

桂枝芍药知母汤提取工艺的优化[△]

郑淑晶*, 王佳, 胡德, 李阳, 冷向阳, 王淑敏[#](长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)02-0179-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.02.09



摘要 目的 优化桂枝芍药知母汤(GSZD)的提取工艺。方法 采用高效液相色谱法同时测定GSZD中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚9个成分的含量。在单因素实验的基础上,以料液比、提取次数、提取时间为考察因素,以上述9个成分含量和干膏得率作为评价指标,采用层次分析法和熵权法确定各指标的复合权重并计算综合评分,以Box-Behnken响应面法优化GSZD的提取工艺参数并验证。结果 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚含量和干膏得率的复合权重分别为0.12、0.10、0.05、0.12、0.14、0.06、0.13、0.15、0.10、0.03。GSZD的最优提取工艺为料液比1:14(g/mL)、提取2次、提取时间3.0 h;3次验证实验的综合评分均值为95.879,RSD为0.50%(n=3),与预测综合评分(94.328)的偏差为1.64%。结论 本研究确定了GSZD的最优提取工艺。

关键词 桂枝芍药知母汤;提取工艺;层次分析法;熵权法;权重分析;Box-Behnken响应面法

Optimization of extraction technology of Guizhi shaoyao zhimu decoction

ZHENG Shujing, WANG Jia, HU De, LI Yang, LENG Xiangyang, WANG Shumin (School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction technology of Guizhi shaoyao zhimu decoction (GSZD). **METHODS** The contents of 9 components in GSZD were determined by HPLC, such as ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, mangiferin, paeoniflorin, liquiritin, 5-O-methylvisammioside, glycyrrhizic acid, cinnamic acid, 6-gingerol. On the basis of single factor experiment, taking material-liquid ratio, extraction times and extraction time as inspection factors, taking the contents of above 9 components and the yield of dry extract as evaluation indicators, the analytic hierarchy process and entropy weight method were used to determine the composite weight of each index and calculate the comprehensive score; the extraction technology parameters of GSZD were optimized by Box-Behnken response surface method, and the validation tests were conducted. **RESULTS** The composite weight of the contents of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, mangiferin, paeoniflorin, glycyrrhizin, 5-O-methylvisamidol, glycyrrhizinate, cinnamic acid, 6-gingerol and the yield of dry extract were respectively 0.12, 0.10, 0.05, 0.12, 0.14, 0.06, 0.13, 0.15, 0.10, 0.03. The optimal extraction technology of GSZD is that the ratio of material to liquid is 1:14(g/mL), extraction is 2 times, and the extraction time is 3.0 h; average comprehensive score of the 3 verification tests was 95.879, and RSD was 0.50% (n=3), the deviation from the predicted comprehensive score (94.328) was 1.64%. **CONCLUSIONS** In this study, the optimal extraction technology of GSZD is determined.

KEYWORDS Guizhi shaoyao zhimu decoction; extraction technology; analytic hierarchy technology; entropy weight method; weight analysis; Box-Behnken response surface method

桂枝芍药知母汤(Guizhi-shaoyao-zhimu decoction, GSZD),由桂枝、芍药(白芍)、甘草、麻黄、生姜、白术、知母、防风、(炮)附子组成,始载于《金匱要略》,曰“诸肢节疼痛,身体魁羸,脚肿如脱,头眩短气,温温欲吐,桂枝芍药知母汤主之”^[1]。周扬俊等^[2]于《金匱玉函经二注》中提及:“桂枝治风,麻黄治寒,白术治湿,故以桂枝、麻黄、白

术为君药;防风佐桂,附子佐麻黄、白术,故以防风、附子为佐药。其芍药、生姜、甘草亦和发其营卫,如桂枝汤例也;知母治脚肿,引诸药祛邪益气力,故以芍药、生姜、甘草、知母为臣药;附子行药势,为开痹大剂。”该方的主要功效为祛风除湿、温经散寒、滋阴清热,可用于临床治疗类风湿性关节炎、膝骨性关节炎、痛风性关节炎及腰椎间盘突出等病症^[1]。有研究指出,该方的主要作用机制包括抑制滑膜炎症增生、减少软骨破坏和骨损伤、抑制炎症细胞侵袭、调节免疫系统使其维持平衡等^[3]。药理学研究证实,桂枝中所含的肉桂酸具有抑菌、利胆、抗突变、抗侵袭和抑制肺癌细胞恶性表达等药理作用^[4];白芍中的芍药苷可以通过抑制单核细胞来减慢炎症的反应

△ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20190304059YY)

