-9 号样品溶液各 10 mL, 按“2.1 醇浸物测定方法”分别测定并计算 1-9 号样品醇浸物含量(mg/g)。每个样品重复测定 3 次, 计算 3 次平均值。结果见表 2。2) 将 1) 步制得的其中 1 份 1-9 号醇浸物分别加 8% 的盐酸 10.00 mL 溶解, 超声处理 2 min, 再加三氯甲烷 10 mL, 加热回流 1h, 放冷, 置分液漏斗中, 用少量三氯甲烷洗涤容器, 并入分液漏斗中, 分取三氯甲烷层, 酸液再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收三氯甲烷至干, 残渣用甲醇溶解、转移并定容至 10 mL, 摇匀, 滤过。取续滤液, 按“2.2 大黄素含量测定方法”分别进样、测定, 计算 1-9 号样品大黄素含量($\text{mg/g} \%$)。每个样品重复测定 3 次, 计算 3 次平均值。结果见表 2。

表 2 正交试验表及结果($n=3$)

试验号	A	B	C	D	醇浸物含量[$(\text{g/g}) \times \%$]	大黄素提取率[$(\text{mg/g}) \times \%$]
1	1	1	1	1	0.9315	135.71
2	1	2	2	2	1.1121	148.22
3	1	3	3	3	1.4187	179.85
4	2	1	2	3	2.2883	219.52
5	2	2	3	1	1.1755	166.42
6	2	3	1	2	2.1562	207.15
7	3	1	3	2	1.9205	188.38
8	3	2	1	3	2.4117	238.32
9	3	3	2	1	1.2096	160.22
醇浸物 K1	3.4623	5.1403	5.4994	3.3166	$\sum x = 14.6241$	
K2	5.62	4.6993	4.61	5.1888	$CT = (\sum x)^2 / 9 = 23.7627$	
K3	5.5418	4.7845	4.5147	6.1187		
R	1.9777	0.441	0.9847	2.8021		
大黄素 K1	463.78	543.61	581.18	462.35	$\sum x = 14.6241$	
K2	593.09	552.96	527.96	543.75	$CT = (\sum x)^2 / 9 = 23.7627$	
K3	586.92	547.22	534.65	637.69		
R	129	9.35	53.2	175		

表 3 醇浸物方差数据分析($n=3$)

方差来源	A	C	D	误差 B
SS	0.9984	0.1966	1.3609	0.0365
V	2	2	2	2
MS	0.4992	0.0983	0.6804	0.01825
F	27.36	5.39	37.3	
P	<0.05*	>0.05	<0.05*	

注: $F_{0.01(2,2)} = 99.00$, $F_{0.05(2,2)} = 19.00$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 结果分析

以醇浸物提取率为指标, 影响因素从大到小依次为 $D > A > C > B$; 其中 A 因素和 D 因素有统计学意义($P < 0.05$), B 因素和 C 因素无显著影响; 最佳条件为 $A_2B_1C_1D_3$ 。以大黄素提取率为指标, 影响因素从大到小依次为 $D > A > C > B$, 其中 A 因素和 D 因素有非常显著影响($P < 0.01$), C 因素有显著影响($P < 0.05$), B 因素无显著影响; 最佳条件为 $A_2B_2C_1D_3$ 。综合醇浸

物和大黄素提取率,考虑到B因素对这两种指标成分提取率均无显著影响,选择 $A_2B_1C_1D_3$ 方案进行工艺验证实验,结果该方案两种指标成分提取率分别醇浸物为 $2.4208[(g/g) \times \%]$,大黄素为 $241.22[(mg/g) \times \%]$ 。因此确定 $A_2B_1C_1D_3$ 为最终生产工艺条件,即用浓度为60%的乙醇,提取3次,每次乙醇用量为药材重量的6倍,每次提取时间为40min。

表4 大黄素方差数据分析($n=3$)

方差来源	A	C	D	误差 B
SS	3547	560	5133	14.8
V	2	2	2	2
MS	1773.5	280	2566.5	7.4
F	240	37.8	347	
P	<0.01**	<0.05*	<0.01**	

注: $F_{0.01(2,2)}=99.00$, $F_{0.05(2,2)}=19.00$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

