

基于信息熵理论的正交设计结合指纹图谱优选加味四妙颗粒的提取工艺

谢凡^{1,2}, 施崇精¹, 杨秀清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** 优选加味四妙颗粒(MSG)的提取工艺。**方法** 采用 HPLC 测定红景天苷、绿原酸、甘草酸铵、盐酸小檗碱、甘草苷的含量, 以此 5 种指标成分的提取率、干膏收率及指纹图谱相似度为综合评分指标, 通过正交试验考察料液比、提取时间和提取次数对提取工艺的影响, 采用信息熵赋权法确定各指标的客观权重, 实现对提取工艺的正交试验优选。**结果** 根据综合评分结果, 确定该制剂最佳提取工艺为加 10 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 30 min。3 批验证综合评分均值为 88.91, RSD 为 0.61%。**结论** 优选后的工艺提取率高、稳定性和重复性好, 适用于该制剂的工业化生产。

关键词: 加味四妙颗粒; 正交试验; 多指标综合评分; 指纹图谱; 信息熵; 提取工艺; 红景天苷; 绿原酸; 甘草酸铵; 盐酸小檗碱; 甘草苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)06-1331-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.015

Exploration on extraction process of Modified Simiao Granule based on orthogonal design in information entropy theory combined with fingerprint optimization

XIE Fan^{1,2}, SHI Chong-jing¹, YANG Xiu-qing¹, SHI Zheng-rong¹, GU Jiang-hua¹, YUAN Qiang-hua², SONG Ying²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China

Abstract: **Objective** To optimize the optional extraction process parameters of Modified Simiao Granule (MSG). **Methods** HPLC was employed to determine the content of rhodoglycoside, chlorogenic acid, ammonium glycyrrhizate, berberine hydrochloride, and glycyrrhizin, using the extraction ratio, dried cream yield, and fingerprint similarity of which as comprehensive evaluation indexes, orthogonal test was used to investigate effects of solid-liquid ratio, extraction time and times on extraction process. Information entropy method was used to determine the objective weight of each index to achieve orthogonal test optimization of extraction process. **Results** According to the result of comprehensive score, the optimal extraction conditions of this preparation were as follows: extracted twice with 10 times of water quantity, each for 30 min. The mean of the three batches of comprehensive evaluation was 88.91 and the RSD value was 0.61%. **Conclusion** The optimized technologies are stable, repeatable, feasible and suitable for the industrial production of MSG.

Key words: Modified Simiao Granule; orthogonal test; comprehensive score of multi-index; fingerprint; information entropy theory; extraction technology; rhodoglycoside; chlorogenic acid; ammonium glycyrrhizate; berberine hydrochloride; glycyrrhizin

收稿日期: 2017-11-07

基金项目: 成都中医药大学附属医院课题 (2016-D-YY-03)

作者简介: 谢凡 (1986—), 女, 四川成都人, 主管中药师, 研究方向为中药新制剂、新工艺和新技术。

Tel: (028)87783474 E-mail: xiefan959@163.com

*通信作者 宋英 (1956—), 男, 四川成都人, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药新制剂、新工艺和新技术。

Tel: (028)87783251 E-mail: songying624@163.com

加味四妙颗粒(Modified Simiao Granule, MSG)源自成都中医药大学附属医院妇科临床应用的有效经验方,由大血藤、延胡索、黄柏、苍术、川牛膝、薏苡仁、甘草配伍而成,具有清热利湿,活血止痛之功,临床上治疗湿热瘀结证型的妇人腹痛疾病(pelvic inflammatory disease, PID)具有显著疗效。传统治疗中该方多采用口服汤剂,为便于患者携带储存,结合各药材活性成分的理化性质,拟用延胡索打粉入药,其他药味水提制备成颗粒剂。复方水提液中活性成分含量对中药复方制剂的质量和疗效起着至关重要的影响,在煎煮过程中易受到加水量、煎煮时间和煎煮次数等因素影响^[1]。

