

• 药剂 •

# 正交法研究如意金黄贴剂的提取工艺

毛平<sup>1</sup>, 毛泉明<sup>1</sup>, 马福良<sup>1</sup>, 吴云鸣<sup>2</sup>, 章军<sup>1</sup>

(1 上海中医药大学, 上海 200032; 2 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 目的: 研究如意金黄贴剂的最佳提取条件。方法: 采用正交设计法, 以小檗碱含量和最低抑菌浓度为指标, 以提取挥发油、醇浓度、提取时间为因子进行试验。结果: 如意金黄贴剂的最佳提取条件是: 提取时间为 3h(第一次提取 2h, 第二次提取 1h, 醇浓度为 90%)。结论: 优选得到的工艺稳定可行。

**关键词:** 如意金黄贴剂; 正交设计; 小檗碱; 最低抑菌浓度

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)04-0001-04

## Studies on the Extracting Techniques of *Ruyijinhuang* Plaster by Orthogonal Design Method

MAO Ping<sup>1</sup>, MAO Quan-ming<sup>1</sup>, MA Fu-liang<sup>1</sup>, WU Yun-ming<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032

2. The National Research center of Chinese Materia Medica Engineering and Technology, Shanghai 201203)

**Abstract:** Objective: To Study the optimal extracting techniques of *Ruyijinhuang* plaster. Methods: By using of contents of berberine and minimal inhibitory concentration as indexes, the conditions of extracting volatile oil, alcoholic concentration and extracting time were determined with orthogonal design method. Results: The optimal extracting conditions are as follows: using 90% alcohol as extracting solvent to extract for two times, the first times for 2 hours and second times for 1 hour. Conclusion: The optimal technique is stable and high efficient.

**Key words:** *Ruyijinhuang* plaster; orthogonal design test; berberine; minimal inhibitory concentration

如意金黄散见于明·陈实功《外科正宗》一书<sup>[1]</sup>, 治疗外科“一切顽恶肿毒, 随手用之, 无不生效, 为疮家良便方。”百余年来一直为中医外治箍围消法的基本代表方, 全方由姜黄、大黄、黄柏等十味中药组成, 具有消肿止痛功效。由于疗效可靠、安全性高、处方合理, 被历版《中华人民共和国药典》收载<sup>[2]</sup>。

如意金黄散是纯生药粉制剂, 未经灭菌处理, 常常发现有超过规定的细菌、霉菌, 甚至致病菌; 且散剂临床应用时, 需用酒或醋或凡士林调敷, 存在着沾污衣服、换洗不便和无法携带的缺点, 本研究将原散剂研制成贴剂。

### 1 因素-水平的确定

如意金黄散原方是 10 味中药经打粉处理而制成的散剂, 用此药粉难以与贴剂基质相混匀, 而成品贴剂又无法载负较多的生药粉, 所以在制备工艺研究中先要对中药进行提取。经分析发现处方中药物成分为醇溶性, 故确立乙醇作为药材的提取溶媒, 分为 90% 和 70% 浓度二水平; 方中有些药物还含有挥

发性成分, 根据所含成分, 拟定提取方式为提取挥发油和不提取挥发油二水平; 参照外用膏生产实际, 提取时间分为 3h 和 2h 二水平, 进行三因素二水平的正交设计。见表 1。

### 2 评价指标的选择

如意金黄散具有消肿止痛的功效, 黄柏是方中君药, “泻火, 利湿, 痈肿敷良。”小檗碱为其主要成分, 具有很强的抗菌、抗病毒作用<sup>[4]</sup>, 且小檗碱含量测定方法比较成熟<sup>[5]</sup>, 故确定用 HPLC 法测定小檗碱含量为第一评价指标。如意金黄散主治疮疡肿痛、丹毒流注、跌打损伤<sup>[2]</sup>, 选择体外抑菌, 观察浸膏对常见致病菌金葡球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌的敏感性为第二评价指标。根据所制定的因素水平表, 选用  $L_8(2^7)$  正交表安排试验。

表 1 因素-水平表<sup>\*</sup>

因素水平	提取挥发油 (A)	醇浓度 (%) (B)	提取时间(h) (C)
1	-	90	3(2+ 1)
2	+	70	2(1+ 1)

### 3 实验部分

#### 3.1 小檗碱含量测定

**3.1.1 材料和仪器** 姜黄、大黄、黄柏、苍术、厚朴、陈皮、甘草、生天南星、白芷、天花粉, 购自浦东新区药材公司, 经本校中药鉴定室鉴定。510 高效液相色谱仪(美国); 486 可变波长紫外检测器; 岛津-365 紫外分光光度计; 超声波清洗仪 250 上海音波声光科技公司。对照品盐酸小檗碱(批号 0713-9906) 购自中国药品生物制品检验所; 乙腈: HPLC 用色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

