

正交设计优选退白汤的提取工艺

盛国荣

(江苏省南通市皮肤病性病防治所, 江苏南通 226006)

[摘要] 目的:研究退白汤的提取工艺。方法:采用正交试验设计法考察不同提取工艺制备的退白汤中补骨脂素和异补骨脂素的含量,依据试验数据设计最佳提取工艺。结果:加水量、煎煮时间对提取效果有显著影响,最佳提取工艺为加水 10 倍量,药材浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次煎煮 1 h。结论:优选出的提取工艺经济,简便,提取效率高。

[关键词] 正交设计;退白汤;补骨脂素;异补骨脂素;提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0041-04

Experimental Study of Extracting Technology Optimization with Orthogonal Design for Tuibai Decoction

SHENG Guo-rong

(Nantong institution for Dermatoses and Venereal Disease prevention, Nantong 226006, China)

[Abstract] **Objective:** To research the extracting technology for Tuibai decoction. **Method:** Orthogonal design method is used to assay psoralen and isopsoralen in Tuibai decoction prepared with different extracting methods. The best extracting method is designed according to the result of these studies. **Result:** Quantity of water

[收稿日期] 20110216(002)

[基金项目] 南通市指令性社会发展科技计划项目(S2009047)

[第一作者] 盛国荣,主任药师,从事医院新制剂的研发和药事管理,Tel:0513-81551531,13615202386, E-mail:ntmgr@126.com

对浸膏收率有显著性影响,A 因素熊果酸和齐墩果酸总量有极显著影响。综上分析,结合实际情况,确定 $A_1B_2C_3D_2$ 为最佳提取工艺,即 10 倍量 90% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。

2.5 验证试验 为考察优选提取工艺的稳定性,按处方量取药材 3 份,加 10 倍量 90% 的乙醇,提取 2 次,每次回流 1.5 h,分别测定熊果酸和齐墩果酸总量及干浸膏得率。结果表明:用优选的工艺条件提取,熊果酸和齐墩果酸总量及干浸膏得率均较高,且稳定。

3 讨论

本实验中采用山茱萸中的主要成分熊果酸和齐墩果酸及浸膏得率为指标优选工艺,选择可能影响提取工艺的 4 个因素进行优化,确定了最佳提取工艺,为进一步研究提供了基础。

现代医学研究表明山茱萸中的有效成分熊果酸和齐墩果酸具有抗菌、降血糖、调节免疫等功能^[2],由于山茱萸中主要有效成分熊果酸和齐墩果酸为脂溶性成分,随着乙醇浓度增大溶解度相应增大。正交试验结果表明,乙醇浓度对熊果酸和齐墩果酸总量提取有显著差异,随浓度增加而提高。本文中以熊果酸和齐墩果酸作为指标进行含量测定,但不能完全代表复方的疗效。

[参考文献]

- [1] 邹瑾丽,项乐源,杨祉雯,等. 正交试验法优选山茱萸的提取工艺[J]. 中国临床药学杂志, 2009, 18(1): 37.
- [2] 楚晋. 山茱萸化学成分及药理活性的研究[J]. 中国自然医学杂志, 1999, 1(1): 46.

[责任编辑 全燕]

and decoction time had significant influence to the results of extraction. The best extracting method was 10 times of quantity of water, soaked for 1 h, and decocted for 2 times, and 1h for each time. **Conclusion:** The optimized extracting method is cheap and effective, and easy to operate.