本实验以药效成分(红景天苷、绿原酸、甘草酸铵、盐酸小檗碱、甘草苷)的提取率、干膏率、指纹图谱相似度作为综合评分指标,在单因素基础上采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,基于信息熵理论对各指标赋权重分析^[2-3],优选 MSG 的提取工艺,为制剂的后续研发提供依据。指纹图谱是一种综合的、整体的、可量化的定性定量分析手段,国内外主要用于成分分析和质量控制研究^[4-9],具有“整体性”特点,能够较好体现复方制剂中各类成分与疗效的相关性。复方组分多靶点、多途径、多环节实现自身疗效的药效学特点^[10],决定工艺指标评价逐步由单一转向多个,以体现整体性和合理性。而权重系数在综合评分中的分配直接关系工艺提取的科学性和合理性。因此,本研究在常规提取的传统经典方法基础上,遵循复方制剂“整体”概念,并借鉴指纹图谱技术,选用信息熵理论分析法,优选 MSG 的提取工艺。

1 仪器与材料

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪,配置四元泵、DAD 检测器、在线脱气装置、OpenLAB 工作站,美国安捷伦公司;BP-211D 型十万分之一电子分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 公司;RE-501 型旋转蒸发器,上海耀特仪器设备有限公司;BP-211D 型电子分析天平,十万分之一,德国 Satorius 公司;98-1-C 型数字控温电热套,天津市泰斯特仪器有限公司。

对照品红景天苷(批号 170301,质量分数为 98.0%)、绿原酸(批号 110753-201313,质量分数为 96.6%)、甘草酸铵(批号 110731-200615,质量分数为 100%)、甘草苷(批号 111610-201106,质量分数为 100%)均购于中国食品药品检定研究院;对照品盐酸小檗碱(批号 15401-69-1,质量分数为

98.0%)购于成都植标化纯生物技术有限公司;乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,美国天地公司;蒸馏水,实验室自制。大血藤 *Sargentodoxae Caulis* (批号 1706074)、延胡索 *Corydalis Rhizoma* (批号 1706017)、黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex* (批号 1703041)、苍术 *Atractylodis Rhizoma* (批号 170601)、川牛膝 *Cyathulae Radix* (批号 1703013)、薏苡仁 *Coicis Semen* (批号 1405061)、甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (批号 1703027)均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学附属医院药剂科副主任中药师盛蓉鉴定,符合《中国药典》2015 年版有关规定。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 Zorbax SB C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(磷酸调节 pH 至 2.50),梯度洗脱:0~28 min, 5%~9.6%乙腈;28~65 min, 9.6%~13.5%乙腈;65~70 min, 13.5%~34%乙腈;70~80 min, 34%~35%乙腈;后运行 5 min;体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;检测波长 220 nm (0~22 min, 检测红景天苷)、327 nm (22~50 min, 检测绿原酸)、220 nm (50~72 min, 检测甘草酸铵)、345 nm (72~77 min, 检测盐酸小檗碱)、250 nm (77~85 min, 检测甘草苷);进样量 10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取红景天苷、绿原酸、甘草酸铵、盐酸小檗碱、甘草苷的对照品适量,加甲醇溶解,制成质量浓度分别为 46.84、47.53、61.70、69.14、49.20 μg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取除延胡索外的 3 倍处方量药材约 99 g,加 7 倍量水,煎煮 3 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,滤液减压浓缩至 250 mL。精密吸取各水提液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至近刻度线,摇匀,超声 30 min,放冷后定容至刻度线,经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,弃去初滤液,取续滤液即得。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 按“2.1.3”项下方法,分别制成缺大血藤阴性样品溶液,缺大血藤、黄柏和苍术阴性样品溶液,缺甘草阴性样品溶液,缺黄柏阴性样品溶液。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 1、2、1、2、5、5 mL,分别置 25、25、

10、10、10、5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度线，摇匀，即得各质量浓度梯度混合对照品溶液。分别精密吸取上述各质量浓度混合对照品溶液 20 μ L，按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量为 X 轴，峰面积为 Y 轴，绘制标准曲线，得各成分回归方程、相关系数 (r)、线性范围依次为红景天苷 $Y=1\,075.6X+6.9$, $r=0.999\,9$, 35.7~936.9 ng; 绿原酸 $Y=508.9X+7.1$, $r=0.999\,9$, 38.0~950.5 ng; 甘草酸铵 $Y=2\,230.10X-1.1$, $r=1.000\,0$, 49.4~1\,234.0 ng; 盐酸小檗碱 $Y=3\,081.3X+8.4$, $r=0.999\,9$, 55.3~1\,382.9 ng; 甘草苷 $Y=1\,160.8X+1.2$, $r=0.999\,9$, 39.4~984.0 ng; 结果表明在相应进样量范围内线性关系良好。

