

# 正交试验优选正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺<sup>△</sup>

蔡小玲\*, 秦贻强, 莫庆优, 陈越(桂林医学院附属医院药学部, 广西桂林 541001)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3288-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.08

**摘要** 目的: 优选正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺条件。方法: 以丹皮酚含量为评价指标, 加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 通过正交试验对正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺进行优选。结果: 优选的最佳工艺条件为加12倍的水煎煮提取2次, 每次2 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行、操作方便, 为正骨洗剂的制备提供了试验依据。

**关键词** 正骨洗剂; 提取工艺; 丹皮酚; 正交试验

## Optimization of the Extraction Technology of Paeonol in Bonesetting Lotion

CAI Xiao-ling, QIN Yi-qiang, MO Qing-you, CHEN Yue (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Paeonol in Bonesetting lotion. METHODS: The extraction technology of Paeonol in Bonesetting lotion was optimized by orthogonal test with paeonol content as the index, using the amount of added water, decocting time and decocting times as factors. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: 12-fold water, decocting for 2 times, 2h every time. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is feasible and easy in operation, and can provide reference for the preparation of Bonesetting lotion.

**KEYWORDS** Bone setting lotion; Extraction technology; Paeonol; Orthogonal test

成的。按星点设计表安排试验后, 对试验结果借助计算机统计软件SPSS、SAS、Statistic等进行多元回归和非线性估计, 以建立拟合度好、相关性高的回归模型, 并结合效应面法描绘三维效应面或二因素的等高线图, 从中获得最佳工艺参数范围<sup>[7-8]</sup>。

星点设计-效应面法能反映出连续自变量的改变对考察指标的影响, 精确度更高, 现已广泛用于药学研究领域。曲面的变化趋势反映了自变量对考察指标的影响程度, 曲面越陡峭影响越显著, 反之越平滑影响越小。本试验的自变量均为连续变量, 可选择星点设计-效应面法设计试验, 对于非连续变量可分别考察。

对多糖质量的测定多以 $d$ -无水葡萄糖为对照品, 采用苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法等。苯酚易氧化, 且毒性较大<sup>[9]</sup>, 故本试验采用蒽酮-硫酸法测定。测定波长文献报道不一, 黄精多糖的含量测定, 有文献报道采用蒽酮-硫酸法, 测定波长为625 nm<sup>[10]</sup>; 2010年版《中国药典》中, 黄精饮片中多糖的测定波长为582 nm<sup>[6]</sup>。本方为复方, 成分之间的相互影响导致其最大吸收波长发生变化, 故在测定样品的吸光度之前要进行全波长扫描以确定最大吸收波长。本试验以 $d$ -无水葡萄糖作为对照品, 与水提样品溶液均采用蒽酮-硫酸法处理, 在400~700 nm波长范围内扫描, 最终确定最大吸收波长为582 nm。

## 参考文献

- [1] 李友元, 邓红波, 向大雄, 等. 黄精多糖的降血脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 429.
- [2] 胡敏, 王琴, 周晓东, 等. 黄精药理作用研究进展及其临床应用[J]. 广东药学, 2005, 15(5): 68.
- [3] 张华锋, 高征, 罗亚飞, 等. 海藻子活性多糖降血脂作用的研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1 925.
- [4] 谢苗, 钟剑霞, 甘纯玢. 海藻多糖的药用功能与展望[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(8): 513.
- [5] 胡婷婷. 海藻多糖的生物活性研究进展[J]. 科技视界, 2012(36): 17.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 288.
- [7] 王跃生, 欧阳旭, 王丹辉, 等. 数学模式试验设计方法的优缺点比较及其在中药研究应用中的适宜性分析[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 207.
- [8] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 455.
- [9] 苏玉顺, 李艳君, 赵方振, 等. 紫外-可见分光光度法在植物多糖含量测定中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3): 1 101.
- [10] 徐艳, 曹松屹, 边际. 超声粉碎与传统方法提取黄精多糖的分析比较[J]. 食品研究, 2008, 29(3): 99.

(收稿日期: 2013-10-27 修回日期: 2014-03-23)

<sup>△</sup> 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(No.GZYZ1226)

\* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0773-2837023。

E-mail: 516442235@qq.com

正骨洗剂是桂林医学院附属医院骨外科集多年临床经验的中药验方,由牡丹皮、红花、川芎、防风等11味中药提取精制而成,用于治疗跌打损伤、风湿骨痛等症。二十多年的临床应用效果证实,该洗剂具有舒筋活络、消肿止痛、活血祛瘀的功效,用于各种原因造成的跌打扭伤、骨折、关节肿痛、脱臼、软组织损伤、瘀血等效果良好;并对风湿骨痛具有较好的防治效果,尤其对劳力过度所致的痹症,能缓解各种疲劳、肌肉酸痛、痉挛、四肢麻木,且应用过程中无明显副作用。由于正骨洗剂为中药煎煮而成,原药液在临床应用时才煎煮,使用极为不便,既不利于及时控制伤情、病情,也不便于携带、存放。为了克服以上缺点,本课题组对本洗剂进行深入研究,开发成制剂。为了进一步控制本品质量并确保其临床疗效,笔者对其制备工艺进行了研究。根据本方传统用法为水煎煮外用,结合方中药材所含的活性成分多为水溶性物质,并参考相关文献<sup>[1-6]</sup>,采用水提精制的工艺路线,并对水提工艺参数进行了优化研究,以处方中所含主要有效成分之一的丹皮酚含量作为评价指标,并与实际生产相结合,优选出最佳提取工艺条件。

