

正交试验优选三黄解毒乳膏提取工艺

柳俊^{1,2}, 杜建平^{1,2}, 施之琪^{1,2} (1 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2 广东省中医研究所, 广东 广州 510095)

[摘要] 目的 优选三黄解毒乳膏的最佳提取工艺。方法 选择乙醇浓度、乙醇用量、提取时间和提取次数为考察因素, 以总干膏量和盐酸小檗碱提取量作为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选三黄解毒乳膏的最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺为加 10 倍药材量 70% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1 h。结论 优选得到的提取工艺稳定、可行。

[关键词] 三黄解毒乳膏; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R 283 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0116-03

Optimization of extraction technology for Sanhuang Jiedu cream by orthogonal test

LIU Jun^{1,2}, DU Jian-ping^{1,2}, SHI Zhi-qi^{1,2} (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Guangdong Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction technology for Sanhuang Jiedu cream. **Methods** The optimum extraction technology for Sanhuang Jiedu cream was investigated by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the total amount of the dry extract and the content of berberine hydrochloride as technology index. The influence factors including the concentration of ethanol, solvent ratio, extraction times, time length of extraction. **Results** The optimum extraction technology was the solid-liquid ratio was 1:10; the concentration of ethanol was 70%; the refluxing extraction was carried out for 3 times (1 hours/time). **Conclusion** The optimum extraction technology for Sanhuang Jiedu cream is stable and feasible.

[Key words] Sanhuang Jiedu cream; orthogonal test; extraction technology

三黄解毒乳膏是临床验方, 由姜黄、大黄、黄柏等六味中药组成, 经多年的临床验证, 具有清热解毒、凉血之功效。科学合理的选择中药复方的提取工艺是保证和提高药物疗效的关键和核心, 本研究针对处方中药物的性质和现代药理学研究进展, 采用乙醇作为提取溶媒进行回流提取。实验中主要考察了乙醇浓度、乙醇用量、提取时间和提取次数 4 项主要影响因素, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 筛选出最佳提取工艺条件。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪 (DAD 检测器)、电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 十万分之一)。

1.2 试剂 盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110713-200609)、乙腈 (色谱级)、磷酸 (分析纯)、十二烷基磺酸钠 (分析纯)。姜黄、大黄、黄柏等药材均购于广州南北行中药饮片有限公司, 经广东省中医研究所中药分析实验室 (国

家中医药科研三级实验室) 鉴定, 符合《中国药典》2005 版相关规定。

2 方法与结果^[1-3]

2.1 干浸膏量的测定 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 称取 1/8 处方量药材, 按设定方案进行提取, 滤过, 滤液合并, 浓缩至一定体积 (V)。精密吸取 20 ml, 置已干燥至恒重的蒸发皿 ($W_{\text{坩埚}}$) 中, 水浴蒸干, 与 105℃ 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速称重 (W), 按下式计算干浸膏量: 干浸膏量 = $(W - W_{\text{坩埚}}) \times (V/20)$ 。

2.2 盐酸小檗碱含量测定 照高效液相色谱法 (《中国药典》2005 年版一部附录 VI D) 测定。

2.2.1 色谱条件 色谱柱: PHENOMENEX ODS C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (40:60) (每 100 ml 含十二烷基磺酸钠 0.1 g); 检测波长: 345 nm; 流速: 1 ml/min; 柱温: 30℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥 24 h 的盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110713-200609) 适量, 加甲醇制成每 1 ml 含盐酸小檗碱 100 μg 的溶液, 即得。

[作者简介] 柳俊 (1978-), 男, 中药师, 硕士。Tel (020) 83501292; 13535312616; E-mail ljmx2000@163.com.

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 20 ml 置 50 ml 容量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 密塞, 称定重量, 超声处理 (功率 200W, 频率 40 kHz) 20 min 放冷, 再称定重量, 用流动相补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 称取除黄柏外的 1/8 处方量药材加 10 倍量 70% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 1.5 h 药液过滤, 合并滤液, 减压浓缩至一定体积, 再按供试品溶液的制备项下“精密吸取样品溶液 20 ml”起同法操作, 制得阴性样品溶液。分别吸取上述对照品、供试品及阴性对照溶液各 10 μL, 分别注入液相色谱仪, 结果表明选择性良好, 阴性无干扰。

