

正交试验优选复方没食子凝胶膏剂中紫草、天仙子、野西瓜和没食子的提取工艺^Δ

何承辉^{1*}, 刘宣麟¹, 邢建国^{1#}, 姜雯²(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.石河子大学, 新疆石河子 832000)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3302-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.12

摘要 目的: 优选复方没食子凝胶膏剂中紫草、天仙子、野西瓜和没食子的提取工艺。方法: 以乙醇浓度、渗漉速度、乙醇用量为考察因素, 以左旋紫草素含量、氢溴酸东莨菪碱质量浓度和浸膏得率为指标, 采用正交试验优选处方中紫草、天仙子和野西瓜的乙醇提取工艺; 以提取次数、提取时间、加水量为考察因素, 以没食子酸质量浓度和浸膏得率为指标, 采用正交试验优选处方中没食子的水提取工艺。结果: 最佳乙醇提取工艺为药材粉碎成中粉, 加10倍量85%乙醇渗漉提取, 渗漉速度为3 ml/min; 最佳水提取工艺为加10倍量水, 提取3次, 每次1 h。结论: 优选工艺合理、可行, 可用于复方没食子凝胶膏剂中紫草、天仙子、野西瓜的提取。
关键词 复方没食子凝胶膏剂; 左旋紫草素; 氢溴酸东莨菪碱; 没食子酸; 正交试验

Optimization of Extraction Technology of *Arnebia euchroma*, *Hyoscyamus niger*, *Citrallus colocynthis* and *Cynips gallaetinctoriae* from Compound Gallnut Cataplasma by Orthogonal Test

HE Cheng-hui¹, LIU Xuan-lin¹, XING Jian-guo¹, JIANG Wen²(1.Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2. Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize extraction technology of *Arnebia euchroma*, *Hyoscyamus niger*, *Citrallus colocynthis* and *Gallnut* from Compound gallnut cataplasma. METHODS: The ethanol extraction technology of *A. euchroma*, *H. niger*, *C. colocynthis* and *C. gallaetinctoriae* from Compound gallnut cataplasma was optimized by orthogonal test with the concentration and amount of ethanol, diaculation velocity as factor using the contents of shikonin and scopolamine hydrobromide, the yield of extract as index. The water extraction technology of gallnut was optimized by orthogonal test with extracting times, extraction time and amount of water as factors using the content of gallic acid and the extract yield as index. RESULTS: The best ethanol extraction technology was as follows: herbal plants were smashed into moderate powder, adding 10 folds 85% ethanol for percolating and extracting, at speed of 3 ml/min; the best water extraction technology was as follows: 10 folds of water, extracting for 3 times, 1 hour for each time. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is reasonable, feasible and suitable for the extraction of *A. euchroma*, *H. niger*, *H. trionum* and *Gallnut* from Compound gallnut cataplasma.

KEY WORDS Compound gallnut cataplasma; Shikonin; Scopolamine hydrobromide; Gallic acid; Orthogonal design

复方没食子凝胶膏剂由没食子、紫草、天仙子、乳香、枯矾、冰片、花椒、野西瓜等8味药组成, 主要用于手术后患者的镇痛、止血和消炎, 可加快伤口愈合。本方没食子中没食子酸具有抗菌、消炎、止痛的功效, 是镇痛、消炎的活性成分^[1]; 紫草中左旋紫草素具有凉血活血、止痛生肌的功效^[2-3]; 天仙子可抑制腺体分泌, 对活动过强或痉挛状态的平滑肌有弛缓作用, 其中的氢溴酸东莨菪碱是其活性成分^[4]; 野西瓜具有祛风、除湿、止痛活血之功效, 其乙醇提取物具有抗菌、抗炎作用^[5-6]。本课题组采用正交试验设计, 以多种有效成分为指标优选最佳提取工艺, 为该制剂的生产工艺参数提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

SPD-10AVP型高效液相色谱仪(日本岛津公司); AB135-S电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); JM-B2003电子天平(余

姚市纪铭称重校验设备有限公司); WP-UP-IV-10型实验室专用超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司); KQ-100DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); KDM型调温电热套(山东省鄞城永兴仪器厂)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯(美国霍尼韦尔公司); 甲醇(分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 磷酸(分析纯, 西安化学试剂厂); 没食子酸、左旋紫草素、氢溴酸东莨菪碱对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110832-200302、0769-9903、100049-200308); 水为超纯水。

