

# 正交试验法优选痔疮熏洗液的水提醇沉工艺

陈朝<sup>1</sup>, 伍小燕<sup>1</sup>, 黄一挚<sup>2\*</sup>, 龚敏阳<sup>1</sup>, 莫小林<sup>1</sup>, 黄权芳<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学第一附属医院药学部, 南宁 530023; 2. 广西卫生职业技术学院, 南宁 530021)

**[摘要]** **目的:** 优选痔疮熏洗液的水提醇沉工艺。**方法:** 以总生物碱含量和干膏率的综合评分为指标, 通过正交试验考察加水量、提取次数、提取时间对水提工艺的影响; 以总生物碱含量为指标, 运用正交试验考察醇沉浓度、放置时间、浓缩液相对密度对醇沉工艺的影响。采用UV测定总生物碱含量, 检测波长416 nm。**结果:** 最佳水提醇沉工艺为加10倍量水煎煮2次, 每次1.5 h, 提取液浓缩至相对密度1.06 g·mL<sup>-1</sup> (25℃), 醇沉至乙醇体积分数60%, 放置时间12 h; 总生物碱质量浓度2.040 g·L<sup>-1</sup>。**结论:** 优选的提取、醇沉工艺稳定可行, 为痔疮熏洗液的规范化生产提供参考。

**[关键词]** 痔疮熏洗液; 酸性染料比色法; 总生物碱; 苦参; 黄柏碱; 氧化苦参碱

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0033-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170033

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1323.003.html>

**[网络出版时间]** 2014-07-15 13:23

## Optimization of Water Extraction and Alcohol Precipitation Technology for Hemorrhoid Fumigants by Orthogonal Test

CHEN Chao<sup>1</sup>, WU Xiao-yan<sup>1</sup>, HUANG Yi-zhi<sup>2\*</sup>, GONG Min-yang<sup>1</sup>, MO Xiao-lin<sup>1</sup>, HUANG Quan-fang<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Medical College, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize water extraction and alcohol precipitation technology of hemorrhoid fumigants. **Method:** With composite score of the content of total alkaloids and dry extract yield as index, effects of the amount of water, extraction times and time on extraction technology was investigated by orthogonal test; with

**[收稿日期]** 20131226(017)

**[基金项目]** 广西壮族自治区中医药管理局项目(GZZJ13-05)

**[第一作者]** 陈朝, 硕士, 主管药师, 从事医院药学与中药制剂研究, Tel:0771-5645433, E-mail:chaochen1980@163.com

**[通讯作者]** \*黄一挚, 讲师, 从事药理学实验教学工作, Tel:0771-2287060, E-mail:yizhi0771@163.com

### 3 讨论

本文采用水回流提取法, 通过正交试验优化提取工艺, 此条件下川续断皂苷 VI 转移率达 94.83%, 说明在该工艺条件下药材中川续断皂苷 VI 基本提取完全。文献[3]中采用乙醇提取川续断皂苷 VI 时收率最高可达 95.8%, 与本文水提工艺相差较小, 但选择水为提取溶剂, 不仅环保, 还可降低生产成本, 优选的工艺简单易行、稳定且提取效率高, 为续断药材资源的充分利用提供参考。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:309.
- [2] 牛银波, 潘亚磊, 李晨睿, 等. 续断防治骨质疏松的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7):892.
- [3] 董玉琼, 何晓红, 钟国跃. 正交法优选川续断的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(11):1107.
- [4] 张显涛. 续断皂苷元的制备工艺、质量标准及其作为 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂的活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011.

[责任编辑 刘德文]

the content of total alkaloids as index, orthogonal test was adopted to investigate effects of relative density of extract, concentration and time of alcohol precipitation on alcohol precipitation technology. UV was employed to determine the content of total alkaloids with detection wavelength at 416 nm. **Result:** The best water extraction and alcohol precipitation technology was as following: decocted twice with 10 times the amount of water for 1.5 h per time, relative density of extract of  $1.06 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , alcohol precipitation concentration 60%, storage time of 12 h; the concentration of total alkaloids was  $2.040 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . **Conclusion:** These optimized technologies were stable and feasible to provide a reference for standardized production of hemorrhoid fumigants.