2.3 提取工艺的优化研究

2.3.1 正交试验优选提取工艺 采用正交试验法

对醇提取工艺进行优选。考虑到影响醇提工艺的因素主要有乙醇浓度 (%), 醇的用量 (倍), 提取时间 (h), 提取次数 (次), 因此, 以上述工艺因素作为正交试验的考察因素, 各取三个水平 (见表 1):

表 1 醇提取工艺因素水平表

水平	因素			
	A 醇浓度 (%)	B 加醇量 (倍)	C 提取时间 (h)	D 提取次数 (次)
1	60	8	1	1
2	70	10	1.5	2
3	80	12	2	3

2.3.2 提取工艺试验结果及方差分析 以总干膏量和盐酸小檗碱提取量作为评价指标, 提取工艺试验结果及方差分析见表 2 表 3。

表 2 醇提取工艺正交试验结果表

实验号	A 因素	B 因素	C 因素	D 因素	盐酸小檗碱总量 (mg)	干浸膏总量 (g)	综合评分
1	1	1	1	1	30.77	13.06	45.30
2	1	2	2	2	66.26	19.52	82.28
3	1	3	3	3	69.47	22.53	89.94
4	2	1	2	3	77.34	21.19	93.21
5	2	2	3	1	56.00	13.41	64.06
6	2	3	1	2	83.47	16.49	89.28
7	3	1	3	2	61.87	14.54	70.29
8	3	2	1	3	82.92	15.90	87.83
9	3	3	2	1	47.19	9.32	50.47
K1	217.52	208.8	222.41	159.83			
K2	246.55	234.17	225.96	241.85			
K3	208.59	229.69	224.29	270.98			
R	37.96	25.37	3.55	111.15			

注: 综合评分 = (60/最大盐酸小檗碱量) × 盐酸小檗碱量 + (40/最大干浸膏量) × 干浸膏量

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	262.6053	2.0000	131.3026	124.8797	$P < 0.01$
B	122.2333	2.0000	61.1166	58.1270	$P < 0.05$
C	2.1029	2.0000	1.0514	1.000	
D	2.2144622	2.0000	1.1072311	1.0530683	$P < 0.01$

注: $F_{0.01(2,2)} = 99.0$, $F_{0.05(2,2)} = 19.0$

由直观分析和方差分析结果可知, 提取次数、乙醇浓度和乙醇用量对提取结果具有显著性影响, 综合考虑节约能源, 降低生产成本等综合因素, 最终确定提取工艺为 $A_2B_2C_1D_3$, 即: 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次加 10 倍量乙醇, 每次回流提取 1 h。

2.4 验证试验 取同一批药材, 称取 1/8 处方量, 按照 $A_2B_2C_1D_3$ 的提取工艺验证 3 批, 测定盐酸小檗碱提取总量和干浸膏总量, 结果见表 4。由表可知, 验证试验结果与正交试验优选结果吻合, 说明正交试验选出的工艺条件合理、稳定可行。

3 结论与讨论

表 4 醇提取工艺验证试验结果

批次	盐酸小檗碱总量 (mg)	干浸膏总量 (g)
1	57.92	20.56
2	57.35	20.39
3	59.19	21.50
平均值	58.15	20.82

3.1 实验筛选的三黄解毒乳膏优化提取工艺 为 $A_2B_2C_1D_3$ 即: 10 倍药材量 70% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1 h。该工艺稳定可行, 可作为三黄解毒乳膏的提取工艺。

3.2 科学合理的选择中药复方的提取工艺 是保持和提高原方疗效的关键和核心, 也是中药剂型改进和创新的前提和基础。本工艺针对处方中药材的性质和现代药理学研究进展, 采用乙醇作为提取溶媒进行回流提取。

(下转第 133 页)

的实验设计方法。

正交试验设计方法简单,在有限的几个试验中即有可能找到合适的条件,通用性强、适应面广,如以分离因子 α 值作为最终分离的衡量指标,通过一些简单的数学表达式判断较好,而且可接受的实验结果所在的区域,一目了然,完全符合对映体分离分析的要求。

Perrin 等采用四因素三水平和三因素二水平试验设计,只需 9 次和 4 次实验即完成了 12 种氨基酸的基线分离^[17]。

3.3 单纯形法 单纯形法是一种系统的优化算法,通过在单纯形的各个顶点上进行实验,对各顶点的实验响应函数值(根据实验的各项结果综合考虑得出的一个对该方法进行总体评价的指标)进行比较,判断其变化趋势,作为下一步的实验条件参考。通过反射变换使单纯形不断移动到响应较好的区域,直至按照预定的精确度充分接近最优点。单纯形法无需考虑各实验参数之间的交互关系。

