

正交设计研究脉通胶囊中虎杖提取工艺

★ 曾池清 邱孟 (华南肿瘤学国家重点实验室、中山大学肿瘤防治中心药剂科 广州 510060)

★ 申俊芳 (广东省广州医学院附属肿瘤医院 广州 510000)

摘要:目的:研究脉通胶囊中虎杖最佳提取工艺。方法:采用正交试验方法,以提取液中总蒽醌含量和虎杖苷的含量为考察指标,对影响两类成分提取工艺的因素进行了研究。结果:乙醇浓度、加液倍数对试验结果有显著影响。结论:虎杖最佳提取工艺条件为 8 倍量 85% 的乙醇,回流提取 2 次,每次 1.5 小时。

关键词:脉通胶囊;虎杖;正交设计;提取工艺

中图分类号:TQ 460.6 **文献标识码:**A

脉通胶囊是由虎杖、黄连、肉桂等多味中药经提取加工制成的纯中药制剂,具有通脉、活血、化瘀等功效。虎杖为方中主要药味,是蓼科植物虎杖(*Polygonum Cuspidatum* sieb.et zucc.)的根茎,性苦微寒,具有活血定痛、清热利湿、止咳化痰的作用。虎杖中的蒽醌类(anthraquinone)和虎杖苷(polydatin)是其主要药理活性成分,本试验选用总蒽醌和虎杖苷为指标进行正交试验,优化虎杖提取工艺,为虎杖的单方或复方制剂生产提供试验依据。

1 仪器与药品

岛津 UV-2501PC 型紫外分光光度仪(日本);Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国);虎杖苷、大黄素对照品(中国药品生物制品检定所);虎杖、黄连、肉桂药材购自广州市药材公司,经鉴定符合药典标准;除液相用乙腈为色谱纯外,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 试验方法

2.1 总蒽醌含量测定方法^[1]

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取大黄素对照品 5.00 mg,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,该对照品溶液浓度为 50.0 $\mu\text{g/mL}$ 。精密吸取对照品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 25 mL 比色管中,氮气吹干甲醇,然后加 5% NaOH-2% NH_4OH (1:1)混合碱液至刻度,摇匀,于 521 nm 处,以 5% NaOH-2% NH_4OH (1:1)混合碱液做空白对照,测定吸光度。测定结果以最小二乘法做线性回归,得方程 $Y=0.9598+35.43X$, $r=0.9995$ 。

2.1.2 样品的含量测定 精密称取虎杖粗粉 100 g 共 9 份,按正交设计进行试验,合并提取液,浓缩定容至 1 000 mL,备用。精密吸取 1 mL,置于圆底烧

瓶中,摇匀,加 2.5 mol/L H_2SO_4 溶液 20 mL,加热回流 1 小时,稍冷,加氯仿约 20 mL,继续回流 2 小时,冷却,分取氯仿层,酸液层再加氯仿 20 mL,振摇分出氯仿层,收集氯仿层提取液,移入 50 mL 的容量瓶中,加入氯仿至刻度。精密吸取上述氯仿提取液 10 mL 置于 25 mL 的比色管中,用氮气吹干氯仿,加 5% NaOH-2% NH_4OH (1:1)混合碱液溶解,并定容至 25 mL,然后按“2.1.1”中条件进行比色测定,并用外标两点法计算总蒽醌含量。

2.2 虎杖苷的含量测定方法^[2]

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil RP-18(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(23:77);流速 1.0 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:306 nm。在此条件下虎杖苷峰与其他色谱峰能达到基线分离,空白样品无干扰。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取虎杖苷对照品 1.50 mg,置 100 mL 容量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,得浓度为 0.0150 mg/mL 的对照品溶液。取虎杖苷对照品溶液 2、4、6、8、10 μL ,照 2.2.1 中条件进样,记录色谱图,测定峰面积,并以峰面积对进样量进行回归,得标准曲线方程为: $Y=5\,657.581\,7X+52.776\,7$, $r=0.999\,9$,以上结果表明,虎杖苷在 0.030 0~0.150 0 μg 范围内,峰面积值与进样量有良好的线性关系。

2.2.3 样品的含量测定 精密吸取“2.1.2”中虎杖提取液 2 mL,水浴蒸干,加乙醇溶解并定容至 10 mL,摇匀。按“2.2.1”中色谱条件进行测定,每次进样 20 μL ,记录色谱图,按外标两点法计算虎杖苷含量。

2.3 提取方法与结果

2.3.1 虎杖、黄连、肉桂混合醇提 取虎杖粗粒 45 g, 黄连粗粒、肉桂粗粒按处方比例加入, 分别用 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 小时, 合并提取液, 滤过, 滤液 70 °C 减压回收乙醇, 得浓缩液 250 mL, 备用。

2.3.2 虎杖单味醇提 取虎杖粗粒 45 g, 分别用 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 小时, 合并提取液, 滤过, 滤液 70 °C 减压回收乙醇, 得浓缩液 250 mL 备用。

