·中药工业·

CCD 联合色谱法优化燥湿洗剂的提取工艺△

陈晓双，宋毅，费小凡*

四川大学 华西医院 临床药学部，四川　成都　610041

［摘要］ **目的**：通过中心组合设计法（CCD）优化燥湿洗剂的提取工艺，以色谱法测定燥湿洗剂中黄芩苷的含量，提升其质量标准。**方法**：以黄芩中黄芩苷的含量为评价指标，通过响应面 Plackett-Burman 设计和 CCD 试验考察料液比、提取时间和提取次数 3 个主要影响因素对燥湿洗剂提取效果的影响，并对结果进行响应面分析，优化提取工艺。对燥湿洗剂中黄芩主要成分黄芩苷进行方法学考察，以验证 CCD 试验结果。**结果**：CCD 优化得燥湿洗剂最佳提取工艺为料液比 1∶10，提取时间 60 min，提取数 2 次，黄芩苷的量可达 1.183 6 mg·mL^{-1}，与模型预测值 1.204 2 mg·mL^{-1}相近。**结论**：综合运用响应面 CCD 联合色谱法优化燥湿洗剂的提取工艺，且优化所得工艺稳定、可行，优化的工艺参数可为其工业化生产提供参考。

［关键词］ 燥湿洗剂；提取工艺；中心组合设计法；色谱法

［中图分类号］ R284.2　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890（2021）05-0849-06

doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20200515001

Combined Central Composite Design Combined with Chromatographic Method for Optimization of Extraction Method of Zaoshi Lotion

CHEN Xiao-shuang，SONG Yi，FEI Xiao-fan*

Department of Clinical Pharmacy，West China Hospital of Sichuan University，Chengdu 610041，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：The quality standard of the Zaoshi Lotion was improved by optimization of the extraction process of lotion with CCD method，and determining the content of baicalin by chromatographic method. **Methods**：The content of baicalin，as the evaluation index，was detected in Plackett-Burman design and comined central composite of response surface methodology. Three pivotal influencing factors，such as the solid-to-liquid ratio，the time of extraction and extraction times，were screened and analyzed by response surface methodology. **Results**：The optimum Zaoshi Lotion extraction conditions were as follows：the solid-to-liquid ratio was 1∶10，the time of extraction was 60 min，extraction times were 2 times，the concentration of baicalin reached 1.183 6 mg·mL^{-1}，closely to the model predicted value of 1.204 2 mg·mL^{-1}. **Conclusion**：The extraction technology of Zaoshi Lotion has been optimized by combining CCD with chromatography method. The optimized extraction technology is stable and feasible and the optimized parameters could provide scientific basis for its further industrial production.

［**Keywords**］ Zaoshi Lotion；extraction technology；CCD；chromatographic method

燥湿洗剂为中药复方制剂，主要成分包括威灵仙、马齿苋、黄芩、大黄、黄柏等 13 味中药，具有清热燥湿、杀虫止痒的功效[1-3]。近年来，燥湿洗剂在临床上常应用于渗出性皮炎的治疗，效果良好。

目前，国内未见关于燥湿洗剂以提高主要活性成分为目的的工艺及质量标准研究的报道。黄芩苷为黄芩的主要活性成分，将黄芩苷作为该制剂的指标性成分，其在黄芩中的质量分数高达 10.11%[4]。黄芩苷具有清热、抗炎、杀菌等药理作用[5-7]。本研究以黄芩苷作为指标成分，采用线性回归的 Plackett-Burman（PB）设计和 Central Composite 设计[8-12]，分析主要影响因素间的交互作用，并联合液相色谱法对其成分测定进行方法学考察，优化处方提取工艺，提升质量标准，以建立全面的燥湿洗剂提取工艺方法，提高其治疗疗效，为进一步研究

△［基金项目］ 四川省科技支撑计划项目（2015SZ0039）；四川省重大科技专项（2017SZDZX0006）

*［通信作者］ 费小凡，主任药师，研究方向：中药新药研发；E-mail：feixiaofan1638@126.com

开发该处方提供参考。

1　材料

1.1　仪器

LC-10AVP 型高效液相色谱系统（日本岛津公司）；ME203E 型电子天平［梅特勒-托利多（Mettler-Toledo）仪器有限公司］；旋转蒸发仪（上海申顺生物科技有限公司）；SHZ（Ⅲ）型真空水泵（巩义市予华仪器有限责任公司）；AS3120 型超声清洗机（天津 AutoScience 仪器有限公司）。