* 硕士研究生。研究方向:中药健康产品研究与开发。电话:0431-86172786。E-mail:540821051@qq.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制、中药分析、药用微生物物质基础与药效学。电话:0431-86172786。E-mail:wangsm@ccucm.edu.cn

速率,从而发挥抗炎作用^[5]。王晓燕^[6]研究发现,灌胃桂枝与白芍水煎液能够明显减轻鸡蛋清所致的大鼠足跖肿胀,抑制二甲苯所致的小鼠耳肿胀,抗炎效果十分明显。盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱为麻黄的重要成分,前者发挥镇痛作用,后者发挥抗炎作用^[7]。芒果苷为知母的主要活性成分,具有缓解喘气不舒、抗自由基氧化、抗炎、抑菌和调节免疫等作用^[8-10]。有研究表明,甘草中的甘草苷可抑制氧化应激导致的细胞凋亡,甘草酸则可通过抑制氧化损伤来减少炎症因子的产生^[11]。6-姜酚是生姜的主要活性成分,极具药用价值,研究发现其有显著的抗炎、止痛、强心、抗氧化作用^[12]。薛宝云等^[13]研究发现,防风中的5-*O*-甲基维斯阿米醇苷能降低发热大鼠的体温,且解热、镇痛、抗炎及抗血小板聚集作用较明显。基于此,本研究以盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸、甘草酸、6-姜酚的含量和干膏得率作为提取工艺的评价指标,采用层次分析法和熵权法计算复合权重,并结合Box-Behnken响应面法优化GSZD的提取工艺,旨在为后续GSZD的研究开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC-20AT型高效液相色谱系统及其配备的SPD-M20A型光电二极管阵列检测器、SIL-20A型自动进样器(日本Shimadzu公司),MS105DU型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),GXZ-9140MBE型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),TGL16M型高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),RE-52AA型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)等。

1.2 主要药品与试剂

知母饮片、甘草饮片、炮附子(黑顺片)饮片(批号分别为38420007、05620036、D01020009)均购自河北仁心药业有限公司;桂枝饮片、白芍饮片、白术饮片、防风饮片(批号分别为200403、200402、200401、200302)均购自安国市安兴中药饮片有限公司;麻黄饮片(批号201911004)购自内蒙古普康药业有限公司;生姜饮片(批号201022)购自河北楚风中药饮片有限公司。上述所有饮片经长春中医药大学王淑敏教授鉴定,均为真品且符合2020年版《中国药典》(一部)各药项下标准^[14]。甘草苷、甘草酸、芍药苷、6-姜酚、芒果苷、肉桂酸、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号分别为DST200412-009、DSTDG000601、DSTDS007001、DST190716-027、DST190305-031、DST190413-045、DST190213-006,纯度均为98.0%)均购自成都德斯特生物技术有限公司;盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品(批号分别为171241-201809、171237-201809,纯度分别为100.0%、99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯)购自美国Sigma公司;其

余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 GSZD的制备

称取桂枝12 g、白芍9 g、知母12 g、防风12 g、麻黄6 g、白术15 g、生姜15 g、甘草6 g、炮附子6 g,加水1 400 mL,浸泡30 min,武火煮沸,转文火微沸,煎煮两次,每次60 min,合并两次滤液,浓缩至100 mL,即得(每1 mL中含生药0.93 g)。

