

## 正交试验法优选皮肤辐射防护膏药材 中醇溶性成分的提取工艺

杨安平<sup>1\*</sup>, 陈耀宗<sup>1</sup>, 陈少宏<sup>1</sup>, 李韵珊<sup>2</sup>

(1. 佛山科学技术学院, 广东 佛山 528000; 2. 佛山市普达美生物医药科技有限公司, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的: 优选皮肤辐射防护膏药材中醇溶性成分的提取工艺。方法: 设计  $L_9(3^4)$  正交试验, 采用 HPLC 测定大叶茜草素的含量作为质控指标, 考察乙醇用量(A)、乙醇浓度(B)、提取时间(C)、和提取次数(D) 4 个因素对皮肤辐射防护膏药材中醇溶性成分提取的影响, 优化提取工艺。结果: 最佳提取条件为: 加入 12 倍药材量 95% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1.5 h。结论: 该提取工艺稳定性和重现性良好, 简便, 快速, 可行。

[关键词] 皮肤; 辐射; 软膏剂; 正交试验; 提取; 大叶茜草素

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0019-03

## Study on Extraction Process for Total Mollugin in Cream with Protecting Skin Against Radiation by Orthogonal Design

YANG An-ping<sup>1</sup>, CHEN Yao-zeng<sup>1</sup>, CHEN Shao-hong<sup>1</sup>, LI Yun-shan<sup>2</sup>

(1. Medical College of Foshan University, Foshan 528000, China; 2. Foshan Pudamei Bio-Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Foshan 528000, China)

**[Abstract] Objective:** To study the optimum extraction process of alcohol-soluble components in cream with protecting skin against radiation. **Method:** By use of orthogonal experimental design  $L_9(3^4)$ , four factors that may effect the extraction had been studied, including volume and concentration of alcohol, extracting time and times. And the content of mollugin was determined by HPLC to screen out the best method of extraction conditions. **Result:** The best extracting technical conditions were as follows: 12 times of 95% EtOH, extracting with reflux for 1.5 hours and 3 times. **Conclusion:** The optimized process was simple, fast and feasible with its stability and repeatability.

**[Key words]** skin; radiation; creams; orthogonal test; extraction; mollugin

皮肤辐射防护膏(RPA 软膏)作为辐射防护剂用于预防和治疗皮肤辐射损伤,保护正常皮肤组织,疗效明显<sup>[1-2]</sup>。在 RPA 软膏原提取工艺<sup>[3]</sup>中,除芦荟外,其他药材均采用回流法分别提取药材中主要成分后混合加入基质制备成中药软膏。本方除芦荟外,其他药材主要成分为醇溶性,笔者为了简化提取工艺,采用混合药材回流提取,并选取处方中君药茜草的主要成分大叶茜草素作为质量指标,筛选该软

膏中主要成分为醇溶性药材的最佳提取工艺。

### 1 仪器与试药

Agilent 1100 series 液相色谱系统(包括 G1311A 四元梯度泵, G1316A 柱温箱, G1314A 紫外检测器, Agilent Chemstation 色谱工作站);大叶茜草素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110884-200604);药材茜草、白芷、川芎、姜黄及苦参购自佛山市德林医药有限公司,经鉴定为正品;其他检测试剂均为色谱纯,乙醇为化学纯试剂。

### 2 方法与结果

#### 2.1 样品含量测定

##### 2.1.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil ODS-1 4.6 mm ×

[收稿日期] 20100327(005)

[基金项目] 佛山市科技发展专项资金项目(03080161)

[通讯作者] \* 杨安平, Tel: 0757-82822744, E-mail: foshanyap@

163.com

200 mm, 流动相 甲醇-水 (90 : 10); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 282 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取大叶茜草素对照品 0.936 0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 30 mL, 超声 5 min, 使之溶解并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 0.018 72 mg·mL<sup>-1</sup>。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取药材乙醇提取液, 滤纸过滤, 精密吸取续滤液 2 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇 10 mL, 超声 10 min, 使之溶解并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

**2.1.4 空白样品溶液的制备** 取不含茜草的空白样品, 照供试品溶液的制备方法制备空白样品溶液。

分别取对照品溶液、供试品溶液与空白样品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪测定, 按供 2.1.1 项色谱条件测定 HPLC 色谱图, 结果空白样品无干扰, 见图 1。