2.3.3 虎杖醇渗漉 取虎杖粗粒 45 g, 75% 乙醇冷浸 24 小时, 以 3~5 mL/(kg·min) 的速度渗漉, 收集 10 倍量渗漉液, 70 °C 减压回收乙醇, 浓缩定容至 250 mL, 备用。

2.3.4 结果 用以上不同提取方法提取的虎杖提取液, 依法测定其中的总蒽醌含量和虎杖苷含量(结果见表 1), 得总蒽醌的提取率大小顺序为虎杖单味乙醇渗漉法>虎杖单味乙醇回流提取>虎杖、黄连、肉桂混合乙醇回流提取; 虎杖苷提取率大小顺序为虎杖单味乙醇回流提取>虎杖、黄连、肉桂混合乙醇回流提取>虎杖单味乙醇渗漉法。由结果可知, 虎杖单煎比合煎有效成分含量高, 故虎杖提取采用单煎; 而渗漉法由于生产周期长, 且对有效成分的提取并无优势, 所以最后确定虎杖的提取工艺为乙醇回流提取。

表 1 不同提取方法提取的虎杖提取液中总蒽醌和虎杖苷含量比较 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$

提取方法	总蒽醌含量	虎杖苷含量
总提	264.113	426.832 9
单煎	317.564 5	620.096 2
渗漉	354.8298	424.762 1

2.4 正交实验方法

在选择了虎杖单独乙醇回流提取作为提取方法的基础上, 选择了乙醇浓度、加醇倍量、回流提取时间为考察因素, 每个因素取 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。因素水平表见表 2。以提取液中总蒽醌和虎杖苷的含量作为考察指标进行综合评价, 筛选最佳提取工艺。按总蒽醌含量的权重系数为 0.6、虎杖苷含量的权重系数 0.4 进行综合评分(综合评分 = 60/最大总蒽醌含量 $\times$ 总蒽醌含量 + 40/最大虎杖苷含量 $\times$ 虎杖苷含量), 结果见表 3。

表 2 因素水平表

	A 乙醇浓度(%)	B 加醇量/倍	C 回流时间/h
1	60	5	1.0
2	75	8	1.5
3	85	12	2.0

表 3 正交试验结果及分析表 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$

实验号	因素				总蒽醌总含量	虎杖苷总含量	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	1052.5903	127.6564	63.02
2	1	2	2	2	1718.7537	161.7139	92.50
3	1	3	3	3	1271.4501	179.8371	81.83
4	2	1	2	3	859.5762	150.8366	61.83
5	2	2	3	1	1497.3162	118.6583	75.64
6	2	3	1	2	766.5725	142.1164	56.83
7	3	1	3	2	1333.4525	135.1555	73.92
8	3	2	1	3	1740.8957	145.5168	89.62
9	3	3	2	1	1825.0437	131.6015	89.29
I	79.117	66.257	69.823	75.983			
II	64.767	85.920	81.207	74.417			
III	84.277	75.983	77.130	77.760			
R	19.510	19.663	11.38	43.343			
F	36.524	34.546	11.888				
P	0.027	0.028	0.078				

结果分析: 由直观分析可知, 影响提取效果的因素顺序为: 加醇量>乙醇浓度>加水量, 得到最佳取方案为 $A_3B_2C_2$ 。从实验结果和方差分析结果表中可见, 因素 A(乙醇浓度)和因素 B(加醇倍量)对有效成分提取效果有显著性影响, 而因素 C 对实验结果无显著性影响, 考虑到实际生产中的经济因素, 最终选取 $A_3B_2C_1$ 作为本工艺的提取方案。为了确证工艺的优劣和稳定性, 根据筛选出的提取工艺, 进行 3 批验证试验, 结果总蒽醌总含量为 1 789.022 5 $\text{mg}/100\text{g}$, $RSD = 0.367\%$; 虎杖苷总含量为 174.631 4 $\text{mg}/100\text{g}$, $RSD = 0.817\%$, 表明本工艺条件基本稳定。

3 讨论

本文以总蒽醌与虎杖苷含量为评价指标, 对虎杖与不同混合药材醇提和虎杖单独醇提的方法进行筛选, 并对比渗漉法和回流法两种提取方法; 同时用正交试验方法考察了虎杖单独醇提的最佳提取工艺条件。结果表明采用单独醇回流提取较混合药材醇提和渗漉法所得指标成分提取量较高。选用单独醇回流提取方法, 以 8 倍量 85% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 小时, 为最优工艺条件。

本文在对虎杖与黄连、肉桂混合组分乙醇提取的成分对比分析实验数据显示, 当用虎杖与黄连、肉桂三药混合热回流醇提时, 虎杖中总蒽醌的提取率稍有降低, 而虎杖苷的提取率明显降低, 提示虎杖的合煎和单煎结果不一样, 其中的原理有待进一步的考察。

参考文献

- [1] 杨梓懿, 刘园华, 石继连, 等. 炒炭对虎杖中蒽醌及鞣质类成分的影响[J]. 中医报, 2004, 32(6): 31~33
- [2] 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. 145~146

(收稿日期: 2006-04-05)