

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00104

如意金黄散简化方3种有效成分的超声提取工艺优选

许孟雪^{1,2}, 张文静², 王卓^{1,2*}, 陈卫东^{1*}

1. 安徽中医学院药学院临床药学教研室, 合肥 230038

2. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

[摘要] **目的** 以小檗碱、厚朴酚和大黄素3种有效成分为指标, 考察和筛选适于如意金黄散简化方新制剂制备工艺和质量控制研究的提取工艺。**方法** 用HPLC法同时测定小檗碱、厚朴酚和大黄素, 采用ACE. 5C₁₈-AR色谱柱, 以甲醇-2%三乙胺(磷酸调pH 5.0)为流动相梯度洗脱, 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 双波长检测: $\lambda_1 = 294 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 345 \text{ nm}$; 进样量: 10 μL 。以3种成分的提取率为指标, 采用单因素试验和正交试验对其超声提取工艺进行优选。**结果** 小檗碱、厚朴酚及大黄的线性范围分别是: 0.292~292 mg/L ($r^2 = 0.9998$), 0.292~292 mg/L ($r^2 = 0.9997$), 0.256~256 mg/L ($r^2 = 0.9995$)。精密密度RSD($n=6$)分别为0.23%、0.17%、0.18%。供试品溶液12 h内稳定性良好。平均回收率分别为98.26% (RSD 2.53%, $n=6$)、105.17% (RSD 2.06%, $n=6$)、100.39% (RSD 2.60%, $n=6$)。单因素试验考察了超声时间和次数、乙醇用量和浓度、酸浓度等因素, 结果表明, 随着超声时间增加、超声次数增多和乙醇含量提高, 三组分的提取率均增加。**结论** 正交试验结果表明最佳提取工艺为: 95%乙醇(含1%盐酸)35 mL, 超声30 min, 提取3次。

[关键词] 小檗碱; 大黄素; 厚朴酚; 高压液相色谱法; 提取工艺**[中图分类号]** R 943**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0104-05

Optimization of extracting conditions for berberine, magnolol and emodin from simplified recipe of Ruyijinhuangsan

XU Meng-xue^{1,2}, ZHANG Wen-jing², WANG Zhuo^{1,2*}, CHEN Wei-dong^{1*}

1. Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui, China

2. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for simultaneous determination of berberine, magnolol and emodin in the blend powder of *Cortex Phellodendri Chinensis*, *Cortex Magnoliae Officinalis* and *Radix et Rhizoma Rhei*, so as to provide evidence for preparation technique and quality control of simplified recipe of Ruyijinhuangsan. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) was used for simultaneous determination of berberine, magnolol and emodin at the following conditions; the column was ACE. 5C₁₈-AR, mobile phase was A; triethylamine, B; methanol. The flow rate was 1.0 mL/min, the temperature of column was 30℃, the detection wavelengths were set at 294 nm and 345 nm, and the injection volume was 10 μL . Using the yield ratio of three constituents as the assessment indices, we optimized the extraction technology by single factor test and orthogonal test L₉ (3⁴). **Results** The calibration curves were linear within the range of 0.292-292 mg/L for berberine ($r^2 = 0.9998$), 0.292-292 mg/L for magnolol ($r^2 = 0.9997$), and 0.256-256 mg/L for emodin ($r^2 = 0.9995$), with the average recovery rates being 98.26% (RSD 2.53%, $n=6$), 105.17% (RSD 2.06%, $n=6$), and 100.39% (RSD 2.60%, $n=6$), respectively. The results of precisions were ($n=6$) 0.23%, 0.17%, 0.18%, respectively. The sample solutions were stable within 12 h. The single factor experiment analyzed ultrasonic duration and times, concentration of alcohol, the amount of solvent and the concentration of HCl. The results showed that, with the increase of ultrasonic duration, times and the alcohol concentration, the yield ratio of the three constituents was increased. **Conclusion** The optimum options for extracting is as follows: ultrasonic extraction 3 times by 95% alcohol containing 0.1% HCl, with the volume at 35 mL, 30 min each time.

