

多指标综合评分法优选柴芍肠宁颗粒的提取工艺

刘耀¹, 张永萍^{1*}, 唐云¹, 徐剑¹, 胡文言², 叶祖光³

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 北京天地外医药科技有限公司, 北京 100086;
3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:采用多指标综合评分法优选柴芍肠宁颗粒的提取工艺,为该制剂的生产工艺提供技术参数。方法:采用正交试验法,以出膏率和芍药苷、盐酸小檗碱、柠檬酸提取量为定量指标,小鼠小肠推进率、小鼠腹泻指数为药理指标,考察溶剂用量、提取时间、提取次数对提取效果的影响,通过综合评分法优选柴芍肠宁颗粒的提取工艺。结果:乌梅单煎的最优提取工艺条件为加10倍量水提取2次,每次1h;柠檬酸提取量 $154.17\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,出膏率31.27%。其余药味的最佳提取工艺条件为加10倍量水提取3次,每次1h;芍药苷、盐酸小檗碱提取量分别为 $3.97, 0.66\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,出膏率26.36%,小肠推进率61.97%,腹泻指数0.98。结论:该提取工艺设计合理、稳定可行,对柴芍肠宁颗粒的生产工艺制定具有一定的指导意义。

[关键词] 柴芍肠宁颗粒; 出膏率; 芍药苷; 盐酸小檗碱; 柠檬酸; 小肠推进率; 腹泻指数

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1;R944.2+7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0010-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1404.016.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 14:04

Optimization of Extraction Technology of Chaishao Changning Granules by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

LIU Yao¹, ZHANG Yong-ping^{1*}, TANG Yun¹, XU Jian¹, HU Wen-yan², YE Zu-guang³

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;

2. Beijing Outworld Medical Technology Co. Ltd., Beijing 100086, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Chaishao Changning granules. **Method:** Orthogonal design were used to optimize extraction process of Chaishao Changning granules by taking solvent volume, extraction time and times as factors, composite score among yield of dry extract, contents of paeoniflorin, berberine hydrochloride and citric acid, intestinal propulsive rate and diarrhea index was index. **Result:** Optimum extraction process of Mume Fructus was: extracted twice with 10 times the amounts of water, 1 h for per time; extracting amount of citric acid was $154.17\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, yield of dry extract was 31.27%. Optimum extraction process of others herbs in Chaishao Changning granules was: extracted thrice with 10 times the amount of water, 1 h for each time; extracting amounts of paeoniflorin and berberine hydrochloride were $3.97, 0.66\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, yield of dry extract was 26.36%, intestinal propulsive rate was 61.97% and diarrhea index was 0.98. **Conclusion:** These optimized processes are stable and feasible, which can provide reliable reference value for the actual production of Chaishao Changning granules.

[收稿日期] 20150928(019)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09101);国家级大学生创新创业训练计划项目(201210662002);黔教高发([2012]426号)

[第一作者] 刘耀,助理实验师,从事药物制剂研究,Tel:13668500680,E-mail:253237643@qq.com

[通讯作者] *张永萍,教授,从事药物制剂研究,Tel:0851-5652704,E-mail:gzzhyp@126.com

[Key words] Chaishao Changning granules; yield of dry extract; paeoniflorin; berberine hydrochloride; citric acid; intestinal propulsive rate; diarrhea index

柴芍肠宁颗粒处方源自痛泻要方(《景岳全书》引刘草窗方)合四逆散(《伤寒论》)加减而成,由柴胡、炒白芍、防风、炒枳实、炒陈皮、炒白术、乌梅、黄连、炙甘草 9 味中药组成。方中柴胡既可升透郁阳,又能疏肝解郁,使郁热外达、气机和畅、舒畅气机、升发阳气;白芍养血柔肝、制肝缓急、和血通痹,与柴胡相伍一散一收,共为君药。白术健脾补中、燥湿止泻,防风柔肝疏肝、胜湿止泻,枳实破气除痞、理气宽中除胀,陈皮理气和中、健脾利湿,共为臣药;乌梅酸涩收敛、补益脾虚、涩肠止泻,黄连清热燥湿、泻火解毒,共为佐药;炙甘草调和诸药、补脾和中为使药。诸药合用,具有补脾泻肝之功,使肝气得疏,脾气健旺,脾胃功能恢复,从而腹胀、腹痛得除,腹泻得止。目前该方已经获得国家专利(专利号 201110178870.4),方中各药味具有相互协同的作用,处方中含有乌梅,而乌梅中含有大量有机酸(以柠檬酸计,不得少于 15.0%),使得其提取液呈酸性。经试验考察,加入乌梅混煎会对柴芍肠宁颗粒的治疗效果产生影响,故乌梅采用单煎,以乌梅有效成分柠檬酸、出膏率作为考察指标优选其提取工艺;而方中其余药味如采用单一指标成分来进行提取工艺优选,不能保证本方的整体质量,故本实验以芍药苷、盐酸小檗碱提取量及出膏率为含量测定指标,小鼠小肠推进率、腹泻指数为药理指标,采用综合评分法研究柴芍肠宁颗粒的提取工艺,为制备质量稳定可控及临床使用安全、有效、方便的制剂提供参考。

