

多指标加权评分法优选肛洗二号凝胶剂的提取工艺

庞晓晨^{1,2}, 刘志东¹, 黄瑞¹, 成睿珍², 赵静², 潘卫三^{3*}

- (1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193;
2. 天津市滨海新区中医医院, 天津 300451; 3. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:为了更好地保证肛洗二号凝胶剂的临床疗效和质量控制,优选其提取工艺。方法:采用 UPLC 测定芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素的含量,流动相乙腈-0.1% 甲酸梯度洗脱,流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 260 nm。以盐酸小檗碱、芦丁和槲皮素提取量的综合评分为评价指标,通过单因素试验和正交试验考察提取次数、提取时间和溶剂用量对提取工艺的影响。结果:最佳提取工艺为加 10 倍量水提取 3 次,每次 1 h。在该工艺条件下,芦丁、盐酸小檗碱、槲皮素平均提取量分别为 9.154, 1.264, 0.734 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论:优选的提取工艺稳定、可靠,为肛洗二号凝胶剂的进一步开发利用提供实验依据。

[关键词] 提取工艺; 正交试验; 盐酸小檗碱; 芦丁; 槲皮素; 综合评分法

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0022-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1134.010.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 11:34

Optimization of Extraction Technology of Gangxi II Gels by Multi-index Weighted Scoring Method

PANG Xiao-chen^{1,2}, LIU Zhi-dong¹, HUANG Rui¹, CHENG Rui-zhen², ZHAO Jing², PAN Wei-san^{3*}

- (1. Engineering Research Center for Discovery and Preparation Technique of Modern Chinese Medicine, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Province and Ministry, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 2. Binhai New Area Hospital of TCM, Tianjin 300451, China; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction conditions of Gangxi II gels. **Method:** UPLC was employed to determine contents of berberine hydrochloride, rutin and quercetin in gels with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution, flow rate of $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and detection wavelength at 260 nm. Taking composite score of extracting amounts of berberine hydrochloride, rutin and quercetin as index, orthogonal test and single factor tests were adopted to optimize extraction process. **Result:** Optimum extraction technology was: extracted thrice with 10 times the amount of water for 1 hour of per time; under these conditions, extracting amounts of rutin, berberine hydrochloride and quercetin were 9.154, 1.264, 0.734 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This optimized technology is stable and feasible, which offers expermental basis for further development of Gangxi II gels.

[Key words] extraction technology; orthogonal test; berberine hydrochloride; rutin; quercetin; comprehensive scoring method

[收稿日期] 20151129(002)

[基金项目] 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题(2015144)

[第一作者] 庞晓晨,博士,从事中药制剂研究, Tel:13194638841, E-mail:pangxiaochen@163.com

[通讯作者] *潘卫三,教授,从事药剂学研究, E-mail:ppwss@163.com

肛洗二号为天津市滨海新区中医医院肛肠科使用多年的中药复方熏洗剂,处方由黄柏、苦参、槐花、五倍子、乳香、没药等 12 味中药组成,是临床用于湿热瘀阻型混合痔术后患者熏洗的经验方,对于混合痔术后缓解水肿及疼痛的效果显著。方中君药为黄柏,臣药为槐花,具有清热解毒、消肿止痛、活血化瘀、敛疮生肌的功效^[1-3]。但由于该制剂存在保存时间短且使用不便,故对其进行再次开发研究,拟将其开发成方便患者使用和保存的中药凝胶剂。考虑到该复方药味众多、成分复杂,为了达到较好的分离效果,缩短分析时间,避免杂质峰的干扰,故本实验以黄柏中的有效成分盐酸小檗碱、槐花中的有效成分芦丁和槲皮素含量的综合评分为考察指标,采用单因素试验和正交试验优选肛洗二号凝胶剂的水提取工艺,以保证该制剂的临床疗效。

