

多指标正交试验优化复方江南卷柏散提取工艺

赵之丽^{1*}, 赵平¹, 邓光锐², 李娟¹, 刘义梅¹, 陈科力^{1#}(1.湖北中医药大学教育部中药资源与中药复方重点实验室, 武汉 430065; 2.黄冈市中医医院中医内科, 湖北黄冈 438000)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3996-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.33

摘要 目的:优化复方江南卷柏散提取工艺。方法:采用多指标正交试验。以芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-吡喃木糖苷(Y II)含量、落新妇苷含量和浸膏得率的综合评分为指标,筛选最优加水倍数、提取时间和提取次数;同时进行验证试验。结果:筛选的最优提取工艺为加12倍水量提取3次,每次1 h;验证试验中Y II含量为0.350 6 mg/g(RSD=1.207 4%, n=3)、落新妇苷的含量为1.406 0 mg/g(RSD=1.459 8%, n=3)、浸膏得率为23.066 6%(RSD=1.660 3%, n=3)。结论:该工艺科学合理,可用于复方江南卷柏散的提取。

关键词 复方江南卷柏散;正交试验;芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-吡喃木糖苷;落新妇苷;浸膏得率;提取工艺

Optimization of Extraction Technology for Compound *Selaginella moellendorffii* Powder with Orthogonal Test by Multiple Indicators

ZHAO Zhili¹, ZHAO Ping¹, DENG Guangrui², LI Juan¹, LIU Yimei¹, CHEN Keli¹(1.Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education & Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2.Dept. of Traditional Chinese Internal Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Huanggang City, Hubei Huanggang 438000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Compound *Selaginella moellendorffii* powder. METHODS: The amount of water, extracting time and times were screened by orthogonal test using the content of 6-C-β-D-glucopyranosul-8-C-β-D-xylopyranosyl apigenin (Y II) and astilbin, the yield of extract as index. The validation test was conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 12-fold water, decocting 3 times, 1 h each time; in validation test, the content of Y II and astilbin were 0.350 6 mg/g (RSD=1.207 4%, n=3) and 1.406 0 mg/g (RSD=1.459 8%, n=3); the yield of extract was 23.066 6% (RSD=1.660 3%, n=3). CONCLUSIONS: The technology is reasonable and scientific, and can be used for the extraction of Compound *S. moellendorffii* powder.

KEYWORDS Compound *Selaginella moellendorffii* powder; Orthogonal test; 6-C-β-D-glucopyranosul-8-C-β-D-xylopyranosyl apigenin; Astilbin; Yield of extract; Extraction technology

复方江南卷柏散为黄冈市中医医院制剂,由江南卷柏、土茯苓和车前子等3味中药组成,用药形式为加水煎服,主要用于治疗高尿酸血症及痛风性关节炎。方中江南卷柏为卷柏科植物江南卷柏(*Selaginella molledorfii* Hieron)的全草,具有清热利湿、凉血止血之功效,其有效成分为黄酮苷、双黄酮等^[1-2]。文献报道其所含黄酮类成分可抑制黄嘌呤氧化酶(XOD)从而减少尿酸生成^[3],同时具有明显的抗炎功效^[4]。土茯苓为百合科植物光叶菝葜(*Smilax glabra* Roxb)的干燥根茎,具有解毒、除湿、利关节的功效。已有报道土茯苓中的落新妇苷可下调肾脏尿酸盐转运体(URAT1)基因mRNA的表达,促进尿酸的排泄,对尿酸钠(MSU)所致的大鼠痛风性关节炎具有明显疗效^[5]。本研究以处方中江南卷柏水溶性部位黄酮苷类代表性成分芹菜素-6-C-β-D-吡喃葡萄糖-8-C-β-D-吡喃木糖苷(Y II)^[6]及土茯苓中落新妇苷含量、浸膏得率进行多指标综合评分,对该复方中药的提取工艺进行优化研究,为该制剂剂型改造提供试验依据。

* 硕士研究生。研究方向:中药资源及其品质。E-mail: 810847743@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药资源及其品质。电话:027-68890106。E-mail: Kelichen@126.com

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱(HPLC)仪,包括二元泵、色谱柱、可变波长检测器、色谱工作站(美国戴安公司);MS105 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司)。