1.2　试药

黄芩苷对照品（中国食品药品检定研究院，批号：110715-200815，纯度 > 99%）；乙醇、三氯甲烷、磷酸均为分析纯（成都市科龙化工试剂厂）；甲醇为色谱纯（美国 Sigma-Aldrich 贸易有限公司）；水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　黄芩苷含量测定方法学考察

2.1.1　对照品溶液制备　精密称取黄芩苷对照品适量，加甲醇使其质量浓度为 60 μg·mL^{-1}，即对照品溶液。

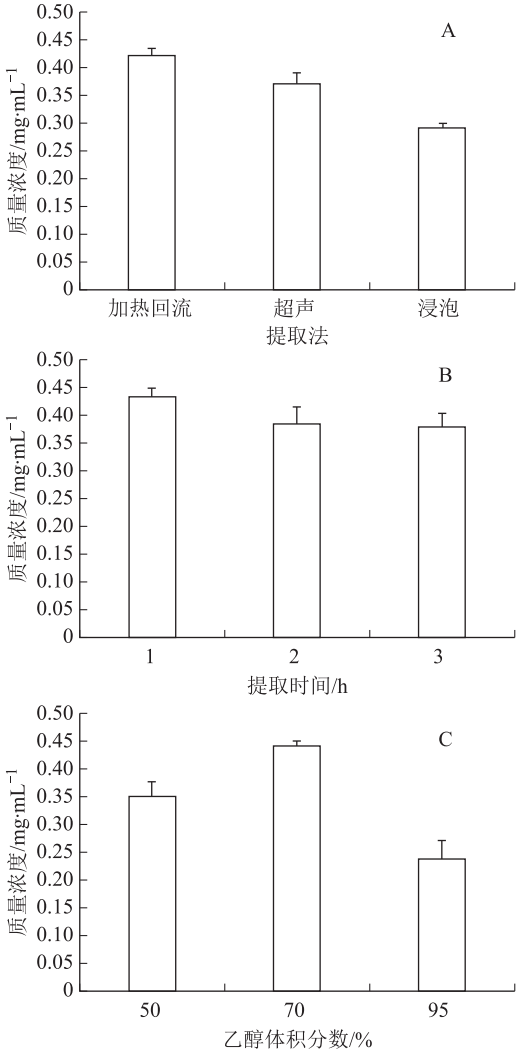
2.1.2　供试品溶液影响因素单因素考察

2.1.2.1　提取方法考察　精密量取 3 份燥湿洗液（上清液）各 2 mL，置于 50 mL 圆底烧瓶中，加 70% 乙醇 40 mL，分别采取加热回流提取 1 h、超声处理 1 h 和浸泡过夜 3 种方式进行提取，滤过，滤液置于 50 mL 量瓶中，用 70% 乙醇多次清洗滤纸和滤渣，并入 50 mL 量瓶中，定容至刻度，0.45 μm 微孔滤膜进行滤过，得供试品溶液。结果见图 1A。提取方法为加热回流时，黄芩苷的含量最高。

2.1.2.2　加热时间考察　分别采用 1、2、3 h 作为加热时间进行提取，其他操作同 **2.1.2.1**。结果见图 1B。加热提取时间为 1 h 时，黄芩苷的含量最高。

2.1.2.3　提取溶剂考察　分别采用 50%、70%、95% 乙醇各 40 mL 进行提取，其他操作同 **2.1.2.1**。结果见图 1C。提取溶剂为 70% 乙醇时，黄芩苷的含量最高。

2.1.2.4　供试品溶液制备　精密量取燥湿洗剂 2 mL，加入 70% 乙醇 40 mL，加热，冷凝回流提取 1 h，滤过，滤液置于 50 mL 量瓶中，用 70% 乙醇定容至刻度，0.45 μm 微孔滤膜进行过滤，得供试品溶液。



