

· 研究报告 ·

正交试验法优化透肤洗剂的提取工艺

彭勇¹, 陈茹静², 刘 Duo¹, 柴伟翰¹, 朱 Quangang² (1.上海市嘉定区中医医院,上海 201899;2.上海市皮肤病医院,上海 200443)

[摘要] 目的 优化透肤洗剂的提取工艺,提高透肤洗剂的质量。方法 采用正交试验法,以加水量、提取时间、提取次数为考察因素,以苦参碱的含量为考察指标,优化提取工艺。结果 最佳提取工艺的加水量是饮片量的8倍,提取2次,每次90 min。结论 该工艺合理可行、稳定性好,可保证制剂质量。

[关键词] 透肤洗剂;苦参碱;正交试验

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)02-0173-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.016

Optimization of extraction technology for Toufu irrigation by orthogonal test

PENG Yong¹, CHEN Rujing², LIU Duo¹, CHAI Weihang¹, ZHU Quangang² (1. Shanghai Jiading Hospital of TCM, Shanghai 201899, China; 2. Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200443, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction process and improve the quality of Toufu irrigation. **Methods** Matrine assay was selected to be the indicator for the extraction efficacy. Orthogonal test was used to determine the optimal water amount, extraction time and extraction frequency. **Results** The best extraction process was to extract 90 minutes twice with the water amount 8 times of the dry herbal material by weight. **Conclusion** This process is feasible and repeatable. It can be used for the quality control of the preparation.

[Key words] Toufu irrigation; matrine; orthogonal test

透肤洗剂来源于上海市嘉定区中医医院皮肤科临床常用的外洗协定方,由苦参、透骨草、地肤子、蛇床子、丹参等五味中药组成,使用时将其煎成水剂,通过熏蒸、塌渍等方法将药物作用于湿疹等患处,临床应用20多年,效果满意。为进一步提高该洗剂的质量,改善临床疗效,本实验在参考相关文献^[1,2]的基础上,采用正交试验法优化其提取工艺。

1 仪器与试药

1.1

高效液相色谱仪(Agilent 1200 Series);电热恒温水浴锅(XMTE-8112型,山海精宏实验设备有限公司);万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器

系统有限公司);三用紫外分析仪(WFH-203B型,上海驰唐仪器有限公司);超声波清洗仪(CQ-250-DST型,上海跃进医用光学器械)。

1.2

苦参碱对照品(批号:110805-200508)、蛇床子素(批号:110822-201308)、原儿茶醛(批号:110810-200205)均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇(色谱纯,Merck公司,批号:1687507323),乙腈(色谱纯,Merck公司,批号:1684930320);其他试剂均为化学纯。

1.3

苦参(产地内蒙古,批号:151120-1,上海万仕诚国药制品有限公司),透骨草(产地河北,批号:20141007,上海雷允上中药饮片厂),丹参(产地山东,批号:YT2015020421,上海华宇药业有限公司),地肤子(产地河北,批号:LY1409017,上海华宇药业有限公司),蛇床子(产地山东,批号:HY2014073002,上海华宇药业有限公司)。

2 方法与结果

2.1

[基金项目] 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-JSFC-2-2001);上海市科委创新行动计划生物医药项目(17401901800)

[作者简介] 彭勇,硕士研究生,主治医师,研究方向:中医药治疗皮肤病的临床和基础研究, Tel:13916769436, Email: pengyongtcm@163.com

[通讯作者] 朱全刚,博士,主任药师,研究方向:皮肤药理学研究, Email: qgzhu@126.com

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-磷酸缓冲盐(pH=6.8),

加入 0.3% 三乙胺)-甲醇=(18:64:18); 检测波长 220 nm, 柱温 40 °C, 进样量 20 μl, 流速 1 ml/min。苦参碱成分峰不受干扰, 符合测定要求。

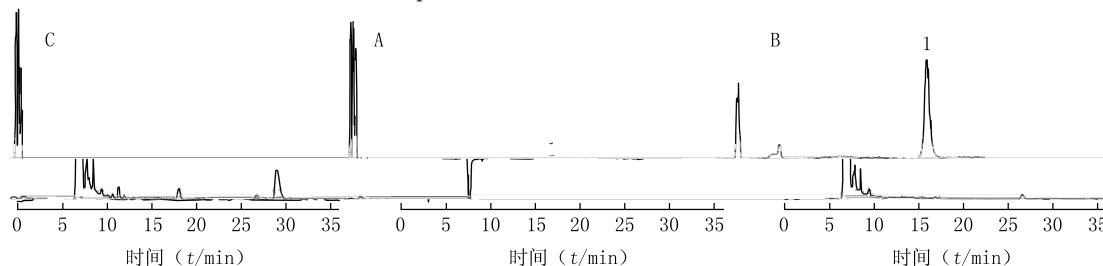


图1 苦参碱 HPLC 图

A. 供试品溶液; B. 对照品溶液; C. 阴性样品溶液; 1. 苦参碱

2.1.2 溶液的制备

(1)对照品溶液: 精密称取苦参碱对照品适量, 置 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 265 μg/ml 的对照品溶液。

