

· 论著 ·

## 星点设计-效应面法优化复方茵陈合剂的醇沉工艺

刘晓玲, 蔡小辉, 倪晓霞, 王庆芬, 陈锦珊 (解放军 175 医院/厦门大学附属东南医院, 福建 漳州 363000)

**[摘要]** **目的** 采用星点设计-效应面法优化复方茵陈合剂的醇沉工艺。**方法** 以栀子苷含量和固形物去除率的总评归一值为指标,通过单因素实验考察药液相对密度、醇沉浓度、醇沉时间和搅拌速度对醇沉工艺的影响,结合医院制剂生产特点,通过趋势分析确定影响醇沉工艺的关键因素,最后采用星点设计-效应面法对关键因素进行进一步的研究与探讨。**结果** 当药液相对密度为 1.07,醇沉浓度为 84%、醇沉时间为 8 h,搅拌速度为 1762 r/min 时醇沉工艺达到最优。**结论** 采用星点设计-效应面法优化了复方茵陈合剂的醇沉工艺,有助于进一步提升复方茵陈合剂工艺的稳定性。

**[关键词]** 复方茵陈合剂;星点设计-效应面法;醇沉工艺;总评归一值

**[中图分类号]** R944.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0329-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.009

## Optimization on alcohol precipitation process of compound Yinchen mixture by central composite design-response surface method

LIU Xiaoling, CAI Xiaohui, NI Xiaoxia, WANG Qingfen, CHEN Jinshan (The 175th Hospital of PLA, Zhangzhou 363000, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the alcohol precipitation process of compound Yinchen mixture by central composite design-response surface method. **Methods** With the transfer rates of geniposide and solid removal rate as comprehensive evaluation index, the effects of relative density, alcohol concentration, stirring speed and standing time were investigated by the single factor experiment on the alcohol precipitation process. By analysis of variance, the key factors that could influence the alcohol precipitation process were determined. Then the range of parameters of key factors was further studied and explored by central composite design-response surface method. **Results** The optimum preparation conditions were as follows: the relative density was 1.07, alcohol concentration was 84%, standing time was 8 h, stirring speed was 1762 r/min. **Conclusion** The alcohol precipitation process of compound Yinchen mixture could be optimized by the response surface method, which could help to enhance the stability of the process.

**[Key words]** Compound Yinchen mixture; central composite design-response surface methodology; alcohol precipitation process; comprehensive evaluation index

复方茵陈合剂由茵陈、栀子、大黄三味中药组成,用于治疗急慢性黄疸型肝炎,在我院临床应用 10 余年,其降低转氨酶、消除黄疸的疗效确切。本方源自《伤寒论·辨阳明病脉证并治》中的茵陈蒿汤,现代药理学研究表明<sup>[1-5]</sup>,此三味中药在肝病治疗中发挥了重要作用。笔者参考茵陈蒿汤相关文献,研究发现,复方茵陈合剂的提取制备工艺对药效物质有较大影响,其水提部位及醇提部位均有一定的保肝退黄作用<sup>[6]</sup>,蔡华丹等发现其水提工艺较

佳<sup>[7]</sup>,窦志华等发现其药效物质主要存在于水煎液的 60% 乙醇沉淀的上清液部分<sup>[8]</sup>。因此,笔者采取水提醇沉的传统方法进行其有效部位的分离,以栀子苷含量和固形物去除率所得总评归一值为评价指标,采用星点设计-效应面法进行实验优化,得到最佳醇沉工艺参数,为今后的生产和质量控制提供依据。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1200 Series);分析天平(SHIMADZU, AUX220);低速离心机(北京医用离心机厂, LD5-2A);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂, RE-2000A);集热式恒温加热磁力搅拌器(上