**[Key words]** hemorrhoid fumigants; acid dye colorimetry; total alkaloids; *Sophorae Flavescentis Radix*; phellodendrine; oxymatrine

痔疮熏洗液为广西中医药大学第一附属医院肛肠科根据痔病“湿热蕴结、气血瘀滞”的基本病机并经过多年临床实践得到的协定处方,由功劳木、苦参、黄柏、石榴皮、芒硝、冰片等中药组成,具有清热利湿解毒、活血化瘀、行气通络、消肿止痛、祛腐生肌之功效,用于治疗炎性外痔、血栓性外痔、内痔嵌顿、痔疮术后等,临床使用已逾 10 年,疗效确切<sup>[1-3]</sup>。

功劳木、苦参和黄柏为方中君药,主要成分为盐酸小檗碱、氧化苦参碱、苦参碱和黄柏碱等。生物碱类成分的含量测定常采用 UV, HPLC, GC 及酸碱滴定法等,前 3 种方法对一种或几种单体生物碱含量的测定灵敏、准确,但中药材或其复方制剂中生物碱数目多,结构复杂;而酸碱滴定法测定总生物碱的含量结果误差较大,因为生物碱一般含有仲胺或者叔胺基团,能在一定 pH 下与溴甲酚绿结合,产生较强的吸收<sup>[4]</sup>。本实验采用酸性染料比色法测定痔疮熏洗液中总生物碱含量,以总生物碱含量和干膏率为综合评价指标,采用  $L_9(3^4)$  正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对水提工艺的影响,浓缩液相对密度、醇沉浓度、放置时间对醇沉工艺的影响,优选痔疮熏洗液的水提醇沉工艺,为该制剂的规范化生产提供实验依据。

## 1 材料

TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),GH-252 型电子分析天平(日本 A&D 公司),PHS-3C 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司),CD-UPT-II 型超纯水机(成都越纯科技有限公司)。

功劳木、苦参、黄柏等药材均购于广西南宁万宝堂药业有限公司,经广西中医药大学田辉教授鉴定分别为小檗科植物阔叶十大功劳 *Mahonia bealei* (Fort.) Carr. 的干燥茎,豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮等;盐酸

小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110713-201212),水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 溴甲酚绿指示液配制** 精密称取溴甲酚绿 125 mg,加  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 12.50 mL 溶解,加入邻苯二甲酸氢钾 2.55 g,加少量水使溶解,加水定容至 250 mL,摇匀,即得。

**2.2 干膏得率的测定** 精密吸取提取液 30 mL,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥 3 h,移至干燥器中,冷却 30 min,迅速精密称定干浸膏质量,计算干膏得率。

### 2.3 总生物碱的含量测定<sup>[5]</sup>

**2.3.1 供试品溶液的制备** 精密吸取本品 5 mL,置分液漏斗,加入氨水 5 mL,摇匀,用三氯甲烷提取 3 次,每次 10 mL,合并三氯甲烷提取液,蒸干,残渣加三氯甲烷 10 mL 使溶解,精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加三氯甲烷稀释至刻度,摇匀。精密吸取 0.5 mL 置分液漏斗中,加入水 0.5 mL,柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.8) 5 mL 和溴甲酚绿指示液 2 mL,摇匀,加入三氯甲烷 10 mL,充分振摇,静置 30 min,分取三氯甲烷层,即得。

**2.3.2 阴性溶液的制备** 按处方工艺制备缺功劳木、苦参和黄柏的痔疮熏洗液阴性样品,按 2.3.1 项下方法制备阴性样品溶液。

**2.3.3 吸收波长的选择** 以三氯甲烷为对照,分别将对照品溶液、供试品溶液和阴性溶液在 350 ~ 600 nm 扫描,结果显示供试品溶液和对照品溶液均在 416 nm 处有最大吸收,且吸收峰相同,而阴性溶液基本无吸收,故选择检测波长 416 nm。

