

银菊解毒口服液大孔树脂纯化工艺研究

杨秀青¹, 石征蓉¹, 谷江华¹, 袁强华², 宋英^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610075

2. 成都中医药大学附属医院 药剂科, 四川 成都 610072

摘要: 目的 在指纹图谱的基础上, 联用 AHP-CRITIC 混合加权法、Plackett-Burman 设计 (PBD) 与 Box-Behnken 设计 (BBD), 多目标筛选银菊解毒口服液 (YJOL) 的纯化工艺。方法 采用 HPLC 法建立 YJOL HPLC 图谱, 以 6 种指标成分绿原酸、蒙花苷、*R,S*-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素的回收率和 HPLC 图谱相似度为指标, 筛选 10 种大孔树脂中最佳型号。AHP-CRITIC 混合加权法赋予 6 种指标成分的回收率和相似度权重, 计算综合指标作为评价标准, 运用 PBD 筛选显著性影响因素, 结合 BBD 优选大孔树脂纯化 YJOL 的最佳工艺参数。结果 HPD-400 型大孔树脂对复方中 6 个指标成分的富集选择性最高。最佳工艺参数为径高比 1 : 7, 上样 pH 值 3.5, 上样质量浓度 0.18 g/mL, 上样量 (药材: 树脂) 0.96 g/g, 8 BV 的 77% 乙醇洗脱。纯化后 6 个指标成分的回收率为 78%~98%, HPLC 指纹图谱相似度大于 0.99, 成分均衡回收。模型综合评价预测值为 94.28%, 实验所得综合评价为 93.69%, 相对偏差 0.59%。结论 在 HPLC 图谱的基础上, 联用 AHP-CRITIC 混合加权法、PBD 与 BBD 筛选 YJOL 纯化工艺是科学可行的, 不仅能提高有效成分的纯度, 还能保持化学成分的一致性。

关键词: 银菊解毒口服液; 大孔树脂; 指纹图谱; 多目标优化; AHP-CRITIC 混合加权法; Plackett-Burman 设计; Box-behnken 设计; 纯化工艺

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)23-4904-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.014

Purification technology of Yinju Jiedu Oral Liquid

YANG Xiu-qing¹, SHI Zheng-rong¹, GU Jiang-hua¹, YUAN Qiang-hua², SONG Ying²

1. Pharmacy College, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China

2. The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To multi-objectively optimize the purification process parameters of Yinju Jiedu Oral Liquid (YJOL), mixed weight of AHP-CRITIC, Plackett-Burman design (PBD), and Box-Behnken design (BBD) were adopted on the basis of HPLC fingerprints. **Methods** HPLC was used to establish HPLC fingerprint of YJOL. Recovery rate of fingerprints of six components (chlorogenic acid, linarin, harpagoside, *R,S*-epigotrin, psoralen, and isobalin) and HPLC fingerprint similarity was taken as the index to optimize the type of macroporous resin among 10 types. Weights of the recovery rates of six components and similarity were determined by mixed weight of AHP-CRITIC, in order to obtain the comprehensive index as the evaluation criterion. The significantly influencing factors were firstly evaluated by PBD, and purification conditions were optimized by BBD. **Results** HPD-400 type resin showed a high selectivity for six components. The optimized purification technology was as follows: the ratio of dia-height was 1 : 7, pH value was 3.5, sample concentration was 0.18 g/mL, ratio of sample to resin was 0.96 g/g, and 77% ethanol's dosage was 8 BV. Under the conditions, the recovery rates of six components were 78%—98%, and the similarity of fingerprint was higher than 0.99. These components could get balanced recovery. Moreover, the theoretical and actual comprehensive indexes were 94.28% and 93.69%, respectively, with a relative error of 0.59%. **Conclusion** Based on HPLC fingerprints, mixed weight of AHP-CRITIC, combined with PBD and BBD-RSM used to optimize the purification process for the YJOL in this study is scientific and feasible, this way can improve the purity of the active components and keep the uniformity of main components in the YJOL as well.

Key words: Yinju Jiedu Oral Liquid; macroporous resin; fingerprint; multi-objective optimization; mixed weight of AHP-CRITIC; Plackett-Burman design; Box-Behnken design; purification process

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 四川省科技支撑项目 (2014SZ0140)

作者简介: 杨秀青 (1992—), 在读硕士, 从事中药新制剂研究。Tel: 18215529231 E-mail: 471331315@qq.com

*通信作者 宋英 (1959—), 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药新制剂、新工艺和新技。Tel: (028)87783735 E-mail: 757508710@qq.com

牙龈炎、牙周炎是常见的口腔炎症性疾病。患者口内菌斑的菌量,细菌的种类较健康人口内的多,矿化的菌斑和其他沉淀物构成牙石,表面粗糙不光滑,菌斑极易附着在牙石上面,并且牙石容易吸附更多毒素,对牙龈、牙周产生局部刺激导致牙龈炎、牙周炎^[1-2]。银菊解毒口服液(Yinju Jiedu Oral Liquid, YJOL)由经验效方与现代制剂技术相结合研制而成,方含川银花、野菊花等5种药味,临床定位为用于治疗牙龈炎、牙周炎的复方制剂,通过查阅方中各组成药味的化学、药理研究及药动学文献资料,发现方中水溶性成分绿原酸、蒙花苷具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化等药理作用^[3-6]; *R,S*-告依春是发挥抗病毒作用的主要有效部位^[7],哈巴俄苷能够有效地恢复免疫功能^[8];补骨脂素和异补骨脂素对多种微生物均有较强的抑制作用和止血能力^[9-10]。

