

正交设计法优选香白通络巴布膏药材的提取方法

张 钦 任世禾

(上海中医药大学附属中医医院, 200071)

关键词 @ 香白通络巴布膏药; 正交设计法

香白通络巴布膏由白芥子、乳香、冰片等药物组成,由本院脑病科根据多年临床实践组方而成,具有祛风通络、牵正口喎之功效,用于穴位敷贴治疗面瘫,疗效显著。白芥子为方中君药,取其祛风通络、化痰散结之功效,文献资料^[1-2]表明白芥子、乳香的主要活性成分适宜于乙醇提取。本文拟采用正交设计法,以白芥子中主要成分芥子碱硫氰酸盐的含量及提取物浸膏得率为考察指标,优选药材的最佳乙醇回流提取工艺条件,为合理提取药物的有效成分提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 HPLC series, Degasser G1322A, QuatPump G1311A, TCC G1316A, DAD G1315D 色谱仪(美国安捷伦公司);SK7210HP 型超声波清洗机(上海科岛超声仪器有限公司);HWS-11 型电热恒温水浴锅(上海慧泰仪器有限公司);RE52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂 白芥子(批号:LY09110023,产地:甘肃)、乳香(批号:100304,产地:埃塞俄比亚)药材取自本院中药房,符合《中国药典》2010 年版一部的有关规定。乙腈色谱纯(上海强顺化学试剂有限公司),磷酸二氢钾分析纯(天津永大化学试剂)。芥子碱硫氰酸盐对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111702-200501),重蒸馏水(实验室自制)。

2 方法及结果

2.1 芥子碱硫氰酸盐含量测定

2.1.1 色谱条件 参照有关文献^[3],以乙腈(流动相 A)-0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液(流动相 B)为流动相。实验比较了流动相 A: 流动相 B=30:70 及 20:80 两种不同比例流动相系统对峰形的影响,结果显示当流动相 A: 流动相 B=30:70 时,出峰时间较早,峰形较好,图谱见图 1、2。确定色谱条件:资生堂 C18 色谱柱(250mm×4.6mm,5 μ m);流动相为乙腈:0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液=30:70;流速 1.0mL/min;柱温为室温;进样量 20 μ L;检测波长 326nm。

2.1.2 溶液的制备 对照品溶液的制备:精密称取芥子碱硫氰酸盐标准品(五氧化二磷干燥器中减压干燥

48h)5.0mg,置 25mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为 0.2mg·mL⁻¹的对照品溶液。供试品溶液的制备:取白芥子、乳香粗粉各 10g,加 6 倍量 50% 乙醇浸渍 30min,80 $^{\circ}$ C 回流 2h,减压浓缩至干浸膏。取浸膏适量,加流动相溶解,30 $^{\circ}$ C 超声 10min,定容至 10mL,过 0.45 μ m 微孔滤膜,作为供试品溶液。

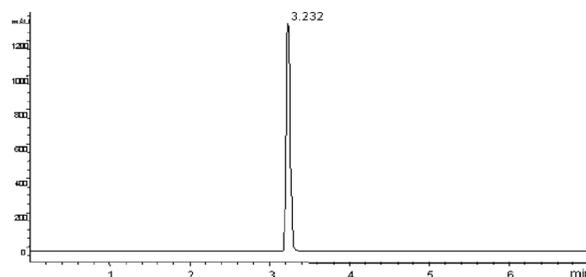


图 1 芥子碱硫氰酸盐对照品 HPLC 色谱图,流动相为乙腈:0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液=30:70

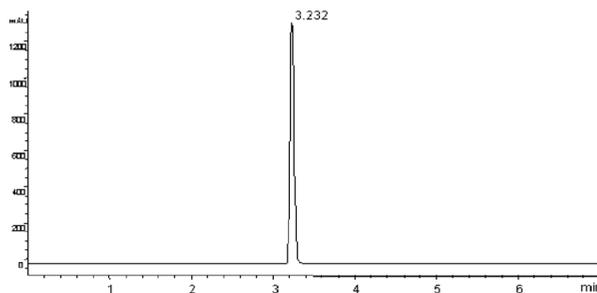


图 2 芥子碱硫氰酸盐对照品 HPLC 色谱图,流动相为乙腈:0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液=20:80

