

正交实验结合指纹图谱筛选白鲜皮提取工艺

邓 翀, 颜永刚, 姚天鹅

(陕西中医学院, 陕西咸阳 712046)

[摘要] 目的: 筛选白鲜皮中化学成分提取的最佳工艺条件。方法: 采用 HPLC/UV 法, 以多成分相对含量为评判指标, 通过正交实验设计, 考察乙醇浓度、乙醇用量、回流时间和回流次数等因素对白鲜皮化学特征的影响。结果: 最佳工艺条件为加乙醇 12 倍量, 体积分数 75%, 提取 1 次, 每次 1.5 h。结论: 该研究方法综合中药化学整体特征, 为提取工艺评价方法提供借鉴。

[关键词] 白鲜皮; 正交试验; HPLC; 指纹图谱; 多指标评价

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2011)04-0025-04

白鲜皮为芸香科植物白鲜 (*Dictamnus dasycarpus Turczl*) 的干燥根皮, 是一种常见的中草药, 为历代本草及中国药典收藏。别名有白鲜, 藓皮, 地羊膻, 金雀儿椒, 八股牛, 白羊鲜等。其味咸, 苦, 性寒, 具清热燥湿, 祛风解毒, 止痒等功效。临床用于湿热疮毒, 黄水淋漓, 湿疹, 风疹, 疥癣疮癩, 风湿热痹, 黄疸尿赤等症^[1]。目前对白鲜皮提取工艺的研究报道主要以总浸膏量和白鲜碱为评价指标进行研究^[2-3]。由于总浸膏量为评价指标缺乏准确性以及白鲜碱为评价指标的单一性, 本实验从整体化学成分角度, 以 HPLC 化学指纹图谱的多成分相对含量为控制指标考察白鲜皮的提取工艺, 筛选白鲜皮提取工艺。为白鲜皮提取分离提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效色谱仪 (L-2130 二元泵, L-2400 检测器, 日本日立公司), 电子天平 (萨多利斯 GB2042 电子天平 (瑞典), 0.1mg), 电热恒温水浴锅 (北京市光明医疗仪器厂)。

1.2 材料

白鲜皮采集于陕西省太白山红河谷 (由陕西中医学院王继涛高级实验师采集并鉴定); 白鲜碱对照品 (购自中国药品生物制品检定所, 批号: 111654-200301); 色谱乙 (科密欧公司); 水为

娃哈哈纯净水; 其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液制备

精密称取白鲜皮药材粉末 (60 目筛) 约 5g, 以适当的溶剂为提取溶媒, 按照实验设计的方法进行提取, 滤过, 提取液在 80℃ 水浴浓缩, 挥干溶媒, 以 95% 乙醇溶解, 定容于 100mL 量瓶中。储存于 4℃, 冷藏待用。

2.1.2 对照品溶液配制

精密称取白鲜碱对照品 10.81mg, 以甲醇溶解, 定容在 25mL 的量瓶中作为对照品母液, 浓度为 0.4324mg/mL; 精密吸取对照品母液 2.0mL, 以甲醇定容在 10mL 量瓶中, 作为对照品溶液, 浓度为 0.08648mg/mL。

2.2 指纹图谱测定方法建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱: 大连依利特 C18 色谱柱; 流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.4% 磷酸水溶液; 梯度洗脱程序: 0~10min, A 相 5%~20%; 10~15min, A 相 20%~30%; 15~25min, A 相 30%~30%; 25~40min, A 相 30%~45%; 40~60min, A 相 45%~65%; 60~70min, A 相 65%~100%; 70~75min, A 相 100%~100%^[4]。检测波长: 228nm; 流速: 1mL/min; 温度: 室温; 进样量: 10μL。对