1.3 药材

紫草[*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston.], 天仙子(*Hyoscyamus niger* L.), 乳香(*Boswellia carterii* Birdw.), 冰片[*Cinnamomum camphora* (L.) Presl], 花椒(*Zanthoxyli Pericarpium*)均为2010年版《中国药典》收载的品种, 没食子(*Cynips gallaetinctoriae* Oliv)为1977年版《中华人民共和国卫生部药品标准·进口药材标准》收载的品种, 野西瓜(*Citrullus colocynthis* Schrad.)为《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》收载的品种, 所有药材均购自安徽省亳州市德昌药业有限公司, 经新

Δ 基金项目: 乌鲁木齐市科学技术计划项目(No.H101123001)

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 中药新药研发。电话: 0991-2318172。E-mail: hch301@sohu.com

通信作者: 研究员, 硕士研究生导师。研究方向: 中药制剂。电话: 0991-2300682。E-mail: xjguodd@163.com

疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 左旋紫草素含量的测定^[7]

2.1.1 对照品溶液的制备 取左旋紫草素对照品适量,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含140 μg左旋紫草素的对照品贮备液;再精密量取此贮备液5 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每1 ml含28 μg左旋紫草素的溶液,即得。

2.1.2 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.025 mol/l磷酸(85:15, V/V);检测波长:515 nm;柱温:35 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl。

2.1.3 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品贮备液1、2、3、4、5、6 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。精密吸取各对照品溶液10 μl,按“2.1.2”项下色谱条件分别测定。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得左旋紫草素标准曲线,详见表1。

2.2 氢溴酸东莨菪碱的含量测定^[8]

2.2.1 对照品溶液的制备 取氢溴酸东莨菪碱对照品适量,精密称定,置于10 ml量瓶中,加甲醇制成每1 ml含400 μg氢溴酸东莨菪碱的对照品贮备液;再精密量取此贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每1 ml含40 μg氢溴酸东莨菪碱的对照品溶液,即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:三乙胺-磷酸溶液(取三乙胺4 ml,加水500 ml,加磷酸1.8 ml,加水至1 000 ml,混匀)-乙腈(85:15, V/V);检测波长:210 nm;柱温:35 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl。

2.2.3 标准曲线的制备 分别精密吸取氢溴酸东莨菪碱对照品贮备液0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。精密吸取各对照品溶液10 μl,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得氢溴酸东莨菪碱的标准曲线,详见表1。

2.3 没食子酸的含量测定^[9]

2.3.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml含72 μg没食子酸的溶液,即得。

2.3.2 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸(5:95, V/V);检测波长:270 nm;柱温:35 ℃;流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl。

2.3.3 标准曲线的制备 分别精密吸取对照品溶液1、3、5、7、10 ml,置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。精密吸取各对照品溶液10 μl,按“2.3.2”项下色谱条件进样测定。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得没食子酸标准曲线,详见表1。

表1 各指标成分的标准曲线方程(n=5)

Tab 1 Standard curve equation of each component(n=5)			
对照品	标准曲线方程	线性范围, μg/ml	r
左旋紫草素	y=152 371 x+1 723.5	12.4~74.4	0.999 2
氢溴酸东莨菪碱	y=288 846 x-208 898	20.0~160.0	0.999 2
没食子酸	y=510 387 x-325 908	7.2~72.0	0.999 5

2.4 浸膏得率的测定

精密量取各个试验号的提取液50 ml,置恒质量(m₁)蒸发

皿中水浴挥干,105 ℃干燥至恒质量后置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量(m₂)。并按下式计算浸膏得率:乙醇提浸膏得率=500/50×(m₂-m₁)/30×100%;水提浸膏得率=1 000/50×(m₂-m₁)/10×100%。

