

均匀设计法优选新促孕液半仿生提取工艺条件

周淑贞, 王德云, 张宝康, 刘家国, 胡元亮*

(南京农业大学中兽医学研究室, 江苏 南京 210095)

表1 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计Table 1 $U_9(9^1 \times 3^3)$ Uniform design

试验号	A	B	C	D/h
1	2.00	7.00	9.00	3.50
2	4.00	6.50	9.00	7.00
3	2.50	6.50	8.00	5.25
4	3.00	7.50	8.50	7.00
5	5.50	7.00	8.00	7.00
6	3.50	7.00	8.00	3.50
7	4.50	7.50	9.00	5.25
8	5.00	7.50	8.50	5.25
9	6.00	6.50	8.50	3.50

新促孕液(新型中药促孕灌注液, new type of fertility-promoting intrauterine infusion liquid, NFPL)是用于防治母畜子宫内膜炎、卵巢静止和持久黄体性不孕症的中兽药。该药由淫羊藿、红花、益母草、黄柏等按水提醇沉法制备而成,已在畜牧生产中推广应用^[1~3]。半仿生提取法(semi-bionic extraction method, SBE)为近年来出现的中药提取新技术,可以提取和保留中药中更多的有效成分^[4]。本实验以淫羊藿苷、小檗碱、总生物碱、干浸膏质量为指标,采用均匀设计法优选了NFPL的SBE提取条件,旨在为进一步提高NFPL中有效成分和疗效提供理论依据。

1 仪器与试剂

Waters 600E 高效液相色谱仪, PHS-3C 型精密pH计(上海雷磁仪器厂), 722型可见分光光度计(上海分析仪器总厂), FA1104N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), KQ5200型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

淫羊藿苷、盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所), 甲醇、乙腈(色谱纯), 三蒸水(自制), 其余试剂均为AR级试剂。

2 方法与结果

2.1 试验设计: 在药材粒度、煎煮方法、煎提温度、煎提用水量、滤过相同的条件下, 确定考察因素和水平。分别为第1煎水pH值(A)、第2煎水pH值(B)、第3煎水pH值(C)和煎煮总计时间(D), 其中3次煎煮时间的比例为1.5:1:1。选用 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计拟水平表安排试验, 具体方案见表1。

2.2 提取液的制备: 将处方药材分别粉碎, 按处方比例淫羊藿、益母草、黄柏、红花的质量比为2.5:2.5:3:1称取药材粗粉9g, 加热回流提取3次(加水量依次为药材量的10、8、8倍, 第1煎水pH值用1mol/L HCl调至规定值, 第2、第3煎水的pH值用0.1mol/L NaOH调至规定值), 提取液滤过,

2 000 r/min离心20 min, 合并上清液, 水浴浓缩至100 mL, 得1~9号提取液。

2.3 供试品溶液的制备: 取1~9号提取液各1 mL置水浴上蒸干, 用适量甲醇超声处理3次, 每次10 min, 最后用甲醇定容至10 mL, 得供试品溶液 $A_1 \sim A_9$ 。

取1~9号提取液各3 mL, 用5 mL 盐酸-甲醇(1:100)溶液超声处理30 min, 滤过, 最后用甲醇定容至10 mL, 得供试品溶液 $B_1 \sim B_9$ 。

2.4 淫羊藿苷的HPLC测定

2.4.1 色谱分析条件: 色谱柱 Kromsil C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水(60:40); 柱温: 室温; 检测波长: 270 nm; 灵敏度: 0.16 AUFS; 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 20 μ L。

2.4.2 线性关系考察: 精密吸取0.2 mg/mL淫羊藿苷对照品溶液0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 加甲醇分别定容至10 mL, 各取20 μ L进样, 测定其峰面积。结果淫羊藿苷在0.1~1.6 μ g时质量与峰面积呈良好线性关系, 回归方程为 $Y = 1\,900\,585 X + 2\,837$, $r = 0.999\,8$ 。