课题组前期优选出了YJOL最佳提取工艺,得到其水提液,但其浸膏得率较高,因而需进一步纯化。大孔吸附树脂由于具有吸附容量大、选择性好、吸附速度快、易于解吸附、机械强度高、再生处理简便等优点,被广泛应用于中药的分离纯化^[11-12],但常规的评价技术多以1种或几种成分的量指标,不足以准确、完整地体现中药有效组分,使得该技术在中药生产应用中受限。本实验以指纹图谱相似度和6个指标化学成分回收率为评价指标,联用AHP-CRITIC混合加权法、Plackett-Burman设计(PBD)与Box-Behnken设计(BBD),多目标筛选YJOL的纯化工艺,不仅能提高有效成分的质量分数,还能保持化学成分的一致性,为YJOL的纯化工艺研究提供数据支持,具有一定的应用价值。

1 仪器与试药

Agilent1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;BP211D 电子分析天平,十万分一,德国Satorius公司;乙腈,色谱纯,美国天地公司;HPD-100、HPD-400、HPD-450、HPD-600、NKA-9、AB-8、S-8、X-5、D-101、LX-17 大孔吸附树脂,沧州宝恩吸附材料有限公司;甲醇、磷酸,分析纯,西陇化工股份有限公司;蒸馏水,自制。

对照品绿原酸(批号110753-201314,质量分数96.6%)、蒙花苷(批号111528-201308,质量分数95.1%)、*R,S*-告依春(批号111753-201304,质量分数99.9%)、哈巴俄苷(批号111730-201307,97.1%)、补骨脂素(批号110739-201115,质量分数99.3%)、异补骨脂素(批号110738-201313,质

量分数100.0%),中国食品药品检定研究院。

川银花为忍冬科忍冬属植物细毡毛忍冬 *Lonicera similis* Hemsl. 的干燥花蕾或带初开的花、野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序、玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根、板蓝根为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥根、补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,5味药材均购自四川省新荷花中药饮片有限公司,经成都中医药大学附属医院药剂科副主任药师盛蓉鉴定,均符合《中国药典》2015年版一部,川银花符合《四川省中药材标准》2010年版,YJOL水提液浸膏(批号20170501),成都中医药大学附属医院代制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

岛津 Inert Sustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~18 min, 5%乙腈;18~24 min, 5%~10%乙腈;24~30 min, 10%~12%乙腈;30~33 min, 12%~13%乙腈;33~42 min, 13%~22%乙腈;42~57 min, 22%~24%乙腈;57~63 min, 24%~30%乙腈;63~65 min, 30%~55%乙腈;后运行5 min, 5%乙腈;检测波长240 nm(0~20 min)、327 nm(20~43 min)、334 nm(43~51 min)、280 nm(51~57 min);柱温30℃;体积流量1.0 mL/min;进样量10 μL;理论塔板数以各成分计均不低于5000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、蒙花苷、*R,S*-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素对照品适量,加50%甲醇制成含绿原酸76.61 μg/mL、蒙花苷25.63 μg/mL、*R,S*-告依春41.01 μg/mL、哈巴俄苷20.09 μg/mL、补骨脂素20.06 μg/mL、异补骨脂素20.14 μg/mL混合对照品溶液。

