

正交设计优选四神结肠片提取工艺

管咏梅¹, 陈振华², 熊英³, 程磊¹, 王森¹, 朱卫丰¹, 杨明¹, 刘红宁^{1*}

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 江西科技师范学院药学院, 南昌 330013; 3. 江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 采用正交试验设计优选四神结肠靶向片的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、溶媒用量、提取次数及提取时间为考察因素, 以补骨脂素、异补骨脂素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的提取率及出膏率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选四神结肠靶向片的HPLC含量测定及提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加8倍量60%乙醇回流提取3次, 每次提取1.5 h。结论: 优选提取工艺合理, 提取效率高, 适用于工业生产。

[关键词] 四神结肠靶向片; 正交试验设计; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0007-03

Optimization of Extraction Technology for Sishen Colon Targeting Tablets by Orthogonal Design Test

GUAN Yong-mei¹, CHEN Zhen-hua², XIONG Ying³, CHENG Lei¹, WANG Sen¹,
ZHU Wei-feng¹, YANG Ming¹, LIU Hong-ning^{1*}

(1. Key Laboratory for Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; 3. College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology for Sishen colon targeting tablets by orthogonal test design. **Method:** $L_9(3^4)$ orthogonal test was used for optimizing content determination extraction technology for Sishen colon targeting tablets with the concentration of ethanol, the amount of solvent, extraction times and extraction time as investigation factors, extraction rate and extract yield of psoralen, isopsoralen, evodiamine, rutaecarpine was taken as indexes. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: reflux extracted 3 times with 8 times the amount of 60% ethanol for 1.5 h each time. **Conclusion:** Optimized extraction technology was rational with high extraction efficiency, it was suitable for industrial production.

[Key words] Sishen colon targeting tablets; orthogonal design test; extraction technology

四神丸首载于《内科摘要》,《中国药典》2010年版一部也有收载^[1],部颁药品标准中药成方制剂第二册亦收载了四神片^[2]。方名“四神”,正如《降

雪园古方选注》所说:“四种之药,治肾泄有神功。”近年来,慢性非特异性溃疡性结肠炎发病情况呈上升趋势。现代研究表明,四神方加减在临床上治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎效果明确^[3-5],制成结肠靶向制剂能直达疾病靶点,更好地发挥疗效,方便患者使用。本文采用正交试验设计,以四神方中补骨脂素、异补骨脂素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量为指标,对提取时间、提取次数、溶媒用量等参数进行了考察。

1 材料

经江中医学院药学院鉴定教研室熊英副教授鉴

[收稿日期] 20111028(004)

[基金项目] 重大新药创制项目(2009ZX09310-005)

[第一作者] 管咏梅,博士,从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119010, E-mail: guanym2008@163.com

[通讯作者] *刘红宁,教授,博士生导师,从事中药学研究, Tel: 0791-87118857, E-mail: lhongning@yahoo.com.cn

定为正品。补骨脂、吴茱萸、五味子、去核枣肉(江西弘源药业有限公司),补骨脂素、异补骨脂素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱等对照品(批号分别为 110739-200814, 110738-200309, 110645-200715, 110638-200605, 中国药品生物制品检定所),KDM 型控温电热套(鄞城华鲁电热仪器有限公司),HH-S 型数显恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂),BS124S 型分析天平(德国 Sartorius),1200 型系列高效液相色谱仪(美国 Aglient),乙腈、甲醇为色谱纯,乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计 根据四神方中所含药味有效成分的理化性质、文献资料及预试验结果,确定采用乙醇回流法提取,以乙醇用量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)、乙醇体积分数(D)为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验设计,因素水平见表 1。将四神方药材 40 °C 烘干,并粉碎成粗粉,精密称取各约 45 g 的药材混合物 9 份,按正交设计的 9 种工艺参数进行提取,提取液滤过合并,备用。

表 1 四神丸醇提工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇用量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数/次	D 乙醇体积分数/%
1	6	1	1	60
2	8	1.5	2	70
3	10	2	3	80

