

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.16.013

正交试验优选头痛方水提工艺*

郑粤文^{1,2}, 陈秋谷^{3,4}, 张尚斌^{3,4}, 张志强^{1,2}, 周国莉^{1,2}, 吴红彦^{1,2Δ}, 陈剑平^{3,4}

(1. 广东省深圳市罗湖区中医院, 广东 深圳 518001; 2. 上海中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518001;
3. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518033; 4. 广东省深圳市中医院·深圳市医院中药制剂研究
重点实验室, 广东 深圳 518033)

摘要:目的 优选头痛方的水提工艺。方法 以共有峰主成分综合评分、4个主成分总含量、总固形物质量加权系数分别为0.3、0.4、0.3的总评分为评价指标, 加水量、煎煮次数、煎煮时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选头痛方水提工艺。结果 优选的最佳水提工艺为加8倍量水, 煎煮3次, 每次1.0 h, 验证试验表明该工艺可行。结论 该水提工艺客观全面, 能兼顾大部分成分种类与含量的变化情况, 实现中药及其产品整个生产过程的质量控制、质量传递与质量追溯。

关键词: 头痛方; 正交试验; 水提工艺; 高效液相色谱法; 主成分分析; 质量追溯

中图分类号: R943; R932; R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)16-0053-04

Optimization of Water Extraction Process of Toutong Recipe by the Orthogonal Test

ZHENG Yuewen^{1,2}, CHEN Qiugu^{3,4}, ZHANG Shangbin^{3,4}, ZHANG Zhiqiang^{1,2}, ZHOU Guoli^{1,2}, WU Hongyan^{1,2}, CHEN Jianping^{3,4}

(1. Shenzhen Luohu District Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518001; 2. Shenzhen Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518001; 3. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518033; 4. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital · Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen, Guangdong, China 518033)

Abstract: **Objective** To optimize the water extraction process of Toutong Recipe. **Methods** The water extraction process of Toutong Recipe was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the comprehensive score of common peak components, the total content of four principal components, the total score of total solid with weighting coefficient of 0.3, 0.4, 0.3 as the evaluation indexes, and with the amount of water addition, the decocting times, and the decocting time as the evaluation factors. **Results** The optimal water extraction process was as follows: adding eight times the amount of water, decocting three times, each time for 1.0 h. The verification test showed that the process was feasible. **Conclusion** The water extraction process is more objective and comprehensive, which can take into account the changes of most component types and contents, and realize the quality control, quality transmission and quality traceability of Chinese herbs and their products in the whole production process.

Key words: Toutong Recipe; orthogonal test; water extraction process; HPLC; principal component analysis; quality traceability

头痛方以川芎为君药, 葛根、白芷、北柴胡为臣药, 白芍、醋延胡索、丹参、僵蚕、天麻、蔓荆子为佐药, 炙甘草为使药, 有疏风、通络、活血止痛之效, 主治气阴亏虚、痰瘀阻络型头痛。该方以汤剂长期应用于临床, 疗效确切, 但煎煮服用和携带不便, 难以适应现代生活需要。因此, 本研究中拟将头痛方转化为服用方便、质量可控、疗效确切的中成药产品, 以更广泛应用。中药复方制剂成分复杂, 理化性质各异, 从药材来源到加工制备工艺过程, 其中每个环节均可能影响或改变中药制剂的药效物质基础^[1], 而这些因素会影响临床疗效的一致性。为了强化整个生产过程的质量控制, 建立产品全生命周期质量追溯系统, 本研究中基于高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究, 采用正交试验法对头痛方的水提工艺进行了优选, 为该方的后续新药或新剂型药物研发奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030型高效液相色谱仪, AUV220D型电子分析天平(精度为十万分之一), 均购自日本Shimadzu公司。

1.2 试药

没食子酸对照品(批号为110831-201605, 含量90.8%), 葛根素对照品(批号为110752-201615, 含量95.4%), 大豆苷对照品(批号为111738-201603, 含量93.3%), 阿魏酸对照品(批号为110773-201614, 含量99.0%), 丹酚酸B对照品(批号为111562-201917, 含量96.6%), 均购自中国食品药品检定研究院; 3'-羟基葛根素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号为wkq18020905, 含量>98%); 甲醇、甲酸均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