1 材料

LC-2010C HT 型高效液相色谱仪(日本岛津),Auy220 型电子天平(日本岛津)。盐酸小檗碱、芍药苷、柠檬酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110713-200208, 110736-201035, 111679-200401);陈皮,柴胡,白术(麸炒),黄连,甘草(炙),防风,枳实(麸炒),乌梅,炒白芍,大黄药材饮片均购自贵州同济堂制药有限公司,经贵阳中医学院周汉华教授鉴定均为 2015 年版《中国药典》收载品种;甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,雌雄兼用,体重(20±2)g,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定

2.1.1 芍药苷^[1] 色谱条件为 Dikma ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(28:72),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 230 nm。精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制备 50 mg·L⁻¹ 对照品溶液。精密吸取缺乌梅处方提取液 25 mL,定容于 100 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.2 盐酸小檗碱^[2-3] 色谱条件为 Dikma ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(每 100 mL 加十二烷基磺酸钠 0.1 g)(50:50),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 345 nm。精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成 24 mg·L⁻¹ 对照品溶液。供试品溶液制备方法同 2.1.1 项。

2.1.3 柠檬酸^[4-5] 色谱条件为 Dikma ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 0.5% 磷酸二氢铵溶液(用磷酸调节 pH 3.0),流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 214 nm。精密称取柠檬酸对照品适量,加甲醇定容成 1.03 g·L⁻¹ 对照品溶液。取乌梅提取液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.2 出膏率测定 分别精密量取各提取工艺下样品浓缩液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,置于 105 ℃ 烘箱中烘干至恒重,取出至干燥器内冷却 30 min,迅速精密称重,计算出膏率。

2.3 药理指标检测

2.3.1 动物分组 试验动物体重 18~22 g,雌雄各半。按 L₉(3⁴) 正交试验组合随机分为 9 组,每组 10 只。

2.3.2 小肠推进率试验^[6-8] 样品组均按剂量 0.02 mL·g⁻¹ 灌胃给予受试物,每天 1 次,连续 7 d。末次给药前各组动物禁食不禁水 24 h,末次给药 30 min 后,给予各组小鼠炭末灌胃,给予炭末 20 min 后脱颈椎处死动物,打开腹腔分离肠系膜,剪取上端自幽门、下端至回盲部的肠管,置于托盘上,轻轻将小肠拉成直线,测量肠管长度为小肠总长度,从幽门至炭末前沿为炭末推进长度,按炭末推进率 = 炭末推进长度/小肠总长度×100% 计算炭末推进率。

2.3.3 腹泻试验^[9-10] 样品组均按剂量 0.02 mL·

g^{-1} 灌胃给予受试物,每天 1 次,连续 7 d。末次给药前禁食不禁水 12 h,末次给药 30 min 后,分别按剂量 $0.02 mL \cdot g^{-1}$ 灌胃 $1 g \cdot mL^{-1}$ 大黄液,将小鼠单个放入垫有中速定性滤纸的鼠笼内,连续观察 4 h,每 1 h 换 1 次滤纸,观察总便数、稀便数和稀便级,计算腹泻指数。稀便级的确定依据为粪便污迹直径 $< 1 cm$ 为 1, $1 \sim 1.9 cm$ 为 2, $2 \sim 3 cm$ 为 3, $> 3 cm$ 为 4。腹泻指数为稀便率与稀便级的乘积。

2.4 提取工艺优选^[11-14]