2.2.2 YJOL溶液的制备 称YJOL水提液浸膏适量,加水溶解稀释为质量浓度0.45 g/mL,即得。

2.3 方法学考察

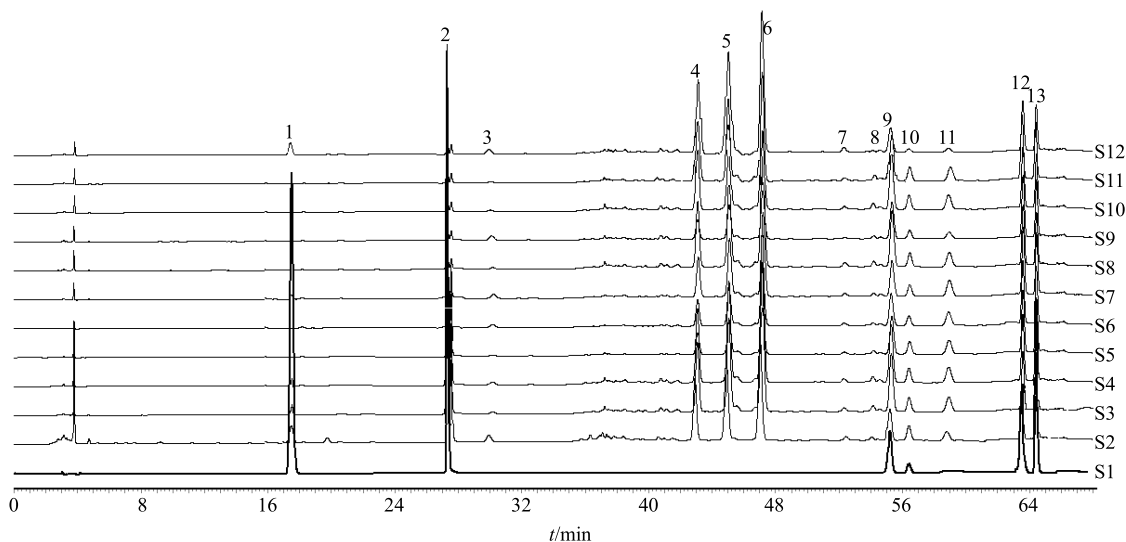
2.3.1 精密度考察 取YJOL(批号20170501)水提液浸膏1份,按“2.2.2”项方法制备YJOL溶液,按“2.1”项条件连续测定6次,6次测定图谱13个主要峰保留时间RSD≤2.01%,峰面积RSD≤2.37%,仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 取 YJOL (批号 20170501) 水提液浸膏 1 份, 按“2.2.2”项方法制备 YJOL 溶液, 按“2.1”项条件分别于 0、2、4、6、10、12 h 进样测定, 所测定图谱的 13 个主要峰保留时间 $RSD \leq 2.44\%$, 峰面积 $RSD \leq 2.79\%$, 样品在 12 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性考察 取 YJOL (批号 20170501) 水提液浸膏 6 份, 按“2.2.2”项方法平行制备 YJOL 溶液, 按“2.1”项条件分别测定, 6 份样品的 13 个主要峰保留时间 $RSD \leq 2.7\%$, 峰面积 $RSD \leq 2.19\%$, 证明方法的重复性良好。

2.4 HPLC 图谱的建立

精密量取 YJOL 溶液、各洗脱液 2 mL, 定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.1”项色谱条件测定色谱图。另取混合对照品溶液, 按色谱条件测定色谱图, 各对照品在复方原液指纹图谱中均有相应的吸收峰。对比各吸收峰的紫外吸收光谱和相对保留时间, 鉴定了其中 6 个峰: 1 号峰为 *R,S*-告依春、9 号峰为蒙花苷、10 号峰为哈巴俄苷、12 号峰为补骨脂素、13 号峰为异补骨脂素。蒙花苷 (9 号峰) 分离较好, 其量较稳定, 对照品易获得, 因此选择蒙花苷作为参照峰, 结果见图 1。



S1-混合对照品 S2-YJOL 溶液 S3-HPD100 洗脱液 S4-HPD400 洗脱液 S5-HPD450 洗脱液 S6-HPD600 洗脱液 S7-NKA9 洗脱液 S8-AB8 洗脱液 S9-S8 洗脱液 S10-X5 洗脱液 S11-D101 洗脱液 S12-LX17 洗脱液 1-*R,S*-告依春 2-绿原酸 9-蒙花苷 10-哈巴俄苷 12-补骨脂素 13-异补骨脂素
S1-mixed reference substances S2-YJOL S3-eluent of HPD100 S4-eluent of HPD400 S5-eluent of HPD450 S6-eluent of HPD600 S7-eluent of NKA9 S8-eluent of AB8 S9-eluent of S8 S10-eluent of X5 S11-eluent of D101 S12-eluent of LX17 1-*R,S*-epigallocatechin gallate 2-chlorogenic acid 9-linarin 10-harpagoside 12-psoralen 13-isobalanol

图1 混合对照品和 YJOL 溶液及不同型号大孔树脂处理后的洗脱液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and fingerprint of YJOL and its eluent treated by different kinds of macroporous resin

2.5 树脂型号筛选

称取预处理^[13]后的 10 种树脂 2.0 g, 分别装入 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入质量浓度为 0.45 g/mL 的 YJOL 溶液 20 mL, 每 10 分钟振摇 1 次, 每次 30 s, 持续振摇 2 h, 静置 24 h 后真空抽滤, 4 BV 纯水冲洗, 吸干树脂表面的水分, 倒回锥形瓶内, 精密加入 70%乙醇 30 mL, 每 10 分钟振摇 1 次, 每次 30 s, 持续振摇 2 h, 静置 24 h 后真空抽滤, 洗脱液定容至 50 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 依照“2.1”项下色谱条件测定, 其中绿原酸、蒙花苷、*R,S*-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素在色谱图中对应的色谱峰经对照品测定予以确

定, 依据其峰面积, 计算各成分回收率, 各成分均以加入 YJOL 溶液的总量视为 100%, 采用相应的峰面积之比计算回收率。回收率按照公式 $Q = S/S_0$ (S 为乙醇洗脱液吸收峰面积, S_0 为 YJOL 溶液吸收峰面积, Q 为成分回收率) 计算^[14]。采用中国药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版》软件计算各洗脱液 HPLC 图谱与 YJOL 溶液 HPLC 图谱的相似度, 结果见表 1。

以绿原酸、蒙花苷、*R,S*-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素的回收率和相似度为指标, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法得到的权重系数对实验结果进行综合评分。

表 1 树脂型号对 6 种主要成分回收率及相似度的影响

Table 1 Effect of resin type on recovery rate and fingerprint similarity of main components

