

祛疣酊渗漉提取工艺研究

王芳¹, 高群², 谈静², 呼梅²

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610072)

摘要:目的 通过正交试验优选祛疣酊最佳渗漉提取工艺。方法 采用L₉(3⁴)正交试验,以丹皮酚和芍药苷含量、浸膏得率为考察指标,优选祛疣酊最佳渗漉提取工艺。结果 正交试验筛选出最佳提取工艺为:加6倍量75%乙醇,浸泡24 h,渗漉速度1 mL/min。结论 优选得到的提取工艺方法简单,药效成分提取率高,成本低。

关键词:祛疣酊; 提取工艺; 正交试验; 丹皮酚; 芍药苷; 浸膏得率

中图分类号: R283.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2010)05-0051-03

Study on Percolation Extract Process of Quyou Tincture WANG Fang¹, GAO Qun², TAN Jing², et al
(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China; 2. The Hospital Affiliated to Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

Abstract: Objective To optimize the extract technology of Quyou Tincture with orthogonal design. Methods With the determination of peoniflorin and paeonol and the extraction rates as indexes, the extract conditions of Quyou Tincture was optimized by orthogonal design. Results The optimal preparation process of alcohol was as follows: adding 6 times alcohol (75%), immerse 24 hours and percolate with 1 mL/min. Conclusion The optimum extracting condition was simple, with a high extraction rate and low cost.

Key words: Quyou Tincture; percolation extract process; orthogonal design; peoniflorin; paeonol; extraction rate

祛疣酊是由牡丹皮、乌梅、山楂等组成的外用中药复方制

剂,有清热散结、收敛润燥的功效,临床主要用于治疗扁平疣、尖锐湿疣及毛囊炎等。祛疣酊的提取工艺采用渗漉法,为考察渗漉提取效果,保证制剂质量,本试验以方中主药牡丹皮的主要有效成分芍药苷、丹皮酚的提取量以及浸膏得率作为评价指

通讯作者:高群, Tel: 028-87783695, E-mail: gaoqun1364@sina.com

20%的酒量,在80℃炒炙4 min,作为提取工艺研究的考察指标。

2.4.5 验证试验 2次最佳工艺验证结果分别为18.01、17.85 mg/g,丹酚酸B成分含量高于试验组,说明所选工艺条件A₂B₂C₁D₂是最佳工艺。

3 讨论

3.1 指标的选择与最佳工艺

甘肃丹参中的脂溶性成分、水溶性成分是其药效作用密切相关的重要活性物质,在进行正交试验时,笔者以两类成分作为考察酒制工艺指标;为了使考察的结果更为贴近实际,我们采用传统的用药方法即饮片煎煮。由于脂溶性成分的煎出率非常低,实际意义不大而忽略。关于炮制品的最佳工艺,我们选择水溶性成分提取最佳工艺,即10%的黄酒,加20%的酒量,在80℃炒炙4 min。

3.2 影响因素探讨

方差分析表明,酒的种类影响最显著,这与大多数文献报道相同;其次是酒的用量,而炒炙时间、炒炙温度影响较小。传统炮制技术中关于炒炙火候的规定为文火,较为含糊,实际操作全凭经验。本研究采用80、110、160℃进行炒炙,最佳工艺的炒炙温度为80℃,虽然与文献报道文火的温度掌握在

120~130℃有一定的差别,但80℃与110℃的煎出率、成品性状相似,160℃酒炙品焦斑明显,甚至呈焦褐色,成品外观较差。说明火候对酒炙品的质量影响较大。

3.3 炮制对化学成分的影响

从试验来看,炮制对各类成分的影响表现出一定程度的多向性,酒炙品水煎出物中脂溶性成分的含量非常低,但其中的丹酚酸B明显高于生品(12.56 mg/g),可能是因为酒炙过程改变了药物的物理性状,有利于丹酚酸B的浸润、溶解、扩散等,提高了其溶出率^[5]。

参考文献:

- [1] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药材标准[S]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2009. 72.
- [2] 赵建邦. 甘肃丹参的研究与应用评价[J]. 中药材, 2003, 26(7): 581.
- [3] 杨树声, 宋平顺. 丹参类药材脂溶成分HPLC测定[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2009, 35(4): 61.
- [4] 杨树声, 宋平顺. 丹参类药材水溶成分HPLC测定[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 23(6): 43.
- [5] 冉懋雄, 郭建民. 现代中药炮制手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002. 133, 147, 282.

