

多指标综合评价复方大黄灌肠液提取工艺研究*

龚敏阳,伍小燕**,秦素红,陈朝,黄权芳

(广西中医药大学第一附属医院 南宁 530023)

摘要:目的:优选复方大黄灌肠液提取工艺。方法:基于大黄灌肠液组方原则,兼顾芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和枸橼酸主要指标成分含量和水溶性总煎出物,以加水量、浸泡时间、提取时间和提取次数为考察因素,采用多指标综合评分法,利用正交试验优选复方大黄灌肠液提取工艺条件。结果:最佳提取工艺为加水量为6倍,浸泡10 min,提取60 min,提取3次。结论:该工艺合理可行,稳定可控,可用于制剂的实际生产。

关键词:复方大黄灌肠液 层次分析法 多指标综合评分法 提取工艺 正交试验

doi: 10.11842/wst.2013.08.029 中图分类号:R284.2 文献标识码:A

肝性脑病由严重肝病引起,以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调综合征,其主要临床表现为意识障碍、行为失常和昏迷,中医在治疗方法上主要采用开窍醒神法^[1]。根据肝性脑病“发于肝、酿于肠、损于脑”的基本病机认识,复方大黄灌肠液由醋制大黄30 g、乌梅30 g组成,基于大肠论治的“通腑开窍”治疗理论^[2,3]的中药复方制剂。现代药理证明^[4]大黄具有抗炎抑菌作用,能明显抑制肠源性内毒素的吸收,显著降低血浆内毒素的水平。近年来研究发现^[5],大黄具有促进肝细胞再生和肝脏功能恢复的生物活性。乌梅中含有大量超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD),具有较强的抗脂质过氧化作用,能促进肠蠕动,收缩肠壁保护粘膜。体外实验表明^[6],乌梅提取液具有抗菌的作用。2药合用既能防止大黄泻下太过,又能酸化汤液,使煎剂成弱酸性,促使 $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$,而血中的氨又不断通过酸透析作用扩散到肠腔,使静脉血氨迅速降低,减少血氨的蓄积和吸收,从而起到清除内毒素、降低血氨,减轻肝性脑病的作用^[7]。

本研究综合考虑芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、

大黄酚、大黄素甲醚和枸橼酸主要指标成分含量和浸膏率对复方大黄灌肠液的重要性,基于主客观结合的层次分析法^[8,9]确立各指标的权重,以加水量、浸泡时间、提取时间和提取次数为考察因素,采用多指标综合评分法^[10],利用正交试验优选复方大黄灌肠液制备工艺条件,为规范其提取制备工艺,发挥其临床疗效,提供试验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-W420 数显三用恒温水箱(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); GH-252 电子分析天平(日本 A&D 公司); CD-UPT-II-10L 超纯水机(成都越纯科技有限公司)。

1.2 试剂

大黄(批号:1211373,产地:甘肃)购自广西南宁万宝堂药业,经广西中医药大学田辉教授鉴定为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill.的根茎; 乌梅(批号:1211344,产地:福建)购自广西南宁万宝堂药业,经广西中医药大学田辉教授鉴定为蔷薇科

收稿日期:2013-02-20

修回日期:2013-03-01

* 广西壮族自治区中医药管理局医院制剂类课题(GZYZ-10-10):大黄灌肠液的研制,负责人:伍小燕。

** 通讯作者:伍小燕,主任药师,主要研究方向:药事管理与中药制剂研发。

植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥果实。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和枸橼酸对照品 (批号分别为 :110795-201007、110757-200206、110756-200110、110796-201118、110758-201013、100396-200301), 购自中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 大黄灌肠液制备

根据单因素试验结果, 以浸泡时间(A)、加水量(B)、煎煮时间(C)和提取次数(D)为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计的工艺条件, 以处方比例称取药材醋大黄 30 g、乌梅 30 g, 按正交试验各项要求进行前处理, 滤过, 合并滤液, 定容至 100 mL, 制备大黄灌肠液样品, 见表 2。

