

基于信息熵理论的哮喘方水提取工艺优选研究

李 淼^{1,2,3,4}, 王星星^{2,3,4}, 康小东^{2,3,4}, 王仁杰^{2,3,4}, 孙永城^{2,3,4}, 王振中^{2,3,4}, 晁恩祥⁵, 萧 伟^{1,2,3,4*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

4. 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222001

5. 北京中日友好医院, 北京 100029

摘要: 目的 应用信息熵理论优选哮喘方中防风、紫苏叶、辛夷、苦杏仁、炙麻黄 5 味药材的提取工艺。方法 以升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的提取率及浸膏得率为评价指标, 采用信息熵赋权法确定各指标的权重系数, 实现对正交试验提取工艺参数的优选。结果 最佳提取工艺为 10 倍量水提取 3 次, 每次 1.5 h。结论 优化后的提取工艺稳定可行, 可为该处方的进一步开发提供数据支持。

关键词: 信息熵; 哮喘方; 防风; 紫苏叶; 辛夷; 苦杏仁; 炙麻黄; 升麻素苷; 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 苦杏仁苷

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)12-2113-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.016

Optimization of extraction technology for Xiaochuan Decoction based on information entropy theory

LI Miao^{1,2,3,4}, WANG Xing-xing^{2,3,4}, KANG Xiao-dong^{2,3,4}, WANG Ren-jie^{2,3,4}, SUN Yong-cheng^{2,3,4}, WANG Zhen-zhong^{2,3,4}, CHAO En-xiang⁵, XIAO Wei^{1,2,3,4}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

4. The Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification Lianyungang 222001, China

5. Department of Respiratory Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of *Saposhnikovia Radix*, *Perillae Folium*, *Magnoliae Flos*, *Armeniacae Amarum Semen*, and honey-fried *Ephedrae Herba* in Xiaochuan Decoction by information entropy theory. **Methods** With the contents of prem-O-glucosylcimifugin, 4'-O-beta-glucopyranosyl-5-O-methylvisamminol, amygdalin, and the yield of extract as comprehensive evaluation indexes in order to optimize the extraction process parameters of orthogonal test, the weight coefficient of each index was determined by the information entropy weight method. **Results** Optimum extraction technology was as follows: reflux extraction for 3 times with 10 fold water, for 1.5 h each time. **Conclusion** The optimized method is stable and reliable, and can provide the reference for further development and utilization of the formula.

Key words: information entropy; Xiaochuan Decoction; *Saposhnikovia Radix*; *Perillae Folium*; *Magnoliae Flos*; *Armeniacae Amarum Semen*; honey-fried *Ephedrae Herba*; prem-O-glucosylcimifugin; 4'-O-beta-glucopyranosyl-5-O-methylvisamminol; amygdalin

哮喘方为国医大师晁恩祥教授临床经验方, 处 风缓急利窍、肃肺平喘, 主要针对哮喘之“风邪伤肺, 肃降失常, 气道挛急”之突发或反复发作。

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家重大新药创制——治疗支气管哮喘急性发作期(热哮)经典方定喘汤的研究(2015ZX09101043-003)

作者简介: 李 淼, 主要从事中药新药及中药制药新技术研究。E-mail: limiao4569092@126.com

*通信作者 萧 伟, 博士, 研究员级高级工程师, 主要从事中药制剂和创新中药的研究与开发。E-mail: kanionlunwen@163.com

该方从 2 个方面针对过敏性哮喘的治疗, 一是以疏风宣降肺气为主, 即从舒缓气道方面改善气道挛急, 对气道高反应以舒缓作用; 二是通窍降气平喘, 针对鼻塞、气急、喘促, 改善肺之肃降功能。方中以防风、紫苏叶为君药, 其意在于疏风, 防风中的升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷则有一定的解热、镇痛、抗炎、抗过敏作用^[1-2]; 方中苦杏仁为臣药可以宣肃肺之气、润肺下气, 针对哮喘憋气喘急而用, 其中的苦杏仁苷则具有免疫抑制、免疫调节、抗炎等方面的药理作用^[3]。