(收稿日期: 2009-11-09, 编辑: 陈静)

标,采用正交试验法优选祛疣酊的渗漉提取工艺。

1 仪器与试剂

HP-1100 高效液相色谱仪 (HP-1100 系列二级泵, 二极管阵列检测器, HP Chemstation 工作站, 美国惠普公司); BP211D 分析天平 (Sartorius 公司); AS10200 超声波清洗机 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。芍药苷 (批号 0736-200219)、丹皮酚 (批号 708-9704) 对照品由中国药品生物制品检定所提供。祛疣酊方中各药材由成都中医药大学附属医院药剂科提供。乙腈色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验优化提取工艺

2.1.1 正交设计 查阅相关文献^[2-3], 影响渗漉提取的主要因素是乙醇浓度、用量、渗漉速度和浸泡时间, 故选择 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交试验, 分别以芍药苷和丹皮酚的含量 (每克牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的提取量)、浸膏得率为评价指标, 正交设计

见表 1。

表 1 提取工艺正交设计因素水平表

水平	乙醇浓度 (%)	乙醇用量 (倍)	流速 [mL/(min · 1000 g)]	浸泡时间 (h)
	A	B	C	D
1	60	6	3	12
2	75	8	2	24
3	90	10	1	36

2.1.2 正交试验结果 按祛疣酊处方取各味药材, 依照正交试验设计方案进行试验, 合并渗漉液, 得 9 份正交试验样品。精密吸取各正交试验样品 2 mL, 加甲醇稀释至 10 mL, 混匀, 滤过, 精密吸取 10 μ L, 按上述色谱条件测定渗漉液中芍药苷和丹皮酚的含量, 并按总体积算出每克原药材中提取成分的量。取正交试验样品 1/10 体积量, 置恒重的蒸发皿中, 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重, 放冷, 测得干浸膏的量, 计算浸膏收得率。将以上测定结果作为评价指标进行综合评分, 结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 2 正交试验结果分析表

试验号	A	B	C	D	芍药苷含量 (mg/g)	丹皮酚含量 (mg/g)	浸膏收得率 (%)	综合评分
					Y_1	Y_2	Y_3	
1	1	1	1	1	5.133 0	21.970 3	19.128 1	83.4
2	1	2	2	2	4.657 7	22.288 7	23.205 1	83.6
3	1	3	3	3	4.984 7	22.320 1	25.645 0	88.0
4	2	1	2	3	5.289 1	25.295 7	20.940 1	91.2
5	2	2	3	1	5.897 7	26.124 8	22.268 8	97.4
6	2	3	1	2	5.108 1	23.864 4	19.714 8	86.6
7	3	1	3	2	4.101 2	22.964 5	14.788 0	74.8
8	3	2	1	3	3.761 2	23.531 7	13.630 3	72.2
9	3	3	2	1	4.358 6	25.004 7	15.829 4	80.4
I	255.0	249.4	242.2	261.2				
II	275.2	253.2	255.2	245.0				
III	227.4	255.0	260.2	251.4				
\bar{I}	85.000 0	83.133 3	80.733 3	87.066 7				
\bar{II}	91.733 3	84.400 0	85.066 7	81.666 7				
\bar{III}	75.800 0	85.000 0	86.733 3	83.800 0				
R	15.933 3	1.866 7	6.000 0	5.400 0				

注: 采用综合加权评分对试验结果进行分析。浸膏收率评分 = (20/最大浸膏收率) \times 浸膏收率; 芍药苷含量评分 = (40/最大芍药苷含量) \times 芍药苷含量; 丹皮酚含量评分 = (40/最大丹皮酚含量) \times 丹皮酚含量; 综合评分 = 浸膏收率评分 + 芍药苷含量评分 + 丹皮酚含量评分