**[基金项目]** 福建中医药大学临床专项校管课题(XB2016067)

**[作者简介]** 刘晓玲,本科,药师,研究方向:医院制剂, Tel: 15260686960, Email: 1018943143@qq.com

**[通讯作者]** 陈锦珊,副主任药师,研究方向:医院药学, Email: cjs1223@sohu.com

海凌科实业发展有限公司,DF-101S)。

## 1.2 试剂

乙醇(药用级,新乡市先丰医药新材料有限公司,20170401);乙腈(色谱级,TEDIA COMPANY,AS1122-001);纯化水(本科室自制);茵陈(樟树市庆仁中药饮片有限公司,201702291);栀子(福建尤溪仙锦药业有限公司,20160510);大黄(汕头市粤东药业有限公司,161102),栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,110749-201617,纯度99.9%)

## 2 方法与结果

### 2.1 栀子苷含量测定

#### 2.1.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈为流动相A,以0.1%磷酸溶液为流动相B,按表1中的条件进行梯度洗脱,检测波长为240 nm,柱温30℃;进样量10 μl。理论板数按栀子苷峰计算应不低于5 000。

表1 梯度洗脱表

时间 (t/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0~15	10	90
15~20	10→25	90→75
20~25	25	75
25~40	25→80	75→20
40~50	80→10	20→90

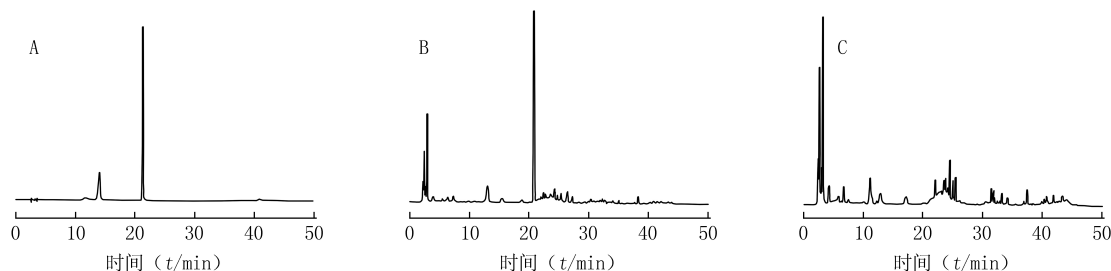


图1 复方茵陈合剂中栀子的高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性样品;1.栀子苷

0.37%,说明该方法精密度良好。

#### 2.1.8 重复性试验

取复方茵陈合剂醇沉液1.0 ml,按“2.1.3”项下的方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算质量浓度。栀子苷质量浓度的RSD为0.11%,说明该方法重复性良好。

#### 2.1.9 稳定性试验

#### 2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取栀子苷对照品25.4 mg,置25 ml容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。

#### 2.1.3 供试品溶液的制备

精密量取复方茵陈合剂醇沉液1.0 ml,置25 ml容量瓶中,加60%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。

#### 2.1.4 阴性样品的制备

参照处方制备不含栀子的醇沉液,精密量取1.0 ml,置25 ml容量瓶中,加60%乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。

#### 2.1.5 系统适用性试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品各10 μl,注入液相色谱仪,测定,即得。结果见图1。结果表明,阴性对照溶液在本方法条件中对供试品溶液无干扰,且栀子苷与相邻峰的分度为1.5,符合分离度要求。

#### 2.1.6 标准曲线的制备

取“2.1.2”项下对照品溶液进行0、2、4、8、16倍稀释,分别精密吸取上述系列对照品溶液各10 μl,注入高效液相色谱仪进行测定,以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得栀子苷回归方程 $Y = 15\ 068X + 55.771$ , $r = 0.999\ 9$ ,线性范围61.90~990.6 μg/ml。

#### 2.1.7 精密度试验

取同一对照品溶液(栀子苷的质量浓度247.7 μg/ml)连续进样6次,峰面积的RSD为

按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h,按“2.1.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。栀子苷峰面积的RSD为0.54%,说明供试品溶液在24 h内稳定。

#### 2.1.10 加样回收率试验

精密量取复方茵陈合剂醇沉液0.5 ml,置于25 ml容量瓶中,分别精密加入样品中栀子苷的100%的对照品溶液,共6份,按上述色谱条件进行

测定,计算回收率,结果栀子苷的平均回收率分别为96.92%,说明在该色谱条件下,测定样品中栀子苷的准确度符合要求。

## 2.2 栀子苷转移率的测定

分别精密量取复方茵陈合剂醇沉前液和醇沉液,各样品按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件,测定栀子苷的含量,并按下式计算转移率:

转移率=醇沉液中栀子苷含量/醇沉前液中栀子苷含量

## 2.3 固形物去除率测定

精密量取复方茵陈合剂醇沉前液和醇沉液各10 ml,置于干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干后于105℃常压干燥箱中干燥至恒定质量,取出,于干燥器中冷却30 min,精密称定,根据干燥恒定的质量,按下式计算固形物去除率。

固形物去除率=(醇沉前液干膏质量-醇沉干膏质量)/醇沉前液干膏质量

## 2.4 实验结果处理<sup>[9-11]</sup>

以相对密度、醇沉时间、醇沉浓度、搅拌速度进行醇沉工艺研究,以栀子苷转移率和固形物去除率为评价指标,每个指标结果均标准化为0-1之间的归一值,再计算两个归一值的几何平均数,得到总评归一值OD。

$$OD = (d_1, d_2, \dots, d_k)^{1/k} \quad (k \text{ 为指标数})$$

取值越大越好的指标为正相关的指标,取值越小越好的指标为负相关的指标,其分别采用 Hassan

方法<sup>[9,11]</sup>进行数学转换求“归一值”,公式如下:

$$\text{正相关数据} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$\text{负相关数据} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

其中, $Y_i$ :相应指标的算术平均值; $Y_{\max}$ :相应指标的最大值; $Y_{\min}$ :相应指标的最小值。

## 2.5 单因素试验设计及结果

### 2.5.1 相对密度的影响

设定醇沉浓度为70%、醇沉时间72 h,搅拌速度为1 200 r/min,考察相对密度分别为1.00、1.05、1.10、1.15、1.20时栀子苷含量、固形物去除率的变化,结果总评值随相对密度的增加先增加后下降,当密度为1.05时OD值最高(图2-A)。

### 2.5.2 醇沉时间的影响

设定醇沉浓度为70%、相对密度为1.05,搅拌速度为1 200 r/min,考察醇沉时间分别为8、16、24、32、40 h时栀子苷含量、固形物去除率的变化,结果总评值随醇沉时间的增加先下降后上升,最后下降并趋于平稳,当时间为8 h,OD值最高(图2-B)。

### 2.5.3 醇沉浓度的影响

设定醇沉时间24 h,相对密度为1.05,搅拌速度为1 200 r/min,考察醇沉浓度分别为50%、60%、70%、80%、90%时栀子苷含量、固形物去除率的变化,结果总评值随醇沉浓度的增加逐渐上升,当醇沉浓度为90%时,OD值最高(图2-C)。

