

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.18.014

基于熵权法的正交试验优选小儿宝泰康颗粒醇提工艺

张清文¹, 汪正宇²

(1. 皖北煤电集团总医院药剂科, 安徽 宿州 234000; 2. 安徽省宿州市食品药品检验检测中心, 安徽 宿州 234000)

摘要:目的 优选小儿宝泰康颗粒醇提工艺。方法 采用基于熵权法的正交试验,以料液比、甲醇体积分数、提取时间为考察因素,绿原酸、连翘酯苷 A、连翘苷、柴胡皂苷 d、甘草酸铵含量为评价指标,计算各指标的信息熵及权重系数,并进行综合评分,对小儿宝泰康颗粒有效成分醇提工艺进行优选,并验证。结果 料液比和提取时间对综合评分有显著影响($P < 0.05$)。小儿宝泰康颗粒有效成分最优醇提工艺为,50 倍量 50% 甲醇提取 90 min。验证试验中,上述 5 种成分含量的 RSD 均小于 0.40% ($n = 3$)。结论 基于熵权法优选的小儿宝泰康颗粒醇提工艺稳定可行。

关键词:小儿宝泰康颗粒;有效成分;正交试验;多指标;熵权法;权重分析

中图分类号:R943;R932

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)18-0062-04

Optimization of Alcohol Extraction Process of Xiao'er Baotai Kang Granules by the Orthogonal Test Based on Entropy Weight Method

ZHANG Qingwen¹, WANG Zhengyu²

(1. Department of Pharmacy, Wanbei Coal - Electricity Corporation General Hospital, Suzhou, Anhui, China 234000; 2. Suzhou Food and Drug Inspection and Testing Center, Suzhou, Anhui, China 234000)

Abstract: **Objective** To optimize the alcohol extraction process of Xiao'er Baotai Kang Granules. **Methods** The material - liquid ratio, volume fraction of methanol and extraction time were taken as the factors, and the contents of chlorogenic acid, forsythoside A, forsythin, saikosaponin D and ammonium glycyrrhizinate were taken as the evaluation indexes, the information entropy and weight coefficient of each index were calculated and the comprehensive score was carried out, the alcohol extraction process of Xiao'er Baotai Kang Granules was optimized and verified by the orthogonal test based on entropy weight method. **Results** The material - liquid ratio and extraction time had significant effects on the comprehensive score ($P < 0.05$). The optimal alcohol extraction process of Xiao'er Baotai Kang Granules was as follows: 50 times of 50% methanol extraction for 90 min. In the validation test, the RSD of the above five components was less than 0.40% ($n = 3$). **Conclusion** The alcohol extraction process of Xiao'er Baotai Kang Granules based on the entropy weight method is stable and feasible.

Key words: Xiao'er Baotai Kang Granules; active ingredients; orthogonal test; multi - indexes; entropy weight method; weight analysis

小儿宝泰康颗粒多用于治疗小儿风热外感引起的发热、流涕、咳嗽和脉浮等证^[1],对上呼吸道感染有较好疗效^[2]。该药由连翘、南板蓝根、滇紫草、地黄、玄参、滇柴胡等 12 味药材组方,现收载的 2020 年版《中国药典(一部)》中仅以紫外 - 可见分光光度法测定制剂中浙贝母总生物碱含量,对其他药材有效成分均无定量检测要求。本研究中以连翘中连翘苷和连翘酯苷 A 含量、滇柴胡中柴胡皂苷 d 含量、甘草中甘草酸和绿原酸含量为评价指标,采用熵权法确定各指标权重系数并进行综合评分,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验,以料液比、甲醇体积分数及提取时间为考察指标,通过直观分析和方法分析优选最佳醇提工艺,为小儿宝泰康颗粒进一步开发利用提供技术支持。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ME204E 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ -

500DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

小儿宝泰康颗粒[健民集团叶开泰国药(随州)有限公司,批号分别为 210109,210118,210237,210232];绿原酸对照品(批号为 110753 - 202119,含量 96.3%),连翘酯苷 A 对照品(批号为 111810 - 202108,含量 96.2%),连翘苷对照品(批号为 110821 - 201816,含量 95.1%),柴胡皂苷 d 对照品(批号为 110778 - 201912,含量 96.3%),甘草酸铵对照品(批号为 110731 - 202021,含量 96.2%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack GIS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B),梯度

第一作者:张清文,男,大学本科,副主任药师,研究方向为临床药学及药事管理,(电子信箱)13085572929@126.com。

洗脱(0 min时5%A, 10 min时25%A, 25 min时30%A, 40 min时55%A, 60 min时55%A, 70 min时5%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别取各对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成每1 mL分别含绿原酸0.450 mg、连翘酯苷A 0.550 mg、连翘苷 1.600 mg、柴胡皂苷d 0.160 mg、甘草酸铵0.330 mg的混合对照品贮备液;精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

供试品溶液:取样品内容物适量,研细,取细粉约0.6 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加50%甲醇30 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)提取,冷却至室温,再次称定质量,加50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按小儿宝泰康颗粒处方和制备工艺制备缺连翘、滇柴胡、甘草的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.1.2项下3种溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵色谱峰与相邻峰分离良好(分离度>1.5),理论板数以连翘苷峰计大于5 000。详见图1。

线性关系考察:分别精密量取2.1.2项下混合对照品贮备液0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL,置5 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密量取10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

检测限与定量限考察:分别精密量取2.1.2项下混合对照品溶液适量,加50%甲醇倍比稀释,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)3:1及10:1时的

表1 回归方程、线性范围与检测限、定量限

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ

待测成分	回归方程	r	线性范围(mg/mL)	检测限(μg)	定量限(μg)
绿原酸	$Y_1 = 2.36 \times 10^4 X_1 + 136$	0.999 8	0.009~0.270	0.05	0.18
连翘酯苷A	$Y_2 = 1.03 \times 10^5 X_2 + 555$	0.999 2	0.011~0.330	0.08	0.31
连翘苷	$Y_3 = 7.65 \times 10^3 X_3 - 26.9$	0.999 9	0.032~0.960	0.16	0.51
柴胡皂苷d	$Y_4 = 4.36 \times 10^4 X_4 - 174$	0.999 2	0.003~0.096	0.02	0.07
甘草酸铵	$Y_5 = 5.71 \times 10^3 X_5 - 465$	0.999 4	0.007~0.198	0.03	0.11

进样量分别记作检测限及定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.1.2项下混合对照品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件,连续3 d、每天1次和1 d内连续进样测定6次,记录峰面积。结果绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵峰面积的 RSD ,日间精密度分别0.62%, 0.81%, 0.18%, 0.50%, 0.67% ($n=3$),日内精密度分别0.21%, 0.43%, 0.15%, 0.20%, 0.32% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.1.2项下供试品溶液(批号为210109)适量,分别于常温下放置0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为0.36%, 0.78%, 0.64%, 1.22%, 0.53% ($n=9$),表明供试品溶液在室温放置48 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为210109)适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液6份,再按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵的平均含量分别为1.985, 2.786, 7.911, 0.705, 1.698 mg/g, RSD 分别为0.52%, 0.78%, 0.33%, 0.89%, 0.42% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为210109)内容物适量,研细,取细粉约0.3 g,精密称定,共6份,分别精密加入混合对照品贮备液1 mL,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1.1项下色谱条件进样测