5 工艺说明

5.1 关于提取方案 该巴布剂组方药物中的木芙蓉、紫草和大黄,及提取挥发油后的乳香、没药、三棱、莪术等药渣均含有醇溶性成分。木芙蓉主要化学成分为黄酮苷、酚类、氨基酸、鞣质、还原糖、甾类化合物和挥发油类成分,其中黄酮苷是其活性成分^[2-3],具有抗炎镇痛等药理作用^[4]。姚莉韵^[5]实验研究认为乙醇回流提取总黄酮效果大大高于水煎法、温浸法,回流提取的最佳工艺条件是用12倍量70%乙醇提取3次,每次3h,其中乙醇浓度是影响提取率的主要因素。大黄主要含蒽醌类化合物,总量为1.01%~5.19%^[6]。蒋孟良等^[7]比较几种提取方法对总蒽醌提取影响,结果认为醇提>渗漉>水提,热提强于冷提。朱雪瑜等^[8]研究认为60%~80%乙醇浓度对大黄总蒽醌(游离蒽醌和结合蒽醌)有较好的提取效果,最佳工艺为用70%的乙醇提取3次,每次1h,溶剂量为药材的10、8、8倍。紫草主要生物活性成分为萘醌类等多种化合物^[9-10],乙醇浓度对萘醌收率有显著影响^[11]。因此,实验设计以乙醇为溶媒进行正交设计优化实验,确定最佳工艺条件。

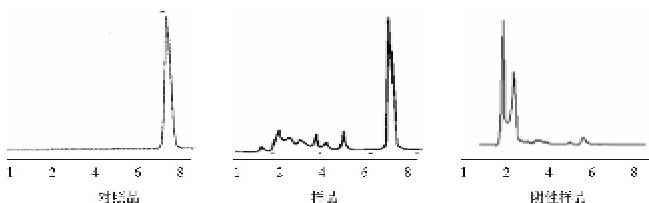


图1 高效液相色谱图

5.2 关于大黄素含量测定方法 参考含大黄复方制剂大黄素含量测定的有关报道资料,先后对流动相甲醇-0.1%磷酸(80:20)^[12-13]、甲醇-0.1%磷酸(85

:15)^[14]、甲醇-0.2%磷酸(84:16)^[15]、甲醇-0.2%磷酸(70:30)^[16]、乙腈-甲醇-1%磷酸(35:37:28)^[17]、甲醇-水-冰醋酸(72:28:1.0)^[18]等系统进行了预试验,观察系统分离效果。结果表明,用甲醇-0.1%磷酸溶液(85:15)作为流动相测定样品中大黄素含量较为适宜,出峰时间短,阴性对照品无干扰(见图1)。确定大黄素含量测定的色谱条件。

5.3 关于精密度和重复性 对照品溶液连续进样5次大黄素峰面积的RSD为1.48%,2号乙醇提取液按“3.2”步处理后依次进样5次大黄素峰面积积分值的RSD值为1.19%,表明该色谱条件的精密度和重复性良好。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 2010版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:22.
- [2] 姚莉韵, 陆阳, 陈泽乃. 木芙蓉叶化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(3):201-203.
- [3] 张丽, 周长征. 木芙蓉叶的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(1):453-454.
- [4] 郇科, 卢立琼. 木芙蓉叶的药理研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(3):37-38.
- [5] 姚莉韵, 王国艳, 王丽平. 木芙蓉叶提取工艺的研究[J]. 中成药, 2000, 22(12):827-829.
- [6] 王本祥. 现代中药药理学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1999:1368.
- [7] 蒋孟良, 郭建生, 杨平华. 提取方法对大黄中总蒽醌含量的影响[J]. 现代应用药学, 1993, 10(1):33.
- [8] 朱雪瑜, 郭鹏, 张铁军. 正交设计优选复方大黄颗粒中大黄总蒽醌的提取工艺[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(5):574-575.
- [9] 徐新刚, 王宝珍, 孙志蓉, 等. 新疆紫草的主要化学成分[J]. 吉林大学学报:理学版, 2010, 48(2):319-322.
- [10] 孙相民. 紫草的药理活性与临床应用研究进展[J]. 中国实用医药, 2010, 5(16):251-252.
- [11] 冯文文, 李国玉, 谭勇, 等. 新疆紫草中萘醌类成分的提取工艺研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2011, 29(1):68-70.
- [12] 陈长水, 桑旭峰. HPLC法测定八正合剂中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄酚[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5):1088-1089.
- [13] 陈冠, 陶遵威, 王文彤. HPLC测定紫金烧伤膏中大黄素和大黄酚的含量[J]. 天津药学, 2010, 22(1):10-13.
- [14] 宁洁. HPLC法测定抗眩晕颗粒中大黄素和大黄酚[J]. 中草药, 2010, 41(5):749-750.
- [15] 朱艳容, 李媛媛, 李先荣, 等. RP-HPLC法测定扶正固本颗粒中大黄素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):69-70.
- [16] 于永润. HPLC法测定通便宁片中芦荟大黄素和大黄酸的含量[J]. 世界中医药, 2010, 5(5):368-369.
- [17] 邢淑艳, 商丽丽. HPLC法测定减肥通便片中大黄素的含量[J]. 中国医药指南, 2010, 8(19):11-12.
- [18] 袁海玲. 高效液相色谱法测定活血通络搽剂中大黄素的含量[J]. 临床合理用药, 2010, 3(8):74.

(2012-11-28 收稿)