2.1.6 专属性试验 按“2.1.1”项下色谱条件，用 0.45 μ m 的微孔滤膜滤过，分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液进样分析，5 种活性成分与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5，并且各组分互不干扰，理论塔板数符合要求。缺大血藤阴性样品溶液在相应位置上无红景天苷色谱峰，缺大血藤、黄柏和苍术阴性样品溶液在相应位置上无红景天苷、绿原酸、盐酸小檗碱色谱峰，缺甘草阴性样品溶液在相应位置上无甘草酸铵和甘草苷色谱峰，缺黄柏阴性样品溶液在相应位置上未见盐酸小檗碱色谱峰，但出现绿原酸的色谱峰。说明绿原酸不具备专属性，其他各成分专属性良好。结果见图 1。

2.1.7 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件连续测定 6 次，记录峰面积。结果显示 5 个成分的峰面积 RSD 在 0.47%~1.68%，表明该方法精密度良好。

2.1.8 重复性试验 按“2.1.3”项下供试品制备方法制备 6 份供试品溶液，标号 1~6，精密吸取各供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算质量分数。结果显示 5 个成分的质量分数 RSD 在 0.36%~1.74%，表明该方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 取“2.1.8”项下 2 号供试品溶液适量，分别于室温放置 0、3、6、12、18、24、36 h，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示 5 个成分峰面积 RSD 在 0.56%~1.70%，表明供试品溶液在室温放置 36 h 内基本稳定。

2.1.10 加样回收率试验 精密吸取“2.1.3”项下已测定指标成分含量的浓缩提取液 1 mL，共 6 份，分

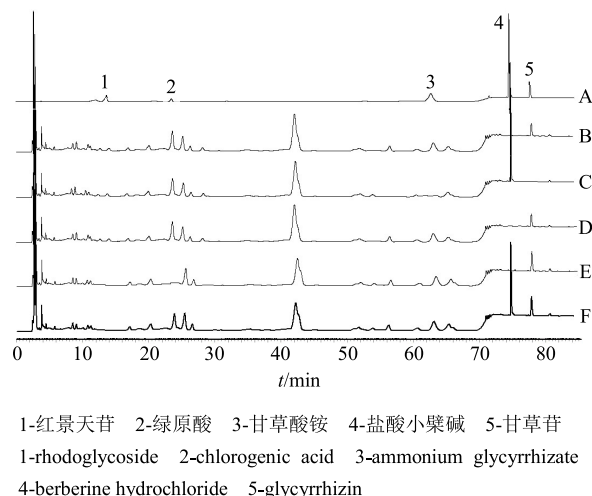


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B)、缺甘草阴性对照 (C)、缺黄柏阴性对照 (D)、缺大血藤、黄柏、苍术阴性对照 (E) 和缺大血藤阴性对照 (F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), negative control without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C), negative control without *Phellodendri Chinensis Cortex* (D), negative control without *Sargentodoxae Caulis*, *Phellodendri Chinensis Cortex*, *Atractylodis Rhizoma* (E), and negative control without *Sargentodoxae Caulis* (F)

别置于 10 mL 量瓶中，每份精密加入含有一定量的红景天苷、绿原酸、甘草酸铵、盐酸小檗碱、甘草苷的混合对照品溶液各 1 mL，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果 5 个成分的平均回收率分别在 98.97%~100.64%，其 RSD 值分别在 0.77%~1.90%，表明此方法回收率较好。

2.2 单因素考察^[10]

2.2.1 料液比考察 称取除延胡索的 3 倍处方量药材，共 6 份，补足吸水量，按料液比分别以 1:4、1:7、1:10、1:13、1:16、1:19，其余按“2.1.3”项方法制备得供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以 1:4 料液比测的各成分峰面积为基准，计算比值，结果见表 1，数据分析可见，料液比达到 1:10 时有效成分呈下降趋势，综合各指标分析，选择 1:4、1:7、1:10 为正交试验的料液比以作进一步考察。

