

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.024

# 正交试验法优选口疮穴位贴提取工艺

周秋娟<sup>1</sup>, 瞿发林<sup>2</sup>, 董文燊<sup>2△</sup>

(1. 江苏省常州市武进区中西医结合医院, 江苏 常州 213003; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇四医院, 江苏 常州 213003)

**摘要:**目的 优选口疮穴位贴处方药材的提取工艺。方法 以吴茱萸碱含量和浸膏量为评价指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验法, 考察乙醇浓度、乙醇用量、提取时间及提取次数 4 个因素对提取工艺的影响, 并进行验证试验。结果 最佳提取工艺为 12 倍量 70% 乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 优选的提取工艺合理、可行、稳定。

**关键词:** 口疮穴位贴; 吴茱萸碱; 正交试验; 提取工艺; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0096-03

## Extraction Process Optimization of Kouchuang Application by Orthogonal Test

ZHOU Qiujuan<sup>1</sup>, QU Falin<sup>2</sup>, DONG Wenshen<sup>2</sup>

(1. Changzhou Wujin District Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Changzhou, Jiangsu, China 213003; 2. The 904th Hospital of Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Changzhou, Jiangsu, China 213003)

**Abstract:** **Objective** To optimize the best extraction process of Kouchuang Application. **Methods** With the content of evodiamine and the amount of extracts as evaluation indexes, the  $L_9(3^4)$  orthogonal test method was used to investigate the effects of four factors, including the concentration of ethanol, the amount of ethanol, the extraction time, and the number of extractions on the extraction process, and a verification test was performed. **Results** The optimized extraction process for Kouchuang Application was 12 times of 70% ethanol, and the extraction was performed 3 times under reflux, each for 1.5 h. **Conclusion** The optimized extraction process is reasonable, feasible, and stable.

**Key words:** Kouchuang Application; evodiamine; orthogonal test; extraction process; high performance liquid chromatography

口疮穴位贴处方为联勤保障部队第九〇四医院中医科验方“口疳散”, 由生大黄、吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 5 味中药组方, 将 5 味中药研粉以醋调匀, 搓制成直径约为 1 cm 的药球, 敷贴于双足底涌泉穴处, 固定, 夜敷昼去。方中生大黄、黄连味苦性寒, 清热泻火, 用于上焦中焦实火上炎; 吴茱萸、细辛、肉桂为温里药, 用于浮越之火引火归原, 导热下行<sup>[1-2]</sup>。方中吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 4 味中药的主要成分有挥发油类、生物碱类、黄酮类等, 其中挥发油类和生物碱类是其发挥药理作用的主要物质基础<sup>[3-7]</sup>。为了提升中药有效成分的利用率, 最大限度发挥中药验方的功效, 将口疮穴位贴处方中吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 4 味中药, 用乙醇提取浓缩成稠膏后, 再加入生大黄细粉及适量醋调制贴剂。本研究中采用正交试验, 以吴茱萸碱含量及浸膏量为综合评价指标, 优选提取工艺, 为口疮穴位贴的研制和生产提供参考。现报道如下。

### 1 仪器与试药

#### 1.1 仪器

Waters 系列高效液相色谱仪, Waters CapLC2487 型双  $\lambda$  吸光度检测器, Empower2 数据处理系统(美国 Waters 公司); FA1004 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司·天平仪器厂, 精度为万分之一); AE240S 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度

为十万分之一); R201 型旋转蒸发器, SHB-3 型循环水式多用真空泵(上海申胜生物技术有限公司); HHS 型恒温水浴锅(上海医疗器械五厂); YB-1A 型真空恒温干燥箱(天津市金洲科学仪器有限公司)。

#### 1.2 试药

吴茱萸(浙江产, 批号为 181118), 细辛(辽宁产, 批号为 181118), 肉桂(广东产, 批号为 180807), 川黄连(四川产, 批号为 181221), 均购自江苏华洪药业科技有限公司, 经联勤保障部队第九〇四医院瞿发林主任药师鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实, 马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. 的干燥根和根茎, 樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥树皮, 毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎; 吴茱萸碱(南京世洲生物科技有限公司, 批号为 201901WZYJ, 规格为 20 mg, 含量按 98% 计); 甲醇及乙腈为色谱纯, 乙醇为分析纯, 水为纯化水。