[**Key words**] orthogonal design; Tuibai decoction; psoralen; isopsoralen; extracting technology

目前对白癜风的治疗方法虽有多种,但均有局限性,而且疗效不确定,疗程长。笔者根据白癜风的病因病机理论以及临床用药经验并结合中医中药基础理论,以养血益肤、祛风通络的基本功效为组方原理,选择补骨脂、当归、丹参等 10 余味中药为主要配方,研制了中药复方制剂退白汤,临床上用于治疗寻常性白癜风,取得了较为满意的临床治疗效果^[1],且几乎无药物不良反应^[2]。为了选择一个最佳提取工艺,本文以君药补骨脂的有效成分补骨脂素和异补骨脂素的含量作为考察指标,采用正交试验设计法^[3-4]对影响退白汤提取工艺的主要因素进行了考察。

1 材料

1.1 仪器 CS-930 型双波长薄层扫描仪(日本岛津),ZF-J 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂),定量点样毛细管(Drummond USA),硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工有限公司)。

1.2 试药 补骨脂素对照品(批号 110739-200814)、异补骨脂素对照品(批号 110738-200309)均为中国药品生物制品检定所提供;补骨脂、当归、丹参、炙黄芪、何首乌、白蒺藜、鸡血藤、红花、陈皮、乌梢蛇、白芷、菟丝子、黑豆衣(徐州彭祖中药饮片有限公司提供,均经过南通市药品检验所中药鉴定室鉴定为正品);退白汤(本所制剂所提供);所有试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 退白汤制备

2.1.1 处方 补骨脂 25 g、当归 25 g、丹参 25 g、炙黄芪 25 g、何首乌 25 g、白蒺藜 75 g、鸡血藤 37.5 g、红花 25 g、陈皮 25 g、乌梢蛇 25 g、白芷 37.5 g、菟丝子 37.5 g、黑豆衣 25 g。

2.1.2 制备 取处方量补骨脂、当归、丹参、炙黄芪、何首乌、白蒺藜、鸡血藤、红花、陈皮、乌梢蛇、白芷、菟丝子、黑豆衣,拣去杂物,加 10 倍量水浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次 1 h,4 层纱布滤过,合并 2 次滤液与榨出液,蒸发浓缩,定容至 1 000 mL,即得。

2.2 补骨脂素和异补骨脂素的含量测定

2.2.1 分析条件选择 硅胶 GF₂₅₄ 薄层板于 110 ℃ 活化 30 min,点对照品溶液,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(15:2:1)为展开剂,展开,晾干,于 365 nm 紫外灯下观察,斑点显蓝色荧光。

2.2.2 测定参数选定 将层析斑点定位后于 CS-930 双波长薄层扫描仪上在紫外光区作光谱扫描,补骨脂素测定波长 $\lambda_s = 272$ nm,参比波长 $\lambda_R = 305$ nm,异补骨脂素 $\lambda_s = 275$ nm,参比波长 $\lambda_R = 310$ nm 狭缝 1.2 nm × 1.2 nm,线性参数 $S_x = 3$,反射法锯齿扫描,用外标二点法定量。

2.2.3 溶液制备 精密吸取退白汤 60 mL 置蒸发皿中,水浴蒸发挥去水分,残渣加甲醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇定容于 10 mL 量瓶中得供试品溶液。分别精密称取经 105 ℃ 干燥至恒重的补骨脂素和异补骨脂素适量,各置 10 mL 量瓶中,分别加甲醇溶解并稀释至刻度即得 270,250 mg·L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.4 标准曲线绘制 用定量毛细管分别精密吸取对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 μL,点于硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,按上述分析条件展开,定位,扫描,以扫描斑点面积积分值为纵坐标,点样量为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $Y_{补} = 3.15 \times 10^3 X - 8.46 \times 10^2$ ($r = 0.9987$); $Y_{异} = 3.26 \times 10^3 X - 2.37 \times 10^2$ ($r = 0.9992$),线性范围补骨脂素 0.27 ~ 1.62 μg,异补骨脂素 0.25 ~ 1.50 μg。

2.2.5 样品含量测定 精密吸取退白汤 60 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液 3 μL,补骨脂素对照品溶液 2,3 μL,异补骨脂素对照品溶液 2,3 μL,点样,展开,扫描,以外标二点法计算其含量。结果补骨脂素平均质量分数为 365 mg·L⁻¹,RSD 1.32% ($n = 5$),异补骨脂素平均质量分数为 354 mg·L⁻¹,RSD 1.21% ($n = 5$)。

