

及筋骨草临床用药的疗效及毒理研究等提供相应的理论依据。

REFERENCES

- [1] KONOSHIMA T, TAKASAKI M, TOKUDA H. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens* [J]. Cancer Letters, 2000, 157(1): 87-92.
- [2] CHEN F, LI X D, WU F H. *Ajuga decumbens* Thunb and its dose-effect relation [J]. J Fujian Univ Tradit Chin Med(福建中医药大学), 2009, 19(6): 27-29.
- [3] GUO X D, HUANG Z Y, BAO Y D, et al. Chemical constituents of *Ajuga decumbens* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2005, 36(5): 646-647.
- [4] WANG J Y, TONG Y, WANG Z M, et al. Simultaneous determination of harpagide and 8-O-acetylharpagide in *Ajugae decumbens* Thunb. by RP-HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Formula(中国实验方剂学杂志), 2009, 15(11): 26-28.
- [5] SHIMOMURA H, SASHIDA Y, OGAWA K. Iridoid

- glucosides and phenylpropanoid glycosides in *Ajuga* species of Japan [J]. Phytochemistry, 1987, 26(7): 1981-1983.
- [6] WANG J Y, SUN X Y, TONG Y, et al. Determination of total iridoid glycoside in *Ajuga decumbens* by spectrophotometry [J]. Chin J Exp Tradit Med Formula(中国实验方剂学杂志), 2009, 15(8): 3-5.
- [7] CHU M Q, LIU G J. Kinetic model for extraction process of chinese traditional medicine [J]. Acta Pharm Sinica(药学报), 2002, 37(7): 559-562.
- [8] ZHAO P, SONG X J, ZHANG Y P. Extraction kinetics of grape seed procyanidins [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(1): 110-112.
- [9] PEI C, CAI Y, SONG J, et al. Determination of iridoid glycoside in *Gardenia jasminoides* from 10 Batches [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2009, 26(5): 412-414.
- [10] KAJIHARA M. Relationship between temperature dependence of interdiffusion and kinetics of reactive diffusion in a hypothetical binary system [J]. Mater Sci Eng A, 2005, 403: 234-240.

收稿日期: 2011-12-20

类风关巴布剂中雷公藤甲素的提取方法研究

杨道纳(苍南县人民医院, 浙江 苍南 325800)

摘要: 目的 研究并优化类风关巴布剂中雷公藤甲素的提取方法, 并测定其含量。方法 HPLC 测定类风关巴布剂中的雷公藤甲素含量, 采用正交试验设计法考察甲醇浓度、甲醇体积、浸渍时间、提取时间对雷公藤甲素提取率的影响。结果 最佳提取条件为用 100 mL 的 60% 甲醇, 浸渍 4 h, 加热回流 2 h 提取效率最高。结论 本方法为类风关巴布剂的质量控制提供了可靠的方法。

关键词: 类风关巴布剂; 正交试验; 雷公藤甲素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)09-0811-03

Study on the Optimized Extraction Technology of Triptolide in Rheumatoid-arthritis Cataplasms

YANG Daona(Cangnan People's Hospital of Zhejiang Province, Cangnan 325800, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study and optimize the extraction method of triptolide in rheumatoid-arthritis cataplasms. **METHODS** With the quantitative determination of triptolide in rheumatoid-arthritis cataplasms by HPLC method, orthogonal test was used to evaluate the extraction, factors including the methanol concentration, methanol volume, soaking time, extraction time. **RESULTS** The optimal condition was using 100 mL of 60% methanol, with soaking time of 4 h and refluxing time of 2 h. **CONCLUSION** The optimized method is reliable for the quality control of cataplasms. **KEY WORDS:** rheumatoid-arthritis cataplasms; orthogonal test; triptolide; HPLC

类风关巴布剂是温州医学院附属第一医院“穴位贴敷治疗类风湿关节炎研究”课题组研制的治疗类风湿关节炎的外用制剂, 由涂膜剂改良而成, 具有吸收理想、不良反应小、药物容量高、作用时间长、贴敷性好等优点^[1]。该方的主要成分

是雷公藤醇提取物。其中雷公藤甲素既是有效成分, 又具有不良反应, 因此控制雷公藤甲素的含量十分必要。本实验通过正交实验设计, 系统地研究了巴布剂中雷公藤甲素的含量测定的提取方法, 以期为巴布剂中雷公藤甲素的含量测定提供