2.2 多指标成分的含量测定

采用高效液相色谱法进行测定。

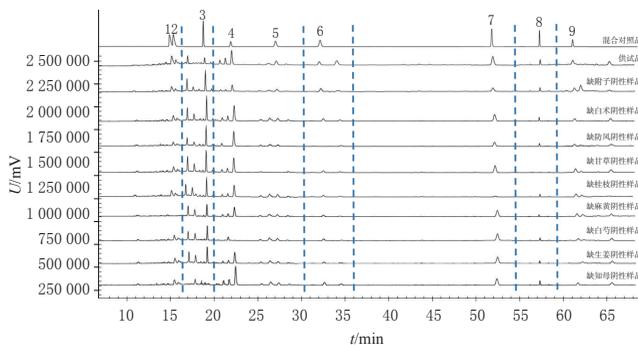
2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚对照品各适量,加甲醇溶解,制成上述各对照品质量浓度分别为2.016、2.024、2.048、4.028、2.026、2.016、2.002、2.000、0.203 mg/mL的单一对照品溶液。取上述各单一对照品溶液适量,加甲醇稀释,制成上述各对照品质量浓度分别为201.6、202.4、204.8、402.8、202.6、201.6、200.2、200.0、20.3 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取GSZD 1 mL,加入4倍体积的甲醇,涡旋混匀,10 000 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照GSZD处方量,分别称取缺麻黄、缺知母、缺白芍、缺甘草、缺防风、缺桂枝、缺生姜、缺附子、缺白术的阴性样品,按“2.1”项下方法进行提取、浓缩,再按“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.2.4 色谱条件与系统适用性试验 以Waters XSelect HSS T3(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min, 95.5% B; 5~8 min, 95.5% B→91% B; 8~13 min, 91% B→82% B; 13~28 min, 82% B→80% B; 28~35 min, 80% B→77% B; 35~43 min, 77% B→72% B; 43~51 min, 72% B→57% B; 51~59 min, 57% B→30% B; 59~64 min, 30% B→5% B; 64~70 min, 5% B);流速为1.0 mL/min;检测波长为210 nm(0~17 min, 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱)、254 nm(17~20 min, 芒果苷)、235 nm(20~29 min, 芍药苷、甘草苷)、254 nm(29~33 min, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷)、280 nm(33~52 min, 肉桂酸)、235 nm(52~58 min, 甘草酸)、280 nm(58~62 min, 6-姜酚);柱温为35 ℃;进样量为10 μL。取“2.2.1”~“2.2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进样测定,结果显示,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸、甘草酸、6-姜酚色谱峰峰形良好,理论板数按甘草苷峰计不低于30 000,分离度均大于1.5,阴性样品对测定无干扰,色谱图见图1。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照



1: 盐酸麻黄碱; 2: 盐酸伪麻黄碱; 3: 芒果苷; 4: 芍药苷; 5: 甘草苷; 6: 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 7: 肉桂酸; 8: 甘草酸; 9: 6-姜酚

图1 盐酸麻黄碱等9个成分定量分析系统适用性试验的高效液相色谱图

品溶液,按“2.2.4”项下色谱条件分别进样1、4、6、8、10、12、14、16 μL ,记录峰面积。以各待测成分进样量(x , μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 盐酸麻黄碱等9个成分的回归方程、线性范围

待测成分	回归方程	R^2	线性范围/ μg
盐酸麻黄碱	$y=207\ 308x-4\ 442.1$	0.999 8	0.201 6~3.225 6
盐酸伪麻黄碱	$y=218\ 744x-6\ 293.7$	0.999 9	0.202 4~3.238 4
芒果苷	$y=390\ 491x-11\ 090$	0.999 9	0.204 8~3.276 8
芍药苷	$y=125\ 123x-9\ 414.9$	0.999 9	0.402 8~6.444 8
甘草苷	$y=213\ 765x-223.47$	0.999 9	0.202 6~3.241 6
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$y=189\ 381x-3\ 782.6$	1.000 0	0.201 6~3.225 6
甘草酸	$y=14\ 140x+792.8$	0.999 3	0.200 2~3.203 2
肉桂酸	$y=828\ 333x-5\ 586.4$	0.999 9	0.200 0~3.200 0
6-姜酚	$y=54\ 213x-25.522$	0.999 8	0.020 3~0.324 8

2.2.6 定量限与检测限考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,以甲醇进行倍比稀释,再按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,以信噪比3:1、10:1分别计算检测限、定量限。结果见表2。

表2 盐酸麻黄碱等9个成分的检测限、定量限

待测成分	检测限/ μg	定量限/ μg	待测成分	检测限/ μg	定量限/ μg
盐酸麻黄碱	0.004 6	0.015 4	5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.004 8	0.016 1
盐酸伪麻黄碱	0.004 4	0.014 5	甘草酸	0.004 5	0.015 2
芒果苷	0.000 8	0.002 7	肉桂酸	0.001 2	0.004 1
芍药苷	0.003 6	0.011 9	6-姜酚	0.003 0	0.010 1
甘草苷	0.003 7	0.012 3			

2.2.7 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL ,按“2.2.4”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚峰面积的RSD分别为0.52%、1.44%、1.84%、0.51%、0.35%、1.59%、1.03%、1.48%、0.87% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、肉桂酸、甘草酸、6-姜酚峰面积的RSD分别为1.64%、

1.96%、1.40%、1.26%、1.58%、1.43%、1.47%、1.07%、1.70% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,再按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算含量。结果显示,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚含量的RSD分别为2.32%、2.20%、2.35%、2.28%、2.14%、2.22%、1.89%、2.05%、2.34% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取已知含量的GSZD 6份,各1 mL,分别加入一定量的单一对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚的平均加样回收率分别为96.90%、99.83%、99.28%、100.72%、101.15%、96.42%、101.47%、98.25%、99.09%、1.33%、0.99%、1.24%、1.43% ($n=6$),表明该方法回收率良好。