1 材料

ACQUITY H-Class 型超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),XP205 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Sorvall ST 16R 型高速离心机(德国 Thermo Fisher 公司),Milli-Q 型超纯水制备仪(美国 Millipore 公司)。盐酸小檗碱、芦丁、槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-201212,100080-201409,100081-201509),黄柏、苦参、槐花等药材饮片(天津市中药饮片厂有限公司和北京盛世龙药业有限公司,经天津滨海新区中医医院药剂科宋斌主管中药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》一部规定),乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱、芦丁和槲皮素的含量测定^[4-5]

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 15% A; 6 ~ 7 min, 15% ~ 25% A; 7 ~ 13 min, 25% A; 13 ~ 16 min, 25% ~ 70% A),流速 0.3 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 30 °C,进样量 2 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素对照品适量,置于同一 50 mL 量瓶中,加 80% 甲醇定容,得质量浓度分别为 200.8, 100.4, 101.6 mg·L⁻¹ 的混合对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取处方量饮片,加 8 倍量水浸泡 0.5 h,提取 1 h,过滤,取续滤液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇定容,于 1 万 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,经 0.20 μm 滤膜滤过,即得。

2.1.4 阴性样品的制备 按处方比例称取除黄柏及槐花以外的其余药材,按 2.1.3 项下方法制备,分别制得缺黄柏和槐花的阴性样品溶液。

2.1.5 标准曲线的绘制 精密量取混合对照品贮备液适量,用 80% 甲醇稀释至刻度,得系列混合对照品溶液。按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素回归方程分别为 $Y = 12\ 059X - 4\ 216$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 24\ 175X - 3\ 920.7$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 23\ 116X - 4\ 999.4$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围依次为 2.01 ~ 160.64, 1.00 ~ 80.32, 1.02 ~ 81.28 mg·L⁻¹。

2.1.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 2 μL,按 2.1.1 项色谱条件连续进样 5 次,计算芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.8% 和 0.8%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,置室温条件下密闭保存,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 按 2.1.1 项色谱条件测定,结果芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素含量的 RSD 分别为 1.2%, 0.9% 和 1.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一供试品溶液适量,共 6 份,按 2.1.1 项色谱条件测定,结果芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素的平均质量浓度分别为 72.94, 11.29, 5.13 mg·L⁻¹, RSD 分别为 1.0%, 0.6% 和 0.8%,表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取已知有效成分含量的样品溶液适量,共 6 份,分别精密加入一定量芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素对照品,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项色谱条件测定,计算芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素的平均加样回收率分别为 101.25%, 99.52% 和 100.41%, RSD 均 < 1.0%。

2.2 单因素试验考察 称取 1 个处方量药材,每份 165 g,分别加 6, 8, 10 倍量浸泡 0.5 h,提取 1 h,结果芦丁提取量分别为 5.12, 5.41, 5.07 mg·g⁻¹, 盐酸小檗碱提取量分别为 0.36, 0.41, 0.39 mg·g⁻¹, 槲皮素提取量分别为 0.27, 0.37, 0.33 mg·g⁻¹。

2.3 正交试验优选 在预试验基础上,综合各因素的考察结果与生产实际,选择提取次数、提取时间和溶剂用量为影响因素,每个因素设定 3 个水平^[6],称取 1 个处方量药材,每份 165 g,浸泡 0.5 h,以芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素提取量的综合评分为评价指标,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。方中君药为黄柏,而盐酸小檗碱是黄柏中的主要有效成分^[7],故权重系数设定 0.6。槐花为方中臣药,芦

丁和槲皮素为其主要有效成分^[12],故芦丁和槲皮素的权重系数分别设为 0.3 和 0.1。直观分析显示各因素作用主次为 $A > B > C$ 。方差分析显示因素 A