1.2 药材与试剂

江南卷柏于2012年9月采于湖北宜昌雾渡河,由湖北中医药大学陈科力教授鉴定为卷柏科植物江南卷柏*Selaginella molledorfii* Hieron的全草(药材标本存放在湖北中医药大学标本馆内);车前子(批号:141202-141204)、土茯苓(批号:141002-141004)均购自安徽亳州药材市场,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定符合2015年版《中国药典》(一部)对应项下规定;落新妇苷对照品(上海阿拉丁试剂有限公司,批号:A102 725,纯度:≥98%);Y II对照品(湖北中医药大学教育部中药资源与中药复方重点实验室自制^[7],批号:20110119,纯度:>98.5%);甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 复方江南卷柏散的制备

取江南卷柏、土茯苓和车前子净药材分别粉碎并过100目

筛,取过筛后的细粉按3:1:1比例均匀混合,即得。

2.2 Y II 及落新妇苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-水(B,含2%的四氢呋喃和0.1%的三氟乙酸),梯度洗脱(0~5 min,18% A→25% A;5~45 min,25% A→45% A;45~55 min,45% A→100% A;55~60 min,100% A→18% A);流速:1 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:330 nm;进样量:20 μl。在上述色谱条件下,取“2.2.2”“2.2.3”(“2.4”项下试验号7)项下溶液进样测定。结果,Y II 与相邻峰分离度≥2.78,理论板数以Y II 计≥12 408;落新妇苷与相邻峰分离度≥1.58,理论板数以落新妇苷计≥25 186。色谱图见图1。

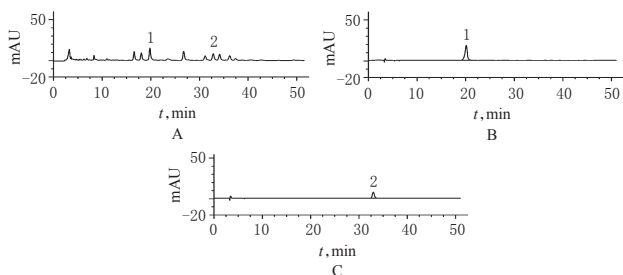


图1 高效液相色谱图

A.样品;B.Y II 对照品;C.落新妇苷对照品;1.Y II ;2.落新妇苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. sample; B. Y II control; C. astilbin control; 1. Y II ; 2. asbilbin

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒质量的落新妇苷对照品2.07 mg,加入甲醇溶解并定容至25 ml量瓶中,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得质量浓度为0.082 8 mg/ml的落新妇苷对照品溶液。精密称取干燥至恒质量的Y II 对照品1.53 mg,加入甲醇溶解并定容至5 ml量瓶中,摇匀,即得质量浓度为0.306 0 mg/ml的Y II 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取复方江南卷柏散干燥粉末9份,每份10 g,精密称定,按“2.4”项下各条件处理后,将所得提取液合并后离心(离心半径为9 cm,1 500 r/min,下同)5 min,取上清液定容至500 ml量瓶,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取落新妇苷对照品溶液1、2、3、4、5 ml置于10 ml量瓶中;Y II 对照品溶液0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 ml置于5 ml量瓶中,分别加甲醇定容,混匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过。精密吸取20 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以对照品质量浓度(x,mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行回归分析,得落新妇苷、Y II 回归方程分别为 $y=153.26x+0.064 1(r=0.999 8)$ 、 $y=896.86x-0.091 7(r=0.999 8)$,线性范围分别为0.008 28~0.041 40、0.003 06~0.015 30 mg/ml,定量限分别为 $1.827 0 \times 10^{-4}$ 、 $5.631 3 \times 10^{-5}$ mg/ml。

2.2.5 精密度、稳定性、重复性试验 按相关方法进行的操作。结果,精密度试验中落新妇苷峰面积的RSD=0.87% (n=6),Y II 峰面积的RSD=1.13% (n=6);稳定性试验中落新妇苷峰面积的RSD=1.94% (n=5),Y II 峰面积的RSD=1.72% (n=5),表明供试品溶液在12 h内稳定;重复性试验中落新妇苷峰面积的RSD=2.55% (n=6),Y II 峰面积的RSD=2.45% (n=6)。