2.3 干膏得率的测定

精密吸取GSZD 20 mL,置于已干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干后,再于105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥3 h,取出,置于干燥器中冷却30 min,精密称定质量,计算干膏得率:干膏得率(%)=干膏质量/药材总量 \times 100%。

2.4 指标权重的确定

2.4.1 层次分析法确定权重系数 根据“君臣佐使”组方规律,将9个成分含量和干膏得率作为权重指标予以量化,即将10个指标分为4个层次,确定各指标的先后顺序如下:盐酸麻黄碱=盐酸伪麻黄碱=肉桂酸>芍药苷=芒果苷=甘草苷=甘草酸=6-姜酚>5-O-甲基维斯阿米醇苷>干膏得率,构建成对比较的优先判断矩阵,并赋予各指标相对评分,详见表3。

表3 盐酸麻黄碱含量等10个指标成对比较的优先判断矩阵及相对评分

权重指标	盐酸麻黄碱含量	盐酸伪麻黄碱含量	肉桂酸含量	芍药苷含量	芒果苷含量	甘草苷含量	甘草酸含量	6-姜酚含量	5-O-甲基维斯阿米醇苷含量	干膏得率
盐酸麻黄碱含量	1	1	1	3	3	3	3	3	5	7
盐酸伪麻黄碱含量	1	1	1	3	3	3	3	3	5	7
肉桂酸含量	1	1	1	3	3	3	3	3	5	7
芍药苷含量	1/3	1/3	1/3	1	1	1	1	1	3	5
芒果苷含量	1/3	1/3	1/3	1	1	1	1	1	3	5
甘草苷含量	1/3	1/3	1/3	1	1	1	1	1	3	5
甘草酸含量	1/3	1/3	1/3	1	1	1	1	1	3	5
6-姜酚含量	1/3	1/3	1/3	1	1	1	1	1	3	5
5-O-甲基维斯阿米醇苷含量	1/5	1/5	1/5	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1	3
干膏得率	1/7	1/7	1/7	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/3	1

根据表3结果,盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、肉桂酸、芍药苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸、6-姜酚、5-O-甲基维斯

阿米醇苷含量和干膏得率10个指标经层次分析后得到的权重系数(A_j)分别为0.193 1、0.193 1、0.193 1、0.073 9、0.073 9、0.073 9、0.073 9、0.032 6、0.018 5,一致性比率(consistent ratio, CR)为0.013 4<0.10,各项指标的优先判断矩阵具满意的一致性,表明权重系数有效^[15]。

2.4.2 熵权法确定权重系数 熵权法是将每个评价指标作为1个随机变量,计算该指标的熵权系数。确定权重的计算步骤如下:(1)原始数据矩阵归一化,建立原始评价指标矩阵;设 m 个评价指标 n 个评价对象的原始数据矩阵为 $A=(a_{ij})_{mn}$,对其归一化后得到 $R=(X_{ij})_{mn}$,对数值大者为优的指标而言,按照以下公式归一化:

$$X_{ij}=(a_{ij}-\frac{\min}{j}\{a_{ij}\})/(\frac{\max}{j}\{a_{ij}\}-\frac{\min}{j}\{a_{ij}\})$$

中, X_{ij} 为第 i 次实验时第 j 个评价指标的取值, $i=1,2,3,\dots,m;j=1,2,3,\dots,n$ 。(2)将原始数据矩阵 $(X_{ij})_{mn}$ 转换为概率矩阵 $(P_{ij})_{mn}$;在信息熵公式中 P_i 为某个信息的概率,满足 $0\leq P_i\leq 1$,因此必须先对矩阵 $(X_{ij})_{mn}$ 进行归一化处理,经处理后的矩阵即可视为指标的概率矩阵。公式如下: $P_{ij}=X_{ij}/\sum_{j=1}^n X_{ij}$ (式中, P_{ij} 为第 j 次实验在第 i 个评价指标下的概率)。(3)计算指标的熵值,确定第 i 个评价指标的信息熵(H_i)。公式如下: $H_i=-k\sum_{j=1}^n P_{ij}\ln P_{ij}$, $k=1/\ln n$ 。(4)计算指标的熵权系数(W_j)。公式如下: $W_j=1-H_j/\sum_{i=1}^m (1-H_i)$, $\sum_{j=1}^m W_j=1,0\leq W_j\leq 1$ 。由此公式可知, X_{ij} 值相差越大时, H_i 越小,表明提供的信息量越大,其权重值越大,该指标就越重要^[16]。结果见表4。

