

# 多指标均匀设计法优选痤疮消凝胶提取工艺

朱亚楠<sup>1,2</sup>, 李萍<sup>2</sup>, 王满<sup>2</sup>, 王璐璐<sup>2</sup>, 鞠建明<sup>2\*</sup>, 陶迪生<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210046;  
2. 中国中医科学院江苏分院, 江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 优选痤疮消凝胶的提取工艺, 为该制剂的临床应用提供参考。方法: 以大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸含量的综合评分为指标, 采用均匀设计法考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间和提取次数对提取工艺的影响。采用 HPLC 测定大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸含量, 流动相分别为甲醇-0.1% 磷酸溶液 (85:15), 甲醇-水 (23:77), 乙腈-0.1% 磷酸溶液 (10:90), 检测波长依次为 254, 238, 323 nm。结果: 最佳提取工艺参数为加 12 倍量 80% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸质量浓度分别为 1 260.33, 1 597.56, 32.19 mg·L<sup>-1</sup>。结论: 优选的痤疮消凝胶提取工艺合理可行、重复性好, 为该制剂生产工艺参数的确定提供实验依据。

**[关键词]** 痤疮消凝胶; 芦荟大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 栀子苷; 咖啡酸

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0006-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190006

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150824.1001.012.html>

**[网络出版时间]** 2015-08-24 10:01

**Optimization of Extraction Process of Cuochuangxiao Gel by Uniform Design** ZHU Ya-nan<sup>1,2</sup>, LI Ping<sup>2</sup>, WANG Man<sup>2</sup>, WANG Lu-lu<sup>2</sup>, JU Jian-ming<sup>2\*</sup>, TAO Di-sheng<sup>1</sup> (1. *Nanjing Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China*; 2. *Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210028, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction technique of Cuochuangxiao gel and provide a reference for clinical application of this preparation. **Method:** With composite score of contents of free anthraquinones in *Rhei Radix et Rhizoma*, gardenin and caffeic acid as index, uniform design was adopted to investigate effects of ethanol concentration, ethanol volume, extraction time and times on extraction process of Cuochuangxiao gel. HPLC was employed to determine contents of free anthraquinones in *Rhei Radix et Rhizoma*, gardenin and caffeic acid with mobile phases of methanol-0.1% phosphoric acid (85:15), methanol-water (23:77) and acetonitrile-0.1% phosphoric acid (10:90), detection wavelenghtes of 254, 238, 323 nm, respectively. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: added 12 times the amount of 80% ethanol, extracted 3 times for 1 h each time. Under these conditions, contents of free anthraquinones in *Rhei Radix et Rhizoma*, gardenin and caffeic acid were 1 260.33, 1 597.56, 32.19 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** This extraction process is reasonable, stable and feasible, which provides a theoretic basis for industrial production of Cuochuangxiao gel.

**[Key words]** Cuochuangxiao gel; aloe-emodin; chrysophanol; physcion; gardenin; caffeic acid

痤疮消方为临床经验方,由生大黄、生栀子、蒲公英等 5 味中药组成,具有清热解毒、化瘀散结之功效,临床上将痤疮消药液倒膜外用对痤疮的炎症性

皮疹如丘疹、脓疱有显著疗效,但其使用和携带不便。为提高临床用药质量和患者依从性,拟将该复方开发成痤疮消凝胶。方中生大黄为君药,主要成

**[收稿日期]** 20150403(015)

**[基金项目]** 中国中医科学院江苏分院研究专项(JSBN1311)

**[第一作者]** 朱亚楠,在读硕士,从事中药新剂型和新工艺研究, Tel:18351895663, E-mail:zyn5663@163.com

**[通讯作者]** \* 鞠建明,博士,研究员,硕士生导师,从事中药新剂型、新工艺及中药材质量控制研究, Tel:025-85639640, E-mail:jjm405@sina.com

分为蒽醌及其苷类,其中游离蒽醌在体外对痤疮丙酸杆菌具有较强的抑制作用和较好的抗炎作用<sup>[1-2]</sup>。生栀子为臣药,主要活性成分为栀子苷等环烯醚萜苷类化合物,外用清热解毒、散瘀消肿,并有抑制痤疮杆菌的作用<sup>[3-4]</sup>。蒲公英为佐药,主要活性成分为咖啡酸,具有抗炎、抗菌、抗真菌、抗病毒和较强的体外抗毛囊蠕形螨活性作用<sup>[5-6]</sup>。本实验以大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸含量的综合评分为评价指标,采用均匀设计优选痤疮消凝胶的提取工艺,为该制剂生产工艺参数的确定提供参考。