2.2.6 加样回收率试验 精密吸取 8 mL 已知补骨脂素和异补骨脂素含量的供试品溶液,精密加入一定量的补骨脂素和异补骨脂素对照品溶液,加甲醇定容于 10 mL 量瓶中,按 2.2.5 项下方法操作,计算回收率,结果见表 1。

表1 补骨脂素(甲)和异补骨脂素(乙)回收率

次数	供试品含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		加样量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		测得量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
	甲	乙	甲	乙	甲	乙	甲	乙	甲	乙	甲	乙
1	292	283	108	100	397	377	99.25	98.43				
2	292	283	216	200	501	489	98.62	101.24				
3	292	283	324	300	627	588	101.79	100.86	99.46	99.60	1.34	1.37
4	292	283	432	400	713	677	98.48	99.12				
5	292	283	540	500	825	770	99.16	98.34				

2.3 正交试验

2.3.1 因素水平的确定 根据单因素分析和预试验,确定加水量(A)、浸泡时间(B)、煎煮时间(C)和煎煮次数(D)为考察因素,每个因素设计4个水平,并对4个因素的水平进行了随机化处理,见表2。

表2 补骨脂素和异补骨脂素提取工艺随机化因素水平

水平	A 加水量 /倍	B 浸泡时间 /h	C 煎煮时间 /h	D 煎煮次数 /次
1	8	2.0	1.5	4
2	12	0.5	2.0	3
3	6	4.0	1.0	1
4	10	1.0	0.5	2

2.3.2 评价标准 为了便于对最佳提取工艺提供评价依据,对样品中补骨脂素和异补骨脂素含量的测定数据进行了分级量化评分。质量浓度大于 $350\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为优,质量浓度小于 $350\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且大于 $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为良,质量浓度小于 $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 且大于 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为中,质量浓度小于 $200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为差。

由表3看出,以补骨脂素含量为评价指标时,各因素对结果的影响大小顺序为 $C > A > B > D$,其最佳因素水平组合为 $A_4B_4C_3D_3$ 。在以异补骨脂素含量为评价指标时,各因素对结果的影响大小顺序为 $A > C > D > B$,其最佳因素水平组合为 $A_4B_4C_1D_4$ 。2个指标的差异为C,D 2个因素,即煎煮时间和煎煮次数。

2.3.3 方差分析 将表3中补骨脂素含量和异补骨脂素含量进行方差分析,见表4。

由表4可见,当以补骨脂素含量为评价指标时,因素C对结果有极显著性差异($P < 0.01$),因素A对结果也有显著性差异($P < 0.05$)。以异补骨脂素含量为评价指标时,因素A对结果有极显著性差异($P < 0.01$),因素C对结果也有显著性差异($P < 0.05$)。以异补骨脂素含量为评价指标时, C_1 与 C_3

无显著性差异,结合补骨脂素含量测定结果,取 C_3 较合适。在以补骨脂素含量为评价指标时, D_3 与 D_4 无显著性差异,结合异补骨脂素含量测定结果以及R值,取 D_4 较合适。综合直观分析和方差分析,最佳因素水平组合为 $A_4B_4C_3D_4$ 。