表4 盐酸麻黄碱含量等10个指标的信息熵和熵权系数

指标	H_i	W_j	指标	H_i	W_j
盐酸麻黄碱含量	0.960	0.051	甘草苷含量	0.882	0.149
盐酸伪麻黄碱含量	0.967	0.042	甘草酸含量	0.890	0.140
肉桂酸含量	0.950	0.063	6-姜酚含量	0.911	0.113
芍药苷含量	0.900	0.128	5-O-甲基维斯阿米醇苷含量	0.885	0.146
芒果苷含量	0.956	0.056	干膏得率	0.912	0.111

2.4.3 计算复合权重 通过层次分析法和熵权法分别计算得到盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、肉桂酸、芍药苷、芒果苷、甘草苷、甘草酸、6-姜酚、5-O-甲基维斯阿米醇苷含量和干膏得率的相关权重,并参考下式计算10个指标

的复合权重(ω_j): $\omega_j=W_jA_j/\sum_{i=1}^m W_jA_j$ 。结果显示,上述10个指标的复合权重分别为0.12、0.10、0.15、0.12、0.05、0.14、0.13、0.10、0.06、0.03。

2.5 单因素实验

2.5.1 料液比的考察 称取GSZD处方量药材,在提取时间2 h、提取1次的条件下,分别对料液比1:8、1:10、1:12、1:14、1:16、1:18(g/mL)进行考察,计算综合评分。公式如下:综合评分=100 $\sum_{i=1}^m (\omega_j X_j)/X_{jmax}$ (式中, X_j 为第 j 个评价指标的数值, X_{jmax} 为第 j 个评价指标中的最大值)。结果显示,随着溶剂的增加,综合评分呈先升高后降低的趋势,当料液比为1:12时综合评分最高,故选择料液比为1:12,详见图2A。

2.5.2 提取次数的考察 称取GSZD处方量药材,在提取时间2.0 h、料液比1:12(g/mL)的条件下,分别对提取次数1、2、3次进行考察,按“2.5.1”项下方法计算综合评分。结果显示,随着提取次数的增加,综合评分呈先升高后降低的趋势,当提取次数为2次时,综合评分最高,表明此时药材被提取得较完全,若再继续提取,综合评分反而降低,故选择提取次数为2次,详见图2B。

2.5.3 提取时间的考察 称取GSZD处方量药材,在料液比1:12(g/mL)、提取2次的条件下,分别对提取时间1、1.5、2.0、2.5、3.0 h进行考察,按“2.5.1”项下方法计算综合评分。结果显示,随着提取时间的延长,综合评分呈先升高后降低的趋势,当提取时间为2.5 h时,综合评分最高,故选择提取时间为2.5 h,详见图2C。

2.6 Box-Behnken响应面优化实验

2.6.1 实验安排与结果 根据单因素实验结果,以料液比(A ,g/mL)、提取次数(B ,次)、提取时间(C ,h)为自变量,以综合评分(Y)为响应值,利用Design-Expert 8.0.6.1软件设计3因素3水平的响应面实验以优化GSZD提取工艺,其中 A 分别为1:10、1:12、1:14(g/mL), B 分别为1、2、3次, C 分别为2.0、2.5、3.0 h。响应面实验安排与结果见表5。

2.6.2 数据处理与分析 运用Design-Expert 8.0.6.1软件对实验结果进行分析,得到各因素与综合评分之间的二次多元回归方程为 $Y=76.63+10.26A+11.21B-1.55C+1.14AB+3.50AC+7.23BC-0.57A^2-19.92B^2+1.24C^2$ 。进