[收稿日期] 2012-10-18**[接受日期]** 2012-12-14**[基金项目]** 国家自然科学基金(30973593), 上海市卫生局中医药科研基金(2010Y003A)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30973593) and Research Foundation for Traditional Chinese Herbs of Shanghai Health Bureau (2010Y003A)。**[作者简介]** 许孟雪, 硕士生。E-mail: xumengxue28@163.com

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-31162299, E-mail: wangzhuo088@yahoo.cn; Tel: 0551-5136810, E-mail: anzhongdong@126.com

[Key words] berberine; emodin; magnolol; high pressure liquid chromatography; extraction technica

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 104-108]

小檗碱、厚朴酚和大黄素均具有抑制 E-selectin (CD62E)等黏附分子表达的功能^[1-3],本课题组前期研究发现 E-selectin 是药物性静脉炎发病机制中的关键因素^[4],并依此筛选简化了临床上处理药物性静脉炎的经典处方如意金黄散^[5],制备成以黄柏、厚朴和大黄为主要成分的金黄散简化方水凝胶剂及水凝胶贴剂,其疗效不低于经典处方,且可克服原有剂型使用不便的缺点,简便易行地对静脉炎进行预防,减少这种药源性疾病的发生。为进一步优化上述新剂型的制备工艺,本实验以上述3种有效成分为评价指标,应用正交试验对混合生药(黄柏、厚朴和大黄)中小檗碱、厚朴酚和大黄素的超声提取工艺^[6-8]做筛选,探讨最佳超声提取工艺,为制备工艺筛选及制剂质量控制提供实验依据。近年来,如意金黄散的成分分析最常用高效液相色谱法^[9],本实验在考察中利用 LC-20AD 型高效液相色谱仪双通道功能特点,建立了小檗碱、厚朴酚和大黄素3种组分同时测定的 HPLC 方法,此方法简便易行,结果准确,重现性好。

1 仪器和试剂

DL-720A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津),LC-solution 色谱工作站,紫外检测器;JA1003 电子天平(千分之一,上海精科天美贸易有限公司);AG285 电子天平(十万分之一,METTLER TOLEDO);pHS-3TC 精密酸度计(上海天达仪器有限公司)。

小檗碱、厚朴酚和大黄素对照品(批号:110713-200911、110729-200412 和 110756-200110,均购自中国食品药品检定研究院);黄柏和厚朴生药(批号:11071025、11071023,均购自上海蔡同德堂中药饮片有限公司);大黄生药(批号:HY2009030418,购自上海华鹰药业有限公司)。甲醇(国产色谱纯),水(超纯水),其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 混合提取液制备 按如意金黄散简化方比例^[5],分别精密称取黄柏、厚朴和大黄粉末各9份,每份黄柏2.5g、厚朴1.0g 和大黄2.5g,加提取液浸泡12h后,按正交试验表安排的因素和水平进行

超声提取,提取液过滤,制得混合提取液。

2.2 色谱条件 色谱柱:ACE. 5C₁₈-AR 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相:甲醇(B)-2%三乙胺水溶液(磷酸调 pH 5.0),梯度洗脱(0~5 min, 50% B→75% B;5~15 min, 75% B;15~23 min, 75% B→80% B;23~30 min, 50% B),流速:1 mL/min;双波长检测:λ₁=294 nm,λ₂=345 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.3 溶液制备 对照品溶液制备:精密称取小檗碱、厚朴酚和大黄素标准品适量,加甲醇制成小檗碱 2.92 mg/mL、厚朴酚 1.46 mg/mL 和大黄素 512 μg/mL 的储备液。再取各标准液置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成每 1 mL 含小檗碱 292 μg、厚朴酚 292 μg 和大黄素 256 μg 的混合溶液,即得。

供试品溶液制备:取混合提取液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察 专属性实验:精密称取对照品溶液、供试品溶液及纯甲醇溶液,在 2.2 项色谱条件下进样,得色谱图 1。

标准曲线制备:分别精密吸取混合对照品溶液 0.005、0.05、0.5、1.25、2.5、5.0 mL,分别置 5 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按 2.2 项色谱条件进样测定,以峰面积(Y)对浓度(C)作线性回归,小檗碱、厚朴酚及大黄素的峰面积回归方程分别为:Y=2.30×10⁵C-0.319(r²=0.9998),Y=5.92×10⁵C-0.867(r²=0.9997),Y=2.27×10⁵C-1.027(r²=0.9995),线性范围分别为 0.292~292、0.292~292 和 0.256~256 mg/L。

精密度试验:精密量取混合对照品溶液,连续进样 6 次,小檗碱、厚朴酚及大黄素的峰面积 RSD(n=6)分别为 0.23%、0.17% 和 0.18%。

稳定性试验:精密量取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 时测定。小檗碱、厚朴酚及大黄素的峰面积 RSD(n=6)分别为 1.83%、1.87% 和 2.16%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