2.2.6 加样回收率试验 精密吸取6份已知含量的供试品溶

液各5 ml,分别加入落新妇苷、Y II 对照品溶液适量,加水定容至10 ml量瓶中,混匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过。精密吸取各溶液20 μl,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,落新妇苷、Y II 的平均加样回收率分别为96.92% (RSD=1.55%,n=6)、96.25% (RSD=1.46%,n=6),表明本方法回收率良好。

2.3 浸膏得率的测定

精密称定复方江南卷柏散干燥粉末10 g,按“2.4”项下各条件处理后,将所得提取液合并后离心5 min,取上清液定容至500 ml量瓶中。精密量取100 ml(相当于原药材2 g),置于干燥至恒质量的蒸发皿中,80 ℃水浴挥干后,置于105 ℃烘箱内烘干至恒质量,于干燥器内冷却30 min,迅速称定质量并计算浸膏得率。浸膏得率(%)=干燥后质量(g)×0.5×100%。

2.4 正交试验优化复方江南卷柏散提取工艺

在预试验的基础上,选择影响提取工艺的3个因素:加水倍数(A)、提取时间(B,h)、提取次数(C),按L₉(3⁴)正交表进行试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(加水倍数)	B(提取时间),h	C(提取次数)	D(空白)
1	12	1	1	1
2	15	1.5	2	2
3	18	2	3	3

称取复方药材粗粉10 g,按L₉(3⁴)正交表的条件进行正交试验。将正交试验得到的提取液滤过后合并,分别测定Y II 含量(X)、落新妇苷含量(M)及浸膏得率(N),并进行多指标综合评分。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化后设定不同权重,X、M、N的权重系数分别设定为0.5、0.4、0.1,综合评分 $Y=0.5X/X_{max}+0.4M/M_{max}+0.1N/N_{max}$ (X_i、M_i、N_i分别为i试验号的相应结果,i=1,2,3...9;X_{max}、M_{max}、N_{max}分别为相应指标的最大值)。正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of test

试验号	A	B	C	D	Y II 含量,mg/g	落新妇苷含量,mg/g	浸膏得率,%	综合评分
1	1	1	1	1	0.311 6	0.745 1	17.727 4	0.717 7
2	1	2	2	2	0.324 4	0.910 4	21.355 5	0.799 5
3	1	3	3	3	0.314 1	1.175 5	24.553 3	0.878 5
4	2	1	2	3	0.369 9	1.196 2	21.283 3	0.946 8
5	2	2	3	1	0.327 5	1.224 9	23.534 6	0.907 3
6	2	3	1	2	0.266 3	0.713 5	18.521 5	0.650 2
7	3	1	3	2	0.354 4	1.328 7	23.464 0	0.974 6
8	3	2	1	3	0.296 9	0.833 8	19.648 6	0.732 4
9	3	3	2	1	0.303 2	1.221 6	22.731 1	0.870 2
K ₁	2.395 7	2.639 1	2.100 3	2.495 2				
K ₂	2.504 3	2.439 2	2.616 5	2.424 3				
K ₃	2.577 2	2.398 9	2.760 4	2.557 7				
\bar{K}_1	0.785 7	0.879 7	0.700 1	0.831 7				
\bar{K}_2	0.834 8	0.813 1	0.872 2	0.808 1				
\bar{K}_3	0.859 1	0.799 6	0.920 1	0.852 6				
R	0.181 5	0.240 2	0.600 1	0.133 4				

由表2可知,各因素的影响强度为C>B>A;由表3可知,A和B无显著影响(P>0.05),C具有显著影响(P<0.05)。考

考虑到节能,最终选择最优工艺为A₁B₁C₃,即加12倍水量提取3次,每次1 h。

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.556	2	0.278	1.881	0.347
B	1.105	2	0.553	3.741	0.211
C	8.030	2	4.015	27.182	0.035
D(误差)	0.295	2	0.148		

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

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

2.5 验证试验

称取复方药材粗粉200 g,共3份,按最优工艺条件提取,验证试验结果见表4。

表4 验证试验结果(n=3)

Tab 4 Results of validation test(n=3)

序号	药材量,g	Y II		落新妇苷		浸膏	
		含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%	得率,%	RSD,%
1	200.033 0	0.350 0		1.412 5		22.712 3	
2	200.010 3	0.355 1	1.207 4	1.422 5	1.459 8	23.014 5	1.660 3
3	200.006 1	0.346 7		1.383 0		23.472 9	
平均值		0.350 6		1.406 0		23.066 6	