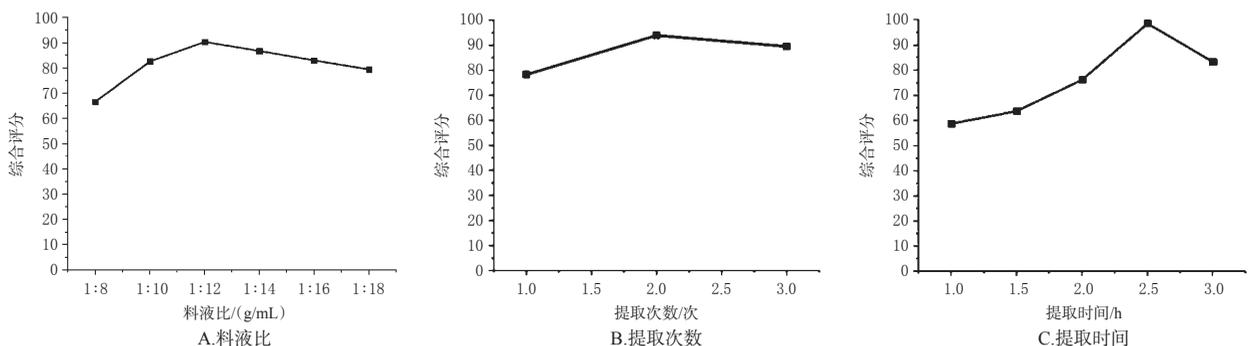


图2 GSZD提取工艺优化的单因素实验结果

表5 GSZD提取工艺优化的响应面实验安排与结果

序号	A/ (g/mL)	B/ 次	C/ h	盐酸麻黄碱 含量/(mg/g)	盐酸伪麻黄碱 含量/(mg/g)	肉桂酸含量/ (mg/g)	芍药苷含量/ (mg/g)	芒果苷含量/ (mg/g)	甘草苷含量/ (mg/g)	甘草酸含量/ (mg/g)	6-姜酚含量/ (mg/g)	5-O-甲基维斯阿米醇苷 含量/(mg/g)	干膏得率/ %	综合评分
1	1:12	2	2.5	0.812	0.328	0.579	2.832	0.674	0.410	0.889	0.048	0.223	30.7	77.634
2	1:10	1	2.5	0.327	0.157	0.263	1.511	0.386	0.188	0.348	0.016	0.125	16.1	35.717
3	1:10	2	2.0	0.691	0.298	0.535	2.583	0.819	0.319	0.767	0.042	0.216	26.1	69.134
4	1:10	3	2.5	0.557	0.202	0.457	2.017	0.510	0.410	0.619	0.043	0.172	30.1	60.266
5	1:12	2	2.5	0.560	0.397	0.739	2.401	0.691	0.379	0.770	0.038	0.295	26.0	74.959
6	1:14	2	2.0	0.806	0.327	0.597	2.885	0.840	0.448	1.130	0.063	0.397	32.7	86.877
7	1:12	2	2.5	0.764	0.289	0.600	2.774	0.653	0.366	0.816	0.047	0.226	29.4	73.795
8	1:10	2	3.0	0.617	0.292	0.489	2.465	0.613	0.272	0.568	0.040	0.175	22.8	60.717
9	1:12	2	2.5	0.793	0.217	0.710	2.804	0.553	0.373	0.847	0.059	0.231	28.8	75.775
10	1:12	3	2.0	0.581	0.217	0.473	2.314	0.571	0.320	0.707	0.042	0.287	22.3	62.125
11	1:14	2	3.0	0.897	0.423	0.787	1.715	0.709	0.446	1.174	0.121	0.310	29.6	92.475
12	1:12	2	2.5	0.745	0.300	0.585	2.821	0.694	0.438	1.036	0.058	0.324	29.7	80.983
13	1:12	3	3.0	0.733	0.279	0.574	2.576	0.713	0.398	0.758	0.043	0.200	29.8	71.801
14	1:12	1	3.0	0.455	0.203	0.305	1.510	0.390	0.191	0.328	0.018	0.117	16.0	39.316
15	1:14	3	2.5	0.760	0.306	0.663	2.632	0.900	0.383	0.848	0.068	0.202	33.9	78.832
16	1:14	1	2.5	0.532	0.211	0.388	1.993	0.437	0.198	0.628	0.027	0.154	23.0	49.721
17	1:12	1	2.0	0.594	0.281	0.489	2.174	0.707	0.263	0.541	0.041	0.141	22.8	58.564

一步对其进行方差分析,结果见表6。由表6可知,模型的 $F=26.52, P=0.0001$,表明二次多元回归模型良好;拟合方程的相关系数(R^2)为0.9715,表明响应值的变化有97.15%来自于所选自变量,模型误差较小;失拟项 $F=3.40, P=0.1341 > 0.05$,表明未知因素对实验的干扰小。确定3个因素对GSZD综合评分的影响顺序为 $B > A > C$,其中 A, B, BC, B^2 对综合评分的影响有统计学意义($P < 0.05$),而 C, AB, AC, A^2, C^2 对综合评分的影响无统计学意义($P > 0.05$)。

表6 GSZD提取工艺优化的回归模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	3 812.79	9	423.64	26.52	0.0001
A	841.96	1	841.96	52.70	0.0002
B	1 005.90	1	1 005.90	62.96	<0.0001
C	19.19	1	19.19	1.20	0.3093
AB	5.20	1	5.20	0.33	0.5861
AC	49.11	1	49.11	3.07	0.1230
BC	209.15	1	209.15	13.09	0.0085
A ²	1.38	1	1.38	0.09	0.7772
B ²	1 671.14	1	1 671.14	104.60	<0.0001
C ²	6.52	1	6.52	0.41	0.5432
残差	111.83	7	15.98		
失拟项	80.31	3	26.77	3.40	0.1341
纯误差	31.52	4	7.88		
总离差	3 924.62	16			

