

多指标正交试验优选双花解毒颗粒中水提部分提取工艺

★ 丁志军* 廖银根 罗美兰 谭志江 (江西省皮肤病专科医院 南昌 330001)

摘要:目的:优选双花解毒颗粒水提部分提取工艺。方法:采用正交试验设计,以绿原酸、芍药苷含量及干膏率为指标,选取 $L_9(3^4)$ 正交表,优化提取工艺中加水量、煎煮次数、煎煮时间3个因素。结果:以饮片投料,加12倍量的水煎煮2次,第一次1.5 h,第二次1.0 h为最佳工艺。结论:该工艺稳定可靠,可用于生产。

关键词:双花解毒颗粒;正交试验;综合评分法;高效液相色谱法

中图分类号:R 284.2 文献标识码:A

Optimization of Extraction Technology of the Water Extraction Part in Shuanghua Detoxification Granules by Orthogonal Design with Multi-targets

DING Zhi-jun, LIAO Yin-gen, LUO Mei-lan, TAN Zhi-jiang

Jiangxi Specialized subject hospital of skin, Nanchang 330001, China

Abstract: Objective: To optimize the extraction technology for the water extraction part in Shuanghua detoxification Granules. Methods: With the yield of extracts yield and the contents of Chlorogenic acid and Paeoniflorin as indexes, orthogonal table $L_9(3^4)$ was used in the experiment of extracting in water to study the effect of technological parameters (the dosage of water, extraction times, the time of extraction) on the content of Chlorogenic acid and Paeoniflorin. Results: The optimum process is that water is used as extracting solution adding 12 times amount of solution, extracting 2 times, 1.5 hours for the first time and 1.0 hour for the second time. Conclusion: The extraction process is stable and suitable for industrial production.

Key words: Shuanghua detoxification; Orthogonal test; Grading methods; HPLC

双花解毒颗粒系江西省皮肤病专科医院中医科专家经十几年临床总结,拥有自主知识产权(专利号:ZL200410033920.X)的经验方。其由金银花、连翘、菊花、赤芍等八味中药组成,具有清热解毒,祛瘀排脓的功效。临床上主要用于治疗由风、热、湿毒所致的痤疮、面部接触性皮炎等皮肤病。为了将双花解毒汤剂更好地应用于临床上,江西省皮肤病专科医院根据其有效成分的性质和药理作用,将处方中药物分为水提组和醇提组分别提取,研究开发出服用、携带方便的双花解毒颗粒剂。现就其水提组工艺研究报道如下。

1 仪器与试药

Agilent 1100 型高效液相色谱系统(安捷伦科技有限公司);CP225D 微量天平(德国 Sartorius);KQ-500E 型医用超声清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

绿原酸(中国药品生物制品检定所,批号 110753-200413);芍药苷(中国药品生物制品检定所,批号 110736-200833)。甲醇为色谱纯,其余所有试剂均为分析纯。本试验中所用的药材均由安徽亳州提供。

2 方法与结果

2.1 考察指标的确定

双花解毒颗粒处方中有多味中药,有效成分众

* 作者简介:丁志军(1981-),男,汉族,工程师/中药师,硕士,研究方向为中药制剂。

多,因此以干膏率作为考察指标之一较全面合理;同时选取君药金银花、臣药菊花都含的有效成分绿原酸,另一臣药赤芍中有效成分芍药苷含量作为考察指标,符合中药多靶点,多方位的原则^[1-2]。

2.2 考察指标的测定方法

2.2.1 干膏率的测定方法 精密移取正交试验提取浓缩液 50 ml,平行 3 份,分别置于已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,并于 105 ℃ 干燥 3 h,迅速取出,置于干燥器中放置 30 min,迅速精密称定干膏重量。干膏率(%) = 干膏重(mg) × 浓缩液总量(ml)/取样量(ml)/生药总量(mg) × 100%。

2.2.2 绿原酸、芍药苷含量测定方法 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Phenomenex C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A) - 1% 磷酸溶液(B) 梯度洗脱,洗脱条件见表 1;DAD 检测器,检测波长 327 nm (绿原酸), 230 nm (芍药苷);流速:0.8 ml/min;柱温:40 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱

t/min	A/%	B/%
0 - 12	18 - 30	82 - 70
12 - 20	30 - 33	70 - 67
20 - 30	33	67

对照品溶液的配制:取绿原酸对照品、芍药苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加甲醇溶解制成每 1 ml 分别含 0.34 mg、0.11 mg 的对照品溶液,即得(10 ℃ 以下保存)。