为了优化该方的水提取工艺, 提高临床疗效, 本实验以哮喘方中升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷 3 个指标性成分以及固含物的提取率作为综合评价指标, 采用正交试验设计法及信息熵理论^[4-6]分析法全面优化哮喘方水提取工艺, 筛选该方的最佳提取工艺参数, 为该方的中试放大及产业化生产提供数据支持。

1 仪器与材料

UltiMate3000 高效液相色谱仪, 美国戴安公司, 包括二元泵, 自动进样器, RS Variable Wavelength 检测器; Satorius BP 211D 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司, 0.01 mg; 美国纯净水发生器。

对照品升麻素苷 (批号 111522-201310, 供定量测定用, 质量分数以 95.0% 计)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 (批号 111523-201208, 供定量测定用, 质量分数以 96.4% 计)、苦杏仁苷 (批号 110820-201305, 供定量测定用, 质量分数以 85.8% 计) 均购于中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯, 上海星可生化有限公司; 水为超纯水。

药材饮片均由连云港康济大药房有限公司吴舟执业药师鉴定, 防风 (批号 Y141001, 产地: 河北) 为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根; 紫苏叶 (批号 Y140812, 产地: 江苏) 为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶或带嫩枝; 辛夷 (批号 Y141030, 产地: 河南) 为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp. 的干燥花蕾; 苦杏仁 (批号 Y141020, 产地: 河北) 为杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子; 炙麻黄 (批号 Y141023, 产地: 内蒙古) 为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎蜜炙而得。

2 方法与结果

2.1 提取方法

取紫苏叶、辛夷, 加入 8 倍量水提取挥发油,

收集挥发油备用。药渣与防风、炙麻黄、苦杏仁 (沸水投料) 合并水提取。检测提取液中升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的量, 并计算提取率。

2.2 升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件^[7-9] 色谱柱 Phenomenex Luna 5u C₁₈(2), 规格为 250 mm×4.6 mm, 5 μm; 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~30% 甲醇; 10~30 min, 30%~80% 甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C; 检测波长: 254 nm 测定升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷, 210 nm 测定苦杏仁苷。

2.2.2 混合对照品溶液制备 分别精密称取升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷对照品 6.80、8.79、15.60 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 340.00、439.50、780.00 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 按照各实验参数设计对药材进行提取。取提取液, 0.22 μm 微孔滤膜 (水膜) 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 系统适应性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液进样分析, 结果见图 1。升麻素苷、5-*O*-甲

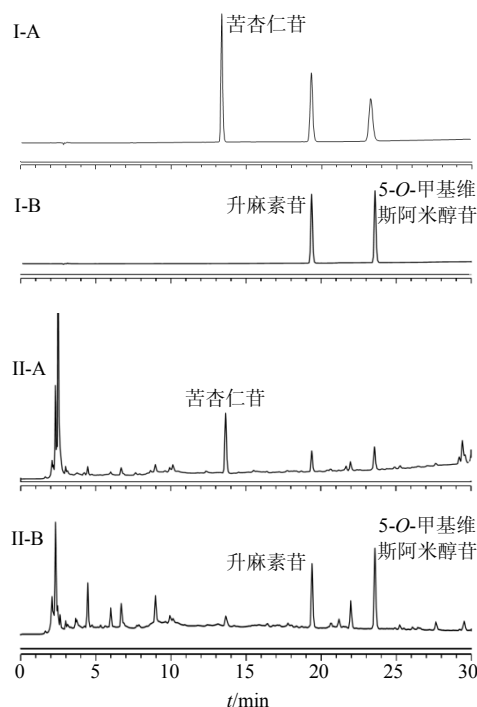


图 1 210 nm (A) 和 254 nm (B) 波长下混合对照品 (I) 和供试品溶液 (II) 的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (I) and sample (II) solutions at 210 nm (A) and 254 nm (B)

基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷与其相邻色谱峰的分离度均大于1.5,拖尾因子在0.95~1.05,理论塔板数以各色谱峰计均在10 000以上。

2.2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0、10.0 mL,分别置10 mL量瓶中,加50%甲醇定容至刻度,摇匀,分别按照“2.2.1”项下色谱条件依次进样,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。回归方程和线性范围分别为升麻素苷 $Y=13.555X-1.789$, $r=0.9999$, $0.034\sim 3.400\ \mu\text{g}$; 5- O -甲基维斯阿米醇苷 $Y=14.286X+4.3558$, $r=0.9999$, $0.044\sim 4.395\ \mu\text{g}$; 苦杏仁苷 $Y=14.32X-4.7754$, $r=0.9999$, $0.078\sim 7.800\ \mu\text{g}$ 。