重复性试验:分别精密称取黄柏、厚朴及大黄粉末各 6 份,每份黄柏 2.5 g、厚朴 1.0 g 和大黄 2.5 g。按正交试验所得的最佳工艺制备提取液,提取液按

2.3 项制备供试品溶液,在 2.2 项色谱条件下进样,小檗碱、厚朴酚及大黄的峰面积 RSD($n=6$)分别为 3.80%、2.63%和 2.43%。

加样回收试验:取已知含量的样品粉末 6.0 g

(按处方比例)6 份,分别精密加入对照品溶液适量,依法测定并计算回收率。得小檗碱、厚朴酚和大黄素平均回收率为 98.26%、105.17%和 100.39%,其 RSD($n=6$)分别为 2.53%、2.06%和 2.60%。

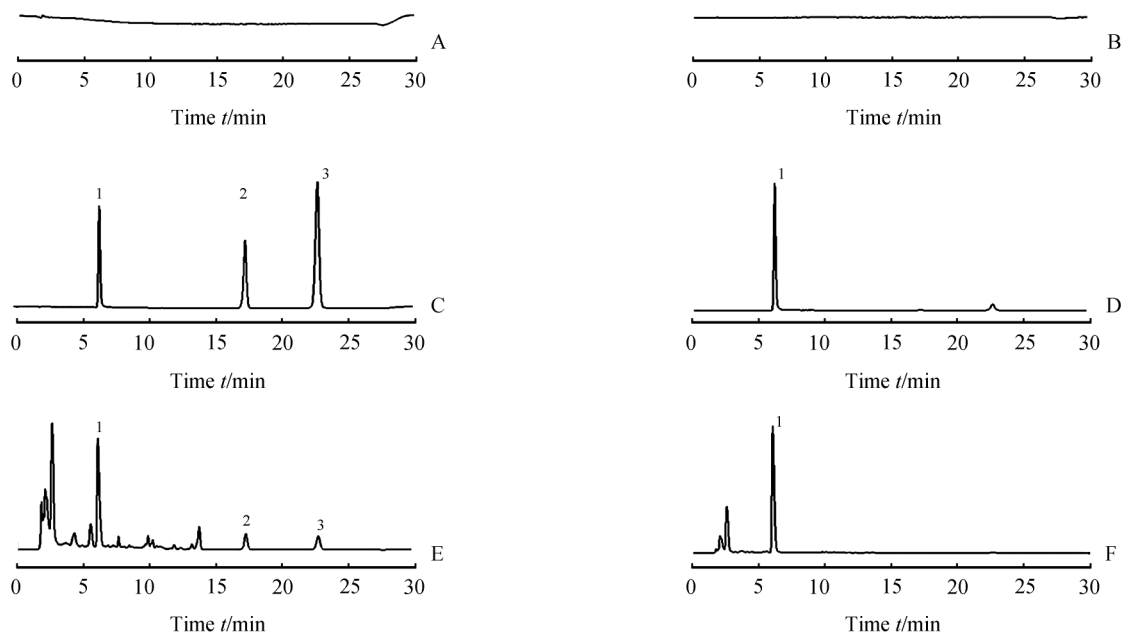


图 1 两种检测波长下各样品的色谱图

A,B: 甲醇; C,D: 混合标准品溶液; E,F: 供试品溶液; A,C,E: 294 nm 检测; B,D,F: 345 nm 检测. 1: 小檗碱 t_R : 6.2 min; 2: 厚朴酚 t_R : 17.2 min; 3: 大黄素 t_R : 22.8 min

2.5 提取工艺研究

2.5.1 单因素考察 每份混合粉末称取黄柏 2.5 g、厚朴 1.0 g 和大黄 2.5 g,进行超声时间(0.5、1、1.5 h)、超声次数(1 次、2 次、3 次)、乙醇用量(25、35、50、75、100 mL)、乙醇浓度(95%、85%、75%、65%、55%)和酸浓度(1%、2%、3%、4%、5%)考察。

实验结果表明,随着超声时间增加、超声次数增多和乙醇含量提高,小檗碱、大黄素、厚朴酚的提取率增加,加酸后小檗碱、大黄素、厚朴酚提取率明显提高,随着酸度增加其提取率变化不大。因此,最终选定 95%乙醇(含 1%盐酸)用量、超声时间及超声次数为其主要影响因素进行正交试验考察。

2.5.2 正交试验设计 在单因素试验基础上,以小檗碱、大黄素、厚朴酚的提取率为指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,各因素水平见表 1,正交试验结果见表 2,方差分析结果见表 3~5。