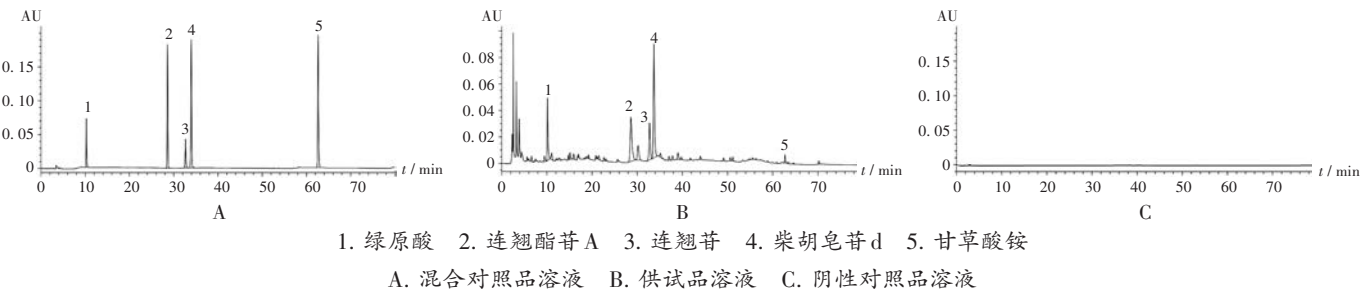


图1 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Forsythoside A 3. Forsythin 4. Saikosaponin d 5. Ammonium glycyrrhizinate
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 2 Results of the recovery test (n=6)						
待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
绿原酸	0.495	0.450	0.944	99.78	99.70	0.42
	0.496	0.450	0.948	100.44		
	0.501	0.450	0.949	99.56		
	0.499	0.450	0.947	99.56		
	0.492	0.450	0.939	99.33		
连翘酯苷A	0.493	0.450	0.941	99.56	98.79	1.07
	0.696	0.550	1.241	99.09		
	0.699	0.550	1.250	100.18		
	0.701	0.550	1.238	97.64		
	0.695	0.550	1.239	98.91		
连翘苷	0.694	0.550	1.230	97.45	99.77	0.15
	0.697	0.550	1.244	99.45		
	1.972	1.600	3.565	99.56		
	1.968	1.600	3.567	99.94		
	1.974	1.600	3.571	99.81		
柴胡皂苷d	1.970	1.600	3.564	99.62	97.40	1.18
	1.966	1.600	3.563	99.81		
	1.967	1.600	3.565	99.88		
	0.178	0.160	0.333	96.88		
	0.177	0.160	0.331	96.25		
甘草酸铵	0.176	0.160	0.334	98.75	98.08	1.55
	0.179	0.160	0.335	97.50		
	0.177	0.160	0.331	96.25		
	0.175	0.160	0.333	98.75		
	0.425	0.330	0.744	96.67		
	0.426	0.330	0.750	98.18	98.08	1.55
	0.427	0.330	0.744	96.06		
	0.423	0.330	0.753	100.00		
	0.426	0.330	0.754	99.39		
	0.425	0.330	0.749	98.18		

定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表2。

2.2 正交试验

试验设计与结果:以料液比(A)、甲醇体积分数(B)和提取时间(C)为考察因素,绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法考察,因素与水平见表3,正交试验设计方案及结果见表4,方差分析结果见表5。

表3 因素与水平

Tab. 3 Factors and their levels			
水平	因素A(g/mL)	因素B(%)	因素C(min)
1	1:30	30	30
2	1:50	50	60
3	1:70	70	90

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 4 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test									
序号	因素			含量(mg/g)					综合评分
	A	B	C	绿原酸	连翘酯苷A	连翘苷	柴胡皂苷d	甘草酸铵	
1	1	1	1	0.791	0.701	2.461	0.350	0.726	0.844
2	1	2	3	1.260	2.112	6.049	0.512	1.225	1.767
3	1	3	2	1.025	1.669	5.652	0.380	1.004	1.515
4	2	1	2	1.799	2.671	7.252	0.693	1.601	2.253
5	2	2	1	1.731	2.767	6.368	0.473	1.420	2.035
6	2	3	3	1.943	2.656	7.419	0.678	1.630	2.305
7	3	1	3	1.888	2.614	7.303	0.640	1.582	2.250
8	3	2	2	1.982	2.769	7.910	0.707	1.699	2.416
9	3	3	1	1.183	1.749	6.061	0.406	1.112	1.643
K_1	4.126	5.347	5.564						
K_2	6.592	6.218	5.663						
K_3	6.309	5.463	5.800						
R	2.466	0.871	0.236						