2.2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液,分别在“2.2.1”项色谱条件下重复进样6次,进样体积为10 μL ,以对照品峰面积进行计算,升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷峰面积的RSD分别为0.17%、0.21%、0.15%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后0、2、4、6、8、12、24 h注入液相色谱仪,记录各成分峰面积。结果升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷峰面积的RSD分别为1.2%、1.4%、1.3%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 取待测提取液,照“2.2.3”项下方法制备6份供试品溶液,进行样品分析,计算升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷平均质量分数分别为0.049、0.058、0.266 mg/g, RSD分别为0.81%、0.73%、0.95%。

2.2.9 加样回收率试验 取已测定的待测溶液6份,分别精密加入升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的混合对照品溶液适量,照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定,其平均回收率分别为98.31%、98.26%、98.55%, RSD分别为0.76%、0.91%、1.24%。试验结果表明,本方法具有良好的回收率。

2.3 浸膏得率测定

精密量取供试品 V_1 (mL),置于已恒定质量的蒸发皿(M_1)中,在水浴锅上蒸至近干,转移至烘箱内,105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒定质量,取出,置干燥器中冷却至室温,迅速精密称定质量(M_2),计算固含物提取率。

$$\text{浸膏得率} = (M_2 - M_1) V_2 / m V_1$$

m 为供试品中生药总质量, V_2 为供试品的总体积

2.4 哮喘方提取工艺单因素试验研究

2.4.1 直接提取与浸泡提取考察 取紫苏叶70 g、辛夷56 g,平行2份,分别加入8倍量水提取挥发油,药渣与防风70 g、炙麻黄42 g、苦杏仁56 g水提取2次,每次1.5 h,其中1份加水后直接提取,另1份浸泡2 h(由于苦杏仁的特殊性,均水沸后投料)。取提取液采用“2.2.3”项方法制备供试品溶液进样检测,比较直接提取与药材浸泡后提取的效果,结果升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷各成分的提取率无显著性差异,浸泡后浸膏得率较直接提取高出4.8%。哮喘方水提取过程药材可以直接提取。

2.4.2 提取加水量初步考察 取紫苏叶70 g、辛夷56 g,平行4份,分别加入8倍量水提取挥发油,药渣与防风70 g、炙麻黄42 g、加水量依次为8、10、12、14倍,待水沸后加入苦杏仁56 g,提取2次,每次1.5 h。测定提取液中升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的量,随着加水倍量的增加,各成分的提取率稍有升高的趋势,但在加水量12倍以后几乎无变化,浸膏得率变化不大。故确定正交试验加水量为8、10、12倍。

2.4.3 提取时间初步考察 取紫苏叶70 g、辛夷56 g,平行6份,分别加入8倍量水提取挥发油,药渣与防风70 g、炙麻黄42 g,加入10倍量水,待水沸后加入苦杏仁56 g。提取时间依次为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h,提取2次。测定提取液中升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的量。随着提取时间的延长,升麻素苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷提取率在0.5~2.0 h呈上升趋势,2.0~3.0 h呈下降趋势;苦杏仁苷提取率在0.5~2.5 h呈上升趋势,2.5~3.0 h呈下降趋势。浸膏得率则在2.0 h后不再升高。故确定正交试验提取时间为0.5、1.5、2.5 h。

2.5 基于信息熵理论的哮喘方水提取工艺评价

2.5.1 哮喘方水提取工艺正交试验 在查阅相关文献^[10-14]并结合单因素试验的基础上,选取加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,因素水平见表1。称取紫苏叶70 g、辛夷56 g,平行9份,分别置5 000 mL圆底烧瓶中,加入8倍量水提取挥发油,药渣分别与防风70 g、炙麻黄42 g,加水,待水沸后加入苦杏仁56 g。以升麻苷、5- O -甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的提取率(提取率即转移率,提取率=提取液中该成分的量/药材中该成分的总量)以及固含物得率,采用熵权法对以上指