2.1.3 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下的对照品溶液 2、3、4、5、6mL,以流动相稀释并定容至 10mL,配制成浓度分别为 0.04mg·mL⁻¹、0.06mg·mL⁻¹、0.08mg·mL⁻¹、0.10mg·mL⁻¹、0.12mg·mL⁻¹ 的标准品溶液,过 0.45 μ m 微孔滤膜。注入液相色谱仪分析。以峰面积积分值为纵坐标,进样浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 38041.3974 + 192.0128X$, $r = 0.9957$,在 0.04mg·mL⁻¹~0.12mg·mL⁻¹ 范围内,线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 20 μ L,重复进样 6 次,测定芥子碱硫氰酸的峰面积。结果峰面积平均值为 4539.2, RSD=0.89%,表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取“2.1.2”项下的供试品溶液 20 μ L, 分别于 0、2、4、6、8h 进样, 测定芥子碱硫氰酸盐各时间点的峰面积。结果, 峰面积平均值为 3541.9, RSD = 1.39%, 表明供试品溶液在 8h 内稳定。图谱见图 3。

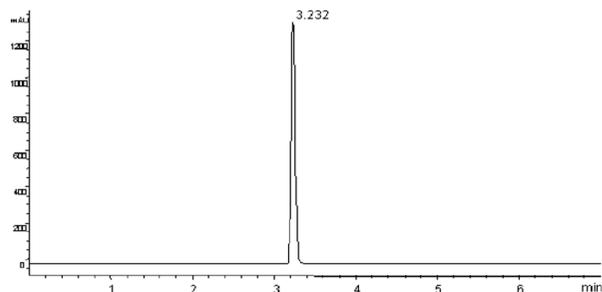


图 3 供试品 HPLC 色谱图

2.2 正交设计筛选药材的提取工艺

2.2.1 因素与水平的设计 以白芥子中主要成分芥子碱硫氰酸盐的含量及提取物浸膏得率为考察指标, 筛选白芥子、乳香 2 药合并乙醇提取的最佳工艺条件。选取影响较大的 3 个因素乙醇浓度(A)、溶剂用量(B)、提取时间(C), 按照正交设计表 L₉(3⁴) 进行考察, 每个因素设计 3 个水平, 提取次数为 1 次, 因素水平安排见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	乙醇浓度/%	溶剂用量/倍	提取时间/h
	A	B	C
1	50	6	2
2	60	8	1.5
3	70	10	1

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取白芥子、乳香药材粗粉, 按表 2 设定的因素水平, “2.1.2”项下供试品溶液制备方法制备。

2.2.3 芥子碱硫氰酸盐含量的测定 吸取上述定容溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 测得峰面积积分值, 代入回归方程, 计算芥子碱硫氰酸盐含量, 结果见表 2, 方差分析见表 3、4。由表 2 得出: 影响香白通络巴布膏药材提取物得率的 3 个因素中, 提取溶剂用量(因素 B)的极差值最大, 说明溶剂用量的影响最大, 其次是提取时间(因素 C)和乙醇浓度(因素 A)。考虑到巴布剂对载药量有限, 提取物浸膏得率低有利于巴布剂成型, 所以最佳提取条件是 A₁B₁C₁。影响芥子碱硫氰酸盐提取量的 3 个因素中, 乙醇浓度(因素 A)的极差值最大, 说明乙醇浓度的影响最大, 其次是溶剂用量(因素 B)和提取时间(因素 C)。所以最佳提取