对提取工艺有显著性影响,而因素 B 和 C 则无显著性差异,故选择最佳提供工艺组合 $A_3B_2C_1$,即加 10 倍量水提取 3 次,每次 1 h。

表 2 肛洗二号凝胶剂提取工艺的正交试验分析

Table 2 Orthogonal test analysis of extraction technology of Gangxi II gels

No.	A 提取数 /次	B 提取时间 /h	C 溶剂用量 /倍	D (空白)	芦丁 /mg·g ⁻¹	盐酸小檗碱 /mg·g ⁻¹	槲皮素 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	1	0.5	10	1	6.139	0.548	0.503	47.79
2	1	1.0	8	2	5.829	0.535	0.387	44.86
3	1	1.5	6	3	4.725	0.471	0.269	37.39
4	2	0.5	8	3	7.424	0.872	0.708	67.97
5	2	1.0	3	1	9.999	0.800	0.546	70.44
6	2	1.5	10	2	7.183	0.956	0.605	69.54
7	3	0.5	6	2	9.316	0.950	0.580	75.26
8	3	1.0	10	3	10.185	1.407	0.794	100.00
9	3	1.5	8	1	6.867	0.929	0.450	65.51

表 3 综合评分方差分析

Table 3 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	F	P
A	2 158.213	25.958	<0.05
B	308.185	3.707	>0.05
C	301.445	3.626	>0.05
D(误差)	83.140		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

2.4 验证试验 称取处方量药材,共 3 份,每份 165 g,浸泡 0.5 h,按最佳工艺条件提取,结果芦丁、盐酸小檗碱、槲皮素平均提取量分别为 9.154, 1.264, 0.734 mg·g⁻¹, RSD 依次为 0.6%, 1.6%, 1.0%,表明优选的提取工艺切实可行,操作性强。

3 讨论

肛洗二号复方由 12 味中药组成,药味众多,成分复杂,在使用 HPLC 进行检测时,可能会出现有效成分分离效果差、分析时间长等现象。因此,本研究以 UPLC 为分析手段,采用梯度洗脱,建立了专属性较强、分析速度快、灵敏度高的含量测定方法,仅 16 min 就完成了该复方的检测分析,且指标成分的分离度高。适宜的提取工艺是中药剂型改进和创新的前提和基础^[8]。为了发挥中药复方的整体效应,根据中药凝胶剂的临床用法及中药复方的特点,本研究以水为提取溶剂,此方法不但可以避免提取后残留有机溶剂对患者用药部位的刺激和损伤,而且工艺简单,经济性和可行性较强。

黄柏为方中君药,其有效成分盐酸小檗碱在方中含量较高;槐花为方中臣药,芦丁和槲皮素是其有效成分^[7],且槲皮素含量相对芦丁较低。本实验在选取评价指标时既要遵循传统中医药理论,又要尽

可能结合现代研究技术,以中医配伍理论为基础,根据复方的君臣佐使不同药味的地位差异,充分考虑分配权重,设定芦丁、盐酸小檗碱和槲皮素的权重系数分别为 0.3, 0.6 和 0.1。将 3 个评价指标转化成 1 个数值,既避免了单一评价的片面性,使分析结果更加科学、客观,又符合中药复方多靶点、多指标的特点和中医理论用药的整体观^[9]。

[参考文献]

[1] 周青,张丹,陈玉根. 中药软膏在痔疮术后的应用研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2011, 35(5): 466-469.

[2] 张俊仲,侯松涛,周冰,等. 瘀热同治法防治混合痔术后水肿 200 例[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2014, 20(5): 515-516.

[3] 苗明三,郭艳,尹俊涛. 中药外用研究的思路[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2574-2575.

[4] 韩毅,于艳,王雪峰,等. 多指标综合评分法优选敷贴巴布贴醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 5-8.

[5] 徐冬冬,吴喜民,芦慧琴,等. UPLC 测定桂皮中原花青素 B-2 和原花青素 C-1 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 40-43.

[6] 樊晖,田原. 正交试验优选天麻安神颗粒乙醇提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 21-23.

[7] 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, 2015: 305, 354.

[8] 盛录,赖宏强,王艺茹,等. 膝骨痹康袋泡熏洗剂提取工艺的优化[J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(8): 28-32.

[9] 张跃,焦连庆,于敏,等. 多指标综合加权评分法优选蜂胶总黄酮提取工艺研究[J]. 中国药师, 2012, 15(6): 759-762.

[责任编辑 刘德文]