标进行权重系数分配, 计算综合评价指标, 按照 $L_9(3^4)$ 进行提取。试验结果见表 1。

2.5.2 哮喘方水提取工艺研究数据处理 根据文献给出的步骤^[4-6], 建立原始评价指标矩阵 (X) 如下。

计算各项指标的信息熵 (H_i), 得到评价指标的 H_i 。

$$X = \begin{bmatrix} 47.88 & 97.53 & 99.13 & 85.05 & 98.84 & 60.61 & 96.95 & 59.24 & 96.78 \\ 54.27 & 94.36 & 95.98 & 98.14 & 97.57 & 75.30 & 83.53 & 66.06 & 76.15 \\ 44.74 & 67.45 & 68.36 & 78.63 & 74.73 & 45.80 & 53.69 & 48.16 & 45.52 \\ 13.37 & 22.27 & 24.59 & 20.51 & 25.46 & 17.45 & 24.31 & 16.35 & 22.91 \end{bmatrix}$$

计算 P_{ij} , 将原始矩阵转换为“概率”矩阵 (P)。

$$P = \begin{bmatrix} 0.0645 & 0.1314 & 0.1336 & 0.1146 & 0.1332 & 0.0817 & 0.1307 & 0.0798 & 0.1304 \\ 0.0732 & 0.1273 & 0.1295 & 0.1324 & 0.1316 & 0.1016 & 0.1127 & 0.0891 & 0.1027 \\ 0.0849 & 0.1280 & 0.1297 & 0.1492 & 0.1418 & 0.0869 & 0.1019 & 0.0914 & 0.0864 \\ 0.0714 & 0.1190 & 0.1313 & 0.1096 & 0.1360 & 0.0932 & 0.1298 & 0.0873 & 0.1224 \end{bmatrix}$$

$$H_i = [0.9864 \quad 0.9924 \quad 0.9891 \quad 0.9913]。$$

计算第 i 项指标的系数 (W_i)。

$$W_i = [0.3337 \quad 0.1865 \quad 0.2671 \quad 0.2127]$$

对于 1 个 m 行 n 列的概率矩阵, 综合评价指标

$$M_m = P_{1m} \times W_1 + P_{2m} \times W_2 + P_{3m} \times W_3 + \cdots + P_{nm} \times W_n。$$

即升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的提取率及浸膏得率各指标的权重系数依次为 0.3337、0.1865、0.2671、0.2127。

将概率矩阵的数据进行加权处理, 得到综合评价指标 (M), 再进行方差分析, 确定最优实验方案。正交试验结果见表 1, 方差分析结果见表 2。

在所选因素水平范围内, 按照熵权法对试验结

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验表及结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/倍	B/h	C/次	D (误差)	提取率/%			浸膏得率/%	M
					升麻素苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	苦杏仁苷		
1	8 (1)	0.5 (1)	1 (1)	(1)	47.88	54.27	44.74	13.37	0.073 05
2	8 (1)	1.5 (2)	2 (2)	(2)	97.53	94.36	67.45	22.27	0.127 08
3	8 (1)	2.5 (3)	3 (3)	(3)	99.13	95.98	68.36	24.59	0.131 30
4	10 (2)	0.5 (1)	2 (2)	(3)	85.05	98.14	78.63	20.51	0.126 08
5	10 (2)	1.5 (2)	3 (3)	(1)	98.84	97.57	74.73	25.46	0.135 79
6	10 (2)	2.5 (3)	1 (1)	(2)	60.61	75.30	45.80	17.45	0.089 23
7	12 (3)	0.5 (1)	3 (3)	(2)	96.95	83.53	53.69	24.31	0.119 44
8	12 (3)	1.5 (2)	1 (1)	(3)	59.24	66.06	48.16	16.35	0.086 24
9	12 (3)	2.5 (3)	2 (2)	(1)	96.78	76.15	45.52	22.91	0.111 78
K_1	0.331 43	0.318 57	0.248 52	0.320 62					
K_2	0.351 10	0.349 11	0.364 94	0.335 75					
K_3	0.317 46	0.332 31	0.386 53	0.343 62					
R	0.033 64	0.030 54	0.138 01	0.023 00					

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.904×10^{-4}	2	2.090	
B	1.560×10^{-4}	2	1.712	
C	3.674×10^{-3}	2	40.332	$P < 0.05$
D (误差)	9.110×10^{-5}	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