万方数据

条件是 A₂B₂C₃。由表 3、4 可知: 乙醇浓度、溶剂用量、提取时间 3 个因素对提取物浸膏得率及芥子碱硫氰酸盐提取量的影响均无显著性差异。

表 2 正交试验方案与结果

试验号	因素			提取物浸膏得率/%	芥子碱硫氰酸盐含量/mg·g ⁻¹
	A	B	C		
1	1	1	1	10.96	6.5638
2	1	2	2	11.35	6.8637
3	1	3	3	10.94	5.8406
4	2	1	2	10.52	6.0767
5	2	2	3	11.54	8.6597
6	2	3	1	12.05	6.8146
7	3	1	3	10.97	5.7294
8	3	2	1	10.11	5.4660
9	3	3	2	14.52	5.8573
K ₁	33.25	32.45	33.12		
K ₂	34.11	33	36.39		
K ₃	35.60	37.51	33.45		
R _{得率}	0.78	1.69	1.09		
K ₁	19.2681	18.3699	18.8444		
K ₂	21.5510	20.9884	18.7977		
K ₃	17.0527	18.5125	20.2297		
R _{芥子碱}	1.4994	0.8728	0.4773		

表 3 提取物浸膏得率方差分析结果

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性 P
A	0.94	2	0.47	0.19	P > 0.05
B	5.14	2	2.57	1.04	P > 0.05
C	2.16	2	1.08	0.44	P > 0.05
误差	4.95	2	2.48		

表 4 芥子碱硫氰酸盐测定数据方差分析结果

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性 P
A	3.3728	2	1.6864	1.4757	P > 0.05
B	1.4324	2	0.7162	0.6267	P > 0.05
C	0.4414	2	0.2207	0.1931	P > 0.05
误差	2.2855	2	1.1428		

2.2.4 验证试验 为了确定提取条件, 并考察 A₁B₁C₁、A₂B₂C₃ 2 种提取工艺的稳定性, 精密称取白芥子、乳香药材粗粉各 10g, 按上述 2 种工艺条件乙醇回流提取, 平行试验 3 份。按上述浸膏的制备及供试液的制备与测定方式进行测定、计算, 结果见表 5。验证试验结果表明, 2 种提取工艺条件均较为稳定。A₂B₂C₃ 条件下提取物中芥子碱硫氰酸盐的含量较高, 该工艺条件相较于 A₁B₁C₁ 条件下的提取物浸膏得率略高。由于君药的主要成分芥子碱硫氰酸盐是药物疗效发挥的主要影响因素, 而提取物浸膏得率仅对巴布剂成型工艺产生影响, 因此, 为了提高药物疗效, 选择 A₂B₂C₃ 为最佳提取工艺条件, 即乙醇浓度为 60%, 溶

剂用量为 8 倍量,提取时间为 1h。

表 5 验证试验结果

提取条件	试样号	提取物浸膏得率 /%	芥子碱硫氰酸盐含量 /mg·g ⁻¹
A ₁ B ₁ C ₁	1	10.73	6.1988
	2	10.96	6.5638
	3	10.93	6.3877
A ₂ B ₂ C ₃	1	11.54	8.6597
	2	11.96	8.9530
	3	12.50	8.3468

3 讨论

3.1 2010 年版《中国药典》一部“芥子”项下所列芥子碱硫氰酸盐的 HPLC 含量测定方法已由“苯基色谱柱、乙腈-3% 醋酸梯度洗脱流动相系统”改为“C18 色谱柱、乙腈-0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液流动相系统”。本实验对流动相中乙腈、磷酸二氢钾的比例进行考察,确定流动相为乙腈:0.08mol/L 磷酸二氢钾溶液=30:70,系统适应性试验表明该分析方法快速、精确。

3.2 经正交筛选得到最佳提取工艺为:将药材粗粉加

入药材量 8 倍的 60% 乙醇,浸渍 0.5h,热回流 1h。药材应提前粉碎成粗粉,药材不经粉碎不利于有效成分溶出,粉碎过细,提取液过于黏稠,过滤困难。优化后的提取工艺溶剂用量适中,提取时间较短,可节约制剂生产成本。