表 3 方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	383.848 9	2	191.924 4	70.445 4	0.014 0*
B	5.448 9	2	2.724 4		
C	57.555 6	2	28.777 8	10.562 8	0.086 5
D	44.382 2	2	22.191 1	8.145 2	0.109 4
误差	5.448 9				
总和	491.235 6				

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

由试验结果的直观分析及方差分析可知, 影响渗漉提取效果的因素顺序为: A > C > D > B, A (乙醇浓度) 对渗漉提取效果有

显著影响 ($P < 0.05$), C (流速) 和 D (浸泡时间) 对提取效果不显著。由直观分析最佳提取工艺为: $A_2B_3C_3D_1$, 鉴于 B (乙醇用量) 因素对提取效果无显著影响, 为节约成本, 将 B_3 调整为 B_1 , 优选提取工艺为 $A_2B_1C_3D_1$, 即药材加 6 倍量 75% 的乙醇, 浸泡 12 h, 渗漉速度 1 mL/min。

2.1.3 验证试验 按正交试验优选的提取工艺条件 $A_2B_1C_3D_1$ 进行重复性验证试验, 结果见表 4。

从重复性验证试验结果可见, 优化条件提取结果芍药苷含量、丹皮酚含量、浸膏收率波动不大, 提取液中芍药苷含量的变异系数为 3.16%, 丹皮酚含量的变异系数为 2.88%, 干浸膏收率变异系数为 0.50%。由此可见, 该提取工艺条件是合理、可行的。

表4 祛瘀酊渗漉提取工艺重复性验证试验结果($n=3$)

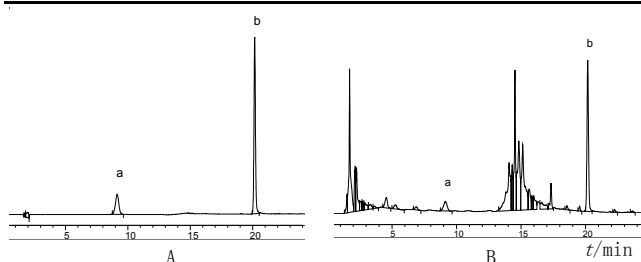
试验号	芍药苷含量(mg/g)	丹皮酚含量(mg/g)	浸膏收率(%)
1	5.512 2	26.382 0	23.10
2	5.218 4	25.086 1	23.05
3	5.224 9	26.378 9	23.21
平均值	5.318 5	25.949 0	23.12
RSD(%)	3.155 7	2.879 9	0.50

2.2 芍药苷和丹皮酚含量测定^[1]

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil ODS-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm, 依利特公司); 以乙腈为流动相 A, 以 0.1%磷酸水溶液为流动相 B, 按表 5 进行梯度洗脱; 流速 1 mL/min, 柱温 20 °C; 紫外检测波长 230 nm; 理论塔板数以芍药苷计不低于 2 000, 以丹皮酚计不低于 5 000。分别按照上述色谱条件测定对照品和初试样品, 色谱图见图 1。

表5 梯度洗脱条件

时间(min)	A(%)	B(%)
0~10	13	87
10~12	13~30	87~70
12~16	30~40	70~60
16~25	40~55	60~45



注: A. 对照品; B. 样品; a. 芍药苷; b. 丹皮酚

图1 祛瘀酊 HPLC 图谱

2.2.2 线性关系考察 分别精密称取芍药苷(4.03 mg)、丹皮酚(5.84 mg)对照品, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 混匀, 得芍药苷和丹皮酚对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液 2、3、5、10、12 μL 和 2、5、10、15、20 μL, 注入高效液相色谱仪, 依上述色谱条件测定峰面积。以色谱峰面积为纵坐标, 以芍药苷、丹皮酚的量为横坐标, 进行线性回归。结果表明: 芍药苷在 0.080 6~0.483 6 μg 范围内线性关系良好, 回归方程为: $Y=1\ 279.331\ 08X+2.188\ 78$, $r=0.999\ 93$; 丹皮酚在 0.116 8~1.168 μg 范围内线性关系良好, 回归方程为: $Y=2\ 520.113\ 49X-32.355\ 70$, $r=0.999\ 94$ 。