2.2.2 提取时间考察 煎煮时间分别以 30、50、70、90、110、130 min，其余按“2.1.3”项制备得供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以 30 min 煎煮时间测的各成分峰面积为基准，计算比值，结果见表 2，数据分析可见，随着

表 1 料液比对各成分峰面积的影响

Table 1 Effects of solid-liquid ratio on peak area

料液比	红景天苷	绿原酸	甘草酸铵	盐酸小檗碱	甘草苷
1 : 4	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
1 : 7	1.09	1.24	1.31	1.02	1.45
1 : 10	0.96	1.19	1.34	1.28	1.26
1 : 13	0.93	0.94	0.90	0.80	0.94
1 : 16	0.92	0.81	0.87	0.88	0.92
1 : 19	0.91	0.72	0.68	0.85	0.86

表 2 提取时间对各成分峰面积的影响

Table 2 Effects of extraction time on peak area

提取时间/min	红景天苷	绿原酸	甘草酸铵	盐酸小檗碱	甘草苷
30	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
50	0.97	1.00	1.16	0.91	1.07
70	1.35	1.11	1.03	0.86	0.83
90	0.93	0.82	0.93	0.78	0.74
110	0.86	0.79	0.77	0.82	0.71
130	0.76	0.68	0.61	0.73	0.80

提取时间的延长,有效成分含量升高,但提取 70 min 后呈下降趋势,故选择 30、50、70 min 为正交试验的提取时间以做进一步考察。

2.2.3 提取次数考察 煎煮次数分别以 1~4 次,其余按“2.1.3”项制备得供试品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以 1 次提取次

数的各成分峰面积为基准,计算比值,结果见表 3,数据分析可见,增加提取次数,有效成分含量呈先上升后下降的趋势,但均比提取 1 次效果好,故选择 2~4 次为正交试验的提取次数做进一步考察。

表 3 提取次数对各成分峰面积的影响

Table 3 Effects of extract times of extraction on peak area

提取次数	红景天苷	绿原酸	甘草酸铵	盐酸小檗碱	甘草苷
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	2.11	1.07	2.60	1.55	3.51
3	2.49	1.19	3.47	1.22	2.94
4	1.16	0.93	2.79	1.10	1.32

2.3 基于信息熵理论的 MSG 水提取工艺及指纹图谱相似度的评价

2.3.1 MSG 水提取工艺正交试验设计 根据单因素考察试验结果,以料液比(A)、提取时间(B)和提取次数(C)为考察因素,建立 3 因素 3 水平正交设计,选用 $L_9(3^4)$ 安排正交试验,因素水平见表 4。

2.3.2 正交试验方案及结果 称取除延胡索的 3 倍处方量药材,共 9 份,按正交表提取,以“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法得到 9 份供试品溶液。精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液和 9 份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算各成分的提取率(提取率=指标成分含量/相应指标的药材中含量);精密吸取各组水煎液 10

