

正交实验法优化黄白熏洗液提取工艺的研究

吴李波 杨 锋 王 岚 蒲清荣 罗 群

合江县中医医院 四川 泸州 646200

【摘要】：目的：利用正交实验法建立黄白熏洗液的最佳水提取工艺。方法：以黄白熏洗液中指标性成分大黄素和大黄酚含量为检测指标，利用正交实验法从加水量、浸泡时间、提取时间和提取次数等维度考察黄白熏洗液的最佳提取条件。结果：黄白熏洗液的最佳水提工艺为加 10 倍量的水、浸泡 1.5 h、提取 1 h、提取 3 次。结论：此方法简单可行、提取效率高、重复性良好，可用于黄白熏洗液的提取工艺。

【关键词】：黄白熏洗液；正交实验法；提取工艺；大黄素；大黄酚

Study on Optimization of Extraction Process of Yellow-white Fumigation Lotion by Orthogonal Experiment

Libo Wu Feng Yang Lan Wang Qingrong Pu Qun Luo

Hejiang County Hospital of Traditional Chinese Medicine Sichuan Luzhou 646200

Abstract: Objective: To establish the best water extraction process of Huangbai fumigation lotion by orthogonal experiment. Methods: With the content of emodin and chrysophanol, the index components in Huangbai fumigation lotion, as the detection index, the best extraction conditions of Huangbai fumigation lotion were investigated by orthogonal experiment from the dimensions of water addition, soaking time, extraction time and extraction times. Results: The best water extraction process of Huangbai fumigation lotion was to add 10 times of water, soak for 1.5 h, extract for 1 h and extract for 3 times. Conclusion: This method is simple and feasible, with high extraction efficiency and good repeatability, and can be used for the extraction process of Huangbai fumigation lotion.

Keywords: Yellow and white fumigating lotion; Orthogonal experiment method; Extraction process; Emodin; Chrysophanol

痔是临床上常见的肛肠疾病之一，青壮年是多发人群，痔是由于静脉曲张形成团块而导致的，其主要表现为便血、肛门部有异物等，临床上常采用手术治疗^[1]。但术后患者容易出现水肿、疼痛、瘙痒、出血等并发症^[2-5]，严重影响患者术后伤口的愈合，降低了患者的生活质量。在多年的临床应用基础上，本院中医科与制剂室研制了一种协定处方（黄白熏洗液）。“白头翁汤”具有清热解毒，凉血止痢的功效^[6]，该方在“白头翁汤”的基础上进行加减，成方后为“黄白熏洗液”。以白头翁汤为君，清热解毒；臣以黄连、黄芩、黄柏、秦皮、栀子、酒大黄清热解毒、燥湿厚肠，由 14 味中药组成，具有清热解毒，燥湿止痒，活血化瘀止痛的疗效。但是，该方的制备工艺并没有规范化，煎煮的时间、煎煮次数、浸泡时间等会存在随意性，这会给临床疗效造成一定程度的影响。为规范该制剂的提取工艺，保证疗效，本研究采用正交实验法来优选黄白熏洗液的提取工艺，给提高临床疗效、保证临床用药安全提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

JA-SERIES 型电子分析天平（常州市幸运电子设备有限公司，千分之一）；LC-20A 型高效液相色谱仪（日本岛津）；AUW120D 型电子分析天平（日本岛津公司，十万分之一）；

金数字超声波发生器 JPCT0328（武汉嘉鹏电子有限公司，功率为 250W，频率为 50KHZ）；HH-4 型数显恒温水浴锅（上海上登实验设备有限公司）；HGZF-II-101-3 型电热恒温鼓风干燥箱（上海跃进医疗器械有限公司）；GOODLOOK-1000 薄层色谱成像系统（上海科哲生化科技有限公司）。

1.2 试药

大黄素（中国食品药品检定研究院，批号：110756-201913，纯度 96.0%）；大黄酚（中国食品药品检定研究院，批号：110796-201922，纯度 99.4%）；甲醇（Thermo Fisher 科技公司，色谱纯）；磷酸（成都科隆化学品有限公司，色谱纯）；煎煮用水为纯化水。

1.3 药材

其中白头翁、酒黄连、酒黄芩、酒大黄、炒栀子、草红藤、紫花地丁、苦参、酒当归、木香、白芷、肉桂购自四川鑫仁泰药业有限责任公司，其产地和批号如下：白头翁（河北，200901）、酒黄连（四川，201101）、酒黄芩（山西，200801）、酒大黄（四川，201201）、炒栀子（四川，201101）、草红藤（四川，201001）、紫花地丁（四川，201101）、苦参（四川，201001）、酒当归（甘肃，200701）、木香（云南，200701）、白芷（四川，200901）、肉桂（广西，201001）；败酱草和盐黄柏购自成都仁济宏药业有限公司，其产地和批