2.4.3 精密度试验: 取同一0.04 mg/mL淫羊藿苷对照品溶液20 μ L, 连续重复进样5次。结果峰面积的RSD为0.79%。

2.4.4 稳定性试验: 取供试品溶液 A_6 20 μ L, 每隔1.5 h测定1次淫羊藿苷峰面积, 连续测定6次。结

收稿日期: 2006-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371057); 科技部农业科技成果转化资金项目(05EFN213200106)

作者简介: 周淑贞(1980—), 女, 广东佛山人, 硕士研究生, 主要从事中药成分分析。Tel: (025)84395203

* 通讯作者 胡元亮 E-mail: yihu@njau.edu.cn

果峰面积的 RSD 为 1.83%。

2.4.5 重现性试验:取 4 号提取液 1 mL(5 份),按供试品溶液 A 的制备方法制备,各取 20 μ L 分别进样,测定淫羊藿苷的峰面积,结果峰面积的 RSD 为 1.25%。

2.4.6 加样回收率试验:取 6 号提取液 1 mL(5 份,含淫羊藿苷 0.721 mg),分别加入 2 mg/mL 淫羊藿苷对照品溶液 0.2 mL,按供试品溶液 A 的制备方法处理,测定,结果平均回收率为 101.20%,RSD 为 1.95%。

2.4.7 样品测定:取供试液 A₁~A₉,用微孔滤膜滤过,取滤液各 20 μ L 进样,结果见表 2。

2.5 小檗碱的 HPLC 测定

2.5.1 色谱分析条件:色谱柱 Kromsil(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.1%磷酸(40:60);体积流量:1 mL/min;检测波长:346 nm;柱温:室温;灵敏度:0.08 AUFS;进样量:20 μ L。

2.5.2 线性关系考察:吸取 0.1 mg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 mL,加甲醇分别定容至 10 mL,各取 20 μ L 进样,测定峰面积。结果盐酸小檗碱在 0.05~0.8 μ g 时其质量与峰面积呈良好的线性关系,回归方程 $Y=2\,462\,113\,X-467$, $r=0.999\,6$ 。

2.5.3 精密度试验:取 0.02 mg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液 20 μ L,连续进样 5 次。结果峰面积的 RSD 为 0.35%。

2.5.4 稳定性试验:取供试品溶液 B₁,每隔 1.5 h 测定一次盐酸小檗碱峰面积,连续测定 6 次。结果峰面积的 RSD 为 0.96%。

2.5.5 重现性试验:取 8 号提取液 3 mL(5 份),按供试品溶液 B 的制备方法制备,各取 20 μ L 分别进样,测定盐酸小檗碱峰面积,结果峰面积的 RSD 为 0.94%。

2.5.6 加样回收率试验:取 1 号提取液 3 mL(5 份,含盐酸小檗碱 0.189 mg),分别加入 0.1mg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液 0.2 mL,按供试品溶液 B 的制备方法制备并测定。结果平均回收率为 100.60%,RSD 为 1.84%。

2.5.7 样品测定:取供试液 B₁~B₉,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取滤液各 20 μ L 进样测定。结果见表 2。

2.6 总生物碱的测定

2.6.1 标准曲线的制备:精取盐酸小檗碱对照品 1.5 mg,用 pH 7.0 缓冲溶液定容至 10 mL,取盐酸小檗碱对照液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 分别置具塞三角瓶中,均用 pH 7.0 缓冲溶液稀释至 2.0 mL,加入 0.007% 溴麝香草酚兰 8.0 mL,摇匀后加入氯仿 10.0 mL,盖好瓶塞,充分振摇 2 min,移入分液漏斗中,静置分层,分取氯仿层,用干燥滤纸滤过,滤液以相应的试剂为空白,在 420 nm 处测定吸光度^[5]。以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=305\,X+69.1$, $r=0.999\,6$ 。

