

多指标综合评分法优选舒筋通络颗粒提取工艺

杨兴鑫, 张艳利, 李晓妮* (山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 优选舒筋通络颗粒最佳提取工艺。方法 根据处方的功能主治和药物成分的性质, 以芍药苷、总生物碱的含量及浸膏得率为考察指标, 采用正交试验法, 以多指标综合评分筛选最佳提取工艺。结果 舒筋通络颗粒最佳提取工艺为加水 8 倍量, 浸泡 1.5 h, 提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 优选的提取工艺科学、合理, 适于大规模生产。

基金项目: 山西省科技厅攻关项目(2007031088-4)

作者简介: 杨兴鑫, 男, 硕士生 Tel: 13994263815
E-mail: ninili1235@163.com

E-mail: yxx78945@163.com

*通信作者: 李晓妮, 女, 教授, 硕导 Tel: 13703515246

关键词: 舒筋通络颗粒; 提取工艺; 正交试验; 综合评分法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0221-05

Applying Grading Methods of Synthesizing Multiple Guidelines to Optimize Extraction Technology for Shujintongluo Granules

YANG Xingxin, ZHANG Yanli, LI Xiaoni* (College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the technology of optimal extraction for Shujintongluo granules. **METHODS** Based on the function and indication of the formula and the properties of its chemical components, orthogonal design was employed for conducting the multiple guidelines evaluation and selecting the optimum extraction technology with paeoniflorin, total alkaloids and the yield of extraction as the detective index. **RESULTS** The optimal extraction technology of Shujintongluo granules was by 8 times volume of water soaking for 1.5 h, then extracting 3 times with 1.5 h for each time. **CONCLUSION** The optimized extraction condition is reasonable and scientific, and it could be used in future large-scaled preparation of Shujintongluo granules.

KEY WORDS: Shujintongluo granules; extraction technology; orthogonal design; grading methods

舒筋通络方为临床经验方,由白芍、续断、伸筋草、延胡索、黄柏、夏天无、红花多味中药材组成。该复方具有活血通络,散风止痛的功效;临床上主要用于治疗关节炎,肩周炎,四肢麻木等症。白芍为方中君药,具有解痉镇痛、免疫调节、抗炎等作用,芍药苷为其主要成分之一。方中伸筋草、延胡索、夏天无等数味药材的主要活性成分分别为石松碱、延胡索乙素、原阿片碱等生物碱类化合物,药理学研究表明,伸筋草、延胡索、夏天无均具有较好的解痉镇痛、抗炎等作用^[1-3]。为将该复方开发成颗粒剂,本试验以芍药苷、总生物碱的含量及浸膏得率为考察指标,采用正交试验设计,以多指标综合评分法对舒筋通络颗粒的提取工艺进行考察,优选最佳工艺条件。

1 仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(LC-10ATvp型输液泵,SPD-10Avp型紫外检测器,LC色谱工作站,日本岛津公司);pH计(上海理达仪器厂)。

芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110736-200731,纯度:97.9%)。中药材均购自山西省药材公司,经山西医科大学药学院生药教研室鉴定,白芍(产地浙江)为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根;续断(产地四川)为川续断科植物川续断 *Dipsacus asperoides* C.Y.Cheng et T.M.Ai.的干燥根;伸筋草(产地福建)为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb.的干燥全草;延胡索(产地浙江)为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T.Wang的干燥块茎;黄柏(产地四川)为芸香科植物黄皮树

Phellodendron chinense Schneid.的干燥树皮;夏天无(产地江西)为罂粟科植物伏生紫堇 *Corydalis decumbentis* (Thunb.) Pres.的块茎;红花(产地新疆)为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.的筒状花冠。均符合中国药典2005版规定。甲醇、乙腈均为色谱纯(天津四友);水为二次蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 确定权重系数^[4]

以芍药苷、总生物碱的含量及浸膏得率3项指标为评价标准对提取工艺进行综合评分,其权重采用层次分析法进行分析,具体步骤如下。

2.1.1 建立评价目标树 对舒筋通络颗粒提取工艺评价这个总评价目标可以通过指标性成分、浸膏得率这两次级目标来反映,指标性成分通过芍药苷、总生物碱2个目标来反映。建立舒筋通络颗粒提取工艺评价目标树图,见图1。



图1 舒筋通络颗粒提取工艺评价目标树图

Fig 1 Goal tree graph of evaluation of extraction technical for Shujintongluo granules