作者简介: 杨道纳, 男, 副主任药师

Tel: (0577)64771283

E-mail: ydndn@163.com

准确可靠的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 515 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 2487 紫外检测器, 717 自动进样系统, 柱温箱。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯, 上海国药集团); 水(超纯水); 雷公藤甲素对照品(中国药品生物制品检定所, 含量 100%, 批号: 1566-200201); 类风湿巴布剂(温州医学院附属第一医院制剂室, 批号: 080101, 081201, 081205)。

1.3 色谱条件^[2]

Alltech Alltima C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(48:52); 检测波长: 225 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。

2 方法与结果

2.1 类风湿巴布剂的组成及制作方法

雷公藤、白花蛇、乳香、没药等共 12 味中药, 按固定剂量配伍(其中雷公藤占总药量的 28%), 晒干, 研粉, 过 20 目筛, 用 80%乙醇渗漉提取, 然后过滤取液, 经低温低压(50 °C, -0.8 个大气压)蒸馏去乙醇后的浸膏, 将浸膏按一定比例加入事先配置好的巴布剂基质中(主要成分是明胶、甘油、聚丙烯酸钠等), 并加入 0.5%的促渗剂(氮酮)及一定比例的乳化剂及防腐剂, 充分熔合, 均匀涂于无纺布上, 覆盖聚乙烯薄膜, 切成 3 cm×3 cm 的方块(重量 1 g), 密封包装, 阴凉处储存备用。

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤甲素对照品 9.3 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得浓度为 0.093 mg·mL⁻¹对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 5 张, 除去盖衬, 剪成碎块, 混匀, 称取样品 9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 按实验设计对样品进行浸渍加热回流提取, 制备供试品溶液。

2.2.3 空白试验 按处方制备不含雷公藤提取物的样品, 同“供试品溶液的制备”方法制成空白溶液, 注入液相色谱仪, 结果色谱图中与雷公藤甲素对应的位置无色谱峰, 说明空白对照无干扰。

2.2.4 线性关系考察 以甲醇稀释雷公藤甲素对照品储备液, 得雷公藤甲素对照品浓度分别为 0.001 86, 0.003 72, 0.007 44, 0.011 16, 0.014 88,

0.018 6 mg·mL⁻¹对照品溶液, 按“1.3”项下色谱条件分别进行测定, 以峰面积为纵坐标(Y), 以所对应的雷公藤甲素浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 线性方程为 $Y=26\ 737\ 978.596\ 4X$, $r=0.999\ 7$ 。表明雷公藤甲素在 0.001 86~0.018 6 mg·mL⁻¹内呈良好的线性关系。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取同一供试品溶液, 重复进样 5 次, 测得雷公藤甲素的峰面积的 RSD 为 0.74%($n=5$)。

2.2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液分别在 1, 2, 4, 8, 24, 48 h 进样, 测得雷公藤甲素的峰面积的 RSD 为 0.64%($n=6$)。

2.2.7 重复性试验 取同一批次样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样测得雷公藤甲素浓度的 RSD 为 0.60%($n=6$)。

2.2.8 加样回收率试验 取样品 6 份(批号为 080101), 各约 0.25 g, 分别精密加入雷公藤甲素对照品 0.42 mg, 按“2.2.2”项下方法处理, 测定, 计算平均回收率为 97.65%, RSD 为 0.42%($n=6$)。

2.3 正交试验设计

采用以巴布剂中的有效成分雷公藤甲素含量为考核指标, 选择溶剂的浓度、溶剂的用量、浸渍时间、加热回流时间 4 个影响因素进行考察研究, 每个因素取 3 个水平, 用 L₉(3⁴)正交试验表安排试验, 结果见表 1。

表 1 提取类风湿巴布剂的因素水平表

Tab 1 Factors and levels of extraction of rheumatoid-arthritis cataplasm

水平	因素			
	甲醇浓度 A/%	提取液用量 B/mL	浸渍时间 C/h	加热回流时间 D/h
1	100	150	8	2
2	60	100	4	1
3	30	50	2	0.5

根据正交试验设计, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.3”项下的色谱条件测定样品中雷公藤甲素的含量, 结果见表 2。

从正交试验优选结果可见: 影响雷公藤甲素提取率的主要因素为浸渍时间和加热回流时间, 甲醇浓度及提取液用量影响较小。最佳提取条件为 A₂B₂C₂D₁, 即用 60%甲醇, 100 mL, 浸渍 4 h, 加热回流 2 h, 加热回流的温度为 100 °C 提取效率最高。