**3.1.2 HPLC 色谱条件** 色谱柱:  $\mu$ -Bandapak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> 3.9 × 300mm; 流动相: 磷酸二氢钾(0.02M)-乙腈-磷酸(700: 300: 1.05); 检测波长: 350nm; 流速: 0.2cm/min; 流速: 1ml/min, 灵敏度: 0.10AVFS; 室温: 25℃; 数据处理方法: 外标峰面积法。

**3.1.3 对照品溶液的制备** 精密称取小檗碱 0.0100g, 用无水乙醇定容于 1ml 容量瓶中, 精密吸取 100 $\mu$ l, 稀释至 2ml, 作为对照品溶液, 备用。

**3.1.4 供试品的制备** 根据处方投药, 每个试验组取药总量相等。按 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) 正交设计表中所列条件进行试验, 浸膏浓缩到相同重量, 作为供试品备用。

含挥发成分的中药用水蒸气蒸馏法提取挥发油。提毕, 药渣与其他药材用乙醇提取, 挥发油加至最后浓缩好的浸膏中, 混匀即可。

**3.1.5 线性关系考察** 精密吸取标准品液 2.2.5、5.10.15.20 $\mu$ l 进行测定(见图 1), 以峰面积(Y) 与进样量(X, mg) 进行回归计算。得回归方程为:  $Y = 16388.71X - 768.25$  (Y 为峰面积, X 为盐酸小檗碱含量),  $r = 0.9999$ 。盐酸小檗碱含量在 0.1~1 $\mu$ g 范围内, 线性关系良好。

**3.1.6 精密度测定** 取同一供试品溶液, 进样量相同(10 $\mu$ l, 供试品处理方法同 3.1.8), 重复测定 5 次, RSD 为 0.8939。

**3.1.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 进样量相同(10 $\mu$ l), 测定峰面积, 每隔一小时测定一次, 共测定 5 次, RSD 为 1.49%, 表明供试液在 4h 内基本稳定。

**3.1.8 样品测定** 每份供试品取 1g 左右, 加无水乙醇, 超声提取 0.5h 后, 全部转移至 25ml 量瓶中, 用无水乙醇定容, 放置 0.5h 以上, 吸取上清液过滤, 得样品溶液, 进样测定, 每个样品测两次, 记录峰面积。用外标两点法作出回归方程, 将峰面积代入计算, 得各样品小檗碱含量(平均值), 结果见表 2~3。

表 2 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) 正交试验结果表

试验号	1 (A)	2 (B)	3	4 (C)	5	6	7	小檗碱含量 (mg/g 浸膏)
1	1	1	1	1	1	1	1	1.4482
2	1	1	1	2	2	2	2	0.8754
3	1	2	2	1	1	2	2	2.1640
4	1	2	2	2	2	1	1	0.2252
5	2	1	2	1	2	1	2	1.6459
6	2	1	2	2	1	2	1	1.1091
7	2	2	1	1	2	2	1	1.4429
8	2	2	1	2	1	1	2	0.7704
I	4.7128	5.0786	4.5369	6.7010	5.4917	4.0897	4.2254	
II	4.9683	4.6025	5.1442	2.9801	4.1894	5.5914	5.4557	
$\bar{T}$	1.1782	1.2696		1.6752				
$\bar{II}$	1.2421	1.1506		0.7450				
R	0.0639	0.1190		0.9302				

表 3 方差分析表

方差来源	SS	v	MS	F	P
A	0.0081	1	0.0081	0.04	
B	0.0283	1	0.0283	0.16	
C	1.7306	1	1.7306	9.49*	< 0.05
误差	0.7292	4	0.1823		

$$F_{0.05}(1, 4) = 7.71$$

**3.1.9 结果分析** 影响因素的大小顺序为: C > B > A。说明提取时间是影响小檗碱含量的主要因素, 醇浓度其次, 是否提取挥发油影响最小。因素 C 有显著性差异, 对结果影响大, 因素 A 由于 R 值太小, 作为误差处理。从生产成本考虑, 选择不提取挥发油。故优选工艺为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>。

**3.2 体外抑菌试验** 如意金黄散具有消肿止痛之功, 适用于红肿热痛的疮疡阳证。采用稀释法观察按正交设计表 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) (见表 1) 试验所得如意金黄浸膏对金葡球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌的抑菌作用。

**3.2.1 材料与方** 材料: 按正交设计试验方案得浸膏 1<sup>#</sup> ~ 8<sup>#</sup>

试验细菌: 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923, 埃希大肠杆菌 ATCC 25922, 铜绿假单胞菌 ATCC 25783; 培养基: MH 培养基, MH 肉汤; 方法: 肉汤稀释法<sup>[6]</sup>。