表5 方差分析结果

Tab. 5 Results of the ANOVA					
来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
校正模型	2.033 ^a	6	0.339	72.951	0.014
截距	32.217	1	32.217	6936.835	
A	1.215	2	0.607	130.771	0.008
B	0.149	2	0.075	16.054	0.059
C	0.669	2	0.335	72.027	0.014
误差	0.009	2	0.005		
总计	34.259	9			
校正后的总变异	2.042	8			

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$; $R^2=0.995$ (调整的 $R^2=0.982$)。

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$; $R^2=0.995$ (adjusted $R^2=0.982$)。

熵权法权重分析:使用EvaGear(版本2.4.7818.29129)软件,对表3数据进行标准化处理,公式:

$$Y_{ij} = \frac{X_{ij} - \min(X_i)}{\max(X_i) - \min(X_i)}$$
,其中*i*为试验次数,*j*为评价指标,

$i=1,2,3\cdots m;j=1,2,3\cdots n$;再计算各指标信息熵

E_j ,公式: $E_j = -K \sum_{i=1}^m P_{ij} \ln(P_{ij})$, $K=1/\ln(m)$, $P_{ij}=Y_{ij}/$

$\sum_{i=1}^n Y_{ij}$,绿原酸、连翘酯苷A、连翘苷、柴胡皂苷d、甘草酸铵的信息熵分别为0.8956,0.9300,0.9391,0.8525,

0.9138;计算各指标的权重系数 W_j ,公式: $W_j=(1-E_j)$

$\sum_{j=1}^n (1-E_j)$,各指标的权重分别为0.2227,0.1492,

0.1298,0.3145,0.1838;最后计算各次试验综合评分

S_i ,公式: $S_i = \sum_{j=1}^m W_j \times P_{ij\odot}$

结果分析:熵权法确定各指标权重关系为,柴胡皂苷d > 绿原酸 > 甘草酸铵 > 连翘酯苷A > 连翘苷,各考察因素对综合评分影响程度为A > B > C,且仅因素A, C对综合评分结果有显著影响($P < 0.05$)。正交试验设计校正模型的 $P < 0.05$,说明试验设计科学合理。综上所述,确定最优提取工艺条件为 $A_2B_2C_3$,即料液比为1:50(g/mL),甲醇体积分数为50%,提取时间为90 min。

2.3 验证试验

取3批样品适量,每批平行3份,按优选的醇提工艺提取,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算各成分含量。结果显示,3批样品试验结果的RSD均小于0.40%($n = 3$),表明该优选醇提工艺较稳定。详见表6。

表6 验证试验结果(mg/g, $n = 3$)

Tab. 6 Results of the validation test (mg/g, $n = 3$)

批号	绿原酸	连翘酯苷A	连翘苷	柴胡皂苷d	甘草酸铵
210118	2.023	2.796	8.023	0.715	1.726
210237	2.031	2.801	8.013	0.711	1.710
210232	2.013	2.790	8.016	0.714	1.715
RSD(%)	0.382	0.174	0.051	0.238	0.389

3 讨论

小儿宝泰康颗粒组方中,连翘为君药,具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效,主要成分为连翘苷和连翘酯苷A^[3-5];滇柴胡产自云南,具有解表散寒、疏肝和胃等功效,主要成分为柴胡皂苷类化合物^[6-7];甘草具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗病毒、神经保护、肝脏保护等药理作用,含有三萜类、黄酮类、多糖类、香豆素类等多种化合物^[8-12]。关于小儿宝泰康颗粒有效成分研究文献较少,沈立茹等^[11]采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定制剂中贝母素甲与贝母素乙含量,宣蓓蓓等^[12]研究了该制剂的指纹图谱及7种成分含量。中药治病机制较复杂,故对于中成药质量考察应结合中医理论综合评价^[13-14]。