2.2 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的含量测定^[11]

2.2.1 分析条件

色谱柱 WondaSil Superb C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液 (84:16); 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μ L。

2.2.2 对照品溶液

取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度分别为 18.00、16.24、16.40、15.84、7.92 μ g·mL⁻¹ 的混合溶液, 置 4℃ 下保存。

2.2.3 供试品溶液的制备

精密吸取“2.1”项下灌肠液 1 mL, 置于具塞锥形瓶中, 加 10% 盐酸溶液 2 mL, 超声 20 min; 置分液漏斗, 加三氯甲烷 20 mL, 摇匀, 分取三氯甲烷层, 酸液层再用三氯甲烷提取 3 次, 每次 10 mL, 合并三氯甲烷液, 减压回收溶剂至干; 残渣加甲醇溶解, 转移

至 25 mL 量瓶, 定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。按处方比例及工艺制备不含大黄的阴性样品, 同法制备阴性样品溶液。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 专属性考察

分取“2.2.2”项下混合对照品溶液、“2.2.3”项下供试品溶液、阴性样品溶液, 按上述 HPLC 分析条件测定, 进样 20 μ L, 结果表明阴性样品溶液在 5 种蒽醌类化合物峰位处均无干扰, 证明此法具有良好的专属性。见图 1。

2.2.4.2 线性关系考察

分别吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1、2、4、8 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇定容, 配置系列浓度的混合对照品溶液。取不同浓度混合对照品溶液, 进样 20 μ L, 按“2.2.1”项下条件测定, 以进样量 (μ g) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 2。