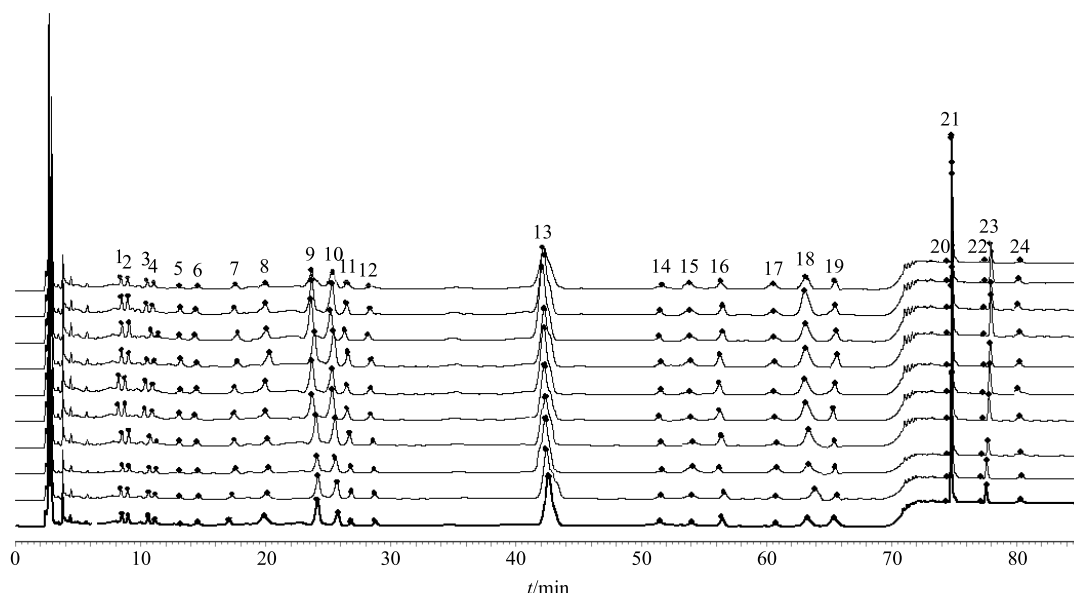
表 4 MSG 提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 4 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test for MSG extraction process

组号	A/倍	B/min	C	D(空白)	提取率/%					出膏率/%	相似度(K)	M
					红景天苷	绿原酸	甘草酸铵	盐酸小檗碱	甘草苷			
1	4 (1)	30 (1)	2 (1)	(1)	45.15	55.46	25.11	44.85	33.63	15.21	0.685	50.98
2	4 (1)	50 (2)	3 (2)	(2)	42.14	45.94	28.50	36.63	32.78	13.86	0.680	48.27
3	4 (1)	70 (3)	4 (3)	(3)	31.97	31.26	24.16	29.91	27.19	10.13	0.714	38.32
4	7 (2)	30 (1)	3 (2)	(3)	69.22	54.60	46.17	47.51	47.25	24.12	0.728	72.09
5	7 (2)	50 (2)	4 (3)	(1)	58.98	55.50	55.84	43.37	57.16	22.36	0.936	75.87
6	7 (2)	70 (3)	2 (1)	(2)	61.22	69.09	49.10	40.77	45.25	23.56	0.924	73.28
7	10 (3)	30 (1)	4 (3)	(2)	60.58	69.45	61.30	55.49	79.96	26.82	0.857	89.99
8	10 (3)	50 (2)	2 (1)	(3)	76.50	80.78	55.13	50.24	50.98	24.84	0.921	83.14
9	10 (3)	70 (3)	3 (2)	(1)	69.68	71.58	75.76	49.25	59.62	24.67	0.919	90.10
K_1	137.57	213.06	207.40	216.95								
K_2	221.24	207.28	210.46	211.54								
K_3	263.23	201.70	204.18	193.55								
R	125.66	11.36	6.28	23.40								

mL, 分别置已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 ℃ 下干燥至恒定质量, 取出, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算出膏率, 结果见表 4。

2.3.3 指纹图谱的建立及相似度评价 分别吸取“2.3.1”中 9 个样品的供试品溶液各 20 μL, 在上述

色谱条件下分别进样测定, 记录色谱图, 以 18 号峰(甘草酸铵)为参照峰, 采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对图谱进行初步分析, 得到对照指纹图谱(R), 相似度评价系统软件进行匹配分析, 按照中位数法建立对照特征图谱, 结果见图 2 和表 4。



4-红景天苷 9-绿原酸 18-甘草酸铵 21-盐酸小檗碱 23-甘草苷
4-rhodoglycoside 9-chlorogenic acid 18-ammonium glycyrrhizate 21-berberine hydrochloride 23-glycyrrhizin

图 2 不同提取条件下 9 个样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of nine samples with different ethanol extraction conditions

2.3.4 信息熵方法对数据的分析 根据文献方法建立原始评价指标矩阵(X)^[2-3,11]如下。

计算各项指标的信息熵(H_i), 得到评价指标的 H_i 。

$$H_i = [0.986 \ 0 \ 0.986 \ 0 \ 0.969 \ 7 \ 0.993 \ 6 \ 0.977 \ 3 \ 0.981 \ 6 \ 0.996 \ 1]$$