注：A. 不同提取方法；B. 不同加热提取时间；C. 不同提取溶剂比例。

图 1　不同提取方法、加热提取时间及提取溶剂对供试品中黄芩苷含量的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

2.1.3　色谱条件　色谱柱为 Amethyst C_{18}（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-0.2% 磷酸（47∶53）；流速：1 mL·min^{-1}；柱温：40 ℃；检测波长：（280 ± 4）nm；进样量：10 μL。

2.1.4　线性关系考察　配制质量浓度分别为 21.66、54.15、108.30、216.60、433.20、866.40 μg·mL^{-1} 黄芩苷对照品。采用液相色谱方法，进样量均为 10 μL，测定峰面积值。以峰面积值为纵坐标，对照品进样量为横坐标，绘制标准曲线，黄芩苷回归方程为 $Y = 4\ 703.1X + 5\ 738.7$，$r = 0.999\ 9$。结果表明，质量浓度为 0.022 ~ 0.866 mg·mL^{-1}，黄芩苷的峰面积值与对照品进样含量呈良好的线性关系。

2.1.5　精密度试验　精密吸取 **2.1.1** 项下黄芩苷对照品溶液 20 μL，注入液相色谱仪，重复进样 5 次，测定峰面积值，其 RSD = 0.53%，表明精密度良好。

2.1.6　稳定性试验　取供试品分别于 0、2、4、6、8、10 h 时进样 10 μL，测定峰面积，其 RSD = 0.78%，表明该供试品溶液在 10 h 内黄芩苷含量变化不大，说明 10 h 内该样品保持稳定。

2.1.7　重复性试验　精密量取同一燥湿洗剂样品，按供试品配制方法进行制备，制得 5 份供试品样品。精密吸取供试品溶液及上述对照品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪中，按 **2.1.3** 色谱条件连续进样，分别测定黄芩苷含量，并计算其 RSD = 1.11%，表明该方法的重复性良好。

2.1.8　加样回收率试验　分别精密量取已测定含量的供试品 6 份，每份 1 mL，分别置 6 个圆底瓶中，精密加入质量浓度为 0.405 mg·mL^{-1} 黄芩苷对照品溶液 1.0 mL，按上述供试品溶液制备方法和色谱条件，制备加样回收供试品溶液并注入高效液相色谱仪中，测定黄芩苷含量，RSD = 1.83%。表明本方法具有良好的回收率。

2.2　PB 设计优化提取工艺

通过 PB 试验筛选燥湿洗剂工艺中的最显著影响因素，通过引入粉碎粒度(A)、浸泡时间(B)、料液比(C)、提取次数(D)、提取时间(E)5 个影响因素，根据前期单因素筛选出的各因素水平范围，按照高效液相色谱法(HPLC)对不同组别中黄芩苷含量进行平行测定，综合考察这 5 个因素对燥湿洗剂中黄芩苷含量的影响。选用 $n = 12$ 的 PB 设计，每个因素取高(+)、低(−)2 个水平。PB 设计中，为了方差分析和估计试验误差，一般可增加 1 ~ 3 个虚拟变量，为保证误差估计的可信度，该设计表中增加了 F、G、H 3 个空白因素。利用 Design Expert 试验设计软件，设计 PB 试验，并对其结果进行分析(表 1)。

表 1　PB 设计筛选燥湿洗剂的不同影响因素和水平

水平	因素							
	A	B/min	C	D	E/min	F	G	H
−	2*	30	1:8	1	30	—	—	—
+	3*	60	1:12	3	60	—	—	—

注：2*(−)代表中碎；3*(+)代表细碎；—表示空白分组因子。

设计分组及结果见表 2，因素效应分析评价见表 3。表 2 所示，12 次试验中，A ~ E 的 5 个因素高(+)、低(−)水平分别出现了 6 次，当某个因子处于高水平时，其余因子各出现高、低水平各 3 次，通过计算这个因素在高、低水平时试验响应的均值并求两均值之差就可得到此因素的效应，其中 F ~ H 空项效应的均方和为标准差估计值。空项效应对应的标准差值均较小，说明该试验产生的随机误差较小。表 3 中模型的 P 值为 0.005 4，$P < 0.05$，说明该模型具有显著性。表 3 中 F 值的大小表明，料液比 > 提取次数 > 提取时间，故对黄芩苷含量影响最大的 3 个因素分别是料液比、提取次数和提取时间。选取这 3 个因素进行后续 CCD 试验。