(2)供试品溶液: 精密量取透肤洗剂或“2.2.2”项下的提取液 0.2 ml, 置 10 ml 容量瓶中, 用 90% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

(3)阴性样品溶液: 按处方比例称取缺苦参的其他中药, 按照透肤洗剂制备方法制成不含苦参的阴性样品, 再按上述(2)方法操作, 即得。

2.1.3 线性关系考察

分别精密量取对照品溶液适量, 置 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得到浓度为 8.28~132.50 μg/ml 的系列标准溶液, 进样量 20 μl。以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归, 得标准曲线方程 $Y = 17.447 X - 36.356 (r = 0.9999, n = 5)$ 。

2.1.4 精密度试验

(1)日内精密度: 取低、中、高 3 个浓度的标准溶液, 每个浓度连续进样 6 次, 记录苦参碱峰面积, 计算 RSD 分别为 1.3%、1.9%、2.0% (n=6)。

(2)日间精密度: 取低、中、高 3 个浓度的标准溶液, 连续进样 5 d, 记录苦参碱峰面积, 计算 RSD 分别为 1.4%、2.3%、0.9% (n=5)。

2.1.5 稳定性试验

按照“2.1.2”项下(2)方法制备 1 份供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 记录苦参碱峰面积, 计算 RSD 为 0.9% (n=7)。

2.1.6 重复性试验

按照“2.1.2”项下(2)方法制备 6 份供试品溶液, 依次进样测定, 记录苦参碱峰面积, 计算 RSD 为 2.5% (n=6)。

2.1.7 加样回收率试验

取“2.1.2”项下(3)阴性样品溶液, 分别加入低、中、高 3 个浓度的对照品溶液, 进样测定峰面积, 代入标准曲线计算测得低、中、高 3 个样品的加样回收率。结果表明, 所建立的 HPLC 方法准确、精密、稳定, 可用于透肤洗剂提取工艺优化试验及质量标准研究中苦参碱成分的含量测定。

表1 苦参碱加样回收率试验结果(n=3)

加入量 (m/μg)	测得量 (m/μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
71.26	73.41	103.02	103.79	0.63
71.26	73.92	103.73		
71.26	74.56	104.63		
127.25	124.12	97.54	98.65	3.38
127.25	131.29	103.17		
127.25	121.19	95.24		
159.06	158.46	99.62	97.41	1.76
159.06	151.82	95.45		
159.06	154.54	97.16		

2.2

2.2.1 正交试验设计及样品制备

以苦参碱含量为考察指标, 采用 L₉(3⁴) 正交试验设计表, 考察加水量(A 因素)、提取时间(B 因素)、提取次数(C 因素)这 3 个因素对提取效果的影响, 优选出最佳提取工艺。正交试验设计见表 2。按处方量(苦参 30 g, 地肤子 30 g, 蛇床子 15 g, 丹参 30 g, 透骨草 30 g)平行称取 9 份药材, 每份 135 g, 根据表 2 设计的因素和水平进行提取、浓缩、过滤, 定容 100 ml, 备用。

2.2.2 样品含量测定

按照“2.1.2”项下(2)方法制备 9 份供试品溶液, 进样测定, 代入标准曲线计算, 结果得到各样品

表2 苦参碱提取工艺的正交试验因素水平表

水平	加水量 (A因素,倍)	提取时间 (B因素,t/min)	提取次数 (C因素,次)
1	6	30	1
2	8	60	2
3	10	90	3

中苦参碱含量分别为:26.04、44.35、58.83、61.53、46.96、44.79、43.98、34.53、74.17 μg/ml。

2.2.3 正交试验分析

根据表3,对正交试验所得样品的苦参碱含量结果做直观分析,根据极差R的大小,得出各因素的影响顺序为C>B>A,优选工艺条件为C₂B₃A₂,即加水量为药材量的8倍,提取2次,每次90 min。由表4的方差分析结果可见,各考察因素对提取工艺均无显著影响。