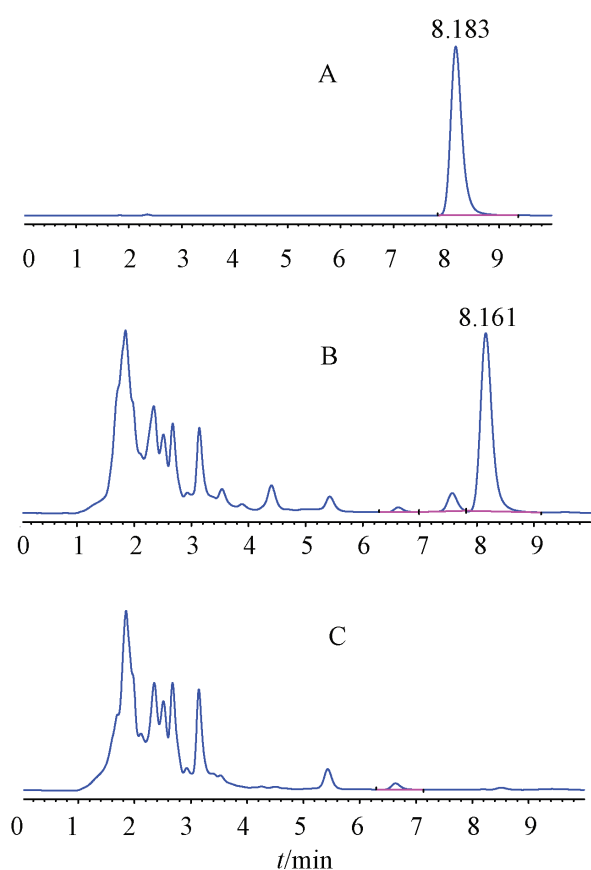


图 1 大叶茜草素含量测定 HPLC

A. 大叶茜草素对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白样品溶液

**2.1.5 线性关系考察** 精密吸取上述对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇依次稀释制成对照品溶液。分别进样 20 μL, 以对照品峰面积为纵坐标, 以溶液含量为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程  $Y = 4\,935.7 \cdot X - 2.674$ ,  $r = 0.999\,9$ , 大叶茜草素进样量在 0.374 4 ~ 1.872 μg·mL<sup>-1</sup> 呈良好的线性关系。

**2.1.6 精密度考察** 精密吸取高、中、低 3 个浓度的大叶茜草素对照品溶液, 连续进样 5 次, 每次 20 μL, 以大叶茜草素峰面积计算 RSD, 分别为 1.26%,

1.33%, 1.12%。

**2.1.7 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 h 进样 20 μL, 记录色谱图, 以大叶茜草素的峰面积计算 RSD, 结果为 2.32%, 表明供试品在 72 h 内稳定。

**2.1.8 重复性试验** 精密量取已知大叶茜草素含量的供试品溶液 6 份, 每份约 50 mL。照供试品制备项下操作测定, 结果该样品中大叶茜草素的平均质量分数为 5.38%, RSD 为 2.23%, 表明重复性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 精密量取已知大叶茜草素含量的供试品溶液 6 份, 每份约 50 mL。每份样品中准确加入已知量的大叶茜草素对照品, 按供试品溶液的制备项下操作方法制备样品并测定, 计算大叶茜草素的平均回收率为 95.3%, RSD 为 2.87%。

**2.2 正交实验方案设计** 本实验结合生产实际, 以大叶茜草素为质控指标, 以正交试验法优选乙醇回流提取的工艺条件。根据预实验, 对乙醇用量 (A)、乙醇浓度 (B)、提取时间 (C)、和提取次数 (D) 4 个影响因素, 分别在 3 个水平上进行正交优选。按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验, 因素水平安排见表 1。称取茜草、白芷、川芎、姜黄及苦参 (2 2 2 1 1) 160 g, 按表 2 加乙醇浸泡, 回流提取, 测定大叶茜草素含量。

表 1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计

水平	A 乙醇用量 / 倍	B 乙醇体积分数 / %	C 提取时间 / h	D 提取次数 / 次
1	8	75	0.5	1
2	10	85	1.0	2
3	12	95	1.5	3

**2.3 正交试验结果分析** 根据正交试验表, 测定出大叶茜草素含量, 计算大叶茜草素提取量。大叶茜草素提取量 = 提取液中 大叶茜草素的质量浓度 × 提取液体积, 结果见表 2。

结果表明, 皮肤辐射防护膏乙醇回流提取时, 各因素对测定结果的影响次数为: B > D > A > C。优选最佳提取条件为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, 即 95% 乙醇, 12 倍用量, 每次 1.5 h, 提取 3 次。

**2.4 优选提取工艺的验证试验** 为进一步考察上述优选工艺的稳定性, 按各种最佳条件进行重复提取 3 份皮肤辐射防护膏中醇溶性成分的药材, 每份 160 g, 加入药材量 12 倍量 95% 乙醇浸泡 15 min, 回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 分别按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 并检测分析大叶茜草素提取量, 结果表明: 大叶茜草素平均提取量达 2.163 mg, RSD 为

表 2 正交试验结果分析

No	A	B	C	D	大叶茜草素 /mg
1	1	1	1	1	0.052 8
2	1	2	2	2	0.558 3
3	1	3	3	3	2.121 5
4	2	1	2	3	0.512 1
5	2	2	3	1	0.979 8
6	2	3	1	2	1.395 7
7	3	1	3	2	0.070 3
8	3	2	1	3	1.437 6
9	3	3	2	1	1.919 5
	0.911	0.212	0.962	0.984	
	0.963	0.992	0.997	0.675	
	1.142	1.812	1.057	1.357	
R	0.231	1.600	0.095	0.682	