表 2　PB 设计筛选燥湿洗剂不同影响因素的结果

实验号	A	B	C	D	E	F	G	H	黄芩苷质量浓度/mg·mL^{-1}
1	−	+	+	−	+	+	+	−	1.10
2	−	−	+	−	+	+	−	+	1.41
3	+	+	+	−	−	−	+	−	2.21
4	−	−	−	−	−	−	−	−	1.31
5	+	+	−	−	−	+	−	+	1.89
6	−	−	−	+	−	+	+	−	1.80
7	+	+	−	+	+	+	−	−	0.82
8	+	−	+	+	−	+	+	+	1.41
9	+	−	+	+	+	−	−	−	1.65
10	−	+	−	+	+	−	+	+	1.48
11	+	−	−	−	+	−	+	+	2.20
12	−	+	+	+	−	−	−	+	0.70

表 3　PB 设计筛选燥湿洗剂不同影响因素的方差分析结果

影响因素	影响值	F 值	P 值
Model	25 062.22	20.86	0.005 4
A	40.33	0.24	0.653 2
B/min	1 986.29	11.47	0.027 6
C	12 640.03	73.66	0.001 0
D	3 268.03	19.04	0.012 0
E/min	3 383.36	19.72	0.011 3

2.3　响应面法优化提取工艺试验

综合 PB 试验和单因素影响试验结果，筛选出影响最显著的 3 个因子，即料液比(X_1)、提取时间(X_2)和提取次数(X_3)，利用 Design-Expert 8.0.5b 软件进行 CCD 响应面设计，采用 3 因素 3 水平，中心点重复 6 次，共运行试验 20 次，试验设计与结果见表 4 ~ 5，方差分析结果见表 6。

根据 Design-Expert 8.05b 对表 5 中指标进行多元回归拟合，得到方程 $Y = 120.41 + 4.74X_1 +$

$16.60X_2 + 5.32X_3 + 6.92X_1X_2 + 1.52X_1X_3 + 2.10X_2X_3 - 11.68X_1^2 - 9.11X_2^2 - 9.76X_3^2$。方差分析及回归系数显著性检验结果显示，所建立的二次多项式模型 P 为 0.015 3，具有显著性（$P < 0.05$），且模型拟合度良好。

将因变量与另外两因素拟合为三维立体作用图和预测图，结果见图 2。响应面曲面图是对各因素与两两因素的交互作用的最直观的反应，提取时间对燥湿洗剂黄芩苷含量影响最大，其次为料液比，提取次数影响最小。提取时间与料液比的交互作用对燥湿洗剂提取效果影响最大，其次为提取次数与料液比的交互作用，提取时间与提取次数的交互作用最不显著。

表 4　响应面设计燥湿洗剂中显著影响因素及水平

水平	因素		
	X_1/min	X_2	X_3
-1	30	1	1:8
0	60	2	1:10
1	90	3	1:12

表 5　燥湿洗剂中显著影响因素的响应面设计及其黄芩苷含量

编号	X_1	X_2	X_3	黄芩苷质量浓度/mg·mL^{-1}
1	60	2	10	1.187 8
2	90	2	10	0.748 2
3	60	2	8	0.808 5
4	30	3	12	0.956 6
5	60	2	12	1.164 1
6	30	1	8	0.903 5
7	90	3	8	1.028 2
8	30	1	12	0.752 8
9	60	2	10	1.202 2
10	60	3	10	0.556 3
11	60	2	10	1.215 1
12	90	1	8	0.631 6
13	30	3	8	0.802 3
14	60	2	10	1.189 5
15	60	2	10	1.217 8
16	60	2	10	1.192 5
17	60	3	10	1.453 3
18	90	3	12	1.022 4
19	90	1	12	0.762 6
20	30	2	10	1.115 7