3.3 正交试验表明,提取时间虽然不是影响提取物得率的主要因素,但是随着提取时间的延长,提取物得率出现先升后降的趋势,推测可能是由于药材中挥发性成分较多,随提取时间延长而损失,所以提取时间不宜过长。本实验仅对处方中君药白芥子所含的芥子碱硫氰酸盐进行检测,建议对提取物中挥发性成分进行含量测定,进一步控制制剂质量。

参考文献

- [1] 李小莉,张迎庆,黄通华. 白芥子提取物的抗炎镇痛作用研究. 现代中药研究与实践,2007,21(6):28-30.
- [2] 郑杭生,冯年平,陈佳,等. 乳香没药的提取工艺及其提取物的镇痛作用. 中成药,2004,26(11):956-958.
- [3] 杜松云,李其兰,余军,等. RP-HPLC 法测定白芥子中芥子碱硫氰酸盐的含量. 中国药房,2007,18(27):2126-2128.

(2011-01-05 收稿)◎

中西医结合治疗慢性肾炎蛋白尿 32 例

丁 劲

(四川省宣汉县胡家中心卫生院,四川宣汉,636154)

关键词 慢性肾炎蛋白尿/中西医结合治疗

笔者自 2006 年以来运用中西医结合治疗慢性肾炎蛋白尿 32 例,收较好疗效,现介绍如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 48 例均为门诊患者,全部病例均符合王海燕主编的《肾脏病学》中有关慢性肾小球肾炎的诊断标准^[1]。随机分为治疗组 32 例和对照组 16 例。治疗组 32 例中,年龄最小 10 岁,最大 60 岁,病程 2~10 年,其中重度 10 例(尿常规检查蛋白尿持续+++~++++,血清肌酐≥133~442μmol/L),中度 15 例(蛋白尿持续++~+++ ,肾功能正常),轻度 7 例(蛋白尿持续+~++ ,肾功能正常)。对照组 16 例中,年龄最小 12 岁,最大 56 岁,病程 1~8 年,其中重度 4 例,中度 8 例,轻度 4 例。2 组性别、年龄及病程均无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。在治疗过程中每 10 天化验 1 次尿常规,30 天化验 1 次肾功。治疗组治疗时间最短 90 天,最长 330 天,对照组治疗时间最短 120 天,最长 350 天。

1.2 治疗方法 对照组:使用西医常规治疗方法,包括饮食疗法、控制感染、调节水电解质平衡及降压等对症治疗,同时给予强的松 30~60mg,每日 1 次,使用 2 个月后逐渐减至维持量。治疗组:在对照组基础上加用自拟中药方:党参 30g,白术 15g,黄芪 30g,茯苓 30g,山药 20g,熟地黄 20g,山茱萸 12g,覆盆子

12g,芡实 15g,菟丝子 10g,金樱子 15g。加减:湿热重加栀子、黄柏、金钱草;血瘀加益母草、丹参;肾阴虚加枸杞子、女贞子;肾阳虚加巴戟天、制附子。用法:每天 1 剂,水煎 3 次,煎汁 300mL,分 3 次服。

2 治疗结果

2.1 疗效评定标准 痊愈:尿常规及肾功能正常,其他伴随症状消失,随访半年至 1 年无复发;显效:蛋白尿及伴随症状消失或减轻,肾功能正常,但半年后随访复发;无效:临床症状及实验室指标均无明显改善或反而加重。

2.2 治疗结果 治疗组痊愈 26 例,显效 5 例;另有 1 例失访算无效,总有效率 96.88%。对照组痊愈 9 例,显效 5 例,无效 2 例,总有效率 87.50%。治疗组疗效明显优于对照组($P<0.05$)。

3 体会

笔者从调理脾胃肾功能入手,自拟补脾益肾方。临床上,在西医常规治疗的基础上配合健脾补肾中药治疗,确能收到较快减轻患者临床症状和消除蛋白尿的功效,并能显著提高治愈好转率,且较单一西药治疗具有较好的远期疗效。

参考文献

- [1] 王海燕,刘平,张鸣和,等. 肾脏病学. 北京:人民卫生出版社,1996:697-699.

(2010-07-13 收稿)