川芎(批号为191101741)、白芷(批号为191200229)、

*基金项目: 广东省深圳市医疗卫生“三名工程”项目[SZZYSM202111002]。

第一作者: 郑粤文, 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中医药防治疾病, (电子信箱)cqg629@163.com。

Δ通信作者: 吴红彦, 男, 博士, 教授, 研究方向为方剂作用机制及药效物质基础, (电子信箱)wuhy@163.com。

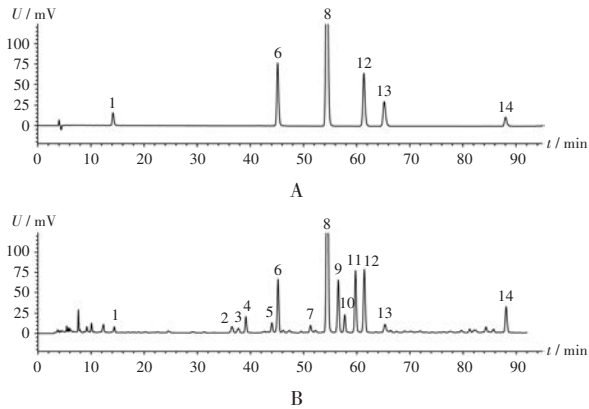
醋延胡索(批号为191001901)、僵蚕(批号为191000059)、葛根(批号为191201)、天麻(批号为191201681)、炒白芍(批号为191200249)、炙甘草(批号为191102971)、丹参(批号为190801921)、蔓荆子(批号为190803681)、北柴胡(批号为190814061a)饮片,均购自康美药业股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 图谱共有峰主成分综合评分的计算

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters XSelect Hss T3柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~90 min时5%A→48%A);流速:0.8 mL/min;检测波长:0~63 min时250 nm,63~90 min时321 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的色谱图见图1。



1. 没食子酸 6. 3'-羟基葛根素 8. 葛根素 12. 大豆苷
13. 阿魏酸 14. 丹酚酸B
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Gallic acid 6. 3'-Hydroxy puerarin 8. Puerarin 12. Daidzin
13. Ferulic acid 14. Salvianolic acid B
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.1.2 溶液制备

取没食子酸、3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、阿魏酸、丹酚酸B对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解制成质量浓度分别为20,50,250,60,20,25 μg/mL的系列混合对照品溶液。按3倍处方量称取2.1.2项下各药材饮片,煎煮提取,滤过,合并滤液,浓缩至1 000 mL,精密量取浓缩液1 mL,加30%乙醇定容至5 mL,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

取2.1.2项下供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,考察方法的精密度;并分别于室温下放置0,2,4,8,12,16,24 h时进样测定,考察供试品溶液稳定性;取2.1.2项下同批浓缩液,按2.1.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件

进样测定,考察方法的重复性。结果精密度、稳定性、重复性试验中各主要色谱峰峰面积(或含量)的RSD均小于2.0%。

2.1.4 主成分分析

导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)分析,共匹配14个共有峰。采用SPSS 22.0统计学软件对14个共有峰的峰面积进行因子分析,结果见表1、表2。根据主成分的提取原则,取特征值大于1的成分作为提取主成分。由表1可知,主成分1的累积贡献率及对应特征值均远高于其他主成分。由表2可知,14个共有峰在主成分1上均有较高载荷,说明所提取的主成分可基本反映全部指标的信息。

表1 主成分贡献统计结果(%)

Tab. 1 Variance contribution rate of the principal components (%)

成分	特征值	贡献率	累计贡献率	成分	特征值	贡献率	累计贡献率
1	12.830	91.646	91.646	5	0.133	0.953	99.492
2	0.513	3.661	95.307	6	0.062	0.444	99.936
3	0.314	2.243	97.550	7	0.005	0.039	99.975
4	0.138	0.989	98.539	8	0.003	0.025	100.000