2.4.1 药理供试液的制备

分别取 3 倍处方量药材 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交试验排列组操作,加入设计量水溶液浸泡 1 h,按设计的提取时间、提取次数进行提取,得提取液,过滤,浓缩至 400 mL,得供试品药液。取生大黄砸成小块,冷水浸 2 次,每次 24 h,合并浸液于 $< 40 ^\circ C$ 浓缩成 $1 g \cdot mL^{-1}$ 浸膏液^[15]。

2.4.2 乌梅提取工艺

精密称取乌梅粗粉 9 份,每份 5 g,选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素,以出膏率和柠檬酸提取量的综合评分为评价指标,权重系数分别为 0.6, 0.4。通过正交试验优选乌梅提取工艺,加一定量水浸泡 1 h,提取液过滤,滤液浓缩至 100 mL,得乌梅提取液。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对乌梅提取工艺的作用主次为 $A > C > B$ 。方差分析表明各因素均无显著性意义。综合考虑,确定乌梅单煎最优提取工艺组合为 $A_2B_2C_2$,即加水量 10 倍,提取数 2 次,提取时间 1 h。

2.4.3 缺乌梅处方提取

按 2 倍处方量(60 g)精密称取缺乌梅的其余药味 9 份,加水浸泡 1 h,提取液过滤,滤液浓缩至 500 mL,得缺乌梅提取液。选

表 1 乌梅提取工艺优选正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis on extraction process of Mume Fructus in Chaishao Changning granules

No.	A 加水量 / 倍	B 提取时间 / h	C 提取数 / 次	D (空白)	柠檬酸 / $mg \cdot g^{-1}$	出膏率 / %	综合评分
1	8	0.5	1	1	115.74	22.86	76.01
2	8	1.0	2	2	142.78	30.06	97.48
3	8	1.5	3	3	130.78	27.50	89.22
4	10	0.5	2	3	147.17	28.01	94.55
5	10	1.0	3	1	143.64	27.75	93.10
6	10	1.5	1	2	152.36	28.80	97.49
7	12	0.5	3	2	146.42	28.58	95.49
8	12	1.0	1	3	141.48	27.34	91.71
9	12	1.5	2	1	143.76	29.82	97.26

表 2 乌梅单煎综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis on composite score of extraction process of Mume Fructus

方差来源	SS	F	P
A	108.514	1.100	> 0.05
B	65.298	0.662	> 0.05
C	96.711	0.980	> 0.05
D(误差)	98.636		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表 4 同)。

择加水量、提取时间、提取次数为考察因素,以芍药苷、盐酸小檗碱提取量及出膏率的定量指标,小鼠小肠推进率、腹泻指数为药理指标,采用综合评分法优选其余药味的提取工艺^[16],权重系数分别为 0.2, 0.2, 0.3, 0.15, 0.15。试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 3 柴芍肠宁颗粒(缺乌梅)提取工艺优选正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis on extraction process of others herbs in Chaishao Changning granules

No.	A 加水量 / 倍	B 提取时间 / h	C 提取数 / 次	D (空白)	芍药苷 / $mg \cdot g^{-1}$	盐酸小檗碱 / $mg \cdot g^{-1}$	出膏率 / %	小肠推进率 / %	腹泻指数	综合评分
1	8	0.5	1	1	1.38	0.37	13.23	22.81	1.30	46.76
2	8	1.0	2	2	2.75	0.56	20.49	45.82	1.05	74.45
3	8	1.5	3	3	3.91	0.78	25.89	52.19	1.19	91.14
4	10	0.5	2	3	2.51	0.57	19.83	43.40	1.19	70.45
5	10	1.0	3	1	3.49	0.97	25.54	39.76	1.10	90.41
6	10	1.5	1	2	1.92	0.61	16.10	48.68	1.21	65.04
7	12	0.5	3	2	3.34	0.65	23.03	60.41	0.96	87.17
8	12	1.0	1	3	1.90	0.41	15.21	50.55	0.98	63.04
9	12	1.5	2	1	2.86	0.49	21.83	54.38	1.11	76.50

表 4 柴芍肠宁颗粒(缺乌梅)提取工艺综合评分方差分析

Table 4 Variance analysis on composite score of extraction process of others herbs

因素	SS	F	P
A	43.385	1.333	>0.05
B	152.992	4.700	>0.05
C	1468.941	44.124	<0.05
D(误差)	32.554		