2.1.2 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1。评分标准,见表2。

表 1 3 项目标成对比较优先矩阵

Tab 1 Preferential matrix of paired comparison for three goals

目标	芍药苷	总生物碱	浸膏得率
芍药苷	1	2	5
总生物碱	1/2	1	3
浸膏得率	1/5	1/3	1

表 2 目标树图各层次评分标准

Tab 2 Score criterion of layers of goal tree graph

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	略为重要	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	一个比另一个更有利, 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

2.1.3 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' 。

$w_1' = \sqrt[3]{1 \times 2 \times 5} = 2.154 4$, 同理可得: $w_2' = 1.144 7$, $w_3' = 0.405 5$ 。

2.1.4 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。

$w_1 = 2.154 4 / (2.154 4 + 1.144 7 + 0.405 5) = 0.6$, 同理可得: $w_2 = 0.3$, $w_3 = 0.1$ 。

即芍药苷、总生物碱、浸膏得率的权重系数分别为 0.6, 0.3, 0.1。

2.1.5 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, $CI = \frac{\lambda_{max} - m}{m - 1}$, 其

中 $\lambda_{max} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (\sum_{j=1}^m a_{ij} \times w_j) \div w_i$, m 为受检验层次的次目标数, 由表 3 查找相应的平均随机一致性指标 RI (random index)。

表 3 平均随机一致性指标 RI 表

Tab 3 The table of RI

矩阵阶数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RI	0.00	0.00	0.58	0.90	1.12	1.24	1.32	1.41	1.45

$\lambda_{max} = 1/3[(1 \times 0.6 + 2 \times 0.3 + 5 \times 0.1)/0.6 + (1/2 \times 0.6 + 1 \times 0.3 + 3 \times 0.1)/0.3 + (1/5 \times 0.6 + 1/3 \times 0.3 + 1 \times 0.1)/0.1] = 3.011 1$;

$CI = (3.011 1 - 3) / (3 - 1) = 0.005 6$;

$CR = 0.005 6 / 0.58 = 0.009 7$, $CR < 0.1$ 。

一致性检验结果 $CR < 0.1$, 表明所计算的权重系数合理有效。

2.2 提取工艺设计

选用 $L_9(3)^4$ 正交表进行试验, 以芍药苷、总生物碱的含量及浸膏得率作为评价指标, 因素水平安排见表 4。称取处方配比的各味药材共 9 份, 按正交条件分别加水煎煮, 药液放冷, 滤过, 定容, 作为正交试验的 9 份样品溶液。

表 4 正交试验因素水平表

Tab 4 Design for factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	煎煮次数 A/次	煎煮时间 B/h	加水量 C/倍	浸泡时间 D/h
1	1	1.0	8	0.5
2	2	1.5	10	1.0
3	3	2.0	12	1.5

2.3 浸膏得率测定

取正交试验的 9 份样品液各 100 mL, 分别置于已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后, 于 105 °C 烘箱中干燥至恒重, 取出置于干燥器内冷却后称重, 计算浸膏得率。结果见表 5, 方差分析见表 6。

2.4 芍药苷含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.05 mol \cdot L⁻¹ KH_2PO_4 -乙腈 (88 : 12); 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μ L。理论板数按芍药苷计不低于 6 000, 芍药苷色谱峰与相邻色谱峰的分度不低于 1.5。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品, 加甲醇制成浓度为 1.5 mg \cdot mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 取“2.3”项下的浸膏约 0.5 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 加甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4.4 阴性对照溶液的制备 按处方配比称取除白芍以外的其余各药材, 按提取工艺制成缺白芍的阴性样品, 取适量蒸干后得浸膏。按“2.4.3”项下方法操作, 制成缺白芍的阴性对照溶液。

2.4.5 阴性对照试验 取芍药苷对照品溶液, 供试品溶液和阴性对照溶液, 在“2.4.1”色谱条件下进样, 记录色谱图, 谱图显示阴性样品无干扰, 见图 2。

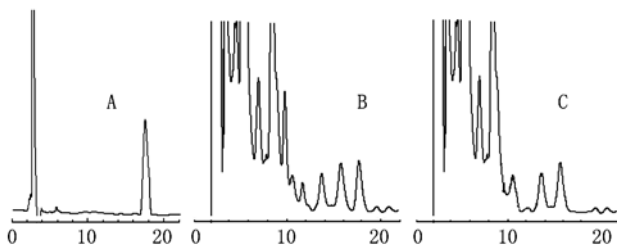


图2 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性对照溶液

Fig 2 HPLC chromatograms

A-control; B-sample; C-blank sample

2.4.6 线性关系 精密量取芍药苷对照品溶液0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于5 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 依次分别进样20 μ L测定峰面积。以芍药苷浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线。得回归方程为 $Y=1\ 703\ 901X+28\ 207$, $r=0.999\ 5$ 。结果表明, 芍药苷在0.060~0.300 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 线性关系良好。

