多指标综合评分法优选戊己丸提取工艺

赖静怡，张振秋*，刘峰，林丽丽，高崇佳，李玉恒
（辽宁中医药大学，辽宁 大连 116600）

［摘要］ **目的**：采用多指标综合评分法优选戊己丸提取工艺，为戊己丸的生产工艺提供技术参数。**方法**：采用正交试验法，以出膏率、总生物碱、芍药苷、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量为评价指标，通过综合评分优选戊己丸的提取工艺。**结果**：提取次数对试验结果有极显著意义，乙醇倍量对试验结果有显著意义，乙醇体积分数和提取时间则无显著意义，综合考察各因素的影响，确定最佳工艺条件为 $A_3B_3C_3D_1$，即 80% 乙醇，10 倍量，提取 3 次，每次 1 h。**结论**：本试验方法稳定可靠，对戊己丸的生产工艺具有一定的指导和参考意义。

［关键词］ 戊己丸；正交试验；综合评分法
［中图分类号］ R283.6 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903(2011)08-0026-03

Optimize Extraction Process of Wuji Wan by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

LAI Jing-yi, ZHANG Zhen-qiu, LIU Feng, LIN Li-li, GAO Chong-jia, LI Yu-heng*
(*Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian* 116600, *China*)

［**Abstract**］ **Objective**: Using multi-index comprehensive evaluation method to provide the production technology parameters of Wuji Wan. **Method**: The orthogonal test was employed with the index of the rate of extraction and the content of total alkaloid, paeoniflorin, evodiamine and rutaecarpine, optimizing the extraction process of Wuji Wan by multi-index comprehensive evaluation method. **Result**: Extraction times had much notable effect on experimental results and times, and the amount of ethanol had notable effect on the results. Ethanol concentration and extraction time had no notable effects. Considering the effects of five factors synthetically, the optimum process was $A_3B_3C_3D_1$, that was 80% ethanol, 10 times the amount of ethanol, extraction 3 times and 1hour every time. **Conclusion**: The experimental method was steady and trusty, which will have some instruction meaning and reference value to the production of Wuji Wan.

［**Key words**］ Wuji Wan; the orthogonal test; comprehensive evaluation method

戊己丸收载于《中国药典》2010 年版一部[1]，由黄连，吴茱萸（制），白芍（炒）3 味药组成。原方用药材细粉以水泛丸制成，具有泻肝和胃、降逆止呕的作用，用于肝火犯胃、肝胃不和所致的胃脘灼热疼痛、呕吐吞酸、口苦嘈杂、腹痛泄泻等症。本实验采用正交试验法，以出膏率、总生物碱、芍药苷、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量为评价指标对该方的提取工艺进行优化筛选。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪，SPD-10AVP 可见-紫外检测器，2140 型电子分析天平，AB135-S 1/10 万电子天平（瑞士 METTLER），日立 U-3010 紫外-可见双光束扫描分光光度计。

盐酸小檗碱（批号 110713-200208）、芍药苷（批号 110736-200629）、吴茱萸碱（批号 110802-200505）、吴茱萸次碱（批号 0801-9702）对照品均由

［收稿日期］ 20100617(001)
［第一作者］ 赖静怡，硕士研究生，研究方向：中药质量研究，E-mail：laijingyi123@163.com
［通讯作者］ *张振秋，教授，博士生导师，Tel：0411-87586058，E-mail：zhangzhenqiu@sina.com

中国药品生物制品检定所提供,供含量测定用,乙腈、甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),其余试剂均为分析纯,超纯水,黄连、吴茱萸和白芍药材均购于河北省安国,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定为黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎、吴茱萸 *Evodia rutaecarpa*(Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,吴茱萸(制)、白芍(炒)均参照《中国药典》2010 年版一部吴茱萸、白芍项下自制。

2 方法与结果

2.1 提取工艺设计[2] 试验前期采用单因素考察法,对水提、醇提、合煎、分煎等提取方法进行考察,确定采用乙醇回流提取。为优选乙醇提取条件,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法,选择乙醇体积分数、乙醇倍量、提取次数、提取时间 4 个因素,进行 3 水平考察,见表 1。以出膏率、总生物碱、芍药苷、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量为评价指标,采用综合评分法进行数据分析(权重系数分别为 0.1,0.4,0.2,0.15,0.15)。