表 6　燥湿洗剂中显著影响因素的响应面结果及方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	8 693.69	9	4.38	0.015 3
X_1	307.14	1	1.39	0.265 3
X_2	3 765.04	1	17.07	0.002 0
X_3	386.84	1	1.75	0.214 9
X_1X_2	383.37	1	1.74	0.214 9
X_1X_3	18.48	1	0.08	0.778 1
X_2X_3	35.36	1	0.16	0.697 3
X_1^2	1 966.63	1	8.92	0.013 7
X_2^2	1 195.01	1	5.42	0.042 2
X_3^2	1 372.85	1	6.22	0.031 7
残差	2 205.64	10		
失拟项	2 197.03	5	255.16	<0.000 1
净误差	8.61	5		
总离差	10 899.34	19		

根据 Design-Expert 8.0.5b 软件优化燥湿洗剂最佳提取工艺条件为提取时间 60 min、提取数 2 次、料液比 1:10。

2.4　验证实验

根据 Design Expert 8.05b 软件优化出最佳提取工艺：粉碎粒度为细碎，浸泡时间为 60 min，料液比为 1:10，提取时间为 60 min，提取数为 2 次。为了检验结果的可靠性，精密平行称定 5 份按上述优化工艺进行实验，测定黄芩中黄芩苷质量浓度分别 1.156 8、1.229 4、1.165 4、1.186 8、1.179 7 mg·mL^{-1}，平均质量浓度为 1.183 6 mg·mL^{-1}，与响应面法预测值 1.204 2 mg·mL^{-1}的相对误差为 1.70%，说明验证值与回归方程预测值吻合较好，优化后的燥湿洗剂提取工艺对进一步生产具有一定的指导意义。

3　讨论

在影响燥湿洗剂提取工艺的各因素中，为筛选多因素对黄芩苷主要药效成分表达量的影响，前期通过单因素试验，对药材粉碎粒度、浸泡时间、料液比、提取时间和提取次数进行初步筛选。结果显示，以燥湿洗剂中黄芩苷含量为指标，不同影响因素的最佳表达水平：粉碎粒度为细碎（1 ~ 6 mm）、浸泡时间为 60 min、料液比为 1:10、提取1 h、共提取 2 次。进而在初步筛选的范围基础上，通过 PB 试验，同时对多个因素进行交互作用分析，根据 F 值