## 1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,Empower 色谱工作站),AT201 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),TC-6K 型电子天平(美国双杰兄弟有限公司)。蒲公英等药材均购自南京海源中药饮片有限公司,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关项下要求;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、栀子苷、咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110795-201308, 110757-200206, 110756-200110, 110796-201319, 110758-201415, 110749-200714, 110885-200102),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 大黄游离蒽醌的含量测定<sup>[7-8]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(85:15),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,波长 254 nm,柱温 35 ℃。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,分别加甲醇溶解,制成质量浓度分别为 387.3, 639.4, 285.7, 633.9, 357.4 mg·L<sup>-1</sup>的储备液。分别精密量取上述储备液适量,置于同一 5 mL 量瓶中,混匀,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为 61.2, 152.4, 40.7, 106.3, 69.7 mg·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密吸取浓缩液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加适量甲醇超声 10 min,冷却后加甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.4 线性范围考察** 精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇定容,得系列混合对照品溶液,精密吸取

系列混合对照品溶液各 10 μL,按 2.1.1 项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚回归方程分别为  $Y = 5.26 \times 10^6 X + 1.68 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 4.97 \times 10^6 X + 1.64 \times 10^4$  ( $r = 0.9998$ ),  $Y = 4.02 \times 10^6 X - 6.38 \times 10^3$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 1.81 \times 10^6 X + 1.29 \times 10^4$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 1.47 \times 10^6 X - 2.73 \times 10^4$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围依次为 0.0612 ~ 0.612, 0.1524 ~ 1.524, 0.0407 ~ 0.407, 0.1063 ~ 1.063, 0.0697 ~ 0.697 μg。

**2.1.5 精密度试验** 取混合对照品溶液,按 2.1.1 项下条件连续重复进样 6 次,每次 10 μL,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.4%, 0.4%, 0.3%, 0.4%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一浓缩液,按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 2.2%, 2.6%, 2.1%, 2.2%,表明该方法重复性较好。

**2.1.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.1.1 项下条件测定。结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 1.4%, 1.2%, 0.9%, 1.9%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 精密量取已知指标成分含量的浓缩药液 1 mL,共 6 份(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分别为 0.0418, 0.0700, 0.0609, 0.3916, 0.1099 mg),分别置于 10 mL 量瓶中,精密加入含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含 0.0424, 0.0713, 0.0615, 0.3927, 0.1115 mg 的对照品溶液各 1 mL,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件进样 10 μL,计算各成分平均加样回收率分别为 101.00%, 100.75%, 101.52%, 99.75%, 99.49%, RSD 分别为 2.6%, 2.7%, 2.2%, 2.8%, 2.1%。

### 2.2 栀子苷的含量测定<sup>[9-10]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(23:77),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 238 nm,柱温 35 ℃。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取栀子苷对照品适量,加甲醇超声使溶解并定容,得 457.8 mg·L<sup>-1</sup>对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密吸取浓缩液 2 mL,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液。

**2.2.4 线性范围考察** 精密吸取栀子苷对照品溶液,依次稀释成质量浓度分别为 457.8, 366.24, 274.68, 183.12, 91.56, 45.78  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液,精密吸取系列对照品溶液 5  $\mu\text{L}$ ,按 2.2.1 项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 1.48 \times 10^6 X - 1.36 \times 10^5$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围 0.2289 ~ 2.289  $\mu\text{g}$ 。

**2.2.5 精密度试验** 取对照品溶液,按 2.2.1 项下条件连续进样 6 次,每次 5  $\mu\text{L}$ ,计算栀子苷峰面积的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