预试验中先后考察了加热回流和超声提取两种提取方式,发现在相同条件下两者各成分含量差异不明显,故选择操作更简便的超声提取;提取溶剂选择时,考察甲醇、乙醇及水3种溶剂,结果以水为溶出介质时,连翘酯苷A、柴胡皂苷d未被检测出,且甲醇的提取效果比乙醇好,故采用甲醇作溶剂。

目前确定指标属性权重方法有主观赋权法、客观赋权法和主客观赋权法(或组合赋权法)三大类,熵权法属客观赋权法,近年来多用于中药多指标成分分析中^[15-18]。其根据各指标的变异程度,利用信息熵计算出各指标的熵权,再通过熵权对各指标的权重进行修正,从而得到较客观的指标权重。

本研究中以料液比、甲醇体积分数和提取时间为考察因素,以熵权法确定各指标权重求算综合评分,通过正交试验法得出最优醇提工艺条件,并通过验证试验验证。该工艺条件稳定性较好,简单实用,可为小儿宝泰康颗粒进一步开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 565.
- [2] 常太芳, 程 栋. 小儿宝泰康颗粒联合头孢呋辛酯治疗小儿上呼吸道感染的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(3): 746-749.
- [3] 齐丽娜, 陈炫好, 金 华, 等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(2): 168-175.
- [4] 社会枝, 马 红. 连翘对神经系统的药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(7): 526-530.
- [5] 梁 洁, 祁金丽, 周昱杉, 等. 止咳颗粒中连翘酯苷A成分鉴定及含量测定[J]. 中国药业, 2021, 30(16): 88-91.
- [6] 马跃新, 刘 黔, 吴永康. HPLC法测定滇柴胡中槲皮素和异鼠李素的含量[J]. 昆明学院学报, 2019, 41(3): 88-92.
- [7] 张东佳, 彭云霞, 魏莉霞, 等. 《中国药典》2015版含柴胡成方制剂分析[J]. 中国中医药科技, 2020, 27(2): 325-329.
- [8] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [9] 邓桃妹, 彭 灿, 彭代银, 等. 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [10] 田武生. 甘草的化学成分和临床研究概况[J]. 中医临床研究, 2012, 4(16): 31-32.
- [11] 沈立茹, 李瑞宏, 王太亮. HPLC-ELSD法同时测定小儿宝泰康颗粒中贝母素甲与贝母素乙的含量[J]. 药学实践杂志, 2016, 34(4): 351-353.
- [12] 宣蓓蓓, 王 怡. 小儿宝泰康颗粒的HPLC指纹图谱研究及7个指标成分含量测定[J]. 中国药师, 2020, 23(2): 376-380.
- [13] 王作君, 张文涛, 马良煜, 等. 中药研究进展[J]. 中国临床实用医学, 2021, 12(6): 1-2.
- [14] 赵 巍, 阳长明, 周思源, 等. 中药药学研究技术指导原则体系介绍[J]. 中国食品药品监管, 2021(9): 56-63.
- [15] 吉部肖情, 李 丽, 阮婧华, 等. 正交设计和BP神经网络结合G1-熵权法对比优化羌活祛风颗粒水提工艺[J]. 中草药, 2022, 53(4): 1051-1058.
- [16] 成余勤, 石森林, 来平凡. 基于熵权法和正交设计优化加味当归芍药散挥发油的 β -环糊精包合工艺[J]. 中草药, 2021, 52(10): 2951-2957.
- [17] 李俊萍, 张 爽, 王谦博, 等. 基于G1-熵权法和正交设计多指标优化刺五加提取工艺[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(7): 871-876.
- [18] 李文靖, 付 博, 颜川岚, 等. 基于熵权法和灰色关联度法的黄精“九蒸九制”次数探析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6764-6769.

(收稿日期: 2022-03-09; 修回日期: 2022-04-02)