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取补骨脂素、异补骨脂素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得,备用(质量浓度分别为 0.595, 0.615, 0.426, 0.454 $g \cdot L^{-1}$)。分别精密量取上述对照品溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得混合对照品溶液(质量浓度分别为 59.5, 61.5, 42.6, 45.4 $mg \cdot L^{-1}$)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 2.1 中 9 份提取液,分别加乙醇定容至 500 mL,摇匀,精密量取 2 mL 置蒸发皿中,于水浴上蒸干,加 5 mL 甲醇溶解,置 10 mL 量瓶中,用甲醇分次洗涤蒸发皿,洗液并入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm , 大连依利特有限公司),流动相乙腈-水(35:65),检测波长 225 nm(吴茱萸碱,吴茱萸次碱),254 nm(补骨脂素,异补骨脂素),流速 1

$mL \cdot min^{-1}$,柱温 35 °C。

2.2.4 线性范围考察 精密吸取混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL,置 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,按 2.2.3 色谱条件进样分析,记录峰面积 A,将峰面积 A 与各对照品溶液质量浓度 C 进行线性拟合,结果见表 2。

表 2 4 种成分线性范围考察

待测物	线性方程	r	线性范围/ $mg \cdot L^{-1}$
补骨脂素	$A = 93.557C + 30.403$	0.999 9	1.19 ~ 35.7
异补骨脂素	$A = 114.66C + 57.8$	0.999 9	1.23 ~ 36.9
吴茱萸碱	$A = 62.367C - 17.694$	0.999 9	0.852 ~ 25.56
吴茱萸次碱	$A = 72.126C - 19.611$	0.999 9	0.908 ~ 27.24

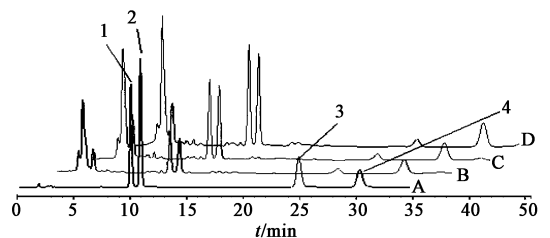
2.2.5 方法学考察 按中药质量标准分析方法验证指导原则(《中国药典》2010 年版一部附录 X VIII A)的方法,对采用的 HPLC 分析方法进行方法学考察,结果见表 3。结果表明所采用的 HPLC 分析方法专属性强,重现性和准确性均良好。

表 3 方法学考察($\bar{x} \pm s$)

指标成分	平均回收率	精密度	8 h 稳定性
	/%	RSD/%	RSD/%
补骨脂素	99.56 \pm 0.82	0.56	1.19
异补骨脂素	101.28 \pm 0.59	1.07	0.93
吴茱萸碱	98.15 \pm 0.58	1.37	1.13
吴茱萸次碱	99.46 \pm 0.71	1.24	0.87

2.2.6 样品测定 精密吸取按 2.2.1, 2.2.2 项下制备的混合对照品溶液和供试品溶液,按 2.2.1 色谱条件进样分析,对照品和供试品色谱见图 1,测定结果见表 4。

2.3 综合评分^[6-8] 权重分配补骨脂素 0.25,异补骨脂素 0.25,吴茱萸碱 0.25,吴茱萸次碱 0.25。具体计算方法是先由 9 个样本对每一指标成分的提取率除以该化学成分 9 个样本内最大的提取率,然后乘以权重系数,得到该化学成分在该样本综合评分的贡献值。同一样本中各化学成分贡献值相加,即为该样本的综合评分。