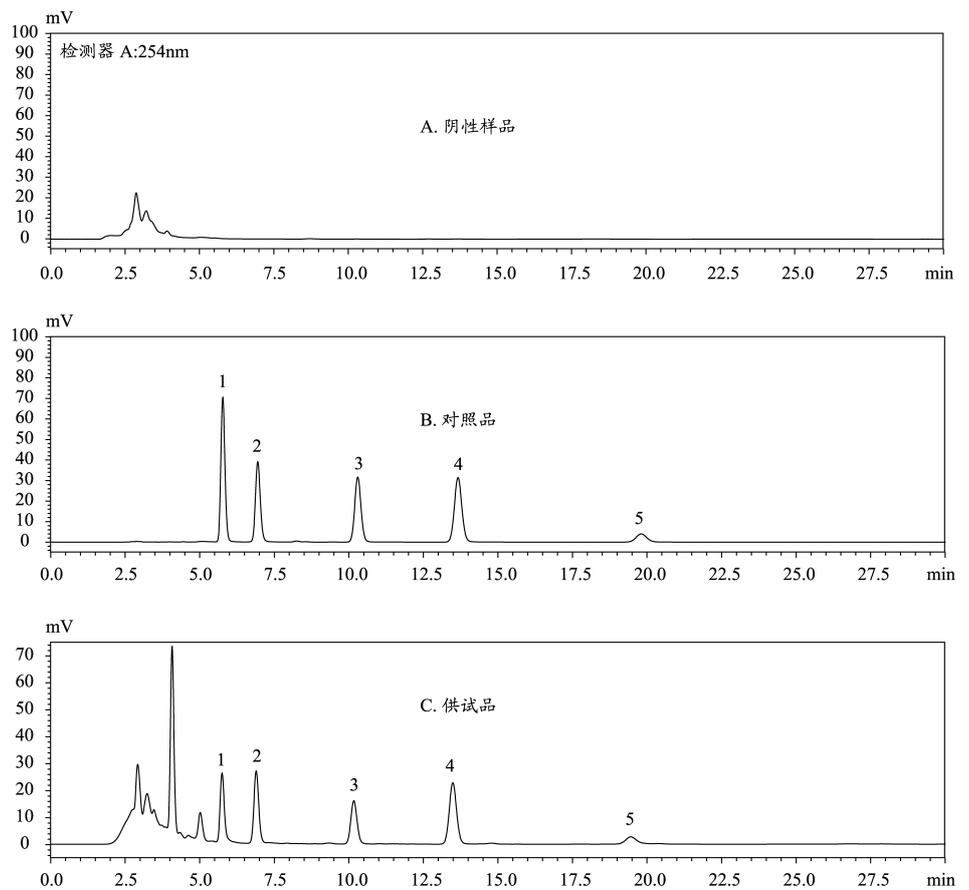


图 1 专属性考察结果

注: 1. 芦荟大黄素 2. 大黄酸 3. 大黄素 4. 大黄酚 5. 大黄素甲醚。

2.2.4.3 精密度考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液连续进样6次,每次20 μL,依法测定,记录峰面积,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.81%、1.68%、1.52%、1.76%、1.73%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.4.4 稳定性考察

取“2.2.3”项下供试品溶液,分别于室温下0、2、4、8、12、16 h进样20 μL,依法测定,记录峰面积,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚RSD分别为1.47%、1.37%、1.50%、1.96%、1.74%,表明溶液在16 h内稳定。

2.2.4.5 重复性考察

按照“2.2.3”项下供试品制备方法,平行制备大黄灌肠液样品6份,进样20 μL,依法测定,记录峰面积,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚RSD分别为1.27%、0.97%、1.39%、1.67%、1.93%,表明方法重复性良好。

2.2.4.6 加样回收率考察

精密吸取已知含量的灌肠液样品溶液1 mL,共5份,分别精密加入芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,按“2.2.3”项下处理,进样20 μL,依法测定,结果芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均加样回收率分别为97.47%、102.42%、96.73%、96.49%、96.02%,RSD分别为2.11%、2.25%、0.81%、1.98%、0.40%。

2.2.5 样品测定结果

精密吸取“2.1”项下灌肠液正交试验样品,参照“2.2.3”项下方法分别制备同时测定芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的供试品溶液,结果见表2。

2.3 枸橼酸的含量测定^[11,12]

2.3.1 分析条件

色谱柱:WondaSil Superb C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(5:95);检测波长:214 nm;流速:0.5 mL·min⁻¹;柱温:30℃;进样量:5 μL。

2.3.2 对照品溶液

取枸橼酸对照品适量,精密称定,加水制成浓度为0.442 mg·mL⁻¹的溶液,置4℃下保存。

2.3.3 供试品溶液的制备

精密吸取“2.1”项下灌肠液1 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,加入10 mL甲醇溶解,超声20 min,过滤,滤液蒸干,残渣加水溶解,转移至50 mL容量瓶,定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。按处方比例及工艺制备不含乌梅的阴性样品,同法制备阴性溶液。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 专属性考察

分取“2.3.2”项下混合对照品溶液、“2.3.3”项下供试品溶液、阴性样品溶液,按上述HPLC分析条件测定,进样5 μL,结果表明阴性样品溶液在枸橼酸峰位处无干扰,见图2,证明此法具有良好的专属性。

2.3.4.2 线性关系考察

分别吸取“2.3.2”项下对照品溶液0.5、1、2、4、6、8 mL置于10 mL容量瓶中,加入超纯水定容,配置系列浓度的对照品溶液。取不同浓度混合对照品溶液,进样20 μL,按上述HPLC分析条件测定,以进样量(μg)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线, $Y=99\ 362X-374.2$ ($r=0.999\ 9$),线性范围0.442~7.072 μg。

2.3.5 样品测定结果

精密吸取“2.1”项下灌肠液正交试验样品,参照“2.3.3”项下方法分别制备测定枸橼酸的供试品溶液,结果见表2。

2.4 浸膏率的测定

精密称取上述滤液20 mL,分别置于干燥恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣于105℃烘箱中干燥3 h,得干浸膏,称定,按下式公式计算浸膏率:浸膏率= $(VW_1/20W) \times 100\%$ 。式中,V为每份药材提取液总体积;W₁为20 mL提取液中干浸膏重量;W为每份药材的重量。结果见表2。