由表 2~5 可以得出,各因素对厚朴酚提取的重要性为 $A > C > B$,最优方案为 $A_2B_1C_2$ 或 $A_2B_1C_3$;对小檗碱提取的重要性为 $C > A > B$,最优方案为 A_2B_2

C_3 ;对大黄素提取的重要性为 $A > C > B$,最优方案为 $A_1B_1C_2$ 、 $A_1B_1C_3$ 、 $A_2B_1C_2$ 、 $A_2B_1C_3$ 。经极差分析和方差分析后,A 因素对于厚朴酚影响较大,厚朴酚在 A_2 条件下提取率较高;C 因素对于小檗碱的影响较大,小檗碱在 C_3 条件下提取率较高;而在 B_1 条件下,厚朴酚和大黄素的提取率较高。综上得出最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3$,即加 95%乙醇 35 mL,超声 30 min,提取 3 次。

表 1 正交试验因素水平表

水平	95%乙醇用量 V/mL	超声时间 t/min	超声次数 C
	A		
1	25,15,15	30	1
2	35,25,25	45	2
3	45,30,30	60	3

2.5.3 验证实验 为确定提取工艺的优劣及稳定性,按优选的提取工艺对同一批药材粉末进行 6 次提取实验。结果提取物中小檗碱、厚朴酚和大黄素的平均提取率分别为 5.51%、1.56%和 0.26%,其 RSD($n=6$)分别为 3.80%、2.63%和 2.43%。

表 2 正交试验结果

试验号	因素				提取率(%)		
	A	B	C	D(空白)	厚朴酚	小檗碱	大黄素
1	1	1	1	1	1.63	3.65	0.25
2	1	2	2	2	1.59	5.05	0.27
3	1	3	3	3	1.67	6.33	0.29
4	2	1	2	3	1.76	5.77	0.30
5	2	2	3	1	1.68	6.38	0.27
6	2	3	1	2	1.48	4.50	0.25
7	3	1	3	2	1.51	6.13	0.25
8	3	2	1	3	1.38	4.92	0.23
9	3	3	2	1	1.52	5.58	0.24
厚朴酚							
k1	1.63	1.63	1.5	1.61			
k2	1.64	1.55	1.62	1.53			
k3	1.47	1.56	1.62	1.60			
R	0.17	0.08	0.12	0.08			
小檗碱							
k1	5.01	5.18	4.36	5.20			
k2	5.55	5.45	5.47	5.23			
k3	5.54	5.47	6.28	5.67			
R	0.54	0.29	1.92	0.47			
大黄素							
k1	0.27	0.27	0.24	0.25			
k2	0.27	0.26	0.27	0.26			
k3	0.24	0.26	0.27	0.27			
R	0.03	0.01	0.03	0.02			

表 3 厚朴酚提取率的方差分析

厚朴酚	方差	自由度	F 值	P 值
A	0.027 3	2	4.789 5	<0.25
B	0.006 5	2	1.140 4	>0.25
C	0.015 7	2	2.754 4	>0.25
误差	0.005 7	2		

$$F_{\alpha=0.25}(2,2)=3.0$$

表 4 小檗碱提取率的方差分析

小檗碱	方差	自由度	F 值	P 值
A	0.288 2	2	1.869 0	>0.25
B	0.077 0	2	0.499 4	>0.25
C	2.796 6	2	18.136 1	<0.1
误差	0.154 2	2		

$$F_{\alpha=0.25}(2,2)=3.0, F_{\alpha=0.1}(2,2)=9.0$$

表 5 大黄素提取率的方差分析

大黄素	方差	自由度	F 值	P 值
A	0.001 1	2	3.666 7	<0.25
B	0.000 1	2	0.333 3	>0.25
C	0.000 8	2	2.666 7	>0.25
误差	0.000 3	2		

$$F_{\alpha=0.25}(2,2)=3.0$$

3 讨论

3.1 3 种有效成分的选定 药物性静脉炎是临床十分常见的药源性疾病之一,且特异性治疗手段有限。本课题组研究发现,抑制黏附分子 E-selectin 是干预该反应的重要药理机制,且已验证临床防治较有效的经典成方如意金黄散同样具有该作用^[4]。为克服该方用药体积大、剂型使用不够便利的不足,本课题组依据药理机制对该方进行了拆方分析和处方简化,试制了药味更加简明、临床使用更加方便的新剂型^[5]。中药药味众多、有效成分复杂,依据药理基础选择用于工艺筛选和质量控制的有效成分更加具有针对性。本研究选择的 3 种有效成分均对 E-selectin 具有抑制作用,与新制剂的疗效质量更加相关。