2.5 供试品溶液的制备

2.5.1 乙醇提取供试品溶液的制备 取紫草、天仙子 and 野西瓜中粉各10 g,用乙醇渗漉提取,收集渗漉液,用85%乙醇定容于500 ml量瓶中,作为乙醇提取溶液。提取液过0.45 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.5.2 水提取供试品溶液的制备 取没食子最粗粉20 g,用水回流提取,合并提取液,用水定容于500 ml量瓶中,作为水提取溶液。提取液过0.45 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.6 乙醇提取工艺的优选

2.6.1 正交试验优选工艺 称取紫草、天仙子、野西瓜3味药材适量,结合前期预试验和单因素试验结果,发现渗漉提取优于回流提取,药材的粉碎粒为中粉较适宜。故选取乙醇浓度(A)、渗漉速度(B)、乙醇用量(C)为考察因素,并根据处方中药材有效成分的作用,选取左旋紫草素、氢溴酸东莨菪碱质量浓度和浸膏得率的综合评分(综合评分=左旋紫草素质量浓度/左旋紫草素质量浓度最大值×40+氢溴酸东莨菪碱质量浓度/氢溴酸东莨菪碱质量浓度最大值×40+浸膏得率/浸膏得率最大值×20)为指标,采用L₉(3⁴)正交表进行试验。因素与水平见表2;正交试验结果见表3;方差分析结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels			
水平	因素		
	A, %	B, ml/min	C, 倍
1	65	1	10
2	75	2	12
3	85	3	15

表3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal test								
试验号	A	B	C	D	左旋紫草素质量浓度, μg/ml	氢溴酸东莨菪碱质量浓度, μg/ml	浸膏得率, %	综合评分
1	1	1	1	1	71.16	20.44	19.09	66.63
2	1	2	2	2	74.96	26.06	17.52	70.04
3	1	3	3	3	68.12	39.48	17.37	73.62
4	2	1	2	3	71.50	59.36	19.93	88.62
5	2	2	3	1	76.04	69.12	17.71	93.99
6	2	3	1	2	70.36	70.36	17.44	91.47
7	3	1	3	2	72.06	58.24	20.00	88.37
8	3	2	1	3	70.02	74.24	18.09	94.03
9	3	3	2	1	77.92	70.18	18.05	95.86
K ₁	210.29	243.62	252.13	256.48				
K ₂	274.08	258.06	254.52	249.88				
K ₃	278.26	260.95	255.98	256.27				
R	67.97	17.33	3.85	6.60				

由表3、表4可知,因素A对评价指标有显著性影响(P<0.01),结合其极差分析,选水平3;B、C因素对评价指标均无显著性影响,为降低成本、节省工时,结合单因素试验结果综合考虑,确定最佳提取工艺为A₃B₃C₁,即药材粉碎成中粉,加10倍量85%乙醇,渗漉提取,渗漉速度为3 ml/min。

2.6.2 工艺验证试验 取药材中粉适量,按上述优选的工艺制备3批样品,并测定综合评分,进行工艺验证试验。结果,左

表4 方差分析结果

Tab 4 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	967.21	2	483.61	103.01	<0.01
B	57.45	2	28.73	6.12	
C	2.51	2	1.25	0.27	
D	9.39	2	4.69		
总变异	1 036.56	8			

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

旋紫草素、氢溴酸东莨菪碱质量浓度分别为71.64、69.74 $\mu\text{g/ml}$, RSD分别为1.2%、1.5% (n 均为3);浸膏得率为18.55%, RSD=0.8% ($n=3$),与正交试验结果吻合,表明优选的工艺合理、稳定、可行。

2.7 水提取工艺的优选

2.7.1 正交试验优选工艺 根据单因素试验结果,选取提取次数(A)、提取时间(B)、加水量(C)为考察因素,以没食子酸质量浓度和浸膏得率的综合评分(综合评分=没食子酸质量浓度/没食子酸质量浓度最大值 $\times 80$ +浸膏得率/浸膏得率最大值 $\times 20$)为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素与水平见表5;正交试验结果见表6;方差分析结果见表7。