### 2.5.4 搅拌速度的影响

设定醇沉时间24 h,相对密度为1.05,醇沉浓度为70%,考察搅拌速度分别为800、1 200、1 600、

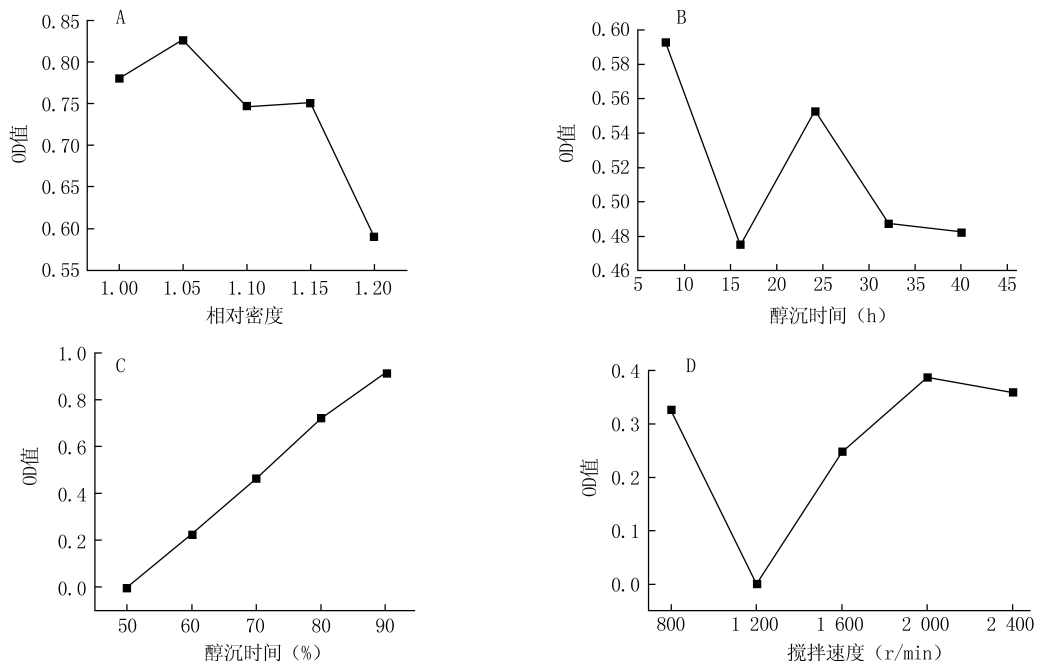


图2 单因素考察结果

2 000、2 400 r/min时栀子苷含量、固形物去除率的变化,结果总评值随搅拌速度的增加先下降后上升,后趋于稳定,当搅拌速度为2 000 r/min时,OD 值最高(图 2-D)。

### 2.6 星点设计-效应面法优化复方茵陈合剂醇沉工艺

#### 2.6.1 模型拟合

根据单因素结果分析,随着醇沉时间的增加 OD 值持续降低,所以设置醇沉时间为固定因素 8 h,分别考察药液相对密度、醇沉浓度、搅拌速度,根据星点设计-效应面法原理继续优化,分别设定 3 个自变量为相对密度(A):1.00~1.10,醇沉浓度(B):60%~90%,搅拌速度(C):1 600 r/min~2 400 r/min。输入 Design-expert8.0 软件,生成的因素表及结果分别见表 2 和表 3。

表 2 各因素水平代码及试验操作值( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

因素	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
相对密度	1.00	1.02	1.05	1.08	1.10
醇沉浓度(%)	60	66.08	75.00	83.92	90
搅拌速度(r/min)	1 600	1 762	2 000	2 238	2 400

将所得数据用 Design Expert 8.0 软件进行响应面分析,以栀子苷含量和固形物去除率总评归一值为响应值分别对各因素进行方程拟合,得到回归方程如下:

$$Y = -133.20 + 225.74 A + 0.291 2 B + 0.059 7 C - 0.135 4 AB - 0.074 0 AC - 4.990 \times 10^{-4} BC - 99.07A^2 - 6.697 \times 10^{-4} B^2 + 5.24 \times 10^{-4} C^2 (r=0.967 6)$$

对上述模型采用 F 检验进行方差分析,结果见表 4。结果表明,各变量影响总评值的主次顺序为 B>A>C,其中相对密度和醇沉浓度有极显著差异,二项式模型达极显著水平( $P<0.01$ ),失拟项结果不显著,说明该方程与实际情况拟合度良好。

#### 2.6.2 效应面优化与预测

根据回归方程分析结果,绘制三维效应面图(图 3)。相对密度和醇沉浓度均具有显著性影响,其中 OD 值随着醇沉浓度的增大而升高,而随着相对密度的增加,OD 值先升高后有下降趋势;搅拌速度影响较小,与方差分析结果一致。结果得到的最优工艺条件:药液相对密度为 1.07,醇沉浓度为 83.92%,搅拌速度为 1 762 r/min 时,总评值的预测

表 3 试验设计及测定结果( $n=3$ )