**2.3.4 线性关系考察** 精密称取于  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品 20 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得对照品母液。精密吸取该母液 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.9 mL,补加水至 1

mL,加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.8)5 mL和溴甲酚绿2 mL,摇匀,精密加入三氯甲烷10 mL,充分振摇,静置30 min,分取三氯甲烷层,于416 nm处测定吸光度(A)。以对照品质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 0.0534C + 0.0558$  ( $r = 0.9995$ ),线性范围2.0~18.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.5 精密度试验** 取12 mg·L<sup>-1</sup>对照品溶液适量,按2.3.4项下方法连续测定5次,结果盐酸小檗碱A的RSD 0.09%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取同一份样品(批号20131104,下同),按2.3.1项下方法制备供试品溶液,分别在室温下0,2,4,8,12 h测定,每次测定后置于4℃冰箱中保存,结果盐酸小檗碱A的RSD 2.05%,表明供试品溶液至少在12 h内稳定。

**2.3.7 重复性试验** 取同一批样品5份,按2.3.1项下方法制备供试品溶液,按2.3.4项下方法测定A,计算盐酸小檗碱平均质量浓度2.043 g·L<sup>-1</sup>,RSD 0.52%,表明该方法重复性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 精密吸取同一批已知盐酸小檗碱质量浓度(2.043 g·L<sup>-1</sup>)的样品5 mL,共9份,均分为3组,按低、中、高3个量级分别精密加入盐酸小檗碱对照品,混匀,按2.3.1项下方法制备供试品溶液,按2.3.4项下方法测定A,结果见表1。

表1 痔疮熏洗液中总生物碱含量测定的加样回收率试验

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
9.614	19.501	96.59		
9.515	19.657	99.23		
9.561	19.651	98.69		
15.744	25.301	95.82		
15.584	25.603	98.74	97.13	1.49
16.548	26.209	96.65		
18.007	27.739	97.32		
18.119	27.506	95.43		
18.167	27.597	95.68		

**2.4 水提工艺优选** 根据熏洗液和有效成分盐酸小檗碱、苦参碱<sup>[6]</sup>、黄柏碱<sup>[7]</sup>等能溶于水或热水的特点,采用水煎煮提取法。选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,以总生物碱质量浓度和干膏得率的综合评分为指标,按1/10处方量称取功劳木、苦参、黄柏等药材,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表煎煮提取,水提液浓缩,加入95%乙醇,搅拌,静置,过滤,加水定量至250 mL,因素水平见表2,试验安排及结果见表3,方差分析见表4。

表2 痔疮熏洗液水提工艺正交试验因素水平

水平	A 加水量/倍	B 提取数/次	C 提取时间/h
1	8	1	0.5
2	10	2	1
3	12	3	1.5

表3 痔疮熏洗液水提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D (空白)	总生物碱 /g·L <sup>-1</sup>	干膏得率 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	0.982	14.43	52.90
2	1	2	2	2	2.050	15.20	95.34
3	1	3	3	3	1.994	17.25	95.23
4	2	1	2	3	1.355	14.64	67.65
5	2	2	3	1	1.987	18.71	96.43
6	2	3	1	2	1.641	18.83	83.02
7	3	1	3	2	1.340	14.73	67.16
8	3	2	1	3	1.489	17.58	75.86
9	3	3	2	1	1.685	19.82	85.74
K <sub>1</sub>	81.157	62.570	70.593	78.357			
K <sub>2</sub>	82.367	89.210	82.910	81.840			
K <sub>3</sub>	76.253	87.997	86.273	79.580			
R	6.114	26.640	15.680	3.483			

注:总生物碱质量浓度和干膏得率的权重系数分别为0.8,0.2。

表4 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	62.880	31.440	3.356	>0.05
B	1357.677	678.839	72.456	<0.05
C	408.857	204.429	21.820	<0.05
D(误差)	18.738	9.369		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0$ 。

由直观分析可知,各因素对水提取工艺的影响顺序为B>C>A。方差分析表明因素B,C对提取工艺的影响显著,因素A则影响不显著,确定最佳水提工艺条件为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即加10倍量水提取2次,每次1.5 h。

**2.5 醇沉工艺优选** 按最佳水提取工艺制备水煎液,以浓缩液相对密度、醇沉浓度、醇沉时间为考察因素,总生物碱质量浓度为评价指标,通过L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验优选醇沉工艺,因素水平见表5,试验安排及结果见表6,方差分析见表7。