线性关系考察:精密吸取混合对照品溶液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 μl 分别注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,进行线性回归,绿原酸的回归方程为 $Y = 119\,381.86X + 0.47$,线性范围为 0.68 - 3.40 μg ($r = 0.999\,8$);芍药苷的回归方程为 $Y = 554\,197.55X + 0.34$,线性范围为 0.22 - 1.10 μg ($r = 0.999\,6$)。

供试品溶液的配制:精密量取提取浓缩液 15 ml,水浴蒸干,转移至具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 ml,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 35 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,即得。

阴性对照溶液的制备:按处方比例,称取本处方中除金银花、菊花、黄芩、黄柏外的各味药材,分别加 10 倍水,煎煮两次,每次 2 h,减压浓缩,定容至 2000 ml,按上述供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液;另按处方比例同法制备缺赤芍、黄芩、黄柏的阴性对照溶液。

测定法:分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 5 μl,注入液相色谱仪测定其峰面积,计算绿原酸、芍药苷含量。液相图见图 1。

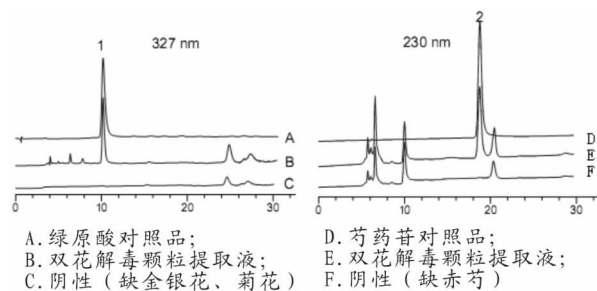


图 1 高效液相色谱图

1 - 绿原酸; 2 - 芍药苷

2.3 正交试验法优选提取工艺

2.3.1 确定权重系数 以绿原酸、芍药苷含量及干膏率 3 项指标为评价标准,其权重采用层次分析法(AHP)进行分析^[3]。

建立评价目标树 双花解毒颗粒提取工艺总评价目标可通过指标性成分、浸出物次级目标来反映,指标性成分通过绿原酸、芍药苷 2 个目标来反映。

构成两两比较优先矩阵 比较同一层次目标的相对重要性,并构成两两比较矩阵。目标树中 3 项目标成对比较的优先矩阵见表 2,评分标准见表 3。

表 2 3 项目标成对比较优先矩阵

目标	绿原酸	芍药苷	干膏率
绿原酸	1	3	5
芍药苷	1/3	1	3
干膏率	1/5	1/3	1

表 3 3 项目标成对比较评分标准

对比打分	相对重要程度	说明
1	同等重要	两者对目标的贡献相同
3	略微重要	根据经验一个比另一个评价稍有利
5	基本重要	根据经验一个比另一个评价更为有利
7	确实重要	一个比一个更有利,且在实践中证明
9	绝对重要	重要程度明显
2,4,6,8	两相邻程度的中间值	需要折中采用

计算初始权重系数 按公式 $w_i' = \sqrt[m]{a_{i1}a_{i2}a_{i3} \dots a_{im}}$ 计算初始权重系数 w_i' 。 $w_1' = \sqrt[3]{1 \times 3 \times 5} = 2.466\,21$,同理可得: $w_2' = 1.000\,00$, $w_3' = 0.405\,48$ 。

计算归一化权重系数 按公式 $w_i = \frac{w_i'}{\sum_{i=1}^m w_i'}$, 计算归一化权重系数。

$w_1 = 2.466\,21 / (2.466\,21 + 1.000\,00 + 0.405\,48) = 0.636\,98$,同理可得: $w_2 = 0.258\,28$, $w_3 = 0.104\,73$ 。

计算权重系数随机一致性比率 按公式 $CR =$

CI/RI 计算随机一致性比率, $CI = \frac{\lambda_{\max} - m}{m - 1} (\lambda_{\max} = 1 / m \sum_{i=1}^m (\sum_{j=1}^m a_{ij} \times w_i \div w_j))$, m 为受检验层次的次目标数), 查找相应的平均随机一致性指标 RI (random index), 见表 4。

表 4 平均随机一致性指标 RI 表

矩阵阶数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RI	0	0	0.58	0.90	1.12	1.24	1.32	1.41	1.45

$\lambda_{\max} = 1/3 [(1 \times 0.636\ 98 + 3 \times 0.258\ 28 + 5 \times 0.104\ 73) / 0.636\ 98 + (1/3 \times 0.636\ 98 + 1 \times 0.258\ 28 + 3 \times 0.104\ 73) / 0.258\ 28 + (1/5 \times 0.636\ 98 + 1/3 \times 0.258\ 28 + 1 \times 0.104\ 73) / 0.104\ 73] = 3.038\ 50$; $CI = (3.038\ 50 - 3) / (3 - 1) = 0.019\ 25$;