计算 P_{ij} , 将原始矩阵转换为“概率”矩阵(P)。计算第 i 项指标的系数(W_i)。

$$W_i = [0.127 \ 6 \ 0.127 \ 3 \ 0.276 \ 4 \ 0.058 \ 1 \ 0.206 \ 9 \ 0.167 \ 9 \ 0.035 \ 9]$$

$$X = \begin{bmatrix} 45.15 & 42.14 & 31.97 & 69.22 & 58.98 & 61.22 & 60.58 & 76.50 & 69.68 \\ 55.46 & 45.94 & 31.26 & 54.60 & 55.50 & 69.09 & 69.45 & 80.78 & 71.58 \\ 25.11 & 28.50 & 24.16 & 46.17 & 55.84 & 49.10 & 61.30 & 55.13 & 75.76 \\ 44.85 & 36.63 & 29.91 & 47.51 & 43.37 & 40.77 & 55.49 & 50.24 & 49.25 \\ 33.63 & 32.78 & 27.19 & 47.25 & 57.16 & 45.25 & 79.96 & 50.98 & 59.62 \\ 15.21 & 13.86 & 10.13 & 24.12 & 22.36 & 23.56 & 26.82 & 24.84 & 24.67 \\ 0.685 & 0.680 & 0.714 & 0.728 & 0.936 & 0.924 & 0.857 & 0.921 & 0.919 \end{bmatrix}$$

$$P = \begin{bmatrix} 0.087 \ 6 & 0.081 \ 8 & 0.062 \ 0 & 0.134 \ 3 & 0.114 \ 4 & 0.118 \ 8 & 0.117 \ 5 & 0.148 \ 4 & 0.135 \ 2 \\ 0.103 \ 9 & 0.086 \ 1 & 0.058 \ 6 & 0.102 \ 3 & 0.104 \ 0 & 0.129 \ 5 & 0.130 \ 1 & 0.151 \ 4 & 0.134 \ 1 \\ 0.059 \ 6 & 0.067 \ 7 & 0.057 \ 4 & 0.109 \ 7 & 0.132 \ 6 & 0.116 \ 6 & 0.145 \ 6 & 0.130 \ 9 & 0.179 \ 9 \\ 0.112 \ 7 & 0.092 \ 0 & 0.075 \ 2 & 0.119 \ 4 & 0.109 \ 0 & 0.102 \ 4 & 0.139 \ 4 & 0.126 \ 2 & 0.123 \ 7 \\ 0.077 \ 5 & 0.075 \ 6 & 0.062 \ 7 & 0.108 \ 9 & 0.131 \ 8 & 0.143 \ 3 & 0.184 \ 3 & 0.117 \ 5 & 0.137 \ 4 \\ 0.082 \ 0 & 0.074 \ 7 & 0.054 \ 6 & 0.129 \ 9 & 0.120 \ 5 & 0.127 \ 0 & 0.144 \ 5 & 0.133 \ 9 & 0.132 \ 9 \\ 0.093 \ 0 & 0.092 \ 3 & 0.097 \ 0 & 0.098 \ 9 & 0.127 \ 1 & 0.125 \ 5 & 0.116 \ 4 & 0.125 \ 1 & 0.124 \ 8 \end{bmatrix}$$

对于 1 个 m 行 n 列的概率矩阵, 综合评价指标 $M_m = P_{1m}W_1 + P_{2m}W_2 + P_{3m}W_3 + \dots + P_{nm}W_n$, 即红景天苷、绿原酸、甘草酸铵、盐酸小檗碱、甘草苷的提取率、出膏率、相似度, 各指标的权重系数依次为 0.127 6、0.127 3、0.276 4、0.058 1、0.206 9、0.167 9、0.035 9。

将概率矩阵的数据进行加权处理, 得到综合评价指标 $[M, M = (X_i \text{ 红景天苷} / X_{\max} \text{ 红景天苷} \times 0.127 \ 6 + X_i \text{ 绿原酸} / X_{\max} \text{ 绿原酸} \times 0.127 \ 3 + X_i \text{ 甘草酸铵} / X_{\max} \text{ 甘草酸铵} \times 0.276 \ 4 + X_i \text{ 盐酸小檗碱} / X_{\max} \text{ 盐酸小檗碱} \times 0.058 \ 1 + X_i \text{ 甘草苷} / X_{\max} \text{ 甘草苷} \times$