## 1 材料

### 1.1 仪器

AEL2-200型电子天平、LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);威玛龙通用多媒体色谱数据工作站(北京北方威玛龙科技有限公司)。

### 1.2 药材

牡丹皮、红花、川芎、防风等11味药材均购于桂林三山医药公司,经笔者鉴定为真品。

### 1.3 试剂

丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110708-200506);试验所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 丹皮酚的含量测定<sup>[7-9]</sup>

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(60:40, V/V);检测波长:274 nm;柱温:室温;进样量:10 μl。理论板数按丹皮酚峰计算,应不低于2 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取丹皮酚对照品适量,加80%甲醇溶液制备成每1 ml含20 μg的丹皮酚对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取正骨洗剂10 ml,置50 ml量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率:250 W,频率:33 kHz)15 min,放冷,加甲醇定容,摇匀,取上清液,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性干扰试验 取缺牡丹皮的阴性对照样品适量,按“2.1.3”项下制备方法制备阴性对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,阴性对照品在丹皮酚出峰位置无吸收峰,表明处方中其他成分无干扰。

2.1.5 标准曲线的制备 精密称取丹皮酚对照品10.70 mg,置250 ml量瓶中,加80%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对

照品贮备溶液。精密量取1、2、3、5、10 ml对照品贮备溶液,分别置10 ml量瓶中,加80%甲醇定容,摇匀,分别作为对照品溶液(质量浓度分别为4.28、8.56、12.84、21.40、42.80 mg/ml)。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以丹皮酚对照品进样量( $x$ , mg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标( $y$ ),进行线性回归,得回归方程为 $y=4148\ 720x-6\ 013.25(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,丹皮酚对照品进样量在0.043~0.428 mg范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样连续测定6次。结果,峰面积的RSD=0.67%( $n=6$ ),表明本方法精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样连续测定6次。结果,丹皮酚平均质量浓度为10.46 μg/ml,RSD=0.61%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 于0、1、2、4、6、8、12 h分别精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液10 μl,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。结果,峰面积的RSD=0.92%( $n=7$ ),表明在12 h内供试品溶液稳定。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取丹皮酚对照品5.36 mg,置100 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,作为回收对照品溶液(质量浓度为53.6 mg/ml)。精密量取已知丹皮酚质量浓度为10.46 mg/100 ml的供试品5 ml,置50 ml量瓶中,平行取样6份,分别精密加入5 ml水和10 ml上述回收对照品溶液,加甲醇适量,超声处理(功率:250 W,频率:33 kHz)15 min,放冷,加甲醇定容,摇匀,取上清液,滤过,取续滤液,进样测定,计算回收率。结果,平均加样回收率为99.22%,RSD=0.70%( $n=6$ ),表明本方法符合定量分析的要求。

### 2.2 正交试验设计

2.2.1 因素与水平 选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计,选取加水量(A)、煎煮时间(B)和煎煮次数(C)作为考察因素,以提取液中丹皮酚含量(mg/100 ml)为考察指标,每个因素选定不同的水平进行试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A,倍	B,h	C,次
1	8	1	1
2	10	2	2
3	12	3	3

2.2.2 正交试验结果 取同批次药材,适度粗碎,按处方比例准确称取9份,每份为2倍处方量,在平行操作条件下,按不同工艺条件组合进行提取,提取液合并,滤过,浓缩,加入适量水定溶至2 000 ml,搅拌均匀,静置24 h,滤过,滤液作为供试品溶液,进样测定丹皮酚含量。正交试验结果见表2。

2.2.3 方差分析结果 根据均方的大小可知,因素的主次关系是A>C>B,其中A和C因素具有显著性,最佳条件为

A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>。方差分析结果见表3。

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

No.	A	B	C	D	丹皮酚含量,mg/100 ml
1	1	1	1	1	6.56
2	1	2	2	2	11.51
3	1	3	3	3	8.03
4	2	1	2	3	11.29
5	2	2	3	2	10.94
6	2	3	1	1	8.95
7	3	1	3	2	12.14
8	3	2	1	1	13.21
9	3	3	2	3	13.63
K <sub>1</sub>	26.10	29.99	28.72	31.13	
K <sub>2</sub>	31.18	35.66	36.43	32.60	
K <sub>3</sub>	38.98	30.61	31.11	32.53	
K <sub>1</sub> <sup>2</sup>	681.21	899.40	824.84	969.08	
K <sub>2</sub> <sup>2</sup>	972.19	1 271.64	1 327.14	1 062.76	
K <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1 519.44	936.97	967.83	1 058.20	
R	28.06	6.45	10.38	0.46	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	28.06	2	14.03	61.21	<0.05
B	6.45	2	3.22	14.07	>0.05
C	10.38	2	5.19	22.65	<0.05
误差	0.46	2	0.23	1.00	