1.81%，稳定性好。

### 3 讨论

放射性皮肤损伤的中医病因病机是热毒蕴发或热毒伤阴、气血凝滞，治当清热解毒、活血祛瘀为主<sup>[4]</sup>。皮肤辐射防护膏由茜草、白芷、川芎、姜黄、苦参、芦荟等药物组成，方中茜草活血祛瘀，白芷燥湿、消肿，川芎活血祛瘀，姜黄解毒消肿，苦参清热燥湿，芦荟清热解毒、祛腐生肌，诸药合用具有清热解毒、活血化瘀、祛腐生肌之功效。同时现代药理<sup>[5-8]</sup>研究也证实茜草中大叶茜草素、白芷中香豆素、川芎中川芎、苦参中苦参碱、姜黄中姜黄素及芦荟多糖等对辐射损伤有明显保护作用。

皮肤辐射防护膏原提取工艺<sup>[3]</sup>为处方中药材分别采用不同溶剂提取其有效成分，但考虑其规模生产的不便性，我们对其提取工艺进行改进，因川芎中川芎、白芷中香豆素、苦参中苦参碱、姜黄中姜黄素及茜草中大叶茜草素等在乙醇中有较好溶解性，则把其混合进行综合提取，并采用正交设计试验法对其提取工艺优化。优选最佳提取条件为处方中药材加入 12 倍用量 95% 乙醇，提取 3 次，每次 1.5 h。因考虑生产成本性，采用 8 倍量乙醇，提取 1.0 h，大叶茜草素的提取量也可达到 13.25  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  药材，与优选的提取工艺进行验证时平均提取量 13.52  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  药材差距不明显。因此生产时提取工艺可考虑采用 95% 乙醇，8 倍用量，每次 1.0 h，提取 3 次。

在优选皮肤辐射防护膏提取工艺中，采用大叶茜草素作为质控指标，我们也尝试采用香豆素、川芎、姜黄素、苦参碱等作为质控指标，但参考文献<sup>[9-14]</sup>的分离条件，色谱图中难以分离出香豆素、川芎、姜黄素、苦参碱等单峰，分离度  $R$  值偏低 ( $< 1$ )，因此值得我们继续探索流动相条件分离，便于进一步采用多指标综合分析。

### [参考文献]

- [1] 洪育萍, 王瑜, 杨安平. 皮肤辐射防护软膏对小鼠耳廓微循环障碍的作用[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(9): 1266.
- [2] 洪育萍, 王瑜, 杨安平. RPA 软膏抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(12): 1740.
- [3] 杨安平, 谭常青, 王宗伟. 皮肤辐射防护膏基质组成与制备工艺的研究[J]. 医药导报, 2006, 25(10): 1047.
- [4] 燕忠生. 中医药对放射性局部损伤的防治作用[J]. 中医杂志, 2006, 47(8): 630.
- [5] 吴宁, 胡德蓉, 齐洁琳, 等. 川芎对急性放射损伤小鼠骨髓中 LFA-1、ICAM-1 表达影响的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(1): 128.
- [6] 孟玲玲, 冯林春, 石怀银, 等. 苦参碱防治放射性肺损伤的实验观察[J]. 军医进修学院学报, 2008, 29(2): 134.
- [7] 沈金龙. 姜黄素对大鼠放射性损伤的保护作用[J]. 中国当代医药, 2009, 16(23): 18.
- [8] 郭朝华, 孔佩艳, 邹仲敏, 等. E838 等抗放药对放射损伤防治作用的比较[J]. 重庆医学, 2002, 31(3): 186.
- [9] 宗东升, 张胜波. HPLC 法测定复方羊角颗粒中欧前胡素的含量[J]. 实用药物与临床, 2008, 11(3): 193.
- [10] 王光发, 廖正根, 梁新丽, 等. HPLC 法同时测定元胡止痛片中 3 种活性成分的含量[J]. 中国药房, 2009, 20(9): 672.
- [11] 崔红彬, 孟建升, 蒋俊春. HPLC 法测定姜黄片中姜黄素的含量[J]. 中国药师, 2008, 11(9): 1071.
- [12] 杨娟, 黄敬群, 李红. HPLC 法测定乳结消片中姜黄素的含量[J]. 中国药房, 2009, 20(6): 446.
- [13] 屈蓉, 尹萌, 张厚宝. 高效液相色谱法测定止痢宁片中苦参碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2786.
- [14] 陈文慧, 张江丽, 吴春维, 等. 高效液相色谱法测定中药洗剂中苦参碱的含量[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34(1): 106.

[责任编辑 仝燕]