表 1 戊己丸提取工艺因素水平

水平	*A* 乙醇体积分数/%	*B* 溶剂倍量/倍	*C* 提取次数/次	*D* 提取时间/h
1	60	6	1	1
2	70	8	2	2
3	80	10	3	3

2.2 指标成分的测定

2.2.1 出膏率测定及干膏制备 按黄连、吴茱萸(制)、白芍(炒)药材(6∶1∶6)的比例称取 9 份,每份约 130 g,分别按正交设计表进行提取,提取液滤过,减压浓缩至 100 mL 量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀。精密吸取 25 mL 置蒸发皿中,水浴蒸干,105 ℃烘 2 h,称重并计算出膏率。其余药液同法蒸干制备干膏,待用。

2.2.2 总生物碱含量的测定 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含0.064 32 mg的溶液,即得。

标准曲线的制备 精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液 0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,分别置 5 mL 量瓶中,各加 0.05 $mol\cdot L^{-1}$ 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。照紫外-可见分光光度法,在 345 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

测定法 精密称取各提取工艺制备的干膏 0.1 g,置索氏提取器中,加盐酸-甲醇(1∶100)适量,加热回流至提取液无色,提取液浓缩后移至 25 mL 量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,照柱色谱法试验,精密量取 5 mL,置氧化铝柱(中性氧化铝 5 g,湿法装柱,用乙醇 30 mL 预洗),用乙醇 35 mL 洗脱,收集洗脱液,置 50 mL 量瓶中,用 0.05 $mol\cdot L^{-1}$ 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,精密吸取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用 0.05 $mol\cdot L^{-1}$ 硫酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得。照紫外-可见分光光度法,在 345 nm 处测定吸光度。总生物碱以盐酸小檗碱计,结果见表 2,3。

2.2.3 芍药苷含量的测定 色谱条件与系统适用性试验 Phenomsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(15∶85),检测波长 230 nm,流速 1.0 $mL\cdot min^{-1}$,柱温室温。在此色谱条件下,理论塔板数按对照品峰计算不少于3 000。

对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 4.192 μg 的溶液,即得。

供试品溶液的制备 精密称取各提取工艺制备的干膏 0.1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入乙醇 25 mL,称重,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积并计算芍药苷含量。结果见表 2,3。

2.2.4 吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量的测定[3]

色谱条件与系统适用性试验 Phenomsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相水-甲醇-乙腈(44∶20∶36),检测波长 225 nm,流速 1.0 $mL\cdot min^{-1}$,柱温室温。在此色谱条件下,理论塔板数按各对照品峰计算均不少于3 000。

对照品溶液的制备 精密称取吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含吴茱萸碱 1.971 μg、吴茱萸次碱 1.796 μg 的混合溶液,即得。

供试品溶液的制备 同芍药苷含量的测定项下的供试品溶液的制备。

测定法 精密吸取对照品溶液,供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,测定峰面积并计算吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量。结果见表 2,3。

2.3 试验结果分析 由直观分析结果可以看出,综合评分数据的极差大小显示各因素主次为 $C>B>A>D$,最佳提取条件为 $A_3B_3C_3D_2$,考虑各因素影响主次,结合能效,最终确定最佳工艺条件为