试验号	A 因素	B 因素	C 因素	OD 值
1	-1	-1	-1	0
2	+1	-1	-1	0.452 7
3	-1	+1	-1	0.563 6
4	+1	+1	-1	0.807 6
5	-1	-1	+1	0.084 5
6	+1	-1	+1	0.419 8
7	-1	+1	+1	0.477 2
8	+1	+1	+1	0.733 9
9	-1.682	0	0	0.195 5
10	+1.682	0	0	0.354 5
11	0	-1.682	0	0
12	0	+1.682	0	0.744 0
13	0	0	-1.682	0.616 5
14	0	0	+1.682	0.533 7
15	0	0	0	0.586 2
16	0	0	0	0.565 6
17	0	0	0	0.590 3
18	0	0	0	0.568 5
19	0	0	0	0.523 1
20	0	0	0	0.458 6

表 4 回归模拟方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	0.96	9	0.11	16.34	<0.000 1
A	0.18	1	0.18	27.20	0.000 4
B	0.61	1	0.61	92.94	<0.000 1
C	$4.49 \times 10^{-3}$	1	$4.49 \times 10^{-3}$	0.69	0.425 7
AB	0.010	1	0.010	1.58	0.236 9
AC	$0.370 \times 10^{-3}$	1	$0.370 \times 10^{-3}$	0.21	0.656 4
BC	$5.602 \times 10^{-3}$	1	$5.602 \times 10^{-3}$	0.86	0.375 7
A <sup>2</sup>	0.11	1	0.11	16.95	0.002 1
B <sup>2</sup>	0.041	1	0.041	6.27	0.031 2
C <sup>2</sup>	$4.950 \times 10^{-3}$	1	$4.950 \times 10^{-3}$	0.76	0.404 0
残差	0.065	10	$6.519 \times 10^{-3}$		
失拟项	0.053	5	0.011	4.18	0.071 3
纯误差	0.013	5	$2.518 \times 10^{-3}$		
总误差	1.02	19			

值为 0.791 5。为便于实际操作,确定药液相对密度为 1.07,醇沉浓度为 84%、醇沉时间为 8 h,搅拌速度为 1 760 r/min。

#### 2.6.3 验证试验

按照优选的工艺条件平行提取 3 份样品,结果总评值分别为 0.772 1,0.770 9,0.778 0,平均值为 0.773 7,RSD 为 0.49%,与预测值的偏差为 2.25%,说明建立的数学模型可靠,预测性良好。