表2 正交设计试验结果

Tab 2 Results of orthogonal design test

试验号	因素				雷公藤甲素 含量/mg·g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.611
2	1	2	2	2	1.546
3	1	3	3	3	0.803
4	2	1	2	3	1.248
5	2	2	3	1	1.231
6	2	3	1	2	1.502
7	3	1	3	2	1.028
8	3	2	1	3	1.211
9	3	3	2	1	1.552
K ₁	3.960	3.887	4.324	4.394	
K ₂	3.981	3.988	4.346	4.076	
K ₃	3.791	3.857	3.062	3.262	
R	0.190	0.131	1.284	1.132	

2.4 类风关巴布剂的含量测定

分别取3个批次的类风关巴布剂,按“2.3”中的最佳提取条件:取本品一张,除去盖衬,剪成碎块,混匀后称取0.5g,置圆底烧瓶,精密加入60%甲醇溶液100mL,称重,浸渍4h,加热回流(2h,100℃),补足减少的重量,倾出上清液,倾出液高速离心,微孔薄膜滤过,按“1.3”项下色谱条件测定样品中雷公藤甲素的含量,即得。结果见表3。

表3 类风关巴布剂中雷公藤甲素的测定结果(n=3)

Tab 3 Triptolide in rhemeutoid-arthritis cataplasm(n=3)

批号	雷公藤甲素/ mg·g ⁻¹	雷公藤甲素/ mg·片 ⁻¹	平均含量/ mg·片 ⁻¹
080101	1.720	1.720	
081201	1.709	1.709	1.715
081205	1.712	1.712	

3 讨论

比较了加热回流法(2h,100℃)与超声处理法(110kHz,30℃,1h)提取效果,按照“2.4”项下方法测定雷公藤甲素的含量,结果分别为1.715和1.405mg·g⁻¹,表明加热回流的提取效率高。故选取加热回流法。

对巴布剂的回流提取的温度因素进行了考察,回流的温度分别设定为60,80,100℃,按照“2.4”项下方法测定雷公藤甲素的含量,结果分别为1.417,1.605,1.715mg·g⁻¹,结果表明回流温度为

100℃时得率最高,故选取回流温度为100℃。

在提取方法的选择时,曾用氯仿及乙酸乙酯提取,结果方法繁琐,但含量测定结果和甲醇提取的无显著差异,选择用甲醇提取。

雷公藤是本处方中的君药,但具有一定的不良反应^[3],特别是口服时容易产生各种毒性反应,但在本制剂中,毒性成分含量较低,(其中雷公藤只相当口服的1/40)。皮肤的毒理研究表明,类风关巴布剂对家兔完整及破损皮肤无任何刺激反应,家兔未出现任何急性毒性反应,豚鼠皮肤未见过敏反应,说明该制剂局部用药是安全的,可用于临床^[4]。

但为了安全用药,控制雷公藤甲素的含量非常必要。计算结果平均每片巴布剂含雷公藤甲素为1.715mg,拟定每片含雷公藤甲素的标示量为1.7mg,每片含雷公藤甲素应为标示量的80.0%~120.0%。

雷公藤甲素是三萜类化合物^[5],是一种脂溶性成分,能溶于甲醇、乙酸乙酯,氯仿等。用甲醇回流提取巴布剂,有效成分溶解性良好,但巴布剂膏体收缩,雷公藤甲素提取不完全;用30%甲醇提取,雷公藤甲素溶解性稍逊,膏体膨胀破碎,提取液浑浊,含有较多水溶性高分子杂质,含量测定结果偏低;用60%甲醇提取,雷公藤甲素溶解性良好,膏体膨胀,雷公藤甲素易提取完全,含量测定结果最高。其他条件不变的情况下把加热回流时间增至3h及4h,测得结果无明显变化,说明此方法已提取完全。

REFERENCES

- [1] CHEN L Y, ZHANG W B, ZHANG L P. Experimental study on transdermal delivery of rhemeutoid-arthritis babugao [J]. Her Med(医药导报), 2004, 23(7): 444-445.
- [2] CHI Y M, WEN H M, XU J G, et al. Determination of content of triptolide in Tripterygium Wilfordii Herbal pieces with HPLC method [J]. Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报:自然科学版), 2001, 17(1): 32-33.
- [3] LI D. Determination of triptolide in compound common threewingnut liniment [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2001, 12(7): 586-597.
- [4] JIN K K, YE T S, JIANG S H. Study on the toxicology of rheumatoid arthritis cataplasma [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2004, 11(3): 216-217.
- [5] XIAO C H, YANG S S, HONG X K. Chinese Medicine Chemistry(中药化学) [M]. Shanghai Science and Technology Press, 1997: 461-463.

收稿日期: 2011-07-27