为进一步评价A、B、C之间交互作用对综合评分的影响,本研究采用Design-Expert 8.0.6.1软件绘制了各因素交互作用对综合评分影响的响应面图与等高线图,结果见图3。等高线的形状可以反映交互作用的强弱,越趋向椭圆表示交互作用越强,越趋向圆形则交互作用越弱^[7]。由图3可知,B与C交互作用较为明显,A与B、A与C交互作用不明显。基于Design-Expert 8.0.6.1软件优化得到GSZD的最优提取工艺如下:料液比1:14(g/mL)、提取次数2.49次、提取时间3.0 h,综合评分的预

测值为94.328。结合生产实际,本研究确定最优提取工艺如下:料液比1:14(g/mL)、提取次数2次、提取时间3.0 h。

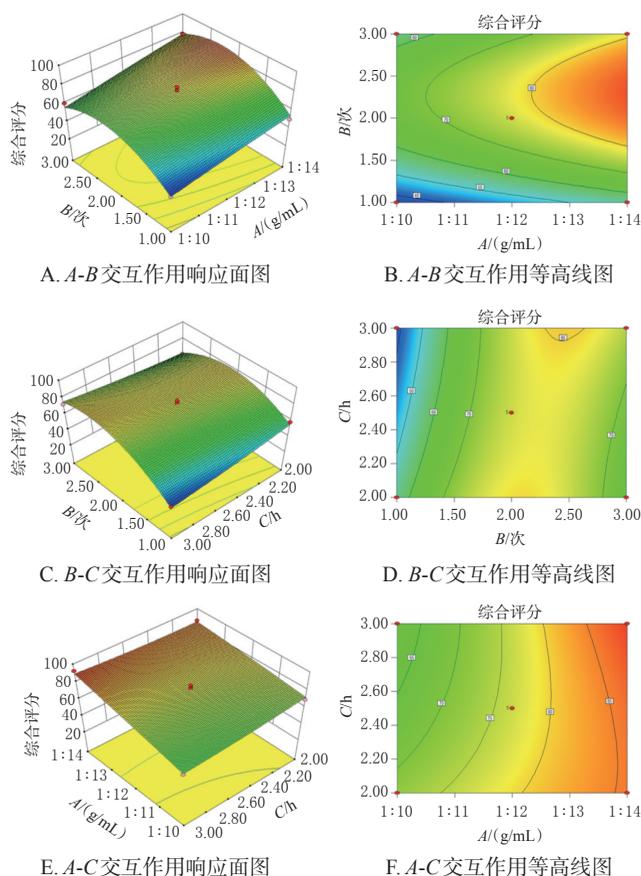


图3 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图与等高线图

2.6.3 提取工艺验证 根据最优提取工艺条件,设计3批验证实验,结果见表7。3批验证实验综合评分均值为95.879, RSD为0.50%,与预测综合评分的偏差为1.64%,表明优化工艺稳定、可靠。

表7 GSZD最优提取工艺验证实验结果

序号	盐酸麻黄碱 含量/(mg/g)	盐酸伪麻黄碱 含量/(mg/g)	肉桂酸含量/ (mg/g)	芍药苷含量/ (mg/g)	芒果苷含量/ (mg/g)	甘草苷含量/ (mg/g)	甘草酸含量/ (mg/g)	6-姜酚含量/ (mg/g)	5-O-甲基维斯阿米醇苷 含量/(mg/g)	干膏得率/ %	综合评分
1	0.909	0.348	0.830	1.804	0.748	0.484	1.204	0.138	0.324	30.3	95.479
2	0.929	0.352	0.846	1.742	0.761	0.486	1.206	0.141	0.330	30.9	96.407
3	0.925	0.319	0.841	1.837	0.748	0.491	1.219	0.141	0.303	31.0	95.753
RSD/%	1.15	5.30	0.98	2.69	1.00	0.74	0.67	1.24	4.44	1.23	0.50

3 讨论

目前,中药饮片复方制剂的质量标准多以多指标成分的含量及出膏率作为考察指标,因此本研究建立了同时测定GSZD中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、芒果苷、芍药苷、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、肉桂酸、6-姜酚9个有效成分含量的高效液相色谱法。与现有测定GSZD中有效成分的方法比较^[18-19],本方法稳定、灵敏度高,既兼顾了方中多味药材有效成分的含量,又符合中药多成分、多靶点的作用特点,为后续GSZD的质量控制提供了科学依据。