收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-01-07

作者简介: 邓翀 (1978~), 男, 陕西咸阳市人, 博士, 讲师。研究方向: 中药质量标准及中药体内分析研究。

照品白鲜碱色谱图见图 1, 指纹图谱色谱图见图 2。

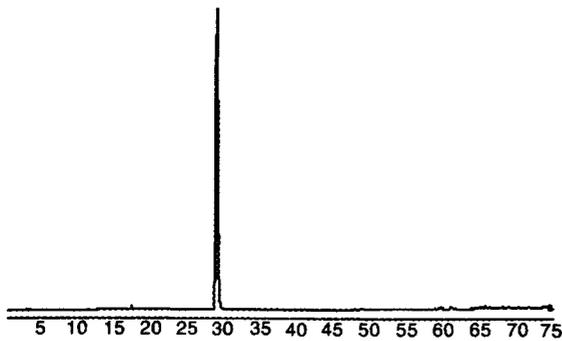


图 1 白鲜碱对照品色谱图

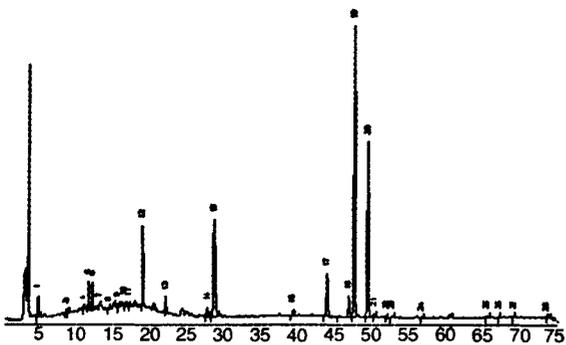


图 2 白鲜皮指纹图谱共有峰色谱图

2.2.2 精密度试验

取同一供试品溶液, 连续进样 5 次, 28 个共有色谱峰相对保留时间 RSD 小于 3%, 28 个共有峰面积 RSD 不超过 5%, 表明进样的精密度良好。

2.2.3 重现性试验

取同一供试品 5 份, 分别按供试品溶液的制备方法制备供试品并测定, 28 个共有色谱峰相对保留时间 RSD 小于 3%, 28 个共有峰面积 RSD 不超过 5%, 表明其重复性良好。

2.2.4 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12h 检测, 28 个共有色谱峰相对保留时间 RSD 小于 3%, 28 个共有峰面积 RSD 不超过 5%, 说明供试品溶液至少在 12h 内稳定。

2.3 提取溶剂选择

取白鲜皮药材粗粉末 (过 4 号筛) 5g, 分别用 8 倍量甲醇、乙醇和 0.2% 盐酸水溶液为提取溶媒, 超声 30min, 按“2.2.1 项”下色谱条件测定, 根据“2.8 项”下计算方法计算, 选择提取溶剂。

2.4 提取方式选择

取白鲜皮药材粗粉末 (过 4 号筛), 等量精密称取 2 份, 8 倍量的以 95% 乙醇为溶剂, 分别用超声法、回流法提取, 制备成等体积的溶液。按“2.2.1 项”下色谱条件测定, 根据“2.8 项”下计算方法计算, 选择提取方式。

2.5 正交试验法研究白鲜皮提取工艺

对影响醇提取工艺的主要因素溶媒浓度 (因素 A)、溶剂用量 (因素 B)、提取次数 (因素 C) 和提取时间 (因素 D) 进行 L9 (3⁴) 实验, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

水平因素	乙醇浓度 (%) /A	溶剂用量 v/w	提取次数	提取时间/h
1	55	4	1	0.5
2	75	8	2	1
3	95	12	3	1.5

2.6 样品测定

取正交实验法项下的 9 个供试品溶液吸取 20μL, 以指纹图谱测定条件进样分析, 记录色谱图。

2.7 评价方法

用多指标实验公式法进行数据处理^[5]。以 X_{ij} 表示第 i 次实验中第 j 个指标的测定值 (即 X_{ij} 表示

正交实验的第 i 次实验的色谱图中第 j 个色谱峰峰面积值, 其中在正交实验各次实验的色谱图中所选定的色谱峰是根据活性部位指纹图谱而确定的, 它们相对应的色谱峰的相对保留时间是一致的), i = 1, 2, ..., n; j = 1, 2, ..., k。首先以各指标的最大值 (即各色谱图中同一相对保留时间的各色谱峰中峰面积值最大者) 作为参照, 对同一指标各