### 2 方法与结果

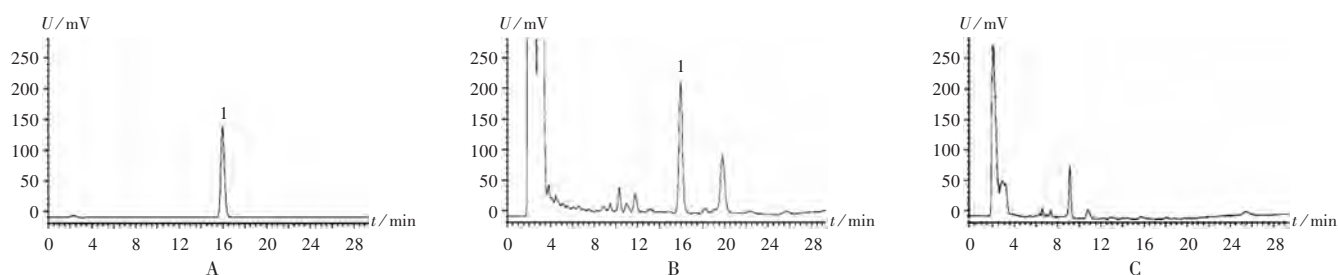
#### 2.1 吴茱萸碱含量测定<sup>[8]</sup>

##### 2.1.1 色谱条件

色谱柱: Lichrospher C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈-水(50:50); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 225 nm; 进样量: 20  $\mu$ L。

第一作者: 周秋娟, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱) qiujuan201@163.com。

<sup>△</sup>通信作者: 董文燊, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院制剂学, (电子信箱) dongwenshen\_hot102@163.com。



1. 吴茱萸碱

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

## 2.1.2 溶液制备

称取 60℃ 干燥至恒重的吴茱萸碱对照品 9.7 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 即得对照品溶液, 摇匀, 备用。精密量取每个煎煮水平的药材提取液适量(2%), 减压浓缩至干, 残渣加甲醇超声溶解 3 次, 每次 8 mL, 并定溶至 25 mL 容量瓶中, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。取细辛、肉桂、川黄连 3 味药材同法回流提取, 按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

## 2.1.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.1.2 项下 3 种溶液适量, 按拟订色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 1。结果阴性对照无干扰, 表明方法专属性良好。

线性关系考察: 精密吸取对照品贮备液, 分别制成质量浓度为 97.00, 48.50, 24.25, 19.40, 12.12, 9.7 μg/mL 的系列溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标, 以最小二乘法进行直线回归, 得回归方程  $Y = 35\,532X + 14\,074$ ,  $r = 0.999\,9$  ( $n = 6$ )。结果表明, 吴茱萸碱进样量在 1.94 ~ 0.194 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取质量浓度为 48.50 μg/mL 的对照品溶液, 按拟订色谱条件重复进样 6 次, 记录峰面积。结果吴茱萸碱峰面积的 RSD 为 0.87% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 2.1.2 项下一份供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果吴茱萸碱峰面积的 RSD 为 1.78% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定 6 次, 记录峰面积。结果吴茱萸碱峰面积的 RSD 为 1.76% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密量取已知含量的口疮穴位贴提取液 5.0 mL, 分别按高、中、低质量浓度加入对照品贮备液(吴茱萸碱 97.00 μg/mL) 2.0, 5.0, 10.0 mL, 平行制备 6 份, 依法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表 1。

表1 加样回收试验结果( $n = 6$ )

| 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| 1.152 1  | 0.194   | 1.347 6 | 100.77 | 100.22        | 1.28   |
| 1.152 1  | 0.194   | 1.349 4 | 101.70 |               |        |
| 1.152 1  | 0.485   | 1.627 9 | 98.10  |               |        |
| 1.152 1  | 0.485   | 1.638 7 | 100.33 |               |        |
| 1.152 1  | 0.970   | 2.116 6 | 99.43  |               |        |
| 1.152 1  | 0.970   | 2.131 6 | 100.98 |               |        |

## 2.2 浸膏得率测定<sup>[9]</sup>

蒸发皿预处理: 蒸发皿 105℃ 烘 5 h, 取出, 置干燥器中冷却至室温, 称定质量( $W_1$ ), 继续烘 1 h, 取出, 置干燥器中冷却至室温, 称定质量( $W_2$ ), 当  $|W_1 - W_2| \leq 0.3$  mg 时, 置干燥器中存放, 备用。

浸膏量测定<sup>[8]</sup>: 剩余提取液于电热恒温水浴锅 80℃ 减压浓缩至稠膏状, 转移至蒸发皿中, 水浴蒸干, 105℃ 烘 5 h, 取出, 置干燥器中冷却至室温, 称定质量( $W_3$ ), 继续烘 1 h, 取出, 置干燥器中冷却至室温, 称定质量( $W_4$ ), 直到  $|W_3 - W_4| \leq 0.3$  mg。浸膏量 =  $(W_4 - W_2) / 98\%$ , 浸膏得率 =  $(\text{浸膏量} / \text{药材量}) \times 100\%$ 。