多指标综合评分的关键是权重系数的确定,常用的权重赋权法有主观赋权法和客观赋权法^[20]。主观赋权法是根据指标的重要性确定权重,主观因素占比较大^[21]。客观赋权法是根据所反映的客观信息来确定权重,不仅体现中药“君臣佐使”的重要性,并且存在一定权重与实际指标相反的情况,客观性更强^[20]。两种赋权方法各有特色,将二者结合起来所涵盖的信息更全面、合理。因此,本研究以中医基础理论为指导,按照“君臣佐使”的组方规律对GSZD中10个指标进行层次分析确定主观权重,再利用熵权法确定客观权重,并将二者组合运用以计算复合权重,从而优化GSZD的提取工艺。这样不仅结合了两种赋权方法的优点使主客观并重,还保证了各指标综合评分的合理性。本实验根据模型拟合结果结合生产实际,确定GSZD的最优提取工艺为料液比1:14(g/mL)、提取次数2次、提取时间3.0 h。

综上所述,本研究确定了GSZD的最优提取工艺,优化后的提取工艺稳定、可行,可为后续GSZD的研究开发提供参考。

参考文献

- [1] 张仲景.金匱要略方论:三卷[M].北京:人民卫生出版社,1963:19-44.
- [2] 周扬俊,赵以德.金匱玉函经二注:五卷[M].北京:人民卫生出版社,1990:88-90.
- [3] 邢雅儒,董秋梅,呼钢.桂枝芍药知母汤治疗RA进展及研究[J].北方药学,2014,11(5):69-70.
- [4] 朴持炫.桂枝文献的研究[D].北京:北京中医药大学,2010.
- [5] 苗艳平,杨晶.芍药化学成分和药理作用的研究及分析[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(59):1-2.
- [6] 王晓燕.白芍配伍桂枝抗炎的药理学作用和机制解析[J/OL].临床医药文献电子杂志,2015,2(21):4304,4308 [2021-06-01]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2015&filename=LCWX201521009&uniplatform=NZKPT&v=Tz1h9ZMu2-HUh7e-302_Jr8iHMIx0oLDTZvwh7EKoEl-wP-qKkOo-SAox3Jufc3kVD. DOI: 10.16281/j.cnki.jocml.2015.21.009.
- [7] 卓小玉,陈晶,田明,等.麻黄的化学成分与药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(2):80-83.
- [8] 范敏,周敏,董世庆,等.芒果苷对妊娠期糖尿病大鼠抗氧化能力的影响[J].临床和实验医学杂志,2017,16(10):943-946.
- [9] 黄岳青,陈蕾.芒果苷对妊娠期糖尿病大鼠血清中TNF- α 、IL-6和糖代谢的影响[J].贵州医药,2018,42(10):1158-1161.
- [10] 杨云霄,曾今诚,李继霞,等.芒果苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J].山东医药,2017,57(5):110-112.
- [11] 李想,李冀.甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J].江苏中医药,2019,51(5):81-86.
- [12] 姜程曦,林良义,宋娇,等.姜中姜酚和姜醇的研究进展[J].中草药,2015,46(16):2499-2504.
- [13] 薛宝云,李文,李丽,等.防风色原甙类成分的药理活性研究[J].中国中药杂志,2000,25(5):297-299.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:88,104,107-108,156,200,229,296,333.
- [15] 郭丽,陈皓,贾明璐,等.层次分析法及多指标正交试验优化归芪通脉合剂水提工艺[J].中国现代中药,2021,23(6):1068-1075.
- [16] 王仁杰,李森,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.
- [17] 何瑶,江华娟,成颜芬,等.基于Box-Behnken设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺[J].中草药,2021,52(22):6845-6855.
- [18] 董运苗,宋志前,刘振丽,等.HPLC同时测定桂枝芍药知母汤中7个有效成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(17):28-31.
- [19] 董运苗,宋志前,易小烈,等.波长切法测定桂枝芍药知母汤提取物中5个脂溶性成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(7):1185-1190.
- [20] 李锐华,孙增涛,王永香,等.运用AHP结合熵权法优化疏风定喘颗粒炙麻黄组的醇沉工艺[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(20):1-5.
- [21] 罗婷,唐玉,王佳琪,等.层次分析法结合正交试验优化川黄柏炒炭工艺[J].成都中医药大学学报,2018,41(4):6-11.

收稿日期:2021-06-01 修回日期:2021-12-01
(编辑:邹丽娟)