表1 线性关系试验结果

对照品	线性范围/μg	回归方程	r
芦荟大黄素	0.009 00~0.288 0	$Y=4.615 \times 10^6 X + 6\ 285$	0.999 9
大黄酸	0.008 12~0.259 8	$Y=3.47 \times 10^6 X + 2\ 483$	0.999 9
大黄素	0.008 20~0.262 4	$Y=3.45 \times 10^6 X + 3\ 497$	0.999 6
大黄酚	0.007 92~0.253 4	$Y=4.195 \times 10^6 X + 6\ 709$	0.999 8
大黄素甲醚	0.003 96~0.126 7	$Y=1.54 \times 10^6 X + 932.5$	0.999 8

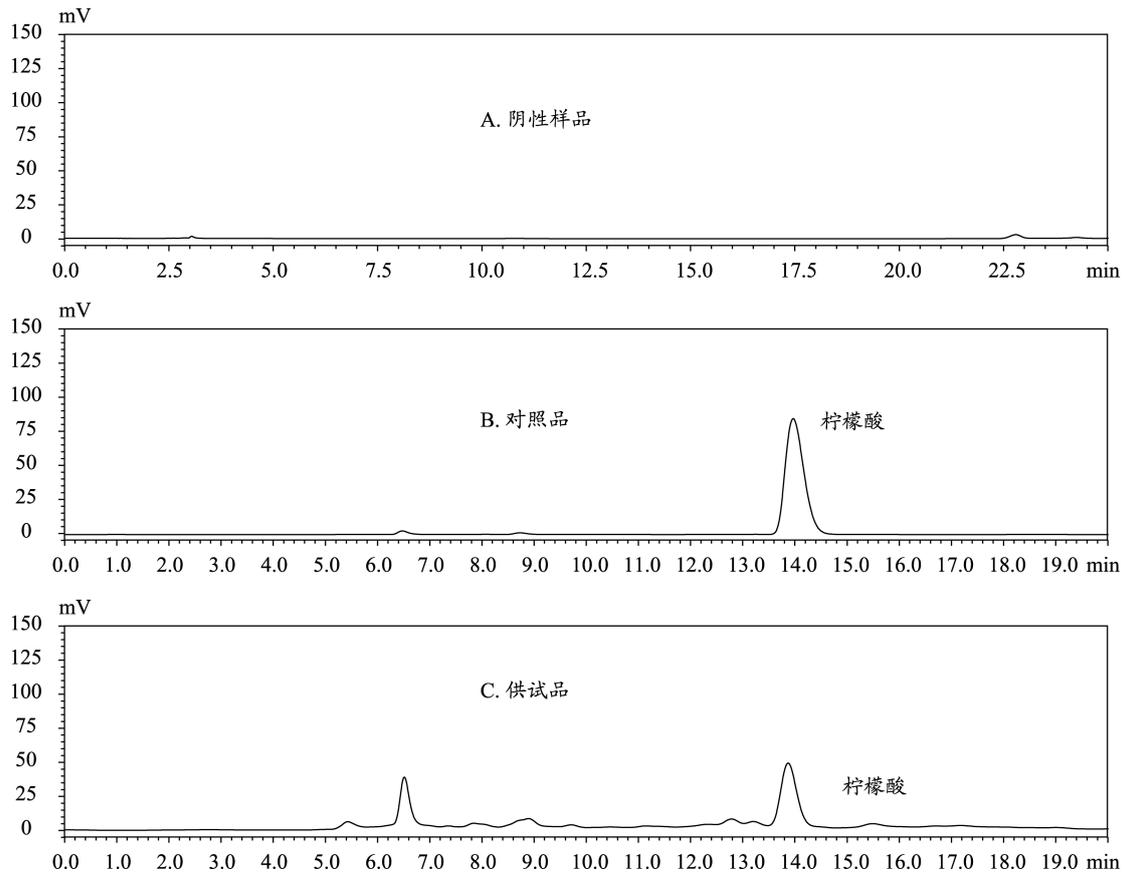


图 2 专属性考察结果

表 2 正交试验结果表

试验号	A/min	B/倍	C/ min	D/次	芦荟大黄素	大黄酸/%	总量/%	枸橼酸/%	浸膏率/%	综合评分
1	10	6	20	1	0.031 6	0.061 5	0.261 5	9.44	24.63	75.84
2	10	8	40	2	0.039 1	0.068 0	0.275 7	7.08	26.47	85.52
3	10	10	60	3	0.044 5	0.079 8	0.307 0	5.21	23.24	99.19
4	30	8	60	1	0.041 6	0.075 5	0.298 1	10.14	27.72	95.41
5	30	10	20	2	0.038 9	0.066 7	0.271 3	6.17	23.89	81.39
6	30	6	40	3	0.035 0	0.062 4	0.266 5	6.33	23.41	79.53
7	60	10	40	1	0.041 2	0.072 9	0.294 6	9.56	24.17	94.31
8	60	6	60	2	0.039 3	0.068 0	0.277 0	10.32	22.32	88.62
9	60	8	20	3	0.038 7	0.065 9	0.270 8	5.32	23.69	82.27
K1	86.850	88.520	81.330	79.833						
K2	85.443	85.177	87.733	86.453						
K3	88.400	86.997	91.630	94.407						
R	2.957	3.343	10.300	14.574						

2.5 权重系数的确定^[9,11]