3.2 提取工艺研究 超声提取具有操作简便、对有效成分破坏性较小、提取率稳定等优点^[10]。本研究拟优化的提取工艺并非用于制备,而是用于工艺考察和质量控制,故以提取的简便性和稳定性为主要标准,首选超声提取法。由于有效成分各自理化性

质不同,提取工艺应尽可能兼顾3种有效成分的提取率。在正交试验考察最佳提取条件时,由于3种有效成分中大黄素的提取率最低,故决策时以大黄素的提取率作为主要指标,兼顾其他2种有效成分。所筛选出的提取工艺提取率高、重现性好,操作简便可行。

3.3 流动相的选定 中药成分较复杂,三组分同时测定时需要优化选择流动相。本实验流动相选用水相 pH<4 时,大黄素出峰时间虽提前,但小檗碱拖尾严重,厚朴酚与杂质峰难以分离;若 pH>7 时厚朴酚与大黄素出峰时间延迟,大黄素保留时间大于 40 min,且高 pH 对色谱柱有损害。最后选取甲醇-2%三乙胺水溶液(磷酸调 pH 5.0)缓冲体系,并设计梯度洗脱程序,使色谱分离度较好,达到基线分离,峰形尖锐,分析速度较快。

3.4 双波长的选择 由于中药成分复杂,杂质干扰较多,故未选择通用波长 254 nm。通过文献^[11-12]阅读和紫外扫描,确定小檗碱在 345 nm 处有最大吸收,大黄素和厚朴酚在 294 nm 处有最大吸收,小檗碱在 294 nm 处虽具有较高吸收,但与待测成分中杂质分离度小于 1.5。因而本实验选用 345 nm 作为小檗碱检测波长,294 nm 作为大黄素和厚朴酚检测波长,利用双波长双通道测定,实现了单次进样、多组分同时定量分析的目的。

本研究建立的 HPLC 双波长检测方法同时测定了如意金黄散简化方中 3 种针对输液性静脉炎防治的有效成分,并优化了 3 种成分经超声法同时提取的工艺,为后续探索新型制剂的处方工艺和质量控制提供了实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Hu Y, Chen X, Duan H, Hu Y, Mu X. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB₂ in LPS-induced rat intestinal micro-

vascular endothelial cells[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009, 31: 550-555.

- [2] Kumar A, Dhawan S, Aggarwal B B. Emodin (3-methyl-1, 6, 8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells [J]. Oncogene, 1998, 17: 913-918.
- [3] Chen Y H, Lin S J, Chen Y L, Liu P L, Chen J W. Anti-inflammatory effects of different drugs/agents with antioxidant property on endothelial expression of adhesion molecules [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006, 6: 279-304.
- [4] 王卓. E-选择素在长春瑞滨致输液性静脉炎中的作用机制及药物调控研究[D]. 第二军医大学博士学位论文, 2006.
- [5] 马丽娟, 周佳, 牟金金, 王学彬, 辛海量, 张莹, 等. 如意金黄散对长春瑞滨所致静脉炎的防治作用及其处方优化和剂型选择[J]. 药学服务与研究, 2011, 11: 417-420.
- [6] 邹时英, 谭文渊, 李富兰, 左惠, 付大友. 超声波-微波协同萃取虎杖中大黄素[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2011, 24: 509-511.
- [7] 刘晓鹏, 姜宁, 周大寨, 向东山, 张驰, 唐巧玉. 超声法提取厚朴中厚朴酚及和厚朴酚的研究[J]. 中药材, 2007, 30: 237-239.
- [8] 白靖文, 叶非. 超声辅助提取功劳木中盐酸小檗碱工艺研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32: 245-250.
- [9] 杨以平, 张师愚. HPLC 法同时测定如意金黄散中大黄素、姜黄素、小檗碱的含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14: 213-214.
- [10] 黄可龙, 李进飞, 刘素琴. 超声场强化中药有效成分提取动力学模型[J]. 化工学报, 2004, 55: 646-648.
- [11] 夏玉凤, 杨勤, 王强. HPLC 测定王氏保赤丸中大黄素和盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药, 2004, 26: 198-201.
- [12] 胡晓静, 高铁哲, 李飞, 赵春杰. HPLC 法测定小承气汤中大黄酸和厚朴酚的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24: 26-28.

[本文编辑] 尹茶