表2 主成分因子载荷矩阵

Tab. 2 Factor load matrix of the principal components

峰号	主成分	峰号	主成分	峰号	主成分
1	0.962	6	0.993	11	0.988
2	0.861	7	0.982	12	0.987
3	0.969	8	0.994	13	0.953
4	0.941	9	0.992	14	0.798
5	0.975	10	0.986		

2.1.5 共有峰主成分综合评分计算^[2]

由公式 $F_i = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_jX_m$ (a 为特征向量,由成分因子载荷矩阵中的第j列载荷除以对应成分特征值的算术平方根所得, X 为原始指标),计算得出 F_1 主成分的表达式。将原始指标进行标准化处理。由公式 $F = C_1F_1 + C_2F_2 + \dots + C_iF_i$ (C 为各主成分得分系数,由主成分特征值除以提取主成分总特征值所得)得,综合评分 $F = F_1$ 。

2.2 主要成分含量测定

2.2.1 溶液制备

取3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、丹酚酸B对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解制成质量浓度分别为0.396,2.003,0.406,0.164 mg/mL的单一对照品贮备液。

2.2.2 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取2.2.1项下各单一对照品贮备液适量,置2 mL容量瓶中,加甲醇制成每1 mL分别含3'-羟基葛根素8.712,21.780,43.560,54.450,65.340,76.230 μg,葛根素40.832,102.080,

204.160, 255.200, 306.240, 357.280 μg , 大豆苷 10.150, 25.375, 50.750, 63.438, 76.125, 88.813 μg , 丹酚酸B 4.920, 9.840, 19.680, 24.600, 29.520, 46.320 μg 的系列混合对照品溶液,分别精密吸取10 μL ,按2.1.1项下色谱条件测定,以质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,3'-羟基葛根素为 $Y_1 = 47\,936.7 X_1 - 70\,348 (r = 0.999\,2, n = 6)$; 葛根素为 $Y_2 = 48\,162.4 X_2 + 224\,867 (r = 0.999\,7, n = 6)$; 大豆苷为 $Y_3 = 45\,451.8 X_3 + 88\,408.9 (r = 0.999\,3, n = 6)$; 丹酚酸B为 $Y_4 = 21\,210.6 X_4 - 52\,051.3 (r = 0.999\,0, n = 6)$ 。结果表明,3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、丹酚酸B质量浓度分别在8.712~76.230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40.832~357.280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.150~88.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.920~46.320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性及加样回收试验:取2.1.2项下供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,考察方法的精密度;并分别于室温下放置0,2,4,8,12,16,24 h时进样测定,考察供试品溶液的稳定性;取2.1.2项下同批浓缩液,按2.1.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,考察方法的重复性;取9份已知含量的浓缩液约0.5 mL,按质量比1:0.5,1:1,1:1.5加入各成分对照品适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果精密度、稳定性、重复性试验中3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、丹酚酸B峰面积的 RSD 均小于3.0%,平均加样回收率分别为98.76%,99.27%,101.52%,102.93%, RSD 分别为2.46%,1.73%,1.49%,2.04%($n = 9$)。

2.2.3 含量测定

取供试品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品总含量。

2.3 总固形物质量测定

精密吸取2.1.2项下浓缩液50 mL,置已恒重的蒸发皿中,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干,105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,置干燥器中冷却0.5 h,迅速称定质量,按2020年版《中国药典(四部)》通则0831干燥失重测定法测定,计算总固形物质量。

2.4 正交试验设计与结果

结合头痛方中医方解理论及临床药理活性研究^[3-8],以共有峰主成分综合评分、4个主成分总含量、总固形物质量加权系数分别为0.3,0.4,0.3的总评分为评价指标,加水量(因素A)、煎煮时间(因素B)和煎煮次数(因素C)为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选头痛方水提工艺^[9]。因素水平见表3,正交试验设计与结果见表4,方差分析结果见表5。由表4、表5可知,