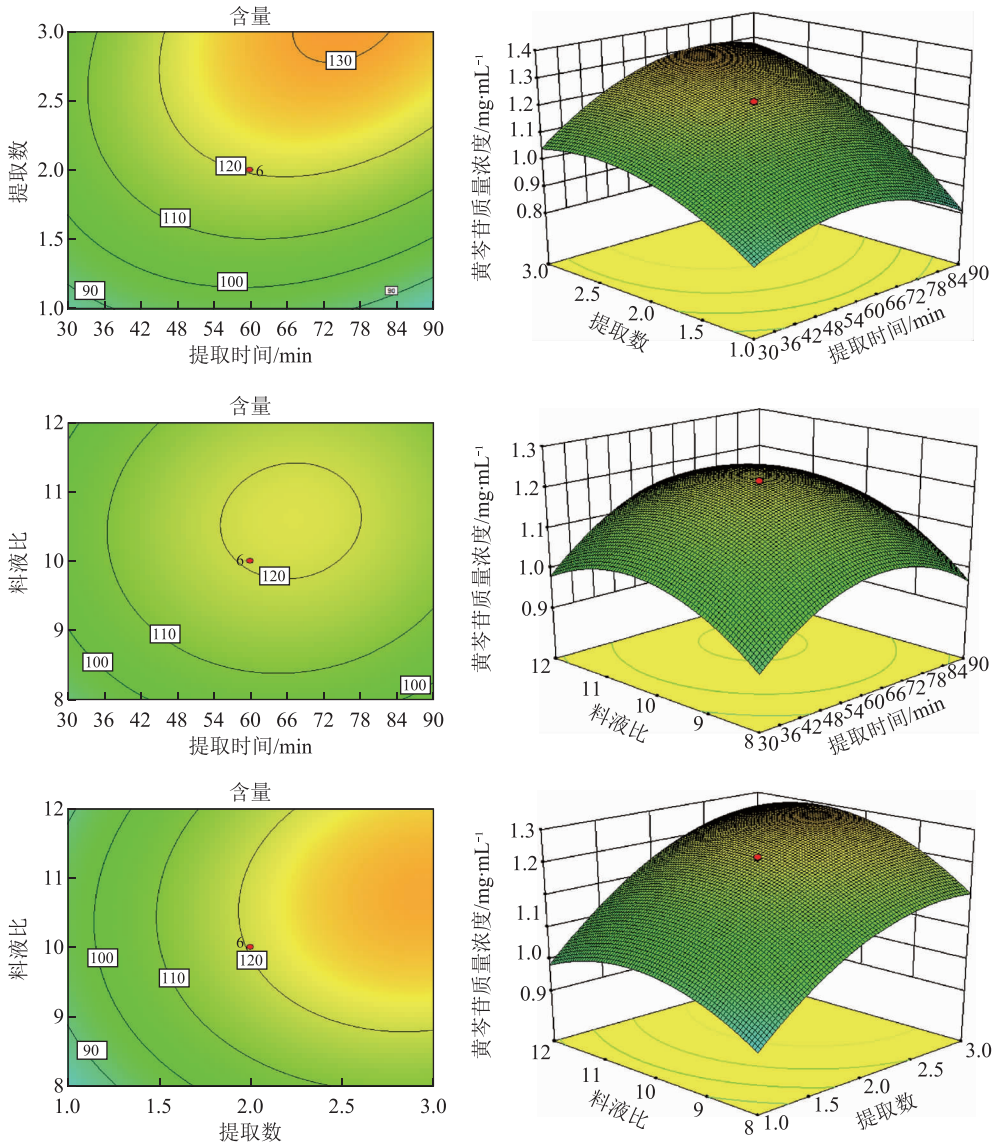


图 2　提取时间、提取次数、料液比对燥湿洗剂提取效果的响应面三维效应面图

大小，筛选具有显著性的关键因素，结果显示，影响燥湿洗剂中黄芩苷含量最主要的 3 个影响因素为料液比、提取时间和提取次数。将这 3 个主要影响因素进行响应面分析，通过 CCD 试验，观察各影响因素间的交互作用及燥湿洗剂提取工艺中的最佳工艺和表达量。分析结果表明，燥湿洗剂最优提取工艺为料液比为 1∶10，提取时间为 60 min，提取次数为 2 次，每 100 mL 燥湿洗剂中黄芩苷的量最高，提取效果最好，优于单因素优化结果。在燥湿洗剂提取工艺优化过程中，采用 PB 设计、响应面设计方法，比传统的正交试验更为精确和快捷，通过求解线性回归方程模型，可以预测出最佳的工艺条件，具有精度高、模型预测好的优点。

综合单因素试验、PB 试验和响应面试验结果，得到燥湿洗剂的最佳提取工艺：以水为提取剂，粉碎粒度为细碎，提取前浸泡 60 min，料液比为 1∶10，提取 1 h，共提取 2 次，燥湿洗剂中黄芩苷质量浓度可达 1.183 6 mg·mL^{-1}。综合分析单因素试验、PB 试验及 CCD 试验结果，采用该方法能够对燥湿洗剂提取工艺进行优化，并提高有效成分的含量，该方法能够为燥湿洗剂的综合开发利用提供参考。

参考文献

[1]　付强，王萍，杜宇凤，等. 威灵仙化学成分及其药理活性最新研究进展[J]. 成都大学学报(自然科学版)，2018，37(2)：113-119.

[2]　王慧，周红潮，张旭，等. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药，2019，30(4)：955-958.