号如下：败酱草（四川，190903）、盐黄柏（贵州，180801）。上述药材经质量检验，符合法定标准（《中国药典》2020 年版、《四川省中药饮片炮制规范》2015 年版）中各饮片项下有关规定，为合格药材。

2 研究方法与结果

2.1 实验设计

根据前期的预实验结果，以及查阅相关提取工艺研究文献发现，影响提取工艺的主要因素有加水量（A）、浸泡时间（B）、煎煮时间（C）、煎煮次数（D）4 个因素，按照加水量（A）设置 6 倍、8 倍、10 倍 3 个水平，浸泡时间（B）设置 0.5 h、1 h 和 1.5 h 3 个水平，煎煮时间（C）设置 0.5 h、1 h 和 1.5 h 3 个水平，煎煮次数（D）设置 1 次、2 次和 3 次 3 个水平来安排正交实验。以处方中大黄的指标性成分大黄素和大黄酚的含量为指标，采用综合评分的方式考察黄白煎洗液制剂的提取工艺进行优选。注：综合评分=[（大黄素含量/大黄素含量最大值）×50%+（大黄酚含量/大黄酚含量最大值）×50%]×100。因素水平详见表 1。

表 1 正交试验因素水平表 L9 (34)

水平	因素			
	加水量 (A)	浸泡时间/h (B)	煎煮时间 /h (C)	煎煮次数 (D)
1	6	0.5	0.5	1
2	8	1	1	2
3	10	1.5	1.5	3

2.2 指标成分的含量测定

2.2.1 混合对照品溶液的制备

取大黄素、大黄酚对照品适量，精密称定，置棕色量瓶中，加甲醇制成每 1 ml 含大黄素、大黄酚各 16 μg 的混合溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备

按照处方量称取药材饮片 9 份，按 L9 (34) 正交表进行正交实验提取，分别回流提取，滤过，合并滤液，记录合并滤液得体积。移取适量的过滤液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得各提取液的供试品溶液。

2.2.3 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-0.1%磷酸溶液（85:15）为流动相；进行梯度洗脱；检测波长为 254 nm；流速为 1 ml/min；柱温为 40℃；进样量 10 μl。理论板数按大黄素峰计算应不低于 3000。混合对照品、阴性对照品、样品的色谱图见图 1。

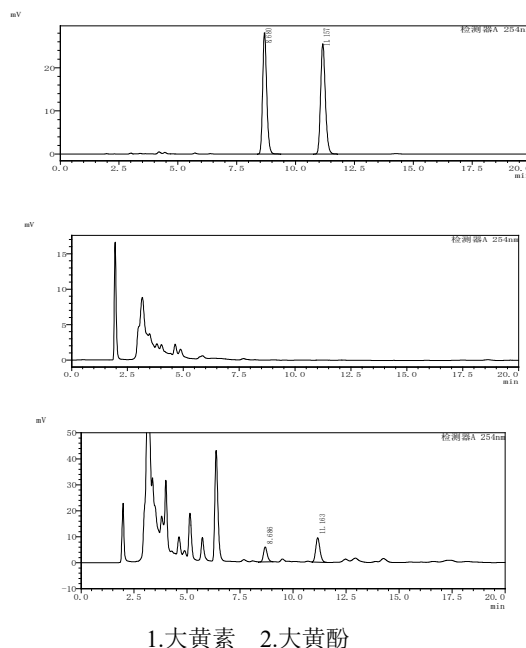


图 1 混合对照品（A）、阴性对照品（B）和样品（C）色谱图

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

取大黄素对照品、大黄酚对照品适量，分别置 50ml 量瓶中，加甲醇使溶解并稀释至刻度，摇匀，分别制得大黄素浓度为 0.2310mg/ml、大黄酚浓度为 0.2248mg/ml 的对照品溶液，备用。分别精密量取上述对照品备用液 0.05 ml, 0.1ml, 0.2 ml, 0.4ml, 0.8ml, 1.6ml, 3.2ml, 6.4ml, 12.8ml 置 50ml 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，分别配制成大黄素浓度为 0.23, 0.46, 0.92, 1.85, 3.70, 7.39, 14.78, 29.56, 59.13 μg·ml⁻¹、大黄酚浓度为 0.22, 0.45, 0.90, 1.80, 3.60, 7.19, 14.39, 28.78, 57.56 μg·ml⁻¹ 的对照品混合溶液。按“2.2.3”项下色谱条件测定峰面积，以峰面积（A）为纵坐标（Y），大黄素浓度（μg/ml）或大黄酚浓度（μg/ml）为横坐标（X），绘制标准曲线，得到回归方程：大黄素：Y=46622X-3230.7, r²=0.9999 (n=9)；大黄酚：Y=50974X-1325.9, r²=0.9999 (n=9)。大黄素在 0.23~59.13 μg·ml⁻¹ 线性范围、大黄酚在 0.22~57.56 μg·ml⁻¹ 线性范围呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度