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

江南卷柏、土茯苓、车前子中均含有较多黄酮类成分,文献[6-8]中对黄酮类成分的提取研究报道较多,多采用乙醇、甲醇等溶剂提取。本课题组通过前期试验比较发现,甲醇提取杂质少、提取完全,但毒性较大;乙醇提取虽无毒且完全,但杂质很多,特别是江南卷柏乙醇提取物中叶绿素含量很高,为后续提取液的纯化工作带来极大困难,且除杂工艺复杂。课题组前期试验证实,江南卷柏的水煎液对痛风性关节炎具有良好疗效,加之黄冈市中医医院的制剂即为水煎液,已有多年临床使用经验。因此,设计本提取工艺时选择水为溶剂。

3.2 因素与水平的选定依据

本研究正交试验前曾以不同加水量和提取时间对复方江南卷柏散水提取工艺进行了单因素考察,根据测定的Y II、落新妇苷的含量和浸膏得率3个指标,得最优的料液比为1:15,提取时间则对上述指标含量影响不显著。因此根据单因素考察结果以15倍水量为中心前后各取一个水平设计了因素水平表。根据正交试验结果,并结合生产实际,最后得到最优提取工艺为加12倍水量提取3次,每次1 h。验证试验结果表明,本研究确立的提取工艺稳定,提取物中有效成分Y II、落新妇苷的含量分别为0.350 6、1.406 0 mg/g(RSD分别为1.207 4%、1.459 8%,n=3),浸膏得率为23.066 6%(RSD=1.660 3%,

n=3)。

3.3 评价指标的选择与权重系数的判定依据

本试验中Y II是江南卷柏的主要水溶性成分之一,研究发现其在体内可代谢为芹菜素,后者具有抑制黄嘌呤氧化酶的作用。落新妇苷为2015年版《中国药典》(一部)^[9]中规定的土茯苓的指标性成分,同时也是土茯苓治疗高尿酸血症及痛风等疾病的活性成分。因此,检测落新妇苷和Y II的含量,能够为该复方的提取工艺优选提供依据。此外,浸膏得率亦可反映复方有效成分的总量,是复方提取工艺优化的评价指标之一^[10-11]。因此,本研究选择Y II、落新妇苷含量和浸膏得率为复方江南卷柏散的工艺评价指标。鉴于江南卷柏为该复方中的君药,故设定其代表成分Y II含量的权重系数为0.5;土茯苓为臣药,故设定其所含落新妇苷含量的权重系数为0.4;浸膏得率权重系数则为0.1。本课题组另设Y II、落新妇苷含量和浸膏得率的权重系数分别为0.4、0.4、0.2时,结果与本文结果一致。

参考文献

- [1] 江雪平,陈科力.江南卷柏中双黄酮类化合物的研究[J].中国药学杂志,2009,44(2):96.
- [2] 朱田密,陈科力,黎莉.江南卷柏中的黄酮碳苷类成分研究[J].中国药房,2012,23(7):622.
- [3] 黎莉,陈科力,朱田密,等.卷柏属7种药用植物的提取物抑制黄嘌呤氧化酶的活性研究[J].中药材,2007,30(4):445.
- [4] 邹辉,徐康平,谭桂山.卷柏属植物化学成分及药理活性研究进展[J].天然产物研究与开发,2012,24(11):1655.
- [5] 张白嘉,刘亚欧,刘榴,等.土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究[J].中药药理与临床,2004,20(1):11.
- [6] 殷丹,陈科力.正交试验优选江南卷柏总黄酮提取工艺[J].中国药房,2010,21(15):1368.
- [7] 陈文龙,陈燕芬,卢传坚.土茯苓总黄酮提取工艺的正交设计优化[J].时珍国医国药,2014,25(3):544.
- [8] 潘冬梅,李向荣.车前子总黄酮的超声辅助提取工艺优化[J].浙江中医杂志,2014,49(12):924.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:18.
- [10] 黄永亮,吴纯洁,何晓燕.中药提取工艺评价指标的研究进展[J].中药与临床,2012,3(5):49.
- [11] 陈纪鹏.中药复方提取工艺及制剂产业化的思路[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(2):59.

(收稿日期:2016-01-14 修回日期:2016-08-16)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