表5 正交试验结果

Tab 5 Results of orthogonal test

编号	因素				评价指标			
	A	B	C	D	总芍药苷含量/g	总生物碱含量/g	浸膏得率/%	综合得分
1	1	1	1	1	0.395	0.803	18.44	47.21
2	1	2	2	2	0.407	0.945	18.79	51.03
3	1	3	3	3	0.489	0.725	19.86	51.81
4	2	1	2	3	0.529	1.246	27.66	67.80
5	2	2	3	1	0.447	1.020	23.12	56.52
6	2	3	1	2	0.462	1.093	25.60	59.82
7	3	1	3	2	0.700	0.894	29.01	71.34
8	3	2	1	3	0.984	1.437	27.30	99.41
9	3	3	2	1	0.431	1.142	26.17	59.14
K ₁	50.017	62.117	68.813	54.29				
K ₂	61.38	68.987	59.323	60.73				
K ₃	76.63	56.923	59.89	73.007				
R	26.613	12.064	9.49	18.717				

注: 综合评分=总芍药苷含量评分+总生物碱含量评分+浸膏得率评分; 总芍药苷含量评分=(总芍药苷含量/最大总芍药苷含量) $\times 100 \times 0.6$; 总生物碱含量评分=(总生物碱含量/最大总生物碱含量) $\times 100 \times 0.3$; 浸膏得率评分=(浸膏得率/最大浸膏得率) $\times 100 \times 0.1$

Note: The comprehensive score= the score of ATP (amounts of total paeoniflorin) + the score of ATA (amounts of total alkaloids) + the score of YE (yield of extraction); the score of ATP=(amounts of total paeoniflorin/the maximum amount) $\times 100 \times 0.6$; the score of ATA=(amounts of total alkaloids/the maximum amount) $\times 100 \times 0.3$; the score of YE=(yield of extraction/ the maximum yield) $\times 100 \times 0.1$

表6 方差分析表

Tab 6 Variance analysis of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	1 069.957	2	6.294	19.000	$P>0.05$
B	219.692	2	1.292	19.000	$P>0.05$
C	170.007	2	1.000	19.000	$P>0.05$
D	542.504	2	3.191	19.000	$P>0.05$
误差	170.01	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19$

2.4.7 样品含量测定 取正交试验的9份样品液, 按“2.4.3”项下方法分别处理样品后进样, 测定峰面积, 计算样品中芍药苷含量。结果见表5, 方差分析见表6。

2.5 总生物碱含量测定

2.5.1 供试品溶液的制备^[5] 取“2.3”项下的浸膏约1.0 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加浓氨溶液5 mL和氯仿100 mL, 加热回流至近无色(约4 h), 提取液置水浴上蒸去大部分氯仿(约剩2 mL), 精密加硫酸滴定液(0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)10 mL, 继续水浴加热除去氯仿, 放冷, 即得。

2.5.2 样品含量测定 取正交试验的9份样品液, 按“2.5.1”项下方法分别处理样品后, 以0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠滴定液滴定剩余硫酸, 用pH计指示终点变化, pH 5.1为滴定终点^[6]。以盐酸小檗碱计算总生物碱的含量。结果见表5, 方差分析见表6。

2.6 结果分析

由正交试验结果的直观分析及方差分析可知, 影响提取效果的因素顺序为: $A>D>B>C$, 无显著性因素影响。因此, 最佳提取条件为 $A_3B_2C_1D_3$, 即: 煎煮3次, 煎煮时间为1.5 h, 加水量为8倍, 浸泡时间为1.5 h。

2.7 工艺验证

按已确定的最佳提取工艺, 即加水8倍量, 浸

泡1.5 h, 煎煮3次, 每次1.5 h, 重复试验3次。结果见表7。

表7 验证试验结果

Tab7 Results of evaluation test

样品号	总芍药苷含量/g	总生物碱含量/g	浸膏得率/%
1	0.976	1.431	27.23
2	0.979	1.429	27.25
3	0.975	1.433	27.21