采用归一化法解决指标间量纲不一致问题,本研究综合考虑各指标之于灌肠液针对肝性脑病的治疗机制的重要性差异,根据层次分析法原理,运用 DPS 软件,主客观结合确定各个指标的权重系数,综合评分后进行统计分析。对灌肠液制备工艺总评价目标通过指标性成分、总煎出物这个次级目标反映,指标性成分包括大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚总量及枸橼酸 3 个目标来反映。建立评价目标树,确定权重系数分别为芦荟大黄素 0.173 1,大黄酸 0.208 6,总量 0.411 4,枸橼酸 0.155 6,总煎出物 0.051 4。经一致性检验^[9],判别矩阵的一致性比例 $CR < 0.10$,表明权重系数合理有效。

2.7 正交试验结果

根据正交试验设计原理,以浸泡时间(A)、加水量(B)、煎煮时间(C)和提取次数(D)为考察因素,考察芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及枸橼酸主要指标成分含量和浸膏率,采用多指标综合评分法,优选复方大黄灌肠液提取工艺条件。结果见表 2、表 3。

各指标综合评分 $V_i = v_{i1} + v_{i2} + v_{i3} + \dots + v_{i6}$; $w_j = 100 \times w_j \times m_{ij} / m_{jmax}$; V_i 为第 i 次处理的综合评分, m_{ij} 为指标 j 在第 i 次处理中的量, m_{jmax} 为指标 j 在所有处理中的最大值, w_j 为指标 j 的归一化权重系数。直观分析结果表明,以综合评分为评价指标,在所选的因素水平范围内,提取次数对灌肠液各指标的提取效果影响最大,煎煮时间影响稍小,加水量和浸泡时间影响最小。方差分析结果表明,提取次数和煎煮时间对综合评分的影响均达到显著水平,具有统计学意义($P < 0.01$),加水量和浸泡时间影响不显著。选取最佳提取工艺为 $A_1B_1C_3D_3$,即浸泡时间 10 min、6 倍加水量、煎煮 60 min 和提取 3 次。

2.10 验证试验

优选工艺与正交试验的比较,本研究最终选取

表 3 方差分析

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	13.123	2	1.000	
B	16.811	2	1.281	
C	162.277	2	12.366	*
D	319.422	2	24.344	*

的提取条件为 $A_1B_1C_3D_3$,试验结果为芦荟大黄素 0.043 9%,大黄酸 0.077 9%,总量 0.310 2%,枸橼酸 7.11%,浸膏率 21.12%,综合评分 99.61;其最终选取实验条件与第 3 组相近,从综合评分结果可以看出,该条件下的综合评分最高,说明选取结果合理。