A. 对照品; B. 样品 1; C. 样品 2; D. 样品 3; 1. 补骨脂素; 2. 异补骨脂素; 3. 吴茱萸碱; 4. 吴茱萸次碱

图 1 四神丸 HPLC

2.4 正交试验统计分析 以综合评分为评价指标,

表4 四神方醇提工艺正交试验及安排

No.	A	B	C	D	含量/%				综合评分		
					补骨脂素	异补骨脂素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱			
1	1	1	1	1	0.478	0.373	3.052	9.612	0.783	9	
2	1	2	2	2	0.390	2.029	3.061	8.318	1.824	0.757	2
3	1	3	3	3	0.535	7.040	3.069	7.918	1.853	0.911	8
4	2	1	2	3	0.391	2.028	4.069	0.414	1.747	0.770	3
5	2	2	3	1	0.565	8.044	2.080	7.515	1.822	0.985	0
6	2	3	1	2	0.428	8.032	5.062	9.515	1.824	0.795	9
7	3	1	3	2	0.376	7.028	3.061	7.717	1.605	0.718	9
8	3	2	1	3	0.328	1.022	5.077	6.616	1.731	0.668	9
9	3	3	2	1	0.585	2.045	7.066	2.219	0.986	5	
K_1	0.818	0.758	0.750	0.918							
K_2	0.850	0.804	0.838	0.757							
K_3	0.791	0.898	0.872	0.784							
R	0.059	0.140	0.122	0.161							

采用直观分析对正交试验结果进行分析,结果表明,各试验因素对有效成分提取量影响主次分别为 $B > D > C > A$, 即提取时间 $>$ 乙醇体积分数 $>$ 提取次数 $>$ 乙醇用量, 应选 $A_2B_3C_2D_1$ 为最佳提取方案。进一步以影响最小的 A 因素为误差项进行方差估算, 见表 5。方差分析结果表明提取时间和乙醇体积分数为影响提取效果的主要因素。

表5 综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A(误差)	0.027	2	1.000	
B	0.425	2	15.741	>0.05
C	0.222	2	8.222	>0.05
D	0.325	2	12.037	>0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 9$ 。

2.5 验证试验 取与上述正交试验同批次的四神方药材混合物 180 g, 共 3 份, 按方案 $A_2B_3C_2D_1$ 进行提取, 补骨脂素、异补骨脂素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱提取总量为 3.772%, 与预测结果比较, 差别不大, 结果较为满意。

3 讨论

本试验利用正交设计将四神结肠片各因素、各

水平之间的组合均匀搭配、合理安排, 找出影响提取中的主要因素、次要因素及较优组合, 确定出四神结肠靶向片的最佳提取工艺。验证试验结果表明, 该工艺稳定、可行。

本课题根据临床需求及制剂的应用特点, 将四神方制成结肠制剂。前期药理研究结果表明肉豆蔻、干姜挥发油、补骨脂、吴茱萸、五味子、大枣等乙醇提取效果最为明显。本试验在前期研究的基础上, 以乙醇为溶剂, 对四神方的提取工艺进行进一步研究。

本方重用补骨脂、吴茱萸, 因补骨脂具有补肾壮阳、固精缩尿、温脾止泻等疗效, 临床常用治疗肾阳不足、精关不固、脾肾虚寒等, 故选择功效重要且成分确切的补骨脂、吴茱萸为醇提工艺考察对象。本试验采用高效液相色谱法测定补骨脂中的补骨脂素、异补骨脂素, 吴茱萸中的吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量作为检测指标, 结果表明, 该法灵敏度高、重现性好。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:434.
- [2] 卫生部颁药品标准中药成方制剂. 第二册[S]. 2002: Z8-55.
- [3] 汤菲, 赵海梅, 潘琦虹, 等. 四神丸化裁治疗溃疡性结肠炎的对比如实验研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8):1969.
- [4] 王晓东, 王春涛, 杨旭东. 四神丸对脾虚小鼠肠道菌群调整及肠保护作用的实验研究[J]. 牡丹江医学院学报, 2007, 28(1):1.
- [5] 高长玉. 四神丸方源考析及止泻作用的药效与机理研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2005.
- [6] 邓翀, 颜永刚, 梁婷, 等. 多指标综合评价南五味子木脂素提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):4.
- [7] 吴玉强, 侯小涛, 郭振旺, 等. 多指标正交优选甘蔗叶多糖的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):11.
- [8] 汪兰芳, 方优妮, 韩建伟, 等. 正交试验优选橘红贴膏的乙醇渗漉提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):38.

[责任编辑 仝燕]