表3 补骨脂素和异补骨脂素提取工艺试验方案与结果

No.	A	B	C	D	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		
					补骨脂素	异补骨脂素	
1	1	1	1	1	223	231	
2	1	2	2	2	155	152	
3	1	3	3	3	358	192	
4	1	4	4	4	119	207	
5	2	1	2	3	193	247	
6	2	2	1	4	227	293	
7	2	3	4	1	106	159	
8	2	4	3	2	368	281	
9	3	1	3	4	247	288	
10	3	2	4	3	54	148	
11	3	3	1	2	233	241	
12	3	4	2	1	163	196	
13	4	1	4	2	146	274	
14	4	2	3	1	346	335	
15	4	3	2	4	237	301	
16	4	4	1	3	309	359	
补	K_1	213.8	202.3	248.0	209.5	3 484	3 904
骨	K_2	223.5	195.5	187.0	225.5		
脂	K_3	174.3	233.5	329.8	228.5		
素	K_4	259.5	239.8	106.3	207.5		
	R	85.2	44.3	223.5	21.0		
异	K_1	195.5	260.0	281.0	230.3		
补	K_2	245.0	232.0	224.0	237.0		
骨	K_3	218.3	223.3	274.0	236.5		
脂	K_4	317.3	260.8	197.0	272.3		
素	R	121.8	37.5	84.0	42.0		

表 4 方差分析

项目	方差来源	SS	f	MS	F	P
补骨脂素	A	14 737.5	3	4 912.5	14.86	<0.05
	B	5 869.5	3	1 956.5	5.92	>0.05
	C	107 347.5	3	35 782.5	108.27	<0.01
	D	1 395.0	3	465.0	1.41	>0.05
	误差	991.5	3	330.5		
异补骨脂素	A	33 527.5	3	11 175.8	34.33	<0.01
	B	4 444.5	3	1 481.5	4.55	>0.05
	C	19 512.0	3	6 504.0	19.98	<0.05
	D	4 369.5	3	1 456.5	4.47	>0.05
	误差	976.5	3	325.5		

注: $F_{0.05}(3,3) = 9.28$, $F_{0.01}(3,3) = 29.46$ 。

2.3.4 优选工艺验证试验 根据优选结果,按最优提取工艺制备 5 批退白汤,以验证退白汤中补骨脂素和异补骨脂素的提取含量,结果见表 5。

表 5 优选提取工艺的验证 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

No.	补骨脂素	异补骨脂素
1	367 ± 11	365 ± 12
2	372 ± 13	358 ± 7
3	362 ± 9	365 ± 14
4	366 ± 8	359 ± 6
5	369 ± 15	363 ± 10

由表 5 看出,最优提取工艺制备的退白汤,在补骨脂素和异补骨脂素含量测定中,两者的质量浓度均大于 $350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,都达到了预定评价指标的要求。

3 讨论

君药补骨脂中含多种香豆精类成分,包括补骨

脂素(呋喃骈香豆素)和异补骨脂素(异呋喃骈香豆素)^[5],且含有较多的光敏性化学物质^[6],它们皆为治疗白癜风的有効成分。退白汤含中药成分 10 余种,各成分相互干扰较大,经反复实验,发现用双波长薄层扫描法测定退白汤中补骨脂素和异补骨脂素的含量,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(15:2:1)为展开剂,展开系统分离度较佳。故选用甲苯-乙酸乙酯-甲酸作为本含量测定的展开剂。

根据预试验结果,并兼顾大生产确定以加水量、水浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,选用君药补骨脂中的有效成分补骨脂素和异补骨脂素的含量作为考察指标。由验证结果看出,本文优选的退白汤提取工艺能确保药材中有效成分提取完全。

[参考文献]

- [1] 谢勇,盛国荣.退白汤联合 NB-UVB 治疗寻常性白癜风的疗效观察[J].药学与临床研究,2010,18(2):171.
- [2] 盛国荣.退白汤毒理学实验研究[J].中国医院药学杂志,2010,30(21):1823.
- [3] 盛国荣.复方利多卡因乳膏的处方优选[J].中国药房,2009,20(28):2182.
- [4] 赵燕,玄振玉.正交法优选连翘酯苷提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):13.
- [5] 穆金波,冯红,曹希正.补肾益脑胶囊中补骨脂的含量测定[J].中国药业,2010,19(16):33.
- [6] 张红莲,王雅楠,王建华.补骨脂的化学成分及药理活性研究概况[J].天然产物研究与开发,2010,22(5):909.

[责任编辑 仝燕]