$0.206\ 9 + X_i \text{ 出膏率} / X_{\max} \text{ 出膏率} \times 0.167\ 9 + X_i \text{ 相似度} / X_{\max} \text{ 相似度} \times 0.035\ 9) \times 100]$, 极差分析和综合评分结果见表 4。

以综合评分为数据, 利用 SPSS 19.0 进行方差分析, 方差分析结果见表 5。由方差分析结果可知, 各因素对综合指标的影响主次顺序为 $A > B > C$, 即料液比 $>$ 提取时间 $>$ 提取次数。其中因素 A 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 因素 B、C 各个水平间无显著性差异 ($P > 0.05$)。为降低成本, 并结合单因素试验和方差分析结果, 确定最佳工艺为 $A_3B_1C_1$, 即加 10 倍水, 煎煮 2 次, 每次 30 min。

2.4 验证试验

称取除延胡索的 10 倍处方量药材, 共 3 份, 按

最佳提取工艺 $A_3B_1C_1$ 进行 3 次验证试验, 结果 5 种活性成分的提取率和出膏率 RSD 值在 5% 以内, 综合评分稳定 (表 6), 表明该工艺可行性高, 稳定性好, 可用于工业化生产。

表 5 方差分析

Table 5 Analyses of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	2 728.251 6	2	27.268 3	$P < 0.05$
B	21.510 5	2	0.215 0	
C	6.574 5	2	0.065 7	
D (误差)	100.052 0	2		
$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$				

表 6 提取工艺验证结果

Table 6 Verification of extracting process

编号	提取率/%					出膏率/%	K	M
	红景天苷	绿原酸	甘草酸铵	盐酸小檗碱	甘草苷			
1	64.68	81.88	58.23	53.17	76.20	25.04	0.889	89.31
2	62.23	80.86	56.40	53.31	75.87	25.30	0.879	88.29
3	65.08	83.96	57.85	53.05	74.96	24.90	0.890	89.14
RSD/%	1.51	1.92	1.68	0.24	0.85	0.81	0.65	0.61

3 讨论

中药复方组成药味较多, 成分复杂, 临床疗效是由许多活性成分协同发挥作用的, 因此在研究提取工艺优化时经常选用几个指标成分, 有利于兼顾各指标的协同效应, 符合中药复方多成分多靶点起效的特点。现代药理研究表明, 大血藤中的酚苷类化合物红景天苷具有抗炎、抗病毒、抗癌、抗细胞凋亡、抗疲劳、抗衰等作用^[12-13]。大血藤、苍术、黄柏中的绿原酸具有保护心血管、降糖、调脂、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗白血病、抗诱变、抗癌等药理作用^[14]。黄柏中的活性成分盐酸小檗碱含量最高, 具有广谱的抗菌作用, 对 PID 中治病病毒革兰阴性菌和革兰阳性菌都有很好的抑制作用^[15-16]。甘草中的活性成分甘草酸铵具有较强的抗病毒作用, 能够明显抑制病毒的复制, 且不影响正常细胞的活性和增殖; 黄酮类成分甘草苷具有清热解毒、缓急止痛的效果, 从减少趋化因子和促炎症因子的表达, 抑制致炎性因子, 抑制类固醇代谢酶等不同机制协同产生抗炎作用^[17-18]。出膏率常作为中药复方提取效果的评价指标^[19-20], 鉴于此 5 种成分与前期对汤剂中检查出的成分一致, 结合其药理活性, 本研究选择此 5 种代表活性成分, 干膏率及相似度作为检