数据进行标准化处理, D_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值的标准化数据。

$$D_{ij} = 100 \times X_{ij} / (X_j)_{\max} \quad [1]$$

再按各指标的重要程度和每组数据的相对标准差确定加权系数。以 SD_j 表示第 j 个指标下 D_{ij} 的标准差, 以 RSD_j 表示第 j 个指标的相对标准差, 则根据各指标相对标准差赋权为 RSD/RSD_j , 其中 RSD 为指定指标 (参照物白鲜碱) 的相对标准差; 根据各指标的重要程度赋权为 E_j , 由于不能确定各组分对药效的贡献大小, 故认为指纹图谱中的各个色谱峰 (群) 所代表的各组分 (群) 都很重要, 均设为 1。结合各指标的重要程度和每组数据的相对标准差确定的权重系数为:

$$F_j = E_j \times RSD/RSD_j \quad j=1, 2, \dots, k \quad [2]$$

因此, 多指标实验公式为:

$$P_i = \sum (F_j \times D_{ij}) / \sum F_j \quad i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, k \quad [3]$$

[3] 式计算所得的兼顾各指标综合效应的公式, 得分越大越好。

3 结果

表 2 正交实验安排及结果表

序号	因素				P 值
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	59.41697
2	1	2	2	2	55.77986
3	1	3	3	3	51.63551
4	2	1	3	2	72.12781
5	2	2	1	3	68.60886
6	2	3	2	1	72.28515
7	3	1	2	3	63.14929
8	3	2	3	1	66.09349
9	3	3	1	2	73.45026
K1	55.61078	64.89802	67.1587	65.93187	
K2	71.00727	63.49407	63.7381	67.11931	
K3	67.56435	65.79031	63.2856	61.13122	
R	15.39649	0.892283	3.873093	5.98809	

3.1 提取溶媒选择结果

根据实验数据分析, 甲醇、乙醇和 0.2% 盐酸

水溶液 3 种提取溶媒的综合评分分别为 56.43372, 70.30897, 55.69554。故本实验选择不同乙醇为提取溶媒。

3.2 提取方式选择结果

根据对超声和回流提取方式实验数据比较, 超声和回流两种提取方式综合评分分别为 66.73388, 71.04552, 故本实验选择回流为提取方式。

3.3 正交试验结果

在前述提取条件初筛的基础上, 采用 4 因素 3 水平正交实验法对溶媒浓度、提取溶剂倍量、回流时间、回流次数进行优化研究, 试验设计见表 1。将各白鲜皮提取液分别定容至 25mL 量瓶中, 0.45 μ m 滤膜滤过后, 用“2.2.1 项”色谱法测定各溶液中 28 个共有峰面积为指标, 对数据进行标准化处理, 结果及极差分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 3 公式评分方差分析表

误差来源	自由度	偏差平方和	方差	F
A	2	130.5978	65.29892	48.73079
B	2	2.679986	1.339993	
C	2	8.968696	4.484348	
D	2	20.10449	10.05225	

注: $F_{0.05(2,2)} = 19$, 当 F 大于 19 说明有统计学意义。

以多指标实验公式法统计分析 P 值为考察指标, 由表 2 中极差 R 值大小显示, 各因素作用主次为 $A > D > C > B$; 由表 3 中方差分析结果表明^[6]: 因素 A 具有显著性差异, 以 $A_2B_3C_1D_2$ 组合为佳, 即最佳工艺条件为料液比 12 倍, 乙醇浓度 75%, 提取次数 1 次, 提取时间 1.5h。

3.4 验证试验

根据正交实验结果对 $A_2B_3C_1D_2$ 工艺条件重复 3 次实验, 以验证该工艺的合理性和稳定性, 结果无显著性差异, RSD 值为 2.433。最后确定的最佳提取工艺为料液比 12 倍, 乙醇浓度 75%, 提取次数 1 次, 提取时间 1.5h。

4 讨论

中药药效是多成分、多靶点整体作用的结果, 在对中药的提取工艺优选过程中, 若只采用某单体成分含量为优化指标, 不能反映全方的整体效应。

在以往对中药的提取工艺研究中,往往只局限于以干浸膏得率、单体含量和化学部位含量为指标进行工艺的优选,具有一定的局限性。本文对白鲜皮醇提工艺优化的过程中,尝试采用未知结构成分的模糊数据(特征色谱峰面积之和)相结合的形式,进行多指标综合评定优化提取工艺,较之于以往可以更全面地反映提取物的成分信息。