**3.2.2 样品测试** 通过体外抑菌试验表明, 如意金黄浸膏对被检菌均有不同程度的抗菌作用, 尤对金葡球菌效果显著, 结果见表 4~6。

表4 如意金黄浸膏抑菌作用的观察

试 验 号	细菌	浓度(生药 mg/ml 浸膏)								抑菌 总分
		1: 1	1: 2	1: 3	1: 5	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	
		600mg/ml	300mg/ml	200mg/ml	120mg/ml	60mg/ml	30mg/ml	15mg/ml	7.5mg/ml	
1	金葡	-	-	-	-	-	-	-	+	8.0
	绿脓	-	-	-	-	-	+	+	+	
	大肠	-	-	-	-	+	+	+	+	
2	金葡	-	-	-	-	+	+	+	+	5.0
	绿脓	-	-	-	+	+	+	+	+	
	大肠	-	-	-	+	+	+	+	+	
3	金葡	-	-	-	-	-	+	+	+	3.5
	绿脓	-	+	+	+	+	+	+	+	
	大肠	-	+	+	+	+	+	+	+	
4	金葡	-	-	-	-	+	+	+	+	3.5
	绿脓	-	-	+	+	+	+	+	+	
	大肠	-	+	+	+	+	+	+	+	
5	金葡	-	-	-	-	-	-	+	+	6.5
	绿脓	-	-	-	+	+	+	+	+	
	大肠	-	-	-	-	+	+	+	+	
6	金葡	-	-	-	-	-	+	+	+	5.5
	绿脓	-	-	-	+	+	+	+	+	
	大肠	-	-	-	+	+	+	+	+	
7	金葡	-	-	-	-	+	+	+	+	3.0
	绿脓	-	+	+	+	+	+	+	+	
	大肠	-	+	+	+	+	+	+	+	
8	金葡	-	-	-	-	-	+	+	+	3.5
	绿脓	-	+	+	+	+	+	+	+	
	大肠	-	+	+	+	+	+	+	+	

注: 1. 表中+ 表示细菌生长, - 表示未见细菌生长;“- /格”的抑菌分为 0.5 分, 抑菌总分为一浸膏对三种细菌抑菌分累加。

2. 肉汤对照: 未见细菌生长; 测试菌生长: 对照细菌生长; 测抗菌药物原液对照: 未见细菌生长。

表5 L<sub>8</sub>(2<sup>7</sup>) 正交试验抑菌结果表

试验号	1	2	3	4	5	6	7	抑菌总分
	A	B	C					
1	1	1	1	1	1	1	1	8.0
2	1	1	1	2	2	2	2	5.0
3	1	2	2	1	1	2	2	3.5
4	1	2	2	2	2	1	1	3.5
5	2	1	2	1	2	1	2	6.5
6	2	1	2	2	1	2	1	5.5
7	2	2	1	1	2	2	1	3.0
8	2	2	1	2	1	1	2	3.5
I	20.0	25.0	19.5	21.0	20.5	21.5	20.0	
II	18.5	13.5	19.0	17.5	18.0	17.0	18.5	
I	5.0	6.25	5.25					
II	4.625	3.375	4.375					
R	0.375	2.875	0.875					

表6 方差分析表

方差来源	SS	v	MS	F	P
A	0.281	1	0.281	0.310	
B	16.531	1	16.531	18.245*	< 0.05
C	1.531	1	1.531	1.690	
误差	0.3625	4	0.906		

$$F_{0.05}(1, 4) = 7.71$$

3.2.3 结果分析 浸膏对抑菌作用影响因素的大小顺序为: B > C > A。浸膏对抑菌作用影响因素的大小顺序为: B<sub>1</sub> > C<sub>1</sub> > A<sub>1</sub>, 其中因素 B 的影响最大, 分析结果表明优选提取工艺组成为 B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>A<sub>1</sub>。

#### 4 讨论

如意金黄散药味众多, 成分复杂, 提取工艺是否合理关系到新剂型的疗效和制剂质量。针对本品消肿止痛的功效、主治病证, 本研究选择两个指标来评价提取工艺, 以有效成分小檗碱的含量与体外抑菌

试验,作为对中药复方制备工艺的评价指标。这种采用多指标对如意金黄贴剂的提取工艺进行筛选,可起到全面考察,综合评价的作用。根据药学、药效学试验表明如意金黄浸膏的优选提取工艺为 $A_1B_1C_1$ 。

按以上优选工艺制成如意金黄贴剂用于临床初试验,治疗阳证疮疡,结果表明新剂型可达到原散剂的效果,又方便病人使用,达到了剂型改革的目的。

#### 参考文献:

[1] 陈伟,路一平.方剂学[M].上海:上海中医学院出版

社,1989.3:519.

- [2] 中华人民共和国药典.一部[S].北京:化学工业出版社,2000.463.
- [3] 南京药学院.药剂学[M].北京:人民卫生出版社,1985.5:836.
- [4] 《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科技出版社,1998.1:325.
- [5] 赵洪武,陈树华,林新华,等.如意金黄黑膏药提取方法研究[J].中草药,1993,24(9):473.
- [6] 俞树荣.微生物学和微生物学检验[M].北京:人民卫生出版社,1997.457-458.