## 2.3 评分标准制订

以口疮穴位贴提取物浸膏量和吴茱萸碱含量作为评价指标, 以加权评分法计算综合评分, 根据 2 个指标的重要程度, 将口疮穴位贴提取物浸膏量和吴茱萸碱含量的权重系数分别定为 0.3 和 0.7, 二者综合评分计算公式为: 总分 =  $[(\text{浸膏质量} / \text{浸膏质量}_{\max} \times 0.3) + (\text{吴茱萸碱含量} / \text{吴茱萸碱含量}_{\max} \times 0.7)]$ 。

## 2.4 正交试验优选

因素与水平: 以乙醇浓度(因素 A)、乙醇用量(因素 B)、提取时间(因素 C)、提取次数(因素 D)为参考因素, 以口疮穴位贴提取物浸膏量和吴茱萸碱含量作为评价指标, 设 4 个因素 3 个水平。详见表 2。

表2 正交试验因素水平表

| 水平 | 因素 A(%) | 因素 B(倍) | 因素 C(h) | 因素 D(次) |
|----|---------|---------|---------|---------|
| 1  | 70      | 8       | 1.0     | 1       |
| 2  | 80      | 10      | 1.5     | 2       |
| 3  | 90      | 12      | 2.0     | 3       |

正交试验设计:按处方配比分别称取吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 4 味中药材置三颈圆底烧瓶中,按煎煮因素水平回流提取(煎煮前先将药材浸泡 1 h),提取液用 8 层纱布压榨滤过,合并提取液,搅匀,得口疮穴位贴的药材提取液。依法行  $L_9(3^4)$  正交试验,测定浸膏量和吴茱萸含量。结果见表 3。

表 3  $L_9(3^4)$  正交试验结果 ( $n=9$ )

| 序号    | 因素 A (%) | 因素 B (倍) | 因素 C (h) | 因素 D (次) | 试验结果*   |             |          |
|-------|----------|----------|----------|----------|---------|-------------|----------|
|       |          |          |          |          | 浸膏量 (g) | 吴茱萸碱含量 (mg) | 综合评分 (分) |
| 1     | 1        | 1        | 1        | 1        | 6.48    | 56.12       | 0.77     |
| 2     | 1        | 2        | 2        | 2        | 9.89    | 61.89       | 0.92     |
| 3     | 1        | 3        | 3        | 3        | 11.17   | 66.43       | 1.00     |
| 4     | 2        | 1        | 2        | 3        | 8.90    | 60.78       | 0.88     |
| 5     | 2        | 2        | 3        | 1        | 6.22    | 46.81       | 0.66     |
| 6     | 2        | 3        | 1        | 2        | 8.00    | 55.23       | 0.80     |
| 7     | 3        | 1        | 3        | 2        | 4.77    | 36.54       | 0.51     |
| 8     | 3        | 2        | 1        | 3        | 5.37    | 38.52       | 0.55     |
| 9     | 3        | 3        | 2        | 1        | 3.25    | 29.21       | 0.40     |
| $K_1$ | 2.68     | 2.16     | 2.11     | 1.82     |         |             |          |
| $K_2$ | 2.34     | 2.13     | 2.19     | 2.23     |         |             |          |
| $K_3$ | 1.46     | 2.19     | 2.17     | 2.43     |         |             |          |
| $R$   | 1.22     | 0.06     | 0.08     | 0.61     |         |             |          |

注: \* 指总药材 35.5 g(吴茱萸 25 g, 细辛 5 g, 肉桂 2.5 g, 川黄连 3 g)。

结果分析:由表 3 可见,各因素影响程度为  $A > D > C > B$ 。由表 4 可见,因素 A ( $F=392.3153$ ,  $P<0.01$ ) 对提取工艺影响极显著,因素 D ( $F=94.6564$ ,  $P<0.05$ ) 对提取工艺影响显著。可见,最佳提取工艺应为  $A_1B_3C_2D_3$ ,即 12 倍量 70% 乙醇,回流提取 3 次,每次 1.5 h。

表 4 方差分析结果

| 方差来源 | 离差平方和  | 自由度 | 均方     | F 值      | P     |
|------|--------|-----|--------|----------|-------|
| A    | 0.2657 | 2   | 0.1329 | 392.3153 | <0.01 |
| B    | 0.0007 | 2   | 0.0003 | 1.0000   |       |
| C    | 0.0012 | 2   | 0.0006 | 1.7206   | >0.05 |
| D    | 0.0641 | 2   | 0.0321 | 94.6564  | <0.05 |