树脂型号	回收率/%						相似度
	绿原酸	蒙花苷	R,S-告依春	哈巴俄苷	补骨脂素	异补骨脂素	
HPD-100	18.54	90.87	57.64	97.77	77.88	75.58	0.608
HPD-400	20.20	90.84	65.81	99.54	88.66	88.52	0.616
HPD-450	9.50	60.12	0	87.89	83.42	82.72	0.474
HPD-600	4.68	49.81	0	66.76	84.55	87.25	0.359
NKA-9	14.14	55.88	50.27	79.25	88.58	90.35	0.561
AB-8	17.48	88.97	53.69	95.69	79.90	78.31	0.591
S-8	28.42	57.56	95.22	57.49	84.08	86.19	0.789
X-5	14.78	89.38	0	97.55	81.44	80.82	0.543
D-101	11.80	86.52	0	96.79	86.53	86.37	0.485
LX-17	23.34	39.57	76.49	23.13	67.10	66.73	0.809

根据复方活性成分的药理作用强弱和君臣佐使的配伍规律,将 6 种活性成分的溶出量和相似度作为权重指标,从主观上将 7 个指标分为 5 个层次:绿原酸>蒙花苷>R,S-告依春=哈巴俄苷>补骨脂素=异补骨脂素>相似度,参考相关文献报道^[15],运用一致矩阵法构造判断矩阵,根据评判的结果对数据进行归一化处理,计算出绿原酸、蒙花苷、R,S-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素的回收率和相似度的 AHP 权重系数。

采用 CRITIC 法将指标权重分为指标间的对比强度 (s_i) 和指标间的冲突性 (δ_i)。 s_i 借鉴标准离差的思想,其标准差越大蕴含的样本信息也大; δ_i 以指标间的相关系数为基础,表示第 i 个指标与其他指标的冲突性,若两指标相关性越低说明两指标间冲突性较大,权重也较大。

$$s_i = \left[\sum_{j=1}^n (z_{ij} - z_i)^2 / (n-1) \right]^{1/2}$$

z_{ij} 为消除量纲后的样本值, z_i 为第 i 个指标的样本均值, m 、 n 分别代表指标个数和样本数, $i=1, 2, \dots, m$

$$\delta_i = \sum_{j=1}^n (1 - r_{ij})$$

r_{ij} 为指标 i, j 的相关系数, $i=1, 2, \dots, m$, 即 δ_i 越大,第 j 个指标包含的信息量越大,该指标相对于其他指标更重要^[16]

将各指标试验数据经线性插值处理^[17],消除单位量纲后,用 SPSS 19.0 软件计算指标间的 s_i 、 δ_i 、综合权重 (c_i) 与权重 (ω_i)。

试验数据指标值 = (实测值 - 最小值) / (最大值 - 最小值) × 100

最后将 2 种加权方法结合,既注重客观,又不失主观,计算的权重系数更加合理、真实。即 $\omega_{\text{综合}} = \omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij} / \sum \omega_{\text{AHP}ij} \omega_{\text{CRITIC}ij}$, ω_{AHP} 表示 AHP 法计算的权重系数, ω_{CRITIC} 表示 CRITIC 法计算的权重系数, i 表示第 i 个因素, j 表示第 j 个样本。

综合评分 (Z) 根据公式计算: $Z = \sum (Q_i / Q_{\text{imax}} \times W_i)$, Q_i 为各指标试验数据, Q_{imax} 为各指标试验数据的最大值, w_i 为各指标对应的权重系数。

计算得绿原酸、蒙花苷、R,S-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素、相似度对应的权重系数分别为 0.284 5、0.246 9、0.151 8、0.129 2、0.067 1、0.072 6、0.047 9; HPD-100、HPD-400、HPD-450、HPD-600、NKA-9、AB-8、S-8、X-5、D-101、LX-17 所对应的 Z 值分别为 80.7%、85.78%、53.02%、42.42%、64.92%、78.49%、84.69%、67.62%、64.24%、64.54%, HPD-400、AB-8、HPD-100 三者效果较佳,绿原酸、蒙花苷、R,S-告依春、哈巴俄苷、补骨脂素、异补骨脂素含有酚基、酚羟基、氨基等,作为一个良好氢键供体,适用于弱极性、非极性和中极性树脂吸附。从极性角度考虑,HPD-100 为非极性大孔树脂,适宜于相对分子质量大、极性小的非极性物质的吸附; AB-8 为弱极性树脂,对于弱极性树脂,相对分子质量相似的化合物,极性越小,吸附能力越强,则越难洗脱下来,极性越大,吸附能力越弱,则越易洗脱下来。对于极性相似的化合物,相对分子质量越大,越易洗脱下来^[18]。HPD-400 为中极性大孔树脂,由于酰基等结构的存在,兼有疏水和亲水 2 部分,由于不同成分之间的竞争结合位点会给吸附带来一定负面影响,中极性大孔树脂更