果进行评价, 影响该方水提取工艺的因素大小依次为 $C > A > B$, 即提取次数 $>$ 加水量 $>$ 提取时间, 提取次数为提取过程中的显著影响因素 ($P < 0.05$); 由方差分析结果可知, 因素 A、B 对实验结果没有显著性影响。因此选择 $A_2B_2C_3$ 为最佳提取条件, 即

加入 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.5 h。

2.5.3 工艺验证试验 根据正交试验结果优选的工艺条件进行 3 批验证试验, 各指标成分的提取率及综合评分结果见表 3, 以最佳工艺参数进行提取, 哮喘方水提液中各主要成分的提取率均较高, 正交

表 3 验证试验结果

Table 3 Test of verification

试验号	提取率/%			浸膏得率/%	M
	升麻素苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	苦杏仁苷		
1	98.95	97.86	74.89	22.56	0.132 70
2	99.16	98.02	74.84	22.04	0.132 22
3	98.87	97.92	77.99	22.53	0.134 21

试验得出的结论与实际提取结果相符且较稳定,说明该提取工艺稳定可行。

3 讨论

本研究选取哮喘方中药味防风、苦杏仁中的已知有效成分升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、苦杏仁苷的提取率以及水提物浸膏得率作为评价指标,用于优先工艺参数,可较全面地评价所选工艺参数的优劣。

在正交试验前,首先进行单因素考察,对哮喘方水提取工艺的因素与水平进行了初步筛选。首先考察了药材浸泡一定时间与直接提取之间的差别,结果仅浸膏得率有变化,所选取成分的提取率无明显变化。故在正交试验中药材不经浸泡直接提取。提取时间选取0.5~3.0 h的6个时间点,由单因素数据来看,提取时间对各成分的提取率有影响,为了看出提取时间对实验结果影响的程度,故在正交试验中将提取时间的跨度变大。加水倍量对各成分的提取率影响较小,这与正交试验得出的结果一致。

在正交试验数据处理过程中利用信息熵理论进行客观赋权,权重系数完全来自与对实验数据的分析,清晰地反映了指标成分在不同提取条件下变化的客观规律^[6],同时也避免了各指标数据间的相互影响,也在一定程度上减少了主观因素对实验结果的干扰,提升了本实验研究的科学性与严谨性。本实验所优选的工艺,经过验证稳定可行,为该方的进一步开发提供了数据支持。

参考文献

[1] 李文,李丽,是元艳,等. 防风有效部位的药理作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 29-31.

- [2] 窦红霞,高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 15-17.
- [3] 吕建珍,邓家刚. 苦杏仁苷的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 530-535.
- [4] 齐敏芳,付忠广,景源,等. 基于信息熵与主成分分析的火电机组综合评价方法 [J]. 中国电机工程学报, 2013, 33(2): 58-64.
- [5] 张东,张宁. 物理学中的熵理论及其应用研究 [J]. 北京联合大学学报, 2007, 21(1): 4-8.
- [6] 王仁杰,李淼,闫明,等. 信息熵理论在热毒宁口服制剂中金银花与栀子提取工艺优选中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 683-687.
- [7] 赵博,杨鑫宝,杨秀伟,等. HPLC法同时测定防风中6个主要成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 382-387.
- [8] 邹小娟,谢和兵,钱芳,等. HPLC法测定苦杏仁中苦杏仁苷含量的方法研究 [J]. 中国药事, 2009, 23(1): 33-36.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] 姚仲青,李文林,周俊,等. 防风提取工艺的研究 [J]. 中国中医药科技, 2007, 14(6): 431-432.
- [11] 白永智,李昌禹,赵景辉,等. 高压脉冲电场法快速提取黄花乌头中关附甲素的工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1267-1270.
- [12] 郑礼娟,秦昆明,蔡皓,等. 多指标正交试验优选白术芍药散提取工艺 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1504-1509.
- [13] 宋丽华,萧伟,鹿丽丽,等. 正交试验优选人参多糖的提取工艺 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 283-287.
- [14] 房祥军,邵海燕,陈杭君. 正交试验法优化山核桃仁中总多酚的提取工艺参数研究 [J]. 中国食品学报, 2009, 9(1): 153-157.