注:  $F_{0.05(2,2)}=19.00$ ,  $F_{0.01(2,2)}=99.00$ 。

## 2.5 最佳工艺验证

按优选的最佳提取工艺制备 5 批样品,测定浸膏量和吴茱萸碱含量,进行综合评分。结果口疮穴位贴浸膏平均量为 11.18 g ( $RSD=1.51\%$ ,  $n=5$ ),吴茱萸碱含量为 65.93 mg ( $RSD=1.07\%$ ,  $n=5$ )。详见表 5。

## 3 讨论

穴位敷贴疗法是以中药经络学为理论依据,通过刺激穴位,发挥药物及穴位的双重功效达到治病、防病的目的一种疗法。涌泉穴是肾经井穴,古代采用药物敷贴涌泉穴治疗脚气、厥证、狂证、口咽病、耳病、鼻病、目疾及难

表 5 最佳提取工艺验证试验结果 ( $n=6$ )

| 序号 | 提取物质量 (g) | 吴茱萸碱含量 (mg) | 综合评分 (分) | 序号        | 提取物质量 (g) | 吴茱萸碱含量 (mg) | 综合评分 (分) |
|----|-----------|-------------|----------|-----------|-----------|-------------|----------|
|    |           |             |          |           |           |             |          |
| 1  | 11.48     | 66.78       | 1.01     | 4         | 11.14     | 66.47       | 1.00     |
| 2  | 11.07     | 65.43       | 0.99     | 5         | 11.08     | 65.92       | 0.99     |
| 3  | 11.15     | 65.07       | 0.99     | $\bar{X}$ | 11.18     | 65.93       | 1.00     |

产等多种常见症,现代采用药物敷贴涌泉穴治疗腹泻、便秘、呕吐、哮喘、失眠、高血压、疼痛、口疮等病症<sup>[10-13]</sup>。

中药穴位贴组方多是古方或中医验方,是将中药碾成细末后,以水、醋、酒等为基质,制成散剂、糊剂和膏剂等剂型,直接贴于穴位患处,为无创伤性外治疗法的药物制剂。中药穴位贴多为散剂、糊剂和膏剂的传统剂型,皮肤外敷给药起效较慢,且人体所吸收的药量有限。为了提升中药穴位贴有效成分的利用率,最大发药物功效,满足现代人使用方便的需求,将口疮穴位贴处方中含有主要成分为挥发油类、生物碱类、黄酮类等发挥主要药理作用的吴茱萸、细辛、肉桂、川黄连 4 味中药进行制剂工艺优选。

本研究中采用高效液相色谱法,以提取物浸膏量和吴茱萸碱含量为综合评价指标,通过正交试验法优选出了口疮穴位贴的最佳提取工艺。经验证试验,该提取工艺简单、可行、稳定,可为制剂的开发与使用提供参考。

## 参考文献:

- [1] 张智琳. 浅析傅青主“上病下治”的诊疗思路[J]. 光明中医, 2019,34(2):202-204.
- [2] 刘世红. 浅析涌泉穴的临床独用[J]. 江西中医药, 2013, 44(3):56-57.
- [3] 刘毅,沈涛,林晶晶,等. 吴茱萸的临床应用研究概况[J]. 云南中医药杂志, 2015,36(10):91-93.
- [4] 尹利顺,孙蓉. 吴茱萸挥发油化学成分与药理毒理研究进展[J]. 中国药物警戒, 2016,13(3):162-164.
- [5] 王懿,黄伟,孙蓉. 基于功效和毒性的细辛化学成分研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013,10(1):36-38.
- [6] 侯小涛,郝二伟,秦健峰,等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2018,49(1):20-34.
- [7] 盖晓红,刘素香,任涛,等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018,49(20):4919-4927.
- [8] 敖华蓉,裴春燕. 高效液相色谱-切换波长法同时测定左金丸中盐酸小檗碱及吴茱萸碱含量[J]. 中国药业, 2019,28(2):33-36.
- [9] 董文燊,谭兴起,邵留英,等. 正交试验法优选假药中总生物碱的提取工艺[J]. 实用药物与临床, 2019,22(7):750-753.
- [10] 刘雅芳,朱晓明,郝俊凯,等. 药物贴敷涌泉穴的古今应用研究述略[J]. 针灸临床杂志, 2018,34(6):72-75.
- [11] 叶玉珍. 中药外敷涌泉穴治疗小儿口疮 200 例临床观察[J]. 北方药学, 2013,10(1):111.
- [12] 鞠娅,岳妍. 吴茱萸穴位敷贴运用药穴相配法的临床进展[J]. 光明中医, 2015,30(11):2490-2492.
- [13] 陈伊莉. 吴茱萸穴位贴敷的临床应用近况[J]. 中医外治杂志, 2016,25(4):51-53.

(收稿日期:2019-07-18)