取大黄素与大黄酚的对照品混合溶液（大黄素浓度：7.39 μg·ml⁻¹、大黄酚浓度：7.19 μg·ml⁻¹）按“2.2.3”项下色谱条件测定，连续测定 6 次，其结果大黄素峰面积均值 336575, RSD 为 0.08%；大黄酚峰面积均值 354574, RSD 为 0.09%。表明仪器精密度高。

2.3.3 重复性

取黄白熏洗液按“2.2.2”供试品溶液制备方法制备，平行制备 6 份样品，测定，结果大黄素峰面积均值 70869，RSD 为 0.62%；大黄酚面积均值 128596，RSD 为 0.21%，表明分析方法重复性良好。

2.3.4 稳定性

精密吸取同一供试品溶液，于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.2.3”项下色谱条件测定，结果大黄素峰面积均值 70674，RSD 为 0.30%；大黄酚峰面积均值 128344，RSD 为 0.26%。

表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率

精密量取黄白熏洗液 2.5ml，共 9 份，每 3 份一组，每组分别加入大黄素与大黄酚对照品混合溶液适量，按“2.2.3”项供试品溶液制备方法制备，测定峰面积，计算加样回收率。结果大黄素平均回收率为 98.73%，RSD 为 1.64%，大黄酚平均回收率为 101.06%，RSD 为 2.62%，表明本方法准确可靠。加样回收实验结果见表 2、表 3。

表 2 加样回收实验结果（大黄素）

编号	样品量 /ml	样品含大黄 素/mg	加入对照品 量/mg	大黄素测得量 /mg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD /%
1	2.5	0.0478	0.0293	0.0769	99.32	98.73	1.64
2	2.5	0.0478	0.0293	0.0768	98.98		
3	2.5	0.0478	0.0293	0.0770	99.66		
4	2.5	0.0478	0.0585	0.1064	100.17		
5	2.5	0.0478	0.0585	0.1067	100.68		
6	2.5	0.0478	0.0585	0.1061	99.66		
7	2.5	0.0478	0.0878	0.1331	97.15		
8	2.5	0.0478	0.0878	0.1328	96.81		
9	2.5	0.0478	0.0878	0.1322	96.13		

表 3 加样回收实验结果（大黄酚）

编号	样品量 /ml	样品含大黄 酚/mg	加入对照品 量/mg	大黄酚测得量 /mg	回收率/%	平均回收 率/%	RSD /%
1	2.5	0.0765	0.0581	0.1345	99.83	101.06	2.62
2	2.5	0.0765	0.0581	0.1358	102.07		
3	2.5	0.0765	0.0581	0.1358	102.07		
4	2.5	0.0765	0.1162	0.1968	103.53		
5	2.5	0.0765	0.1162	0.1973	103.96		
6	2.5	0.0765	0.1162	0.1975	104.13		
7	2.5	0.0765	0.1743	0.2471	97.88		
8	2.5	0.0765	0.1743	0.2472	97.93		
9	2.5	0.0765	0.1743	0.2475	98.11		

2.4 正交实验方案及结果

本次正交实验采用了指标成分进行分析测定，运用加权评分法对实验结果进行数据处理。设定满分为 100 分，其中大黄素含量和大黄酚含量的权重系数分别为 0.5 和 0.5，再进

行总加权评分，利用综合评分值对实验结果进行综合评价，其中综合评分=[（大黄素含量/大黄素含量最大值）×50%+（大黄酚含量/大黄酚含量最大值）×50%]×100。结果见表 4、表 5。

表 4 正交试验结果分析

试验号	因素A	因素B	因素C	因素D	大黄素含量 (mg/ml)	大黄酚含量 (mg/ml)	综合评分
1	1	1	1	1	0.0257	0.0407	28.55
2	1	2	2	2	0.0540	0.0932	62.88

3	1	3	3	3	0.0690	0.0936	70.77
4	2	1	2	3	0.0889	0.1246	92.68
5	2	2	3	1	0.0362	0.0477	36.60
6	2	3	1	2	0.0730	0.1133	80.23
7	3	1	3	2	0.0713	0.0985	73.79
8	3	2	1	3	0.0969	0.1331	100.00
9	3	3	2	1	0.0535	0.0781	56.94
I	162.19	195.02	208.78	122.09			
II	209.51	199.47	212.50	216.90			
III	230.74	207.94	181.16	263.44			
R	68.55	12.92	31.34	141.35			

表 5 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	均方	F	P
A	820.543	2	410.271	28.580	P<0.05
B (误差)	28.710	2	14.355		
C	195.433	2	97.717	6.807	P>0.05
D	3459.832	2	1729.916	120.510	P<0.05