结果表明, 验证试验结果与正交试验结果相近, 所确定的提取工艺基本稳定, 合理可行, 可操作性强, 可以作为舒筋通络颗粒的最佳提取工艺。

3 讨论

3.1 层次分析法(AHP)确立权重系数

鉴于中药多组分、多靶点的作用特点, 设置多指标检测标准已成为优化中药复方制剂提取工艺的重要手段。但是, 对多指标如何合理的综合评价, 是确立提取工艺的关键。而综合评价中, 确定各个评价指标的权重系数是科学、合理评价的基础。目前, 中药提取工艺综合评价中常用的经验性权数法, 它是由专家或主研者根据评价指标的重要性来确定权重系数, 主观因素影响较大, 难免带有片面性。

本试验采用AHP确立权重系数, 进行多指标综合评价, 在多指标优选中药复方提取工艺中建立一种主、客观相结合的确立权重法。一致性检验结果($CR < 0.1$)表明权重系数合理有效, AHP简单易行且具有较高的准确性, 运用AHP确定权重, 更能提高多指标优选中药复方提取工艺的科学性和准确性。

3.2 构成两两比较优先矩阵

比较同一层次目标的相对重要性, 构成两两比较矩阵。指标性成分是发挥临床药效的物质基础, 其相对于浸膏率更重要。白芍为方中君药, 其代表性成分芍药苷相对总生物碱成分更重要, 记2分, 相对浸膏率更重要, 记5分; 总生物碱相对芍药苷重要性要差, 记1/2分; 相对浸膏率略为重要, 记3分, 其余以此类推。

本试验中3项指标优先比较矩阵满足一致性要求($CR < 0.1$), 所以, 其相应求得的权重有效。该结果与经验性权数^[7]比较, 更具有准确性。

3.3 总生物碱测定方法选择

对于供试品的制备, 参照文献[8], 本试验曾在碱性条件下用氯仿萃取总生物碱, 发现氯仿层易与水层发生乳化现象, 测定误差大; 加碱液后用氯仿超声提取, 氯仿层仍发生乳化; 采用氯仿索氏提取, 克服乳化现象, 测定结果准确, 故选择索氏提取总生物碱。

对于总生物碱测定方法, 文献报道有多种^[9]。酸碱滴定法简便, 本试验选择几种不同的指示剂指示终点变化, 发现提取物本身色素干扰严重, 终点颜色变化不明显, 且由于指示剂变色范围大, 滴定终点时溶液pH相差较大, 测定结果偏差大; 两相滴定法氯仿层易与水层发生乳化现象, 终点难观察; 电位滴定法终点易确定, 且不受颜色干扰, 测定结果准确, 故电位滴定法较好。

REFERENCES

- [1] TENG C C, HE Y Z, WANG Y, et al. Research advancement about chemical composition and pharmacological actions of *Lycopodium japonicum* Thunb [J]. Med Recapit(医学综述), 2008, 14(20): 3174-3175.
- [2] HE K, GAO J L, ZHAO G S. Advances in studies on chemistry, pharmacology, and quality control of *Corydalis yanhusuo* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38(12): 1909-1912.
- [3] CHEN R, YANG S H, TANG X L. Research advancement of *Corydalis decumbentis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31(12): 948-949.
- [4] REN A N, LU A L, TIAN Y Z, et al. AHP application to study of weighted coefficient on multicriteria optimization of extraction technology about chinese traditional compound drugs [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33(4): 372-374.
- [5] ZHONG Z J, FU J, LIANG C Q. Determination of total alkaloids in Fengshiding tablet [J]. J Changchun Coll Tradit Chin Med(长春中医学院学报), 2004, 20(4): 40-41.
- [6] LI X F, LUO Q H, REN W. Comparative analysis of alkaloid content determination and abirritation of yanhusuo both before and after its preparation [J]. Hunan Guid J Tradit Chin Med Pharmacol(湖南中医药导报), 2001, 7(5): 253-255.
- [7] LUO Y, LIU G, ZHOU B H, et al. Study on water extraction techniques for Radix Astragali by the synthetical mark [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2004, 24(11): 667-669.
- [8] DU Q, PAN J H, YAN G J. Determination of ester-series alkaloid and total alkaloids in complex prescription monkshood plaster [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008, 19(1): 158-160.
- [9] HE Z A, LIU Y W, LI J R, et al. Studies on the quality specification of compound Xiao Jin Liquor [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 1994, 14(7): 306-308.

收稿日期: 2009-07-03