黄河舟等采用改良型单纯形法成功分离了 9-硝基喜树碱和 12-硝基喜树碱。该法在最优化条件的搜索模式上比传统方法更科学,各个因子之间的交互作用不会影响最终结果,从而实现了电泳条件的综合优化,结果更优。也为“单纯形法”应用于手性拆分提供了借鉴^[18]。

【参考文献】

- [1] 柴逸峰. 毛细管电泳法在手性药物分析中的基础和应用研究 [D]. 第二军医大学, 2002.
- [2] 安登魁, 等. 现代药物分析选论 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [3] 陈 义. 毛细管电泳技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [4] 林炳承. 毛细管电泳导论 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] 丁文静. 几种手性药物的色谱和毛细管电泳拆分方法研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [6] Jindal M I, Van Ael W, Van Nyen P, *et al*. A screening strategy for the development of enantiomeric separation methods in cap-

- illary electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 2004, 25(16): 2772.
- [7] 宫守凤, 何新亚, 林炳承, 等. 毛细管电泳手性拆分中的二元环糊精体系 [J]. *化学进展*, 2001, 13(6): 450.
- [8] Cucinotta V, Guffrida A, Maccarrone G, *et al*. The 6-derivative of beta-cyclodextrin with succinic acid: a new chiral selector for CD-EKC [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 37(5): 1009.
- [9] Salami M, Jira T, Otto HH. Capillary electrophoretic separation of enantiomers of amino acids and amino acid derivatives using crown ether and cyclodextrin [J]. *Pharmazie*, 2005, 60(3): 181.
- [10] Yang WC, Yu AM, Yu XD, *et al*. Modeling and optimization of the chiral selectivity of basic analytes in chiral capillary electrophoresis with negatively charged cyclodextrins using electrochemical detection [J]. *Electrophoresis* 2001, 22(10): 2025.
- [11] Wistuba D, Schurig V. Recent progress in enantiomer separation by capillary electrochromatography [J]. *Electrophoresis* 2000, 21(18): 4136.
- [12] Daali Y, Cherkaoui S, Christen P, *et al*. Experimental design for enantioselective separation of cefiprolol by capillary electrophoresis using sulfated beta-cyclodextrin [J]. *Electrophoresis* 1999, 20(17): 3424.
- [13] Rizzi AM, Kramser L. pKa shift associated effects in enantioseparations by cyclodextrin mediated capillary zone electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 1999, 20(13): 2715.
- [14] Fillet M, Chankvetadze B, Crommen J, *et al*. Designed combination of chiral selectors for adjustment of enantioselectivity in capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 1999, 20(13): 2691.
- [15] Varesio E, Gauvrit JY, Longey R, *et al*. Central composite design in the chiral analysis of amphetamines by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 1997, 18(6): 931.
- [16] Wren SA, Rowe RC, Payne RS. A theoretical approach to chiral capillary electrophoresis with some practical implications [J]. *Electrophoresis* 1994, 15(6): 774.
- [17] Perrin C, Vargas MG, Heyden YV, *et al*. Fast development of separation methods for the chiral analysis of amino acid derivatives using capillary electrophoresis and experimental designs [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 883: 249.
- [18] 黄河舟, 柴逸峰, 李吉学, 等. 改良型单纯形法优化硝基喜树碱的毛细管电泳分离 [J]. *分析实验室*, 2004, 23(9): 29.

[收稿日期] 2009-10-21

[修回日期] 2009-12-03

(上接第 117 页)

3.3 盐酸小檗碱为方中君药黄柏的主要药效成分,该成分的浸出效果代表了方中有效成分的浸出情况,且其含量测定有成熟方法,故选其为评价指标,权重系数定为 0.6。同时总干浸膏的多少可以作为大类成分间接控制的一个指标,所以选择其作为评价指标之一,权重系数定为 0.4。通过加权计算综合得分评价提取工艺,最终筛选出三黄解毒乳膏中药材的最佳提取工艺。

【参考文献】

- [1] 张兆旺. 中药药剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 299.
- [2] 谢华, 贾云志. 正交试验优选复方苦黄乳膏乳化工艺 [J]. *中国药房*, 2008, 19(3): 190.
- [3] 赖庆宽, 廖 芳, 李世娟, 等. 左金丸提取工艺的优化研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(10): 1560.

[收稿日期] 2009-09-08

[修回日期] 2009-11-05