能兼顾各成分的吸附与洗脱, 且其 Z 值最大, 综合考虑确定以 HPD-400 大孔树脂为纯化材料。

2.6 纯化条件的优化

2.6.1 上样液 pH 值的考察 称取抽滤至干的 2.0 g 预处理好的 HPD-400 型大孔树脂 6 份, 湿法装柱。分别精密加入 0.45 g/mL 用稀氨水或稀盐酸调节 pH 值为 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5 的 YJOL 溶液 20 mL, 静置 24 h, 用 4 BV 水以 1.0 mL/min 的体积流量冲洗除杂, 接着用 8 BV 的 70% 乙醇以 1.0 mL/min 的体积流量洗脱, 收集洗脱液, 70% 乙醇定容至 50 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 依照“2.1”项下色谱条件测定, 计算 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液 HPLC 图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算对应的 Z 值分别为 60.66%、93.44%、81.49%、55.45%、60.58%、54.48%, 当上样液 pH 值为 3.5 时, Z 值最大, 故选择上样液 pH 值 3.5。

2.6.2 上样液质量浓度的考察 将 YJOL 水提液浸膏稀释成质量浓度为 0.15、0.25、0.35、0.45、0.55、0.65 g/mL 的溶液, 调节 pH 值至 3.5, 按照每克树脂 1.5 g 药材的比例上样, 其他同“2.6.1”项下工艺参数操作, 计算 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液 HPLC 图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算 Z 值分别为 82.30%、85.27%、61.92%、56.79%、55.68%、55.50%。当上样液质量浓度为 0.25 g/mL 时, Z 值最大, 故确定上样液质量浓度 0.25 g/mL。

2.6.3 上样量的考察 将 YJOL 水提液浸膏稀释成质量浓度为 0.25 g/mL 的溶液, 调节 pH 值至 3.5, 分别按照药材-树脂比 0.8 : 1、0.9 : 1、1.0 : 1、1.1 : 1、1.2 : 1、1.3 : 1 上样, 其他同“2.6.1”项下工艺参数操作, 计算 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液指纹图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算 Z 值分别为 89.07%、86.43%、90.66%、81.29%、80.58%、77.08%, 当上样液量药材-树脂比为 1.0 : 1 时, Z 值最大, 故确定药材-树脂比为 1.0 : 1。

2.6.4 洗脱液乙醇体积分数的考察 将 YJOL 水提液浸膏稀释成质量浓度为 0.25 g/mL 的溶液, 调节 pH 值至 3.5, 按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样, 待吸附 24 h 后, 用 4 BV 水冲洗除杂, 分别用体积分数为 40%、50%、60%、70%、80%、90% 乙醇进行洗脱, 其他同“2.6.1”项下工艺参数操作, 计算

6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液指纹图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算 Z 值分别为 20.52%、47.17%、69.94%、87.48%、84.27%、73.49%, 当洗脱液体积分数为 70% 时, Z 值最大。

2.6.5 洗脱剂用量的考察 将 YJOL 水提液浸膏稀释成质量浓度为 0.25 g/mL 的溶液, 调节 pH 值至 3.5, 按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样, 待吸附 24 h 后, 用 4 BV 水冲洗除杂。用 70% 乙醇分别以 4、6、8、10、12、14 BV 洗脱用量进行洗脱, 其他同“2.6.1”项下工艺参数操作, 计算 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液指纹图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算 Z 值分别为 63.44%、76.8%、86.21%、88.07%、89.92%、90.54%, 当洗脱剂用量为 8 BV 时, Z 值的变化趋于平缓, 为节约能源并提高试验效率, 故选用 8 BV 的洗脱剂用量。

2.6.6 径高比的考察 将 YJOL 水提液浸膏稀释成质量浓度为 0.25 g/mL 的溶液, 调节 pH 值至 3.5, 按照每克树脂 1.0 g 药材的比例上样, 分别通过已经处理好的树脂床, 径高比分别为 3 : 1、5 : 1、7 : 1、9 : 1、11 : 1、13 : 1, 待吸附 24 h 后, 用 4 BV 水冲洗除杂, 接着用 8 BV 的 70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 70% 乙醇定容至 50 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 依照“2.1”项下色谱条件测定, 计算 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液指纹图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数。通过计算不同径高比对应的 Z 值分别为 60.03%、76.32%、88.41%、88.05%、80.43%、70.77%, 当径高比为 7 : 1 时, Z 值最大, 故选用 7 : 1 的径高比。

2.7 PBD 试验筛选主要影响因素^[19-21]

在单因素试验基础上, 选用 Plackett-Burman 试验设计, 考察影响 Z 值的显著性因素。选取 6 个试验因素: 上样液 pH 值 (A)、上样液质量浓度 (B)、上样量 (C)、洗脱液乙醇体积分数 (D)、洗脱体积 (E)、径比高 (F) 以及 3 个空白因素 (G、H、I), 共 12 组试验, 每个因素取高、低 2 个水平, 计算每组实验 6 种指标成分的回收率以及与 YJOL 溶液指纹图谱相似度, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数 (W), 再将 6 种成分的回收率、相似度及 W 代入 Z 公式中, 求 Z 值。用 Minitab 16.0 软件进行试验设计及结果统计分析, PBD 试验设计及结果见表 2、3。由偏回归系数及显著性检验可知,