由直观分析可知,各因素对柴芍肠宁颗粒(缺乌梅)提取工艺的作用主次为 $C > B > A$ 。方差分析表明因素 C 对提取效果的影响有显著性意义,因素 A, B 则无显著性差异。综合分析,确定最优提取工艺组合为 $A_2B_2C_3$,即加水量 10 倍,提取数 3 次,提取时间 1 h。

2.5 验证试验 取乌梅粗粉 5 g,其余各药称取 2 倍处方量,按最优工艺进行 3 次验证试验,结果乌梅单煎时柠檬酸提取量 $154.17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.8%,出膏率 31.27%, RSD 1.6%;芍药苷提取量 $3.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.5%,盐酸小檗碱提取量 $0.66 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.7%,出膏率 26.36%, RSD 1.1%,小肠推进率 61.97%, RSD 2.2%,腹泻指数 0.98, RSD 5.7%。表明该工艺稳定可行。

3 讨论

乌梅单煎时,由于乌梅含果肉个体差异较大,导致试验误差较大,故本实验将乌梅打成粗粉混匀后再进行提取以确保均匀性及准确性。芍药苷与柠檬酸按 2015 年版《中国药典》相关项下条件进行测定,发现均会受到其他成分的干扰,色谱峰分离效果不佳,通过调整流动相系统及其比例,最终将芍药苷和柠檬酸的流动相分别调整为甲醇-0.1% 磷酸(28:72)和 0.5% 磷酸二氢铵溶液(用磷酸调节 pH 3.0),分离度得到明显改善。

多指标优选中药复方提取工艺是提高中药复方制剂质量的一个重要方法,但要得出一个合理的评价标准,就需要考虑到提取条件的设计和指标间的一致性以及各指标之间的协调问题,因此合理地设置各指标的权重系数就显得极为重要,本方中芍药苷为君药白芍中有效成分,盐酸小檗碱为抑制胃肠道细菌感染的有效成分,其他有效成分还不是十分明确,故以浸出物的质量来代表其他有效成分,并将出膏率设为正权重系数,并结合其药理作用,以层次分析法最终确定了各指标的权重系数值,这样采用

多指标综合评分法优选出的提取工艺更具有科学性和合理性,对中药复方的生产起到积极的指导作用。

[参考文献]

[1] 张士勇. 芪丹芍龙合剂中芍药苷含量测定方法的研究[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(1): 71-72.

[2] 徐少婷, 黄红雯. HPLC 测定黄连上清片中盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药, 2004, 26(8): 634-636.

[3] 纪丽莎, 张先福, 喻卫武, 等. HPLC 法测定黄连复方汤中盐酸小檗碱、表小檗碱、药根碱、盐酸巴马汀和甘草酸[J]. 中草药, 2011, 42(2): 285-287.

[4] 陈琳, 刘丽梅, 王瑞海, 等. 高效液相色谱法测定乌梅丸中柠檬酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 30-31.

[5] 李树梅, 李应超, 张发明, 等. 乌梅酸枣仁口服液的质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3101-3103.

[6] 李凤金, 张玉昆, 刘泓涛, 等. 健脾口服液对脾虚证小鼠胃肠运动功能及胃肠激素分泌的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 212-215.

[7] 李柏群, 陈绍成, 彭腾, 等. 风芍六君子汤治疗脾虚腹泻型肠易激综合征的药效学研究[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2229-2233.

[8] 任爱农, 高燃, 田耀洲. 多指标综合评分法优选清颗粒提取工艺[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1059-1061.

[9] 徐海燕, 曹银生, 辛国芹, 等. 合生元对小鼠腹泻型肠易激综合征作用的研究[J]. 药学研究, 2013, 32(10): 562-565.

[10] 邓少玲, 叶小青. 芪茶益肠胶囊对小鼠腹泻及肠蠕动的影晌[J]. 中国热带医学, 2005, 5(9): 1911-1912.

[11] 李佃贵, 赵玉斌. 痛泻药方对肠易激综合征作用机制的实验研究[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1681-1685.

[12] 陈国战, 恩伯提, 张志琪. RP-HPLC 同时测定乌梅中 8 种有机酸含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1783-1786.

[13] 高家荣, 吴溪, 韩燕全, 等. 酸枣仁-五味子药对的单煎液、单煎混合液与合煎液 UPLC 特征指纹图谱相关性研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1001-1005.

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

[15] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 28-29.

[16] 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.

[责任编辑 刘德文]