头痛方的最佳水提工艺为 $A_3B_2C_3$,各因素对提取效果的影响大小为 $C > A > B$,但3个因素对水提工艺结果均无明显影响。为节约能源,提高提取效率,选择提取工艺为 $A_1B_1C_3$,即加8倍量水,煎煮3次,每次1.0 h。

表3 因素与水平

Tab.3 Factors and their levels

水平	因素A(倍)	因素B(h)	因素C(次)
1	8	1.0	1
2	10	1.5	2
3	12	2.0	3

表4 正交试验设计及结果

Tab.4 Design and results of the orthogonal test

编号	因素				共有峰主成分	主成分总	总固形物	总评分
	A	B	C	D(误差)	综合评分	含量(mg)	质量(mg)	
1	1	1	1	1	0.040	736.420	48.486	38.44
2	1	2	2	2	0.050	1 707.235	92.960	76.60
3	1	3	3	3	0.056	1 687.600	93.658	77.26
4	2	1	2	3	0.051	1 402.770	85.366	67.24
5	2	2	3	1	0.196	1 639.125	93.990	97.33
6	2	3	1	2	0.185	891.610	59.190	67.28
7	3	1	3	2	0.199	1 619.090	86.510	94.98
8	3	2	1	3	0.172	1 037.630	72.146	72.79
9	3	3	2	1	0.195	1 667.635	95.974	98.47
K_1	192.29	200.66	178.51	234.24				
K_2	231.85	246.72	242.30	238.85				
K_3	266.24	243.01	269.57	217.29				
R	73.94	46.06	91.05	21.56				

表5 方差分析结果

Tab.5 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	912.78	2	456.39	10.62	> 0.05
B	436.61	2	218.30	5.08	> 0.05
C	1 455.87	2	727.93	16.94	> 0.05
D(误差)	85.96	2	42.98		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.5 验证试验

称取3倍处方量各药材饮片,按最佳水提工艺进行提取,同法计算总评分,结果见表6。3批验证试验的平均总评分为96.78分, RSD 为0.35%,且各评价指标的 RSD 均小于1%,表明本试验所优选的工艺稳定,重复性好,可作为头痛方的水提工艺。

3 讨论

目前,我国中药复方多以单一性指标成分含量和干膏率为评价指标进行提取工艺筛选^[10-12]。但中药复方中各味药材所含成分复杂多样,药效作用来源于多

表6 验证试验结果
Tab. 6 Results of the verification test

批次	共有峰主成分 综合评分	4个主成分 总含量(mg)	总固形物 质量(mg)	总评分
1	0.191	1 646.085	93.289	96.52
2	0.191	1 655.545	92.994	96.65
3	0.193	1 650.910	93.969	97.16
$\bar{x}$	0.192	1 650.847	93.417	96.78
RSD(%)	0.60	0.29	0.54	0.35

种成分的配伍。我国中药复方新药质量标准控制已采用指纹图谱技术、多成分测定、一测多评或指纹图谱技术结合多成分测定/一测多评等分析手段^[13-14],但以单一性指标成分含量和干膏率为评价指标进行提取工艺筛选,已不能适应和满足中药复方现代化改革创新的需要,故本研究中将指纹图谱技术和多成分测定引入提取工艺筛选,运用正交试验法设计科学、合理、可靠的工艺方案,从不同角度有效地控制、提升产品的质量。在工艺研究过程中建立指纹图谱和多成分测定方法,还可为后期中间体和成品的质量标准控制提供依据,以期建立一个系统的、动态的质量控制体系,实现中药及其产品整个生产过程的质量控制、质量传递与质量追溯。