表 2 PBD 试验设计及结果
Table 2 Test and results of PBD

试验号	A	B/(g·mL ⁻¹)	C/(g·g ⁻¹)	D/%	E/BV	F	G	H	I	Z/%
1	4.5 (1)	0.15 (-1)	1.1 : 1 (1)	80 (1)	7 (-1)	8 : 1 (1)	0	0	0	96.30
2	2.5 (-1)	0.35 (1)	1.1 : 1 (1)	80 (1)	7 (-1)	8 : 1 (1)	0	0	0	85.90
3	2.5 (-1)	0.15 (-1)	1.1 : 1 (1)	80 (1)	9 (1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	97.09
4	2.5 (-1)	0.15 (-1)	0.9 : 1 (-1)	80 (1)	9 (1)	8 : 1 (1)	0	0	0	76.34
5	2.5 (-1)	0.35 (1)	1.1 : 1 (1)	60 (-1)	7 (-1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	57.22
6	4.5 (1)	0.35 (1)	0.9 : 1 (-1)	80 (1)	9 (1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	74.72
7	2.5 (-1)	0.35 (1)	0.9 : 1 (-1)	60 (-1)	9 (1)	8 : 1 (1)	0	0	0	40.10
8	4.5 (1)	0.15 (-1)	1.1 : 1 (1)	60 (-1)	9 (1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	66.57
9	4.5 (1)	0.15 (-1)	0.9 : 1 (-1)	60 (-1)	7 (-1)	8 : 1 (1)	0	0	0	50.05
10	4.5 (1)	0.35 (1)	1.1 : 1 (1)	60 (-1)	9 (1)	8 : 1 (1)	0	0	0	70.01
11	4.5 (1)	0.35 (1)	0.9 : 1 (-1)	80 (1)	7 (-1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	66.58
12	2.5 (-1)	0.15 (-1)	0.9 : 1 (-1)	60 (-1)	7 (-1)	6 : 1 (-1)	0	0	0	61.63

表 3 PBD 显著性分析
Table 3 Significance analysis of PBD

因素	回归系数	<i>T</i>	<i>P</i>	重要性排序
A	-0.999	-2.09	0.798	6
B	-4.603	-1.76	0.220	3
C	7.908	3.14	0.088	2
D	15.895	4.83	0.040	1
E	3.278	0.97	0.433	4
F	-1.437	-0.62	0.597	5

影响 *Z* 的主要因素依次为上样液质量浓度、上样量、洗脱液乙醇体积分数。

2.8 BBD 试验方案及结果

选择上样液质量浓度 (X_1)、上样量 (X_2) 及洗脱液乙醇体积分数 (X_3) 为自变量, *Z* 为因变量, 采用 AHP-CRITIC 混合加权法计算指标权重系数 (*W*), 再将 6 种成分的回收率、相似度及 *W* 代入 *Z* 公式中, 求 *Z* 值。*W* 值分别为 0.309 3、0.177 7、0.137 0、0.114 5、0.070 5、0.072 8、0.118 2。通过 BBD-效应面法优化 YJOL 纯化工艺, 采用 Design Expert 8.0 软件对试验数据进行拟合分析, 每个因素的低、中、高试验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 共 17 组试验, 因素水平及试验安排见表 4。动态纯化过程中各因素经回归拟合所得的方程为 $Z = 0.91 + 0.025 X_1 + 0.056 X_2 + 0.032 X_3 + 0.019 X_1 X_2 - 0.015 X_1 X_3 - 0.06 X_2 X_3 - 0.07 X_1^2 - 0.074 X_2^2 - 0.011 X_3^2$ 。公式校正决定系数 (R^2) 为 0.929 3, 表明 92.93% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释, 可靠度较高。由表 5 可知, 在动态纯化过程中, 由 BBD 所得的

表 4 BBD 试验设计及结果
Table 4 Test and results of BBD

试验号	X_1 /(g·mL ⁻¹)	X_2 /(g·g ⁻¹)	X_3 /%	<i>Z</i> /%
1	0.35 (1)	1.0 (0)	80 (1)	87.87
2	0.35 (1)	0.9 (-1)	70 (0)	69.41
3	0.25 (0)	0.9 (-1)	60 (-1)	69.54
4	0.25 (0)	1.0 (0)	70 (0)	89.36
5	0.35 (1)	1.1 (1)	70 (0)	87.53
6	0.25 (0)	1.0 (0)	70 (0)	90.19
7	0.25 (0)	1.0 (0)	70 (0)	89.38
8	0.35 (1)	1.0 (0)	60 (-1)	83.46
9	0.15 (-1)	1.0 (0)	80 (1)	85.09
10	0.25 (0)	1.1 (1)	80 (1)	83.06
11	0.25 (0)	1.0 (0)	70 (0)	93.11
12	0.25 (0)	0.9 (-1)	80 (1)	86.74
13	0.25 (0)	1.0 (0)	70 (0)	91.95
14	0.15 (-1)	0.9 (-1)	70 (0)	69.17
15	0.15 (-1)	1.1 (1)	70 (0)	79.53
16	0.15 (-1)	1.0 (0)	60 (-1)	74.63
17	0.25 (0)	1.1 (1)	60 (-1)	89.76