3 讨论

复方大黄灌肠液中大黄作为君药,主要含蒽醌类衍生物,现代药理证明其有抗炎抑菌作用^[4],能明显抑制肠源性内毒素的吸收,显著降低血浆内毒素的水平;处方中乌梅主要成分熊果酸等有机酸可溶于水^[6],乌梅具有较强的抗脂质过氧化作用,能促进肠蠕动,收缩肠壁保护粘膜;同时其水溶性总煎出物对组方的功效具有一定的表征性。本研究以芦荟大黄素、大黄酸以及总量、枸橼酸和水溶性总煎出物 5 个指标的量为考察对象,综合考虑其之于复方功效的力度,采用主客观结合的层次分析法、多指标加权综合评分法^[8,10]优选了复方大黄灌肠液的制备工艺,优选的最佳提取工艺具有良好的连续性、稳定性和可操作性,可用于该制剂的实际生产。

参考文献

- 1 毛德文,邱华,韦艾凌.肝性脑病中医证治研究.天津中医药, 2007, 24(3):225~227.
- 2 黄古叶,毛德文,胡国平,等.大黄煎剂配合西药治疗慢性重型肝炎肠源性内毒素症疗效观察.辽宁中医杂志,2006, 33(12):1588~1589.
- 3 王振常,毛德文,黄古叶,等.加用大黄煎剂灌肠治疗重型肝炎并发肝性脑病疗效观察.广西中医学院学报, 2006, 9(4):7~8.
- 4 庄江能.大黄的主要成分及其临床药理研究进展.西南军医, 2009, 11(5):931~933.
- 5 孟珂伟,潘承恩,吴胜利,等.大黄素及全血供对减体积大鼠肝移植术后肝再生的影响.中华实用中西医杂志, 2005, 18(1):4~6.
- 6 沈红梅,乔传卓,苏中武,等.乌梅的化学药理及临床研究进展.中成药, 1993, 15(7):35~36.
- 7 刘树权,关欣,高玉飞,等.开窍通腑化浊法治疗急性缺血性中风的机理探讨.辽宁中医杂志, 2007, 34(3):283~284.
- 8 任爱农,卢爱玲,田耀洲,等.层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究.中国中药杂志, 2008, 33(4):372~374.
- 9 周仁郁.SAS 统计软件.北京:中国中医药出版社,2006.
- 10 王冬梅,吕振江,王永红,等.多指标综合评价玉竹蜜蒸炮制工艺研究.中草药,2012,43(10):1934~1938.
- 11 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2010 年版一部.化学工业出版社,2010.
- 12 唐慧慧,蔡清宇,毛翼. HPLC 法测定净乌梅及乌梅炭中柠檬酸和苹果酸的含量.中药材, 2007, 30(1):52~54.

Study on Extraction Techniques of Compound *Rhubarb* Enema by Multi-index Comprehensive Evaluation

Gong Minyang, Wu Xiaoyan, Qin Suhong, Chen Chao, Huang Quanfang

(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

Abstract: This study was aimed to optimize extraction techniques of Compound *Rhubarb* Enema. Based on the formula principle of Compound *Rhubarb* Enema, effects of the amount of water, soaking time, extraction time and frequency on each index were studied. The content of Aloe-emodin, Rhein, Emodin, Chrysophanol, Physcion, Citric acid, and water soluble substance were taken into consideration. The best extraction condition was optimized by using the orthogonal test coupled with the multi-index comprehensive evaluation. The results showed that the best condition was soaking for 10 min, extraction time for 60 min, extraction for 3 times; and 6 times of water was added. It was concluded that this preparation techniques were feasible and reliable for the manufacturing process of Compound *Rhubarb* Enema.

Keywords: Compound *Rhubarb* Enema, analytic hierarchy process, multi-index comprehensive evaluation, extraction techniques, orthogonal test

(责任编辑:叶丽萍 张志华,责任译审:王 晶)