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

note:  $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

### 2.3 验证试验

取同批次药材,按10倍处方比例称取各味药材,共3份,按上述优选的水煎煮提取最佳方案进行提取,滤过,浓缩,加入适量水定容至10 000 ml,搅拌均匀,静置24 h,滤过,滤液作为供试品溶液,测定丹皮酚含量。结果,3份提取液中丹皮酚的质量浓度分别为11.95、12.48、11.71 mg/100 ml,表明按优选得到的提取工艺条件进行提取,其丹皮酚含量稳定在较优水平,说明优选得到的提取工艺条件合理、可行,因此确定正骨洗剂提取工艺的最佳条件为加12倍水煎煮提取2次,每次2 h。

### 3 讨论

正交试验及验证试验的结果表明,正骨洗剂的最佳提取工艺为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即加12倍水煎煮提取2次,每次2 h。

提取液浓缩至相对密度约为1.01(70 ℃)时,药液体积超过处方体积总量,药液浓度低;浓缩至相对密度为1.08(70 ℃)时,药液体积已远少于处方药液体积,且药液受热时间较长;浓缩至相对密度为1.03~1.05(70 ℃)时,药液体积接近理论所需体积,且节约能源,生产效率较高,能较好地控制药液受热时间,故选择将药液浓缩至相对密度为1.03~1.05(70 ℃),再稀释至理论值。

本研究中,丹皮酚含量并不是考量的唯一标准<sup>[10]</sup>,还要综合考虑实际生产中的效益问题和保证药物稳定性等。

### 参考文献

- [1] 郑仁礼,余忠.正交设计优选复方护肺颗粒水煎醇沉提取工艺[J].中国药师,2010,22(3):436.
- [2] 郭未艳,孙秋燕,徐晓红.滇黄精多糖提取的工艺组合及其优化[J].时珍国医国药,2013,24(6):1 391.
- [3] 付起凤,孟凡佳,苗青,等.牡丹皮中丹皮酚提取工艺的研究进展[J].中医药信息,2010,27(6):108.
- [4] 廖银根,丁志军,罗美兰,等.正交试验优选荆防止咳颗粒提取工艺[J].中国药房,2011,22(39):3 673.
- [5] 王晖,张丽艳,杨玉平,等.正交试验法优化疏毛茛菪提取工艺[J].中国民族民间医药,2010,(23):52.
- [6] 陈红红,郭姣,唐春萍,等.正交试验法优选复方降脂灵的提取工艺[J].时珍国医国药,2009,20(8):1 988.
- [7] 孙瑛蔚,徐芝育.高效液相色谱法测定蒲黄止血口服液中丹皮酚的含量[J].吉林中医药,2010,30(2):172.
- [8] 刘智生,李嘉,黄建猷.乳康酊的薄层鉴别及丹皮酚的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):50.
- [9] 吴振宇,王书婷,蒋英,等.HPLC法对舒新片中丹皮酚的含量测定[J].现代生物医学进展,2012,12(30):5 930.
- [10] 张守平,李广华,张杰.关于中药提取正交试验设计的疑问和探讨[J].齐鲁药事,2011,30(9):546.

(收稿日期:2014-01-26 修回日期:2014-04-25)

## 国家卫生计生委副主任崔丽前往民主党派中央交流提案建议工作

本刊讯 2014年5-6月,国家卫生计生委副主任崔丽率队分别前往农工党中央、致公党中央和九三学社中央,与全国人大常委会副委员长、农工党中央主席陈竺,致公党中央副主席蒋作君,全国政协副秘书长、九三学社中央常务副主席邵鸿,全国政协常委、九三学社中央副主席赖明等就卫生计生提案建议工作进行座谈。

崔丽副主任首先感谢各民主党派中央长期以来对卫生计生工作的重视和支持,提出了很多高质量的提案,对卫生计生事业发展发挥了重要作用。崔丽副主任介绍了2014年国家卫生计生委提案办理工作情况,报告了2014年卫生计生重点工作。崔丽副主任强调,希望与三个党派在多方面加强合

作:一是推动卫生立法,深化医药卫生体制改革;二是促进我国社区卫生服务发展;三是加强医政医管工作,提高医疗服务质量;四是大力发展社会办医,培育现代医疗服务业;五是大力发展养老服务业,应对人口老龄化;六是完善分级诊疗制度等。

三个党派的领导同志表示,希望继续加强与国家卫生计生委的合作,积极发挥自身优势,做好参政议政工作。今后,将致力于进一步推进医药卫生体制改革,围绕卫生立法、深化基层医疗卫生机构综合改革、加快公立医院改革、鼓励社会办医、促进人口长期均衡发展等方面开展调查研究并积极建言献策。