非线性方程模型 $P < 0.000 1$, 表明该模型极显著, 失拟性检验不显著 ($P = 0.189 9 > 0.05$), 说明回归模型的拟合情况良好, 能准确地预测实际情况。各项因素对 *Z* 的影响为 $X_2 > X_3 > X_1$, 交互项中 $X_2 X_3$ 相互作用对 *Z* 影响显著, X_1^2 、 X_2^2 对 *Z* 有显著性影响。 X_1 、 X_2 、 X_3 对 *Z* 值的响应面图见图 2。

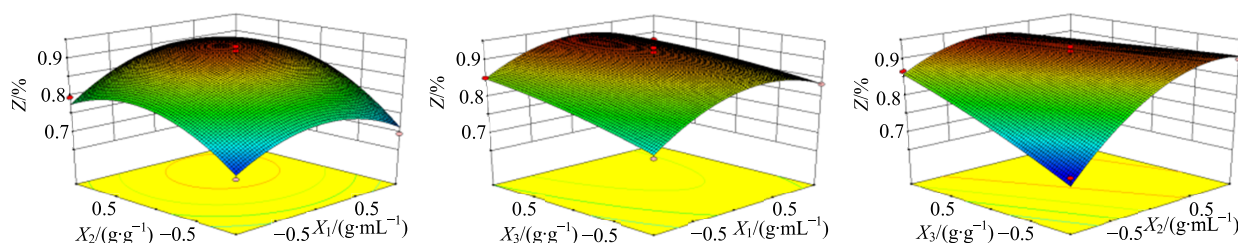
2.9 最佳纯化工艺和验证试验结果

采用 Design-Expert 8.0 软件对各因素水平进行优化预测, 得最佳纯化工艺为上样质量分数 0.18 g/g,

表 5 BBD 方差分析表

Table 5 ANOVA of regression analysis of BBD

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.1	9	0.011	24.36	0.000 2	X_1^2	0.02	1	0.02	43.48	0.000 3
X_1	4.93×10^{-3}	1	4.93×10^{-3}	10.53	0.014 2	X_2^2	0.023	1	0.023	49.79	0.000 2
X_2	0.025	1	0.025	54.15	0.000 2	X_3^2	4.96×10^{-4}	1	4.96×10^{-4}	1.06	0.337 5
X_3	8.05×10^{-3}	1	8.05×10^{-3}	17.20	0.004 3	残差	3.28×10^{-3}	7	4.68×10^{-4}		
X_1X_2	1.51×10^{-3}	1	1.51×10^{-3}	3.22	0.115 9	失拟项	2.16×10^{-3}	3	7.21×10^{-4}	2.59	0.189 9
X_1X_3	9.15×10^{-4}	1	9.15×10^{-4}	1.96	0.204 7	纯误差	1.11×10^{-3}	4	2.78×10^{-4}		
X_2X_3	0.014	1	0.014	30.52	0.000 9	总和	0.11	16			

图 2 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Z 值的响应面图Fig. 2 Response surface plot of X_1 , X_2 , and X_3 on Z value

上样量 0.96 g/g 洗脱剂乙醇体积分数 77%，最大预测 Z 值为 94.28%。为验证该模型的稳定性，按此工艺条件进行 3 次重复试验（表 6），采用优选后的大孔树脂纯化条件，复方中 6 种指标成分回收率为 78%~99%，相似度达到 0.989 以上，实际 Z 平均值

为 93.69%，与预测 Z 值（94.28%）相比，偏差为 0.59%，表明优选的工艺稳定可行。本研究得到 YJOL 最佳纯化工艺参数为径高比 1:7，上样 pH 值 3.5，上样液质量浓度 0.18 g/mL，上样量 0.96 g/g，8 BV 的 77%乙醇洗脱。

表 6 3 批验证试验结果

Table 6 Results of three batches of confirmatory tests

批号	回收率/%						相似度	Z /%
	绿原酸	蒙花苷	R,S -告依春	哈巴俄苷	补骨脂素	异补骨脂素		
1	83.43	91.97	88.01	98.98	92.25	91.07	0.989	94.44
2	78.99	91.92	89.60	99.43	92.36	92.33	0.995	93.27
3	81.11	90.47	88.48	99.17	90.82	90.69	0.997	93.35

3 讨论

中药的化学成分繁多且复杂，具有“多组分、多靶点、整体效应”的特点，因此有效组分的提取和分离纯化是中药研究中的关键问题。大孔吸附树脂技术应用于中药成分富集和纯化的研究日益增多，但由于中药成分复杂，理化性质差异较大，成分回收率差异显著，致使分离产物无法准确、完整地体现中药物质基础，因此该技术在中药生产中的推广应用受到限制^[22-23]。中药指纹图谱具有整体性、宏观性和模糊性，能够综合、全面地反映出中药产品的内在质量^[24-25]。以指纹图谱相似度结合特征化学成分回收率为评价指标为指标优化分离过程，既

能保证分离效果，又能够保持分离前后成分组成的一致性，保证药性的统一。

多指标综合加权评分法中，权重系数的分配是综合评分标准是否科学合理的直接体现，是优选复方提取工艺和保证中药复方制剂质量和疗效的关键。目前确立权重的方法主要归纳为 2 类：即主观权重系数和客观权重系数。主观权重系数如 AHP 法、专家评分法等，是凭借试验者的主观经验赋值，目前涉及多指标优化问题时多采用此法，但该方法易受试验者主观判断的影响，难免带入片面性。客观权重系数如 CRITIC 法、熵权法等，利用试验数据的指标值反映客观信息确定权重，虽避免了人为主