由直观分析可知,各因素对醇沉工艺的影响顺序为F>G>E。方差分析表明因素F对醇沉工艺具有极显著性影响,因素E,G则均无显著影响,确

表5 痔疮熏洗液醇沉工艺正交试验因素水平

水平	E 浓缩液相对密度/ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	F 乙醇体积分数/%	G 放置时间/h
1	1.03	60	6
2	1.06	70	12
3	1.12	80	24

表6 痔疮熏洗液醇沉工艺正交试验安排及直观分析

No.	E	F	G	H(空白)	总生物碱/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	1	1	1	1	2.021
2	1	2	2	2	1.885
3	1	3	3	3	1.660
4	2	1	2	3	2.038
5	2	2	3	1	1.855
6	2	3	1	2	1.761
7	3	1	3	2	2.005
8	3	2	1	3	1.872
9	3	3	2	1	1.734
$K_1$	1.855	2.022	1.885	1.870	
$K_2$	1.885	1.870	1.886	1.884	
$K_3$	1.870	1.718	1.840	1.857	
R	0.029	0.303	0.046	0.027	

表7 醇沉工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
E	0.001	0.000 5	1	>0.05
F	0.138	0.069	138	<0.01
G	0.004	0.002	4	>0.05
H(误差)	0.001	0.000 5		

注： $F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。

定最佳醇沉条件为  $E_2F_1G_2$ ，即浓缩液相对密度  $1.06 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ )，醇沉浓度 60%，放置时间 12 h。

**2.6 验证试验** 按处方量称取同一批次药材 3 份，根据优选的水提醇沉工艺进行验证试验，结果总生物碱质量浓度分别为  $2.039\ 3, 2.038\ 5, 2.042\ 3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明优选的工艺稳定可行且操作简便。

### 3 讨论

功劳木、苦参、黄柏为方中君药，三者均含有多

种生物碱，功劳木、黄柏、苦参的主要有效成分分别为盐酸小檗碱、小檗碱和黄柏碱、苦参碱和氧化苦参碱，故将总生物碱作为控制指标，以全面反映痔疮熏洗液的提取情况。

本文采用溴甲酚绿比色法测定总生物碱含量<sup>[5]</sup>，由于痔疮熏洗液中盐酸小檗碱含量远高于其他生物碱类成分，故选择盐酸小檗碱为指标成分计算总生物碱含量，使试验结果稳定可靠、误差较小。预试验对缓冲液 pH 进行了考察，配制了 pH 2.8, 3.8, 4.8, 5.8, 6.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，结果发现缓冲液 pH 4.8 时 A 最大。

考虑到本品为复方制剂，干膏得率与产品生产及质量密切相关，故增加干膏率作为水提取工艺的评价指标，鉴于总生物碱含量及干膏得率对成品药效的影响，配制二者权重系数分别为 0.8, 0.2<sup>[8]</sup>。试验过程中发现本品水提液经高速离心后放置一段时间仍会产生较多沉淀，给熏洗带来不便，故将水提液进行醇沉处理，以达到纯化目的。

### [参考文献]

- [1] 李晶. PPH 配合痔疮外洗液治疗混合痔术后水肿 30 例[J]. 新中医, 2006, 38(10): 83.
- [2] 李晶. 痔疮外洗液坐浴治疗混合痔术后水肿 50 例[J]. 新中医, 2007, 39(7): 72.
- [3] 李晶, 孙平良, 刘春强. 地奥司明片联合痔疮外洗液治疗炎性外痔临床观察[J]. 新中医, 2010, 42(12): 49.
- [4] 刘喜纲, 刘翠哲, 常金花. 应用酸性染料比色法测定总生物碱的含量[J]. 中国药房, 2007, 18(11): 875.
- [5] 年华, 徐玲玲, 马明华, 等. 复方二仙汤中盐酸小檗碱及总生物碱的含量测定[J]. 药学实践杂志, 2008, 26(1): 38.
- [6] 刘冰, 吕佳. HPLC 测定苦参碱平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 43.
- [7] 张英, 李卫民. 大孔树脂 AB-8 动态吸附黄柏总生物碱的工艺研究[J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(3): 267.
- [8] 刘效栓, 陈二林, 张小华, 等. 正交试验法优选创伤科洁肤液的制备工艺[J]. 中药材, 2013, 36(5): 809.

[责任编辑 刘德文]