**2.2.6 重复性试验** 取同一浓缩液,按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,结果栀子苷峰面积的 RSD 2.0%,说明该方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.2.1 项下条件测定,结果栀子苷峰面积的 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 取含栀子苷 0.4997 mg 的浓缩液 1 mL,精密加入对照品溶液适量(含栀子苷 0.5026 mg),按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下条件进样 5  $\mu\text{L}$ ,计算栀子苷平均加样回收率 100.38%,RSD 2.8%。

### 2.3 咖啡酸的含量测定<sup>[11]</sup>

**2.3.1 色谱条件** Alltima C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液(10:90),流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长 323 nm,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取咖啡酸对照品适量,加甲醇超声溶解并定容,得 105.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  对照品溶液。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密吸取浓缩液 4 mL,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液。

**2.3.4 线性范围考察** 精密吸取咖啡酸对照品溶液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释到刻度,依次稀释成每 1 mL 含咖啡酸 21, 16.8, 12.6, 8.4, 4.2, 2.1  $\mu\text{g}$  的系列对照品溶液,精密吸取系列对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,按 2.3.1 项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 4.55 \times 10^6 X + 2.09 \times 10^4$  ( $r = 0.9992$ ),线性范围 0.042 ~ 0.42  $\mu\text{g}$ 。

**2.3.5 精密度试验** 取同一对照品溶液,按 2.3.1

项下条件连续进样 6 次,每次 20  $\mu\text{L}$ ,计算咖啡酸峰面积的 RSD 0.4%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 取同一浓缩液,按 2.3.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.3.1 项下条件测定,结果咖啡酸峰面积的 RSD 2.0%,说明该方法重复性好。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.3.1 项下条件测定,结果咖啡酸峰面积的 RSD 1.0%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 取含咖啡酸 0.0974 mg 的浓缩液 2 mL,精密加入对照品溶液适量(含咖啡酸 0.0958 mg),按 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.3.1 项下条件进样 20  $\mu\text{L}$ ,计算咖啡酸平均加样回收率 99.32%,RSD 2.6%。

**2.4 均匀试验设计<sup>[12-14]</sup>** 在预试验基础上,选取乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素,为了确保试验的准确性,前 3 个因素各取 6 个水平,结合实际生产,选择提取次数选择 3 个水平,故选用混合水平  $U_6(6^3 \times 3)$  均匀设计表<sup>[15]</sup>,每组试验重复 3 次。以大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸含量的综合评分为评价指标,权重系数分别为 0.5, 0.3, 0.2, 大黄游离总蒽醌为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的总和。按处方比例称取方中各药材共 150 g,置于圆底烧瓶中,按一定条件进行乙醇回流提取,过滤并合并滤液,减压回收乙醇并定容至 500 mL,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

利用 SPSS 16.0 软件对均匀设计结果进行逐步回归分析,得回归方程  $Y = -20.835 + 18.060D + 0.432A + 2.674B$  ( $r = 0.999$ ),回归方程经  $F$  检验确定具有极显著意义,且该回归方程对提取过程拟合情况良好,可根据其预测提取结果。由回归方程可知,影响提取效果各因素作用顺序为  $D > B > A$ ,且都与提取效果呈正相关,因素  $C$  则无显著影响作用。结合实际生产,在保证提取效果的前提下,尽可能节能降耗,拟确定提取条件为加 12 倍量 80% 乙醇提取 3 次,每次 1 h,按回归方程计算预测综合评分 99.99 分。

**2.5 验证试验** 按处方比例称取方中各药材共 150 g,重复 3 份,按优选的工艺进行提取,按上述方法测定各指标成分含量,结果质量浓度分别为大黄游离总蒽醌 1 267.27, 1 259.89, 1 253.82  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,栀子苷 1 604.32, 1 596.61, 1 591.74  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,咖啡