表3 苦参碱提取工艺的正交试验结果

序号	A因素	B因素	C因素	D因素 (误差)	苦参碱含量 (mg/ml)
1	1	1	1	1	26.04
2	1	2	2	2	44.35
3	1	3	3	3	58.83
4	2	1	2	3	61.53
5	2	2	3	1	46.96
6	2	3	1	2	44.79
7	3	1	3	2	43.98
8	3	2	1	3	34.53
9	3	3	2	1	74.17
K ₁	43.07	43.85	35.12	49.06	
K ₂	51.09	41.95	60.02	44.37	
K ₃	50.89	59.26	49.92	51.63	
R	8.02	17.31	24.90	7.26	

表4 苦参碱提取工艺的方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	F值	P值
A因素	125.51	2	0.23	>0.1
B因素	541.06	2	1.01	>0.1
C因素	940.86	2	1.76	>0.1

$F_{0.10(2,2)}=9.0$, $F_{0.05(2,2)}=19.0$, $F_{0.01(2,2)}=99.0$

2.2.4 工艺验证实验

根据上述优化工艺,重复提取3批,按“2.2.2”项样品含量测定方法进行测定,换算得到3批提取液中苦参碱浓度分别为5.35、5.56、5.35 mg/ml (RSD为2.24%),说明提取工艺稳定,重现性好。

3 讨论

透肤洗剂由苦参、透骨草、地肤子、蛇床子、丹参

五味中药组成,方中君药苦参清热燥湿、杀虫止痒;臣药透骨草祛风除湿,地肤子清热祛湿;佐以蛇床子祛风止痒,丹参活血祛风,全方共奏清热利湿、祛风止痒之功。

苦参为豆科植物苦参属的干燥根,李时珍在《本草纲目》中用“苦以味名,参以功名”概述其功效。其外治用于赤白带下,阴肿阴痒,湿疹,湿疮,皮肤瘙痒,疥癣麻风等^[3]。有学者对古今湿疹处方进行分析^[4]发现,清热燥湿解毒药物在中药外治湿疹上应用最为广泛,尤以苦参使用频率最高,并总结分析了中药外用的剂型选择,发现使用最多的是溶液剂。溶液有清洁、止痒、消肿、收敛、清热解毒的作用,适用于急性皮肤病,渗出较多或脓性分泌物多的皮损,在临床应用中将溶液剂用于浸泡、熏蒸,还能起到软化角质、减轻肥厚皮损的作用。

对苦参的化学研究较为系统,主药成分以生物碱类苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱、氧化槐果碱和槐定碱以及黄酮类三叶豆紫檀苷为代表^[5]。现代药理学研究证实,苦参碱具有抗炎、免疫抑制、抗纤维化作用^[6],可用于治疗瘙痒性、炎症性、免疫性等皮肤疾病的治疗^[7]。本研究采用水煎煮法^[8],以苦参碱含量为指标,应用正交试验法,对透肤洗剂的提取工艺进行优化,得出最佳提取工艺为加水量是饮片量的8倍,提取2次,每次90 min,药材在提取前应浸泡2 h,使其吸水完全,组织浸润疏松,有利于有效成分的溶出。根据优化工艺,重复提取3批,对工艺进行验证,表明该工艺稳定可行,重现性好。本研究建立的苦参碱含量测定方法,可作为其质量控制指标之一,其他活性成分的控制还有待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] 杨 霄,于喜水,金哲雄.苦参生物碱提取工艺研究进展[J].黑龙江医药,2013,26(3):425-427.
- [2] 王光函,张 宏,姜 鸿,等.基于苦参碱含量的中药失眠小复方提取工艺研究[J].时珍国医国药,2015;26(11):2673-2674.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2015年版(一部)[S].北京:化学工业出版社,2015:202-203.
- [4] 娄方璐,刁庆春,刘 毅,等.湿疹中医外治处方用药规律分析[J].陕西中医,2012,33(1):97-100.
- [5] 张 翅,马 悦,高慧敏,等.苦参化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(4):205-214.
- [6] 智 信,陈 晓,苏佳灿.苦参碱药理作用研究进展[J].成都中医药大学学报,2017;40(1):123-127.
- [7] 吴芳妮,张 芊,张春雷.苦参在T细胞介导的皮肤良恶性疾病中的应用进展[J].中国皮肤性病杂志,2016,30(8):847-849.
- [8] 郭德祥,郭亚楠,李向阳.苦参碱的提取纯化工艺研究[J].河南畜牧兽医(综合版),2013(3):12-14.

[收稿日期] 2017-11-27 [修回日期] 2017-12-04

[本文编辑] 李睿旻