2.6.2 样品测定:取 1~9 号提取液 1.0 mL,置具塞三角瓶中,水浴蒸干,残渣中加入 pH 7.0 缓冲液 2.0 mL 使其溶解,按标准曲线的方法进行测定。总生物碱以盐酸小檗碱计算,结果见表 2。

2.7 干浸膏的测定:取 1~9 号提取液 5 mL,置恒重的称量瓶中于水浴上蒸干,105 $^{\circ}$ C 烘至恒重(3 h 以上)^[6],计算干浸膏的得出率。结果见表 2。

表 2 9 种提取液中各指标成分的比较($n=3$)

Table 2 Comparison of each marker constituents in nine kinds of extract solutions ($n=3$)

提取液	淫羊藿苷		小檗碱		总生物碱		干浸膏		综合评价指标
	质量分数/%	RSD/%	质量分数/%	RSD/%	质量分数/%	RSD/%	质量分数/%	RSD/%	
1	9.526	1.80	1.444	0.96	3.422	2.30	13.74	0.13	37.110 8
2	6.894	0.26	1.656	1.27	2.400	1.60	13.82	0.23	0.162 1
3	5.393	0.27	1.878	1.04	2.911	1.64	13.47	0.59	-15.415 1
4	6.701	0.77	2.100	0.96	2.744	2.14	13.73	0.69	-16.599 3
5	7.613	1.52	1.678	2.01	3.500	1.43	14.91	0.53	14.274 7
6	8.008	1.83	1.756	1.82	2.733	2.04	14.00	0.91	6.610 5
7	6.688	1.23	1.800	0.53	2.678	1.75	13.47	1.07	-3.500 7
8	7.720	0.98	1.611	0.75	2.700	2.57	13.82	0.42	-2.874 7
9	5.661	0.50	1.656	1.30	2.622	1.00	12.96	0.98	-19.773 6

2.8 条件的优化:将淫羊藿苷、小檗碱和总生物碱的质量分数和干浸膏质量数据,按公式 $x'_{i,j}=(x_{i,j}-\bar{x}_j)/s_j$ (式中 $x_{i,j}$ 为供试品溶液 i 中 4 个成分 j 的相应数值, $\bar{x}_j$ 为 9 种供试品溶液成分 j 的平均值,

s_j 为成分 j 的标准偏差, $x'_{i,j}$ 为标准化后的值)进行标准化处理,分别将 $x'_{i,j}$ 加权后求和,即得综合评价指标 Y 值,其关系式 $Y=(\text{淫羊藿苷}+\text{小檗碱})\times 8+\text{总生物碱}\times 4+\text{干浸膏}\times 3$ 。将表 2 中 Y 值用 SPSS

软件经二项式回归统计处理,得出回归方程 $Y = 1.82 X_1^2 + 2.731 X_4^2 - 5.124 X_1 X_3 + 5.534 X_1 X_4 - 8.529 X_2 X_4 + 0.722 X_3 X_4 + 53.549 X_2 + 20.802 X_3 - 325.987$, $r = 0.9997$ 。优化条件为: $X_1 = 2.01$, $X_2 = 7.49$, $X_3 = 8.96$, $X_4 = 3.53$; 即第1、2、3煎水的pH值分别为2.01、7.49、8.96,3次煎煮总时间为3.53 h。预测值Y为48.95。

2.9 优化条件的验证:按照优化所得工艺条件,制备3批样品,分别测定各指标成分。淫羊藿苷为9.824%,RSD为1.21%;小檗碱为2.154%,RSD为1.57%;总生物碱为3.463%,RSD为0.83%;干浸膏为13.79%,RSD为0.65%; $Y = 46.28$,接近预测值。

结合实际生产,进一步确定其工艺条件为:第1煎用水以HCl调至pH 2.0,第2、3煎用水以NaOH分别调至pH 7.5、9.0,煎煮时间依次为1.51、1.01、1.01 h。优选所得的条件为NFPL再进一步的半仿生提取研究提供了基础。