表5 因素与水平

Tab 5 Factors and levels

水平	因素		
	A,次	B,h	C,倍
1	1	1.0	10
2	2	1.5	12
3	3	2.0	14

表6 正交试验结果

Tab 6 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	没食子酸质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	浸膏得率, %	综合评分
1	1	1	1	1	39.023	57.62	51.63
2	1	2	2	2	56.708	63.10	69.97
3	1	3	3	3	58.487	64.15	71.94
4	2	1	2	3	59.101	75.57	75.33
5	2	2	3	1	63.876	76.79	80.21
6	2	3	1	2	66.591	73.80	82.09
7	3	1	3	2	77.806	81.63	94.79
8	3	2	1	3	71.408	77.83	87.71
9	3	3	2	1	83.226	79.85	99.54
K_1	193.54	221.75	221.43	231.38			
K_2	237.63	237.89	244.84	246.85			
K_3	282.04	253.57	246.94	234.98			
R	88.50	31.82	25.51	15.47			

由表6、表7可知,因素A对评价指标有显著性影响($P<0.05$),结合其极差分析,选水平3;B、C因素对指标均无显著性影响,为降低成本、节省工时,结合单因素试验结果综合考虑,确定最佳提取工艺为 $A_3B_1C_1$,即加10倍量水,提取3次,每次1.0 h。

2.7.2 工艺验证试验 取药材中粉适量,按上述优选的工艺制备3批样品,并测定综合评分,进行工艺验证试验。结果,没食子酸质量浓度为80.536 $\mu\text{g/ml}$, RSD=1.3% ($n=3$);浸膏得

表7 方差分析结果

Tab 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	1305.58	2.00	652.79	29.85	<0.05
B	168.73	2.00	84.37	3.86	
C	133.61	2.00	66.81	3.06	
D	43.73	2.00	21.87		
总变异	1651.66	8.00			

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

率为78.52%, RSD=1.5% ($n=3$),与正交试验结果吻合,表明最佳提取工艺合理、稳定、可行。

3 讨论

紫草中有效成分左旋紫草素在热水中和干热情况下不稳定,故有很多文献采用高浓度乙醇回流的方法提取左旋紫草素。笔者在预试验时发现,对回流提取影响较大的因素有乙醇浓度、提取温度等,且随着温度的升高,在高浓度乙醇提取下,左旋紫草素含量逐渐降低。笔者又比较了回流提取和渗漉提取两种方法,结果不同温度下回流提取的左旋紫草素含量均低于渗漉提取方法,且在采用回流提取时需严格控制提取温度,这在工业化生产中增加了提取难度。笔者在中试生产中进一步证明筛选的工艺条件稳定、可行,适合工业化生产,同时可达到较高的提取效率和节约能源的目的。

笔者对乙醇提取工艺中药材的浸泡时间进行了考察,发现浸泡的时间越长,左旋紫草素和氢溴酸东莨菪碱的含量均有所下降,不利于渗漉,加之从工业生产节约工时方面综合考虑,确定药材不浸泡。

参考文献

- [1] 柯发敏.没食子酸的研究进展[J].泸州医学院学报,2011,34(4):440.
- [2] 王文杰,白金叶,刘大培,等.紫草素抗炎及对白三烯 β -4生物合成的抑制作用[J].药理学杂志,1994,29(3):161.
- [3] 代巧妹,王金凤,张凤山.紫草素对晚期胶原性关节炎的作用研究[J].哈尔滨医科大学学报,2009,43(1):48.
- [4] 王岩,白宗利,李军,等.天仙子急性毒性、抗炎及镇痛作用研究[J].中国中药杂志,2008,6(2):5.
- [5] Adel MM. Screening of some indigenous qutarl medicinal plants for antimicrobial activity[J]. *Phytother Res*, 2002, 16(8):751.
- [6] Alsaid MS, Abdeisatter EA. Isolation and identification of an anti-inflammatory principle from capparid sphenosa [J]. *Pharmazie*, 1988, 43(9):640.
- [7] 林雄,潘旭东,黄燕,等.HPLC测定紫草油中左旋紫草素的含量[J].海峡药学,2011,23(7):83.
- [8] 王晶,王晓黎,欧伊益,等.氢溴酸东莨菪碱微乳的制备及其体外透皮吸收研究[J].药学实践杂志,2009,27(4):279.
- [9] 斯琴格日乐,范云场,恩德,等.HPLC法测定怀菊花中没食子酸的含量[J].广东微量元素科学,2012,19(1):34.

(收稿日期:2012-10-24 修回日期:2013-02-08)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