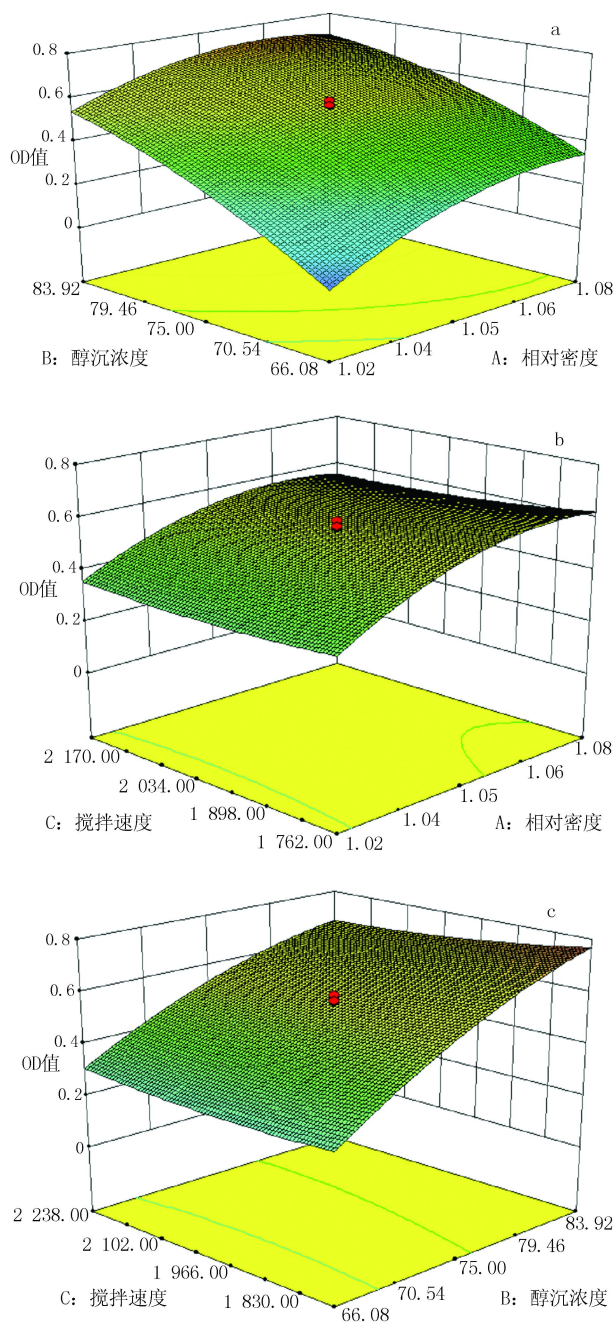


图3 各因素的三维效应面图

表5 验证实验结果

试验号	栀子苷转移率(%)	栀子苷转移率归一值	固形物去除率(%)	固形物去除率归一值	OD值
1	93.21	0.694	54.80	0.859 1	0.772 1
2	93.00	0.683 7	55.00	0.869 3	0.770 9
3	93.87	0.726 1	54.30	0.833 7	0.778 0
平均	93.36	0.701 2	54.70	0.854 0	0.773 7

### 3 讨论

#### 3.1 考察因素选择

复方茵陈合剂醇沉工艺重点考察相对密度、醇

沉浓度、醇沉时间、搅拌速度,其中相对密度的大小及搅拌速度可影响药液对乙醇的包裹程度,药液越黏稠,包裹越严重,导致醇沉效果存在较大差异。此外,醇沉浓度和醇沉时间的考察不仅可以让产品的工艺流程达到最优,还可以节约实际生产成本。

#### 3.2 指标成分的选择

预实验选择指标性成分包含复方茵陈合剂君药中的主要成分绿原酸,通过实验结果表明,绿原酸极不稳定,且绿原酸的稳定性和加样回收率均不合格。因此,绿原酸不适合作为本品的质量控制指标。臣药中的主要成分栀子苷方法学考察均符合规定,方法稳定可靠,故选择其作为本品的主要质控指标。

#### 3.3 优选方法的选择

目前复方中药制剂的提取制备工艺多采用正交设计法,该方法建立的数学模型较简单但预测性不够。因此,本实验采用星点设计-效应面法建立质控指标与关键工艺参数的数学模型,并运用该模型对最佳工艺的结果进行预测,结果显示预测值与实际值的偏差在5%以内,实验精密度高,适用于解决多变量的问题。此次为小样试验数据,可为生产提供参考,扩大生产时还需要进一步验证。

#### 3.4 实验结果处理方法

在工艺优选方面,需要兼顾多个指标,目前多采用综合评分法,但主观性太强,会影响优选条件的预测性。采用数据标准化及总评归一值法可消除多个指标间的相互影响,得到各指标的综合效应,使数据更加准确。

综上所述,本实验采用总评归一值数据处理方法,结合星点设计-效应面法优选的最佳醇沉工艺参数,不仅为控制复方茵陈合剂醇沉液生产过程提供参考,也有助于进一步提升工艺的稳定性。

### 【参考文献】

- [1] 陶艺杰. 茵陈与花茵陈的现代药理对比及临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(19): 193-194.
- [2] 曹锦花. 茵陈的化学成分和药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 489-494.
- [3] 邬博, 刘彦晶, 连丽. 大黄的药理作用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 20(13): 152-154.
- [4] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展[J]. 中国现代中药, 2010, 9(12): 7-12.
- [5] 王恩力, 董方, 姚景春. 栀子苷药理学和毒理学研究进展[J]. 中国药房, 2015, 19(26): 2730-2733.
- [6] 窦志华, 陈智娴, 王冬梅, 等. 茵陈蒿汤醇提与水提部位利胆保肝药效研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 9(19): 40-42.