$CR = 0.019\ 25 / 0.58 = 0.033\ 18$, $CR < 0.1$ 。

2.3.2 试验设计 经过预试验, 多方考察影响水煎煮的因素, 选择加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为影响水煎煮的主因素, 每个因素选取 3 个水平, 以绿原酸、芍药苷含量及干膏率综合得分为评价指标, 用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 因素水平与正交试验设计见表 5-6。

表 5 因素水平

水平	因素		
	A/倍	B/h	C/次
1	10	1.0	1
2	12	1.5	2
3	14	2.0	3

2.3.3 正交试验安排及结果 按处方(除黄柏和黄芩外)比例称取金银花、菊花、赤芍等六味药材 135 g, 共 9 份。根据 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表, 将金银花和菊花提取挥发油, 过滤, 滤液另存, 备用; 药渣与其它四味药材加水混合提取, 提取完毕后, 将不同条件下的水提液与上述滤液混合, 分别浓缩至适量, 定容至 2000 ml, 称定重量, 备用。以绿原酸、芍药苷含量及干膏率为考察指标进行试验。结果见表 6~7。

表 6 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	干膏率/%	绿原酸含量/ mg·mL ⁻¹	芍药苷含量/ mg·mL ⁻¹	综合得分
1	1	1	1	1	16.70	0.791 0	0.170 2	70.84
2	1	2	2	2	21.29	0.997 5	0.245 2	92.63
3	1	3	3	3	21.62	0.983 5	0.224 2	89.71
4	2	1	2	3	22.83	1.022 0	0.244 5	94.56
5	2	2	3	1	21.98	1.071 0	0.230 2	95.67
6	2	3	1	2	22.01	0.864 5	0.203 2	80.55
7	3	1	3	2	22.95	1.008 0	0.220 5	91.24
8	3	2	1	3	25.83	0.847 0	0.201 0	80.62
9	3	3	2	1	29.81	1.022 0	0.224 2	94.87
K_1	253.18	256.64	232.02	261.38				
K_2	270.78	268.92	282.07	264.43				
K_3	266.74	265.13	276.61	264.89				
R	17.60	12.29	50.05	3.51				

表 7 方差分析结果

变异来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	56.641	2	28.320	23.402	<0.05
B	26.360	2	13.180	10.891	<0.10
C	502.739	2	251.369	207.718	<0.01
误差	2.420	2	1.210		

注: $F_{0.1(2,2)} = 9.00$, $F_{0.05(2,2)} = 19.00$

由直观分析可知, 综合评分数据的极差大小显示各因素主次为 $C > A > B$, 方差分析结果表明, A、C 为主要因素, B 为次要因素。综合分析, 考虑到工业生产节省时间, 提高效率, 最终确定最佳工艺为: 加 12 倍量水煎煮 2 次, 第一次 1.5 h, 第二次 1.0 h。

2.3.4 最佳提取工艺验证 为了进一步验证正交试验结果的准确性, 以确保提取工艺合理可行, 按上述最佳工艺条件重复安排 3 批试验。结果见表 8。

表 8 最佳提取工艺验证结果

试验序号	干膏率/%	绿原酸含量/ mg·mL ⁻¹	芍药苷含量/ mg·mL ⁻¹
1	23.39	1.069 2	0.244 2
2	22.74	1.068 9	0.243 1
3	22.48	1.070 3	0.242 3

3 讨论

在测定指标成分含量时, 以 HPLC 同时测定双花解毒颗粒提取液中绿原酸、芍药苷含量, 对其方法学进行了考察, 分离效果理想, 重现性好, 考虑到本文主要报道提取工艺研究, 故暂未将其列入正文。

本试验采用正交试验的方法, 以金银花和菊花中绿原酸、赤芍芍药苷含量及干膏率为指标, 运用多指标综合评分法优化提取工艺中加水量, 煎煮时间、煎煮次数 3 个因素, 得到最佳工艺, 并经验证试验最终确定提取工艺为 12 倍量水煎煮 2 次, 第一次 1.5 h, 第二次 1.0 h。结果表明优选的提取工艺简单, 可操作性强。

参考文献

- [1] 王筱亮, 张玉杰, 陈明霞, 等. 多指标正交试验优选酸枣仁最佳提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 753.
- [2] 李丽, 周军, 张莹, 等. 多指标综合评分法优化痛风宁颗粒提取工艺[J]. 中成药, 2007, 29(2): 82.
- [3] 任爱农, 卢爱玲, 田耀洲, 等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372-374.

(收稿日期: 2011-11-20)