观影响,但计算结果未能客观反应指标的实际重要程度,特别是中药复方的君臣佐使配伍规律,常导致赋权结果与客观实际存在一定的差距。本实验采用主、客观结合的方法分配权重系数,既考虑各指标的重要程度,又注重试验数据之间的相互影响,增强了总体评价的科学性和合理性^[26-27]。

PBD 试验是一种两水平的试验,以最少的试验次数精确估计因素的主效果,适用于从众多的考察因素中快速筛选显著影响因素^[28],但 PBD 试验不能区分主效应与交互作用的影响;BBD 采用多元回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,充分考虑到研究因素与响应值之间、因素与因素之间的相互作用,寻求最优工艺参数,解决多变量优化问题^[29],但 BBD 在变量较多时由于一些因素不显著而浪费资源。本实验采用 PBD 试验结合 BBD 试验,不仅能提高试验精度,还能提高试验结果的预测性,所得结果可靠、工艺可行,为 YJOL 的纯化工艺研究提供数据支持,具有一定的应用价值。

参考文献

- [1] 吴永杰. 500 例妇女妊娠期牙龈炎发病情况调查分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(19): 4523-4524.
- [2] 潘卫红, 凌 慧. 妊娠期龈炎与口腔卫生的相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2006, 21(15): 2056-2057.
- [3] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.
- [4] 王亚丹, 杨建波, 戴 忠, 等. 中药金银花的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 1928-1935.
- [5] 张金杰, 吕文文, 翁远超, 等. 野菊花中黄酮类成分的抗菌活性及指纹图谱 [J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(6): 807-812.
- [6] 杨秀青, 石征蓉, 谷江华, 等. 银菊解毒口服液指纹图谱结合多指标成分定量测定的质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2645-2652.
- [7] 陈 凯, 窦 月, 陈 智, 等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 275-278.
- [8] 李祚丹. 玄参中环烯醚萜类物质的分离纯化研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
- [9] 何文英, 姚小军, 胡之德, 等. 补骨脂素和异补骨脂素与人免疫球蛋白的相互作用 [J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(5): 911-918.
- [10] 关丽杰. 补骨脂抑菌活性成分及其制剂研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [11] 张 旭, 王锦玉, 全 燕, 等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 286-290.
- [12] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1146-1152.
- [13] 汤 杰, 万 进, 马永贵, 等. 大孔吸附树脂分离纯化板蓝根有机酸组分 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(18): 1504-1507.
- [14] 李守信, 展金祥, 刘武占, 等. 基于指纹图谱的金银花物质组纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 55-60.
- [15] 石振武, 赵 敏. 运用层次分析法确定指标的权值 [J]. 科技和产业, 2008, 2(8): 23-25.
- [16] 王 晖, 陈 丽, 梁 庆, 等. 多指标综合评价方法及权重系数的选择 [J]. 广东药学院学报, 2007, 5(23): 583-589.
- [17] 郭 真, 于丽红, 兰庆高. 村镇银行可持续发展评价指标体系的构建——基于对湖南湘乡市村镇银行的调查 [J]. 金融理论与实践, 2011(5): 53-56.
- [18] 谷成燕. AB8 大孔树脂与硅胶柱层析分离姜酚的对比 [D]. 济南: 山东大学, 2009.
- [19] 田彦芳, 万海同, 朱紫烨, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1118-1125.
- [20] 班书贤, 倪 艳, 孙迎娜, 等. Plackett-Burman 试验联合响应面试验优选 XDA-7 型大孔树脂纯化白子菜总多糖的工艺条件 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 25-29.
- [21] 宋立华, 杜茂波, 刘淑芝, 等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 响应面法优化凝胶膏剂基质研 [J]. 中成药, 2015, 37(12): 2623-2627.
- [22] 刘 丹, 吴叶红, 李玮桓, 等. 大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2764-2770.
- [23] 陈贤春, 吴 清, 李冀湘. 大孔吸附树脂富集丹参总酚酸的工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1158-1160.
- [24] 王春雷, 姜建伟, 侯桂兰. 急支糖浆 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4192-4197.
- [25] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, et al. Comparison on HPLC fingerprints between *Fraxini Cortex* and its eye drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [26] 李 磊, 程虹毓, 朱玉野, 等. 多指标综合评分法优化栀子柏皮汤的提取工艺 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 306-310.
- [27] 杨 铭, 张 莉, 葛迎利, 等. 以多种数学模型探求降脂颗粒组方配伍优化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3439-3443.
- [28] 史亚军, 吴品江, 魏 萍. Plackett-Burman 设计与星点设计-效应面法优化山楂总黄酮磷脂复合物制备工艺 [J]. 中药材, 2010, 33(3): 437-441.
- [29] 郑孟凯, 何 昱, 万海同, 等. 响应面法优化大孔树脂纯化麻黄总生物碱的工艺研究 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2079-2084.