本研究中的高效液相色谱图谱中共匹配了14个共有色谱峰,并指认出其中6个。由于处方中成分的含量和紫外吸收程度各不相同,所建指纹图谱的各个色谱峰的峰面积大小不一,指纹图谱的模糊性易忽略各关键工艺参数对色谱峰1,2,3,5,7,13等含量较低成分的影响,若仅以指纹图谱共有峰的峰面积总和作为关键质量属性,仍无法全面考察提取工艺。主成分分析可根据实际需要提取较少的综合变量,以尽可能反映原有变量信息,是一种科学有效的降维方法^[15],可解决指纹图谱模糊性导致成分权重系数失重的弊端。因此将指纹图谱研究和主成分分析结合,既可从整体上判断各关键工艺参数对药物成分的影响,又可从局部兼顾含量较低的药效成分^[16]。在此基础上,本研究选择分离度大于1.5的4种成分作为定量测定指标,其中3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷为方中臣药葛根中的黄酮类成分,现代药理学研究表明,葛根的总黄酮对偏头痛、血管性头痛及高血压引起的头痛、耳鸣、头晕、项强等症状有显著疗效,尤以缓解头痛、项强为著^[2-4];而丹酚酸B作为丹参的生物活性成分,具有多种药理活性,对心血管、脑、肝脏、糖尿病肾病等疾病均有较好的保护作用^[5-7]。故本研究选取此4个成分的总含量作为水提工艺的关键质量属性。

综上所述,本研究中结合中药复方提取工艺特点

及中药复方配伍,采用正交试验法,以多指标综合的总评分为考察指标,加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,优选出的头痛方水提工艺稳定、可行,可为该方的后续新药研发奠定基础。

参考文献

[1] 阳长明. 基于临床价值和传承创新的中药复方制剂设计[J]. 中草药, 2019, 50(17): 3997-4002.

[2] 陈秋谷, 李茂生, 刘德亮, 等. 基于多指标定量和指纹图谱技术综合评价的正交试验优选活血降糖颗粒水提工艺[J]. 中药材, 2020, 43(2): 402-407.

[3] 张素慧, 宁 炼, 石劲敏, 等. 葛根总黄酮经鼻给药对硝酸甘油致偏头痛模型大鼠的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(5): 394-398.

[4] 王天观. 葛根素注射液治疗血管性头痛疗效观察[J]. 河北中医, 2012, 34(7): 1052-1053.

[5] 房 伟. 葛根药理作用研究进展[J]. 中国药物经济学, 2017, 12(11): 159-160.

[6] LING C, LIANG J, ZHANG C, et al. Synergistic Effects of Salvianolic Acid B and Puerarin on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury[J]. Molecules, 2018, 23(3): 564.

[7] ZHAO XS, ZHENG B, WEN Y, et al. Salvianolic acid B inhibits Ang II - induced VSMC proliferation *in vitro* and intimal hyperplasia *in vivo* by downregulating miR - 146a expression [J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152754.

[8] MA ZG, XIA HQ, CUI SL, et al. Attenuation of renal ischemic reperfusion injury by salvianolic acid B via suppressing oxidative stress and inflammation through PI3K / Akt signaling pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 50(6): e5954.

[9] 黄兴国, 张 静, 杜文慧, 等. QbD 理念的经典名方研究: 四物汤加减方的提取工艺优化研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4329-4335.

[10] 林海成, 祝洪艳, 何忠梅, 等. 正交试验优选酸枣仁总皂苷提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 42-45.

[11] 黄丽贞, 邓家刚, 谢 滢, 等. 正交试验优选复方威灵方提取工艺及其颗粒剂制备工艺研究[J]. 广西中医药, 2016, 39(1): 76-79.

[12] 高 彪, 蒋 琪, 向 蓉, 等. 复方枫蓼颗粒制备工艺研究[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(1): 54-63.

[13] 栗焕焕, 毛营营, 刘亚男, 等. 基于定量指纹图谱技术的蓝芩口服液质量标准研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2094-2100.

[14] 张 寒, 李振皓, 范晓辉. 一标多测 UPLC 定量指纹图谱在丹参注射液质量评价中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3724-3731.

[15] 杜 平, 刘 文, 卿勇军, 等. 不同评价指标对芍药甘草汤提取工艺优化的影响[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2188-2193.

[16] 韩胜男, 张晓杭, 周培培, 等. 化学计量学在中药组效关系研究中的应用进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2595-2602.

(收稿日期: 2021-09-11; 修回日期: 2022-03-22)