由表 4、表 5 可以看出因素 A、因素 D，即加水量、煎煮次数对大黄酚、大黄素含量影响最大，影响因素大小顺序为 D>A>C>B。对于因素 A，其优劣次序为 3>2>1。对于因素 B，其优劣次序为 3>2>1。对于因素 C，其优劣次序为 2>1>3。对于因素 D，其优劣次序为 3>2>1。最终选择以 A3 B3 C2 D3 为最佳水提工艺，即最佳水提工艺为：加 10 倍量水，浸泡 1.5 小时，煎煮 1 小时，煎煮 3 次。

2.5 验证实验

按处方量分别称取 3 份样品，采用最佳提取工艺提取，测定大黄素和大黄酚的含量。其结果见表 6。

表 6 黄白熏洗液提取工艺验证结果

测定次数	1	2	3	$\bar{x}$
大黄素含量 (mg/ml)	0.1180	0.1205	0.1226	0.1204
大黄酚含量 (mg/ml)	0.1779	0.1778	0.1810	0.1789
总含量 (mg/ml)	0.2959	0.2983	0.3036	0.2993

结果显示，大黄素含量的平均值为 0.1204mg/ml，RSD 为 1.91% (n=3)，大黄酚含量的平均值为 0.1789mg/ml，RSD 为 1.02% (n=3)。表明重复性良好，本研究确定的最佳提取工艺稳定可行。

3 讨论

3.1 指标性成分

中药的成分复杂，处方中药味众多，本研究选择处方中

主要药味大黄进行指标分析，据相关文献报道，大黄主含蒽醌类化合物^[7]，而蒽醌中又以大黄素和大黄酚为主^[8]。用单一的成分难以全面反映处方中活性成分的最佳提取工艺，故本研究选择了大黄素和大黄酚的含量进行指标性成分的综合评分^[9]，更能反映提取工艺的优劣。

3.2 方法学考察

本研究在正交实验的基础上，进行了方法学的考察。方法学的实验结果表明，该色谱方法在一定浓度范围内有良好的线性关系，仪器的精密性、重复性良好，样品提取液在 24 h 内稳定，加样回收率实验表明加样回收率良好。

3.3 量取方法

按照正交实验提取的提取液，每次将其定容到相同的体积存在诸多不便。如加水倍数的不一致，提取液的体积量差异比较大，定容时会造成溶剂的浪费，若将体积多的进行浓缩，又会花大量时间；而且提取液的量较大，一般的容器很难盛装并定容。有文献^[10]采用先将溶剂回收，再定容至相同的体积，测定时取等量的溶液进行稀释。为节约时间成本，方便操作，本研究采用直接先测定提取液的体积，再进行含量分析的方法。

3.4 小结

本研究的实验结果可知，黄白熏洗液的最佳提取工艺为加 10 倍量水，浸泡 1.5 小时，煎煮 1 小时，煎煮 3 次。验证实验表明，该优化工艺得率高，稳定可行，为黄白熏洗液的进一步研究提供了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 赵云,高哲.快速康复外科结合中药熏洗防治混合痔术后并发症的临床研究[J].河北中医,2019,41(10):1522-1526.
- [2] 刘安,李磊磊,胡响当.熏洗灌肠液防治湿热下注型混合痔术后并发症临床观察[J].山西中医,2021,37(10):41-42.
- [3] 王东宏,胡响当,刘洁.凉血地黄汤联合消痔栓治疗混合痔术后并发症疗效观察及对创面愈合、炎症因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(03):465-470.
- [4] 雷洪峰,万青,熊帆.自制痔疮膏联合腹针疗法预防性治疗混合痔术后并发症的临床研究[J].药品评价,2022,19(07):441-443.
- [5] 赵凤芹,冀凤坤,聂枫.苦黄洗剂防治混合痔术后并发症的临床研究[J].中医药临床杂志,2021,33(08):1585-1589.
- [6] 侯玉明.白头翁汤的本义与衍义[J].中医药学报,1986(05):44+49.
- [7] Dou ZH, Dai Y, Zhou YZ, et al. Quality evaluation of rhubarb based on qualitative analysis of the HPLC fingerprint and UFLC-Q-TOF-MS/MS combined with quantitative analysis of eight anthraquinone glycosides by QAMS [J]. Biomed Chromatogr, 2021,35(6): e5074.
- [8] 王玉,杨雪,夏鹏飞,等.大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J].中草药,2019,50(19):4821-4837.
- [9] 田慧,韦林利,曾昭清,等.多指标综合加权评分法优选十一方药酒渗漉提取工艺研究[J].中药材,2021,44(05):1199-1201.
- [10] 谢仲德,李文烈,方应权,等.白芍中芍药苷的闪式提取工艺研究[J].中成药,2013,35(9):2037.