2.2.3 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL, 照上述色谱条件重复进样 6 次, 记录色谱峰面积。结果芍药苷峰面积平均值为 520.578, RSD=0.38%; 丹皮酚峰面积平均值为 1 443.525, RSD=0.294 3%。

2.2.4 重复性试验 精密量取同一初试样品 6 份, 每份 2 mL, 加甲醇稀释至 10 mL, 混匀, 滤过, 精密吸取 10 μL, 按上述色

谱条件测定, 并计算芍药苷与丹皮酚的含量。结果每 1 g 原药材中提取芍药苷的量平均值为 4.786 7 mg, RSD=1.44%; 每 1 g 原药材中提取丹皮酚的量平均值为 23.385 2 mg, RSD=1.29%。

2.2.5 稳定性试验 取同一初试样品供试品溶液, 分别在 0、2、5、10、12 h 测得芍药苷与丹皮酚峰面积, 其峰面积 RSD 分别为 1.35%、0.62%, 表明供试品溶液 12 h 内基本稳定。

2.2.6 加样回收率试验 取已知含量的同一初试样品 6 份, 分别精密加入芍药苷对照品溶液、丹皮酚对照品溶液适量, 按“2.1.4”项下方法制得供试品溶液, 并按上述色谱条件测定溶液中芍药苷与丹皮酚含量, 计算加样回收率。结果芍药苷平均回收率为 97.64%, RSD=1.32%; 丹皮酚平均回收率为 99.97%, RSD=0.99%。

3 讨论

查阅相关文献^[4-5], 芍药苷和丹皮酚的含量测定多选用 250 mm 的长柱, 本试验选择的色谱条件采用 C₁₈ 150 mm 的短柱, 同样能对芍药苷和丹皮酚进行很好的分离, 测定方法准确可靠, 且出峰时间较快。

在本试验条件下, 当芍药苷的进样量大于 0.483 6 μg(12 μL) 时, 色谱峰拖尾明显, 标准曲线的相关系数降低, 可能与色谱柱的载样量有关, 有待进一步的试验研究。根据样品中芍药苷的含量, 芍药苷进样量在 0.080 6~0.483 6 μg 间线性关系良好($r=0.999\ 93$), 符合样品含量测定的要求。

本试验进行正交试验综合评价时, 考虑到芍药苷和丹皮酚为该方中主要有效成分, 其含量对酊剂疗效影响较大, 因此, 芍药苷和丹皮酚总含量的权重系数以 80% 计(各占 40%); 浸膏收率作为间接参考指标, 综合评分时权重系数以 20% 计。

在正交试验条件筛选过程中, 以不同的溶媒浓度、溶媒用量、浸泡时间、流速测定了牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的提取率。方差分析表明, 乙醇浓度为关键因素, 流速、浸泡时间、乙醇用量对提取效果不显著。正交试验结果表明, 最佳提取工艺为 A₂B₃C₃D₁, 即药材加 6 倍量 75% 的乙醇, 浸泡 12 h, 渗漉速度 1 mL/min, 在此条件下牡丹皮中芍药苷和丹皮酚的提取率稳定且含量较高。

参考文献:

- [1] 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. 69, 119.
- [2] 黄建猷, 刘智生, 黄瑞松. 正交实验法优选乳康酊渗漉提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(11): 19-20.
- [3] 杨瑜, 方世平, 肖从新. 正交实验法优选赤芍的渗漉提取工艺[J]. 医药导报, 2005, 24(5): 433-434.
- [4] 潘莹, 郭小龙, 陈勇. HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135.
- [5] 周欣, 杨文业. 高效液相色谱法测定丹栀逍遥丸中栀子苷、芍药苷、丹皮酚和甘草酸含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 784-787.

(收稿日期: 2009-12-11, 编辑: 陈静)