(下转第 867 页)

积的大小，这可能与加热时间延长及温度的升高有关。

3.3　干姜不同炮制品的临床应用的内在依据

金元医家李杲云："干姜，生辛炮苦，阳也，生用逐寒邪而发表，炮则除胃冷而守中"[10]，表明生品干姜与其炮制品功效有明显差异，临床应用有所区别。本实验研究表明，炮制前后，土炒干姜、炮姜及姜炭有新色谱峰出现，这可能是干姜不同炮制品的临床应用不同的内在依据。

3.4　干姜不同炮制品增加指标性成分质量控制

研究表明，姜酚具有舒张血管并表现良好的抑制血小板聚集作用[11]。本研究表明，炮姜、姜炭的姜酚含量明显低于生品干姜、清炒干姜、土炒干姜，与其长于止血相吻合。且不同干姜炮制品化学组成成分的存在差异，而成分差异主要标记物为已确定的 6-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚 3 个药效成分，对其临床疗效产生不同影响。故应增加不同干姜炮制品中 6-姜酚、6-姜烯酚、10-姜酚等成分的含量控制，进一步提高其安全性、有效性。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：15.

[2]　中医研究院中药研究所，北京药品生物制品检定所. 中药炮制经验集成[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社，1974：109.

[3]　福建省卫生局. 福建省中药饮片炮制规范[M]. 福州：福建科学技术出版社，1998：30-31.

[4]　甘肃省卫生局. 甘肃省中药饮片炮制规范[M]. 兰州：甘肃文化出版社，2009：5.

[5]　北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范[M]. 北京：化学工业出版社，2008：4.

[6]　薛丹丹，张科卫，钱琏. 干姜、姜皮和姜炭的 HPLC 指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21(5)：57-60.

[7]　王小平，杨丽珠，夏玉苹，等. 基于化学模式识别技术的不同产地土炒白术质量比较研究[J]. 中国现代中药，2018，20(7)：855-859.

[8]　龙全江，李文涛，张颖，等. 不同加工法制得的干姜片及炮制品高效液相色谱指纹图谱比较研究[J]. 甘肃中医药大学学报，2019，36(2)：23-27.

[9]　李鹏辉，严辉，朱邵晴，等. 干姜 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J]. 中成药，2019，41(9)：2246-2251.

[10]　韩燕全，洪燕，桂洁，等. 不同产地生、干、炮姜的 UPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中成药，2013，35(2)：356-359.

[11]　刘伟，周春丽，赵婧，等. 姜酚的研究进展[J]. 食品研究与开发，2014，35(17)：127-131.

（收稿日期：2020-05-21　　编辑：王笑辉）

（上接第 853 页）

[3]　郭姗姗，杨晓蓓，刘菁. 自拟燥湿止痒洗剂治疗慢性肛周湿疹 60 例临床观察[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2019，18(1)：68-69.

[4]　WEI F Y，WANG X，ZHANG X Y. Application of graphene oxide as a catalyst to accelerate extraction of total flavonoids and the hydrolysis of baicalin from Radix Scutellaria[J]. Sep Purif Technol，2014，133：421-428.

[5]　罗燕子. 中药黄芩的化学成分及药理作用的相关研究进展[J]. 临床合理用药杂志，2018，11(30)：180-181.

[6]　MUHAMMAD S，ARHAM S，KEN W. The antioxidant effects of Radix Astragali (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease[J]. Current Drug Targets，2016，17(12)：1331-1340.

[7]　QINGYUN J，TENGTENG W，XIAOYUN W，et al. Astragalin suppresses inflammatory responses and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis and in human fibroblast-like synoviocytes[J]. Front Pharmacol，2019，94(10)：1-14.

[8]　王仁广，贾艾玲，邱智东，等. 响应面法优化黄芩中黄芩苷的电磁裂解提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(21)：106-111.

[9]　李化，贺敬霞，牟倩倩，等. BBD-RSM 结合多指标法优选黄芩黄酮的红外快提工艺[J]. 中药材，2017，40(9)：2133-2137.

[10]　陈晓双，张培，李文尧，等. 响应面法优化柴芩承气汤提取工艺的研究[J]. 中药材，2018，41(8)：1954-1957.

[11]　张雅蓉，徐犇，李纳，等. 响应面法优化黄芩茎叶对照提取物纯化工艺及其特征图谱研究[J]. 中国现代中药，2019，21(5)：654-661.

[12]　张舒彦，陈昊，徐翠珊，等. 星点设计-效应面法优化黄芩总黄酮固体脂质纳米粒的处方研究[J]. 中医学报，2019，34(7)：1487-1491.

（收稿日期：2020-05-15　　编辑：王笑辉）