表 1 疮疮消凝胶方提取工艺均匀试验分析

Table 1 Uniform design analysis of extraction process of Cuochuangxiao gel

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 乙醇用量 /倍	C 提取时间 /min	D 提取数 /次	大黄游离总蒽醌 /mg·L <sup>-1</sup>	栀子苷 /mg·L <sup>-1</sup>	咖啡酸 /mg·L <sup>-1</sup>	综合评分 /分
1	15	6	60	2	285.75	583.5	23.38	36.80
2	30	10	120	1	352.50	473.5	21.38	36.14
3	45	14	40	3	1 111.75	1 610.0	28.88	92.01
4	60	4	100	1	463.25	411.0	15.44	35.63
5	75	8	20	3	1 265.50	930.0	30.38	86.35
6	90	12	80	2	1257.50	835.0	31.94	85.24

表 2 综合评分方差分析

Table 2 ANOVA of composite score

方差来源	SS	f	MS	F	P
回归来源	4 023.091	3	1 341.030	277.049	<0.01
剩余	9.681	2	4.840		
总和	4 032.772	5			

注:  $F_{0.01}(3, 2) = 99.17$ 。

色 32.37, 32.23, 31.96 mg·L<sup>-1</sup>, 综合评分依次为 100.23, 99.71, 99.21 分, 表明优选的提取工艺稳定可行, 重复性好。

### 3 讨论

中药复方具有多成分、多靶点的特点, 因此仅以君药的活性成分或单一成分作为指标考察提取工艺, 不能全面反映提取效果。疮疮消方中生大黄、生栀子和蒲公英分别为君药、臣药和佐药, 依据各药在方中的重要性确定权重系数, 故认为这 3 味药的主要活性成分大黄游离总蒽醌、栀子苷、咖啡酸含量的权重系数应依次递减, 分别确定为 0.5, 0.3, 0.2。这样既符合中医药组方特色, 又能充分、合理地反映复方提取效果。

均匀设计是常用的试验设计方法, 其试验点在试验范围内充分分散, 每一个试验点都有很好的代表性, 可大大减少试验次数, 具有方便、适用、预测性好等优点, 非常适合用于中药提取工艺优选、处方筛选、药理药效筛选等研究中多因素多水平试验。本文考察了乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数 4 个因素对疮疮消凝胶提取效果的影响, 采用混合水平  $U_6(6^3 \times 3)$  均匀设计表优选提取工艺。验证试验结果显示, 实际值与预测值非常相近, 说明优选的工艺合理可行、重复性好, 适用于中药复方提取工艺的选择。

#### [参考文献]

[1] 傅兴圣, 陈菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1534-1538.

[2] 江丽, 单萍萍, 申国庆, 等. 中药对疮疮致病菌的体外抑菌活性实验研究[J]. 药学与临床研究, 2014, 22(4): 315-318.

[3] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药, 2010, 12(9): 7-12.

[4] 程生辉, 张妍妍, 李会芳, 等. 基于黄疸模型大鼠的栀子苷急性肝肾毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 174-178.

[5] 李喜凤, 郝哲, 杜云锋. 蒲公英的生物活性研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(5): 823-826.

[6] 纪晓宇, 彭苑霞, 刘敏, 等. 蒲公英不同提取物对大肠杆菌体外抑菌活性的作用[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(1): 116-120.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 22-23.

[8] 李树翠, 冯俭, 张秋燕, 等. 采用“一测多评”法测定大黄及其制剂中大黄蒽醌类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 66-71.

[9] 饶黄云, 邹盛勤. 反相高效液相色谱法测定不同品质栀子中栀子苷的含量[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4207-4208.

[10] 毕宏生, 郭俊国, 解孝锋, 等. 正交试验优选栀子的水提醇沉工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 19-23.

[11] 杨斌, 李耘胜. 高效液相色谱法测定旋复花中咖啡酸的含量[J]. 药物研究, 2010, 19(21): 13-14.

[12] 钱大玮, 朱玲英, 段金廛, 等. 用均匀设计优化黄芪皂苷提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 1-2.

[13] 李智勇, 王洛临, 施之琪, 等. 丹莲肝康颗粒中药材的提取工艺研究[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 522-525.

[14] 邵淑蕊, 赵志刚, 侯俊玲, 等. 均匀设计法优化丹参中 4 种活性成分的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 8-12.

[15] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 44-45.

[责任编辑 刘德文]