测指标, 通过正交试验和指纹图谱, 结合信息熵分析方法, 考察 MSG 的水提工艺, 不但减少试验次数还可保证试验结果稳定可靠。

MSG 处方中延胡索中的活性成分主要为生物碱, 由于在水提过程中容易受到黄柏中胶体类成分的影响, 导致其在水中的提取率偏低, 而选用打粉入药也与古方中的应用方式一致。如《雷公炮制论》中治疗心痛及腹痛,《方勺泊宅编》中治疗遍体作痛,《圣惠方》《普济方》中延胡索散、《素问病机气宜保命集》中金铃子散都以延胡索打粉冲服, 疗效显著。故本方将选用延胡索打粉提取入药, 不进行水提工艺考察。川牛膝指标成分杯苋甾酮为植物类激素, 其主要药理作用为降血脂^[21], 而川牛膝在本方中发挥药效的成分为多糖类物质, 多糖类物质的检测无专属性可言, 故暂未将其列为考察指标; 2015 版《中国药典》中“薏苡仁”定性定量考察的目标成分为薏苡仁油、甘油三油酸酯等脂溶性成分^[22], 而本方在临床使用均采用水提汤剂形式, 且疗效得到确认, 故推断薏苡仁的水溶性成分为本方发挥药效的目标物, 将在后期对其做进一步研究。

经前期预实验检测, 本方中大血藤、黄柏、苍术中均含有绿原酸而不具有专属性, 但其含量较高,

是本方清热解毒的有效成分,应重点进行质控,故列入质控指标。

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,权重系数完全来自于对实验数据的分析,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^[3],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。

稳定的多种药效成分是决定中药复方制剂临床疗效的关键,而在复方提取过程中,通常由多种药效同时进行作用。本实验采用信息熵分析方法结合指纹筛选更能控制药物的总体质量,所优选的工艺,经验证稳定可行,为该方的进一步开发提供了数据支持。

参考文献

- [1] 杨红梅,曹 蕾,宋 英,等.多指标正交试验优选双黄二仙颗粒的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,7(22):28-30.
- [2] 李 淼,王星星,康小东,等.基于信息熵理论的哮喘方水提取工艺优选研究[J].中草药,2016,47(12):2113-2117.
- [3] 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.
- [4] 秦建平,吴建雄,郎 悦,等.痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2016,31(4):427-430.
- [5] 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.
- [6] 张娟娟,孙 巍,张 磊,等.复方丹参滴丸及原药材指纹图谱研究进展[J].药物评价研究,2017,40(6):859-865.
- [7] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研
- 究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [8] Jing J, Ren W S, Chen S B, et al. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines[J]. *Transition Met Chem*, 2013, 44: 39-45.
- [9] 祝 明,陈碧莲,石上梅,等.中药指纹图谱技术在中国药典 2015 版一部中的应用[J].中国现代应用药学,2016,33(5):611-614.
- [10] 王荔青,林 楠,李新雄,等.建青黛高效液相特征指纹图谱研究[J].海峡药学,2010,22(6):98-101.
- [11] 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.
- [12] 韩雪娇,郭 娜,朱美宣,等.红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,1(35):171-174.
- [13] 姜爱玲,张 岩.红景天苷药理作用的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(10):1161-1164.
- [14] 严永旺,肖 兰,周 旭,等.绿原酸的药理作用及药用研发对策[J].中国药房,2017,28(19):2729-2732.
- [15] 陈阳峰,钟晓红.黄柏的药理作用及其活性成分提取[J].作物研究,2015,29(5):564-568.
- [16] 谢 凡,宋 英,黄永亮.中西医治疗盆腔炎性疾病的临床用药进展[J].中国药房,2017,28(30):4312-4315.
- [17] 于鲁志.中药甘草抗炎作用药理和临床研究进展[J].光明中医,2017,32(19):2895-2898.
- [18] 刘海燕,刘禹宏,齐增艳.中药甘草中提取物的分析研究[J].中外医学研究,2014,12(32):162-164.
- [19] 伍振峰,陈伟良,王雅琪,等.丹参减压提取工艺优化及技术适宜性研究[J].中草药,2014,45(6):795-800.
- [20] 汪露露,何丹丹,王 满,等.基于指纹图谱与主成分分析相结合的复方虎杖方提取工艺研究[J].中草药,2017,48(2):278-282.
- [21] 郭 晶,孙传鑫,王秋红,等.川牛膝化学拆分组分性味药理学评价——川牛膝化学拆分组分降血脂作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2017,18(7):16-19.
- [22] 中国药典[S].一部.2015.