(下转第354页)

皮素提取率影响的主次顺序为  $C > D > A > B$ , 即料液比影响最大, 其次为超声功率。由此可确定最佳工艺条件为  $A_1 B_2 C_2 D_2$ , 即用体积分数为 40% 的甲醇水溶液为提取剂, 以 1:40 的料液比, 在 200 W 的超声功率下超声 40 min 进行提取。

### 2.2.5 最佳工艺条件验证

精确称取车前子粉末(过 40 目筛)1.0 g 于锥形瓶中, 用 40 ml 体积分数为 40% 的甲醇溶液浸泡过夜后, 于 200 W 功率下超声 40 min, 将提取液过滤, 滤液减压浓缩成约 40 ml, 按“2.2.2”项方法计算提取率, 重复试验 3 次, 提取率分别为 0.78%、0.79%、0.79%。结果显示, 该工艺条件有很好的重现性。以本试验所确定的工艺条件, 溶剂消耗量小, 提取时间短, 相对于文献<sup>[11]</sup>报道的 0.645% 总黄酮提取率更具有专属性和高效性。

### 3 讨论

车前子中黄酮成分复杂, 有多个文献指出采用紫外分光光度法进行含量测定, 大部分黄酮类成分在 360 nm 处具有紫外吸收, 很难采用紫外法测定其中槲皮素含量, 因此, 本文采用了 HPLC 法进行分离后于 360 nm 进行检测, 结果表明本实验所建立的方法灵敏度高、重现性好、简便可靠, 可作为定量分析方法, 为今后进一步研究利用车前子中槲皮素这一有效成分提供了科学依据。

### 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 50-51.
  - [2] 季大洪, 肖振宇. 中药车前研究与应用概况[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(7): 361-362.
  - [3] ANNE BS. The traditional uses chemical constituents and bio-logical activities of plantago major L[J]. Journal of Ethno-pharmacology, 2000, 71: 1-21.
  - [4] 高明哲, 张惠, 林立, 等. 车前子苷的提取分离[J]. 辽宁中医学院学报, 2003, 5(2): 157-157.
  - [5] 王将, 郑亚军, 冯翠萍. 杏仁皮中槲皮素类化合物抗氧化性的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 78-81.
  - [6] 王桃云, 陈鹏, 董五科, 等. 超声波提取豆荚总槲皮素优化工艺与抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 114-117.
  - [7] 刘艳辉. 超声辅助萃取车前草槲皮素的工艺研究[J]. 粮油加工, 2009, 6: 133-135.
  - [8] 曹学松, 王锦军, 黄兆文. 车前子中槲皮素、木犀草、山柰酚、芹菜素的含量测定[J]. 中国药业, 2009, 18(12): 33-34.
  - [9] 钟瑞建, 俞燕, 丁剑虹, 等. 车前子中车前素的 TLC 鉴别及 HPLC 含量测定[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 715-718.
  - [10] 陈卓君, 欧阳效兴, 周捷, 等. 正交试验法优化怀枝果皮原花青素提取工艺[J]. 今日药学, 2016, 26(3): 165-168.
  - [11] 贲永光, 丘泰球, 李康, 等. 超声强化溶剂提取车前草中总槲皮素的研究[J]. 声学技术, 2009, 28(2): 133-136.
- [收稿日期] 2017-11-29 [修回日期] 2018-03-05  
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 333 页)

- [7] 蔡华丹, 张慧芹, 续畅, 等. 茵陈蒿汤水提物和醇提物活性组分的差异及对 D-GaLN 诱导大鼠急性肝损伤预防作用的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 10(19): 216-220.
- [8] 窦志华, 罗琳, 侯金燕, 等. 茵陈蒿汤保肝退黄药效部位筛选[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2371-2373.
- [9] 史亚军, 王昌利, 赵海峰, 等. 星点设计-效应面法优选止鼾颗粒成型工艺[J]. 中成药, 2014, 9(36): 1863-1866.

- [10] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 5(46): 671-678.
  - [11] 李喜香, 刘效栓, 刘维忠, 等. 姜石肠炎康颗粒醇沉工艺的星点设计-效应面法优化[J]. 时珍国医国药, 2016, 8(27): 1887-1891.
- [收稿日期] 2017-12-03 [修回日期] 2018-05-14  
[本文编辑] 陈盛新