3 讨论

HPLC测定小檗碱在本实验中曾选用3种流动相,分别是甲醇-乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钠(20:30:55,检测波长346 nm)^[7]、乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾(68:32,检测波长265 nm)^[8]和乙腈-0.1%磷酸(40:60,检测波长346 nm)。这3种流动相都能使对照品溶液出峰,但第1种流动相无法把样品中目的成分峰与其他杂质峰分开,第2种流动相则无小檗碱成分峰出现,只有第3种流动相能较好的把样品中的成分峰与杂质峰分开,而且分离完全,前后无干扰,出峰时间与对照品一致。比较了乙腈-0.1%磷酸3个不同配比的影响,结果乙腈-

0.1%磷酸(30:70)时样品不出峰,乙腈-0.1%磷酸(36:64)可以把成分峰分离完全,但出峰时间较长(14 min),乙腈-0.1%磷酸(40:60)时出峰时间提前(10 min),同时并不影响成分峰的分离效果。小檗碱在盐酸和热水中溶解度较大,曾直接用甲醇超声提取药液中的小檗碱,在相同的色谱条件下HPLC图谱中无成分峰出现。改用盐酸-甲醇(1:100)25℃超声处理30 min,即出现了小檗碱的成分峰。

References:

- [1] Hu Y L, Xu K W, Xu F Y, et al. Therapeutic evaluation of new fertility-promoting intrauterine infusion liquid for endometritis and inactive ovaries and persistent corpus luteum in dairy cattle [J]. *Anim Husb Vet Med* (畜牧与兽医), 1999, 31(3):6-8.
- [2] Hu Y L, Zhang B K, Liu J G, et al. Therapeutic and fertility-promoting effect of new fertility-promoting intrauterine infusion liquid for endometritis in sows [J]. *J Tradit Chin Vet Med* (中兽医杂志), 1999, 2(95):3-5.
- [3] Zhang B K, Hu Y L, Liu J G, et al. A study on quality control method of NFPL [J]. *Chin J Vet Drug* (中国兽药杂志), 2000, 34(1):17-19.
- [4] Zhang Z W, Sun X M. SBE—a new approach to the study on extraction of active components of Chinese herbal compound [J]. *World Sci Tech: Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术:中药现代化), 2000, 2(4):53-56.
- [5] Zhang X L, Zhang Z W, Liu C Q, et al. Technical condition of semi-biotic extraction in optimizing formula of Jiaotai Pill through homogenous design [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(8):575-578.
- [6] Zhang X L, Zhang Z W, Xu X, et al. Comparison of SBE and WE in extraction of chemical constituents from processed *Cortex phellodendri* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(10):600-602.
- [7] Li B M, He L Y. Determination of berberine hydrochloride in Zhimei Miedi Capsules by RP-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(6):128-129.
- [8] Wei N, Tan J. Determination of hydrochloric berberine in Zhichuangling Tincture by RP-HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(9):A9-A10.

毛细管气相色谱法测定莪术油微纳囊中莪术醇

袁慧慧¹, 何正有², 戚冯展², 沈平嫖⁴, 刘志远⁴, 蓝闽波^{1,2,3}

(1. 华东理工大学材料科学与工程学院 超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237; 2. 华东理工大学分析与测试中心, 上海 200237; 3. 华东理工大学 结构可控先进功能材料及其制备教育部重点实验室, 上海 200237; 4. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

莪术油是姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Valetton、温郁金 *C. wenyujin* Y. H.

收稿日期: 2006-09-16

基金项目: 国家科技攻关项目 (2003BA310A14); 上海市纳米专项 (0352nm121)

作者简介: 袁慧慧 (1973—), 女, 上海市人, 讲师, 华东理工大学材料学院在职博士, 从事药物新剂型、中草药分离及活性成分的研究。
Tel: (021) 64252055 E-mail: yuanhuihui@ecust.edu.cn