表 2　戊己丸提取工艺正交试验结果及直观分析

No	A	B	C	D	出膏率 /%	总生物碱 /mg·g⁻¹	芍药苷 /mg·g⁻¹	吴茱萸碱 /mg·g⁻¹	吴茱萸次碱 /mg·g⁻¹	综合评分
1	1	1	1	1	14.24	19.61	0.125 7	0.117 5	0.046 30	54.77
2	1	2	2	2	23.09	33.67	0.177 8	0.103 9	0.063 10	79.72
3	1	3	3	3	25.80	36.35	0.238 3	0.119 5	0.075 60	92.11
4	2	1	2	3	20.44	30.28	0.160 6	0.141 3	0.059 02	75.86
5	2	2	3	1	22.96	33.67	0.164 2	0.133 8	0.073 84	82.71
6	2	3	1	2	18.01	26.22	0.152 3	0.173 9	0.075 81	75.16
7	3	1	3	2	21.87	33.94	0.169 8	0.185 7	0.087 3	89.47
8	3	2	1	3	15.83	25.15	0.147 0	0.142 5	0.058 44	67.29
9	3	3	2	1	22.23	35.99	0.192 5	0.181 0	0.091 0	94.00
K_1	75.533	73.367	65.740	77.160						
K_2	77.910	76.573	83.193	81.450						
K_3	83.587	87.090	88.097	78.420						
R	8.054	13.723	22.357	4.290						

$A_3B_3C_3D_1$，即 80% 乙醇，10 倍量，提取 3 次，每次 1 h。以 D 因素为误差项的方差分析结果表明，提取次数对提取效果有显著意义，乙醇倍量对提取效果有一定意义，乙醇体积分数无显著意义。

表 3　综合评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A	102.729	2	3.521	
B	309.213	2	10.599	<0.1
C	828.482	2	28.399	<0.05
D(误差)	29.173	2	1.000	

注：$F_{0.05}(2,2)=19$，$F_{0.1}(2,2)=9$。

2.4　优选工艺验证试验　为验证上述优选工艺最佳条件的稳定性，取处方药材 3 份，按优选工艺进行验证试验，得出膏率平均值 29.41%，RSD 2.4%；总生物碱质量分数平均值 43.20 mg·g⁻¹，RSD 2.1%；芍药苷质量分数平均值 0.439 6 mg·g⁻¹，RSD 3.0%；吴茱萸碱质量分数平均值 0.295 9 mg·g⁻¹，RSD 2.3%；吴茱萸次碱质量分数平均值 0.177 4 mg·g⁻¹，RSD 2.9%（$n=3$）。结果表明该工艺合理，稳定可行。

3　讨论

正交设计中不包含空白列，正交试验各指标所得数据均为 3 次重复试验的平均值。

采用高效液相色谱法测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱含量时，曾考察样品的提取溶剂，发现用盐酸-甲醇溶剂提取后吴茱萸碱和吴茱萸次碱成分大量损失，几乎检测不到，因此实验中所测总生物碱含量主要为黄连药材中的总生物碱，并不包含吴茱萸碱和吴茱萸次碱。

试验中并未选择盐酸小檗碱单体含量为评价指标，因为考虑到黄连中还含有多种生物碱，如巴马汀、药根碱、黄连碱、表小檗碱等，在缺少对照品的条件下，以盐酸小檗碱计测定总生物碱含量，希望使评价指标更加全面。

现代药理表明[4]，黄连具有抗菌，抗病毒，抑制胃酸分泌和抗溃疡等多种作用，其主要有效成分为盐酸小檗碱；吴茱萸具有镇痛、镇吐、防止溃疡形成等作用，其主要有效成分为吴茱萸碱和吴茱萸次碱；白芍具有保肝、镇静、镇痛、解痉、抗炎的作用，其主要有效成分为芍药苷。如以单指标成分进行工艺优选，这与中药多组分，多靶点的治疗特点不符，因此本实验以三药中具有代表性的有效成分为评价指标，多个指标综合评分优选提取工艺，从而控制制剂与药效统一。

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，就必须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，因此合理的设置各指标的权重系数就显得极为重要[5]。本方中黄连为君药，吴茱萸和白芍为佐药，并结合其有效成分的药理作用，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]　中国药典. 一部[S]. 2010:637.
[2]　张朔. 黄连、吴茱萸药对的配伍研究[D]. 大连：辽宁中医药大学，2009:39.
[3]　王世永，李小定. 吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的提取及测定[J]. 湖北农业科学，2008，47(3):340.
[4]　宫海民，段文卓. 戊己丸镇痛，抗炎作用的实验研究[J]. 中国中医药科技，1998，5(3):147.
[5]　任爱农，高燃，田耀洲. 多指标综合评分法优选清清颗粒提取工艺[J]. 中成药，2008，30(7):1059.

[责任编辑　仝燕]