尽管指纹图谱可以提供较为丰富的中药提取物信息,但是本实验中采用紫外检测器,只能提供药液中具有紫外吸收的成分的相对含量信息;且指纹峰所对应成分的药效作用尚不完全清楚,在中药提取工艺的优化方面尚不能实现所有药效组分的提取与检测。在未来工作中,有待于结合现代高通量筛选技术,追踪各成分的药物活性;同时,可以尝试建立药液的液质联用指纹图谱,借助质谱等更加灵敏、通用的检测系统,进行全成分的高效分析、检测,提高中药制剂的提取效率和制剂水平,推进中

药研究的现代化进程。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(2010年版)一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2010: 92.
- [2] 苏伟梁, 靳丽梅. 正交法优选白鲜皮的提取工艺[J]. 黑龙江医药, 2006, 19(1): 16-17.
- [3] 梁红, 韦宝韩, 黄光伟, 等. 正交试验法研究白鲜皮的提取工艺[J]. 广西轻业, 2009, 12(5): 16-17.
- [4] 杜程芳, 屠鹏飞. 白鲜皮药材指纹图谱研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 94-98.
- [5] 韩可勤, 杨静化, 刘晓东. 药学应用概率统计[M]. 南京:东南大学出版社, 2000: 1301.
- [6] 腾海英, 祝国强, 黄平, 等. 正交试验设计实例分析[J]. 药学服务与研究, 2008, 8(1): 75-76.

(编辑: 迟 越)

Orthogonal Combination Fingerprint Screening Extraction

Bark of Root - bark of Densefruit Pittany

DENG Chong, YAN Yong - gang, YAO Tian - e

(Shanxi Traditional Chinese Medicine College, Xianyang Shanxi 712046, China)

[ABSTRACT] Objective: Chemical composition of Root - bark of Dense fruit Pittany screen extraction of optimum conditions. Methods: Using high - performance liquid chromatography with UV detection, the relative content of multi - component as evaluation index, by the orthogonal experimental design, studying the concentration of ethanol, ethanol, reflux time and numbers effect chemical characteristics of Root - bark of dense fruit Pittany. Results: The optimum reflux extracting condition obtained: adding 12 folds of 75% alcohol, extracting once, Every 1.5h. Conclusion: The study of method evaluate the overall hydro - chemical characteristics of traditional Chinese medicine, for evaluation of extraction process for reference.

[KEY WORDS] root - bark of densefruit pittany; orthogonal test; HPLC; fingerprint; multiple indicator assessment

欢迎订阅, 欢迎投稿!

正交实验结合指纹图谱筛选白鲜皮提取工艺

作者: [邓翀](#), [颜永刚](#), [姚天鹅](#), [DENG Chong](#), [YAN Yong-gang](#), [YAO Tian-e](#)
作者单位: [陕西中医学院, 陕西咸阳, 712046](#)
刊名: [云南中医学院学报](#) 
英文刊名: [Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine](#)
年, 卷(期): 2011, 34(4)
被引用次数: 2次

参考文献(6条)

1. 中华人民共和国药典委员会 [中华人民共和国药典\(2010年版\)一部](#) 2010
2. [苏伟梁](#); [靳丽梅](#) [正交法优选白鲜皮的提取工艺](#)[期刊论文]-[黑龙江医药](#) 2006(01)
3. [梁红](#); [韦宝韩](#); [黄光伟](#) [正交试验法研究白鲜皮的提取工艺](#)[期刊论文]-[广西轻工业](#) 2009(05)
4. [杜程芳](#); [屠鹏飞](#) [白鲜皮药材指纹图谱研究](#)[期刊论文]-[中国天然药物](#) 2003(02)
5. [韩可勤](#); [杨静化](#); [刘晓东](#) [药学应用概率统计](#) 2000
6. [腾海英](#); [祝国强](#); [黄平](#) [正交试验设计实例分析](#)[期刊论文]-[药学服务与研究](#) 2008(01)

引证文献(2条)

1. [毕宏生](#), [郭俊国](#), [解孝锋](#) [正交试验优选栀子水提醇沉工艺](#)[期刊论文]-[中国实验方剂学杂志](#) 2014(1)
2. [邓翀](#), [郑洁](#), [宋小妹](#) [指纹图谱结合响应面法研究醋制南五味子炮制工艺](#)[期刊论文]-[中成药](#) 2012(8)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_ynzyxyxb201104008.aspx