

苦参-黄柏药对的提取工艺研究^Δ

管咏梅^{1*},陶颖¹,邹成玉¹,臧振中¹,陈丽华¹,刘丽丽¹,陈丽梅^{1,2},朱卫丰^{1#}(1.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004;2.江西中医药大学附属医院科研科,南昌 330004)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)07-0793-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.07.05



摘要 目的 研究苦参-黄柏药对的提取工艺,为治疗肛肠疾病的新药开发提供参考依据。方法 以苦参总碱(苦参碱+氧化苦参碱)含量、盐酸小檗碱含量、总黄酮含量及浸膏得率为评价指标,采用层次分析法-熵权法计算各指标权重系数,结合Box-Behnken设计-响应面法研究苦参-黄柏药对的最佳提取工艺并进行验证。结果 苦参-黄柏药对的最优提取工艺为以12倍量58%乙醇浸泡30 min后提取2次,每次120 min。验证实验结果与预测值的相对误差为1.88%。结论 所得提取工艺稳定、可行,可为苦参-黄柏药对的进一步应用与新药开发提供参考。

关键词 苦参;黄柏;药对;Box-Behnken设计;响应面法;提取工艺;层次分析法;熵权法;痔疮

Study on extraction technology of *Sophora flavescens-Phellodendron chinense* drug pair

GUAN Yongmei¹, TAO Ying¹, ZOU Chengyu¹, ZANG Zhenzhong¹, CHEN Lihua¹, LIU Lili¹, CHEN Limei^{1,2}, ZHU Weifeng¹(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Research Department, the Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the extraction technology of *Sophora flavescens-Phellodendron chinense* drug pair and provide a reference for the development of new drugs for the treatment of anorectal diseases. **METHODS** Using the contents of total alkaloids of *S. flavescens* (matrine+oxymatrine), berberine hydrochloride and total flavonoid, and extract yield as evaluation indicators, analytic hierarchy process-entropy weight method was used to calculate the weight coefficient of each indicator, and was combined with Box-Behnken design-response surface method to study the extraction technology of *S. flavescens-P. chinense* drug pair and verify it. **RESULTS** The optimal extraction technology of *S. flavescens-P. chinense* drug pair was immersed in 12-fold amount of 58% ethanol for 30 minutes and extracted twice, each time for 120 minutes. The relative error between the verification experimental results and the predicted value was 1.88%. **CONCLUSIONS** The obtained extraction technology is stable and feasible and can provide reference for the application of *S. flavescens-P. chinense* drug pair and development of new drugs.

KEYWORDS *Sophora flavescens*; *Phellodendron chinense*; drug pair; Box-Behnken design; response surface method; extraction technology; analytic hierarchy process; entropy weight method; hemorrhoids

《外科正宗》卷四中的“诸疮一扫光”方由苦参、黄柏等组成,主治干、湿痒疮。方中苦参主治湿热内生,可杀虫止痒^[1];黄柏主治下焦湿热,可解毒疗疮^[2];两者配伍共奏清热燥湿、解疮生肌之效,可用于治疗临床常见肛肠疾病。目前,相关数据挖掘研究发现,治疗肛肠疾病时,苦参与黄柏的配伍使用频次较高^[3-5]。由此可知,苦参、

黄柏2味药材配伍具有治疗肛肠疾病的潜在作用。因此,本课题组拟研究苦参-黄柏药对的提取工艺,以期在治疗肛肠疾病的新药开发提供参考。

现代药理研究表明,苦参-黄柏药对中的生物碱、黄酮等生物活性成分具有抗炎^[6]、抑菌^[7]、镇痛^[8]等作用,可以缓解发病时伤口的细菌感染、发炎及疼痛症状,加快疾病的恢复。因此,本课题组以苦参总碱(苦参碱+氧化苦参碱)含量、盐酸小檗碱含量、总黄酮含量及浸膏得率为评价指标,使用层次分析法(analytic hierarchy process, AHP)-熵权法(entropy weight method, EWM)对各指标进行赋权评分,再结合Box-Behnken设计-响应面法研究苦参-黄柏药对的提取工艺。

Δ 基金项目 国家自然科学基金项目(No.82360812);全国中药特色技术传承人才培养项目(No.国中医药人教函[2023]96号);江西中医药大学2023年“大学生创新创业训练计划”项目(No.X202310412176)

* 第一作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药新制剂与新技术、食疗学。E-mail:guanym2008@163.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:中药新剂型与新技术。E-mail:zwf0322@126.com

1 材料

1.1 主要仪器

1260 Infinity II 型高效液相色谱(HPLC)仪购自美国 Agilent 公司;BT25S 型分析天平购自德国 Sartorius 公司;KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗仪购自昆山市超声仪器有限公司;T6 型紫外可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司;SPX-150F 型生化培养箱购自上海龙跃仪器设备有限公司;Direct-Q 5 型超纯水机购自美国 Millipore 公司。

1.2 主要药物与试剂

苦参饮片(批号 220901)、黄柏饮片(批号 221025)均由江西江中中药饮片有限公司提供;盐酸小檗碱(批号 110713-202015,纯度 86.7%)、苦参碱(批号 110805-201808,纯度 99.8%)、氧化苦参碱(批号 110806-202212,纯度 98.8%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;芦丁对照品(批号 23011002,纯度 99.98%)购自成都普菲德生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 苦参-黄柏提取液中盐酸小檗碱含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件

采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调 pH 至 6.2 左右)(30:70, V/V);流速为 1 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 265 nm;进样量为 5 μL。

2.1.2 盐酸小檗碱对照品贮备液的制备

精密称取盐酸小檗碱对照品 0.002 26 g 至容量瓶中,加流动相溶解并稀释,制成质量浓度为 226.00 μg/mL 的盐酸小檗碱对照品贮备液。

2.1.3 供试品溶液的制备

按 1:1(m/m) 处方配比称取苦参、黄柏饮片(两药质量比参照“诸疮一扫光”方),加入 10 倍量 60% 乙醇浸泡 30 min 后提取 2 次,每次 90 min,得苦参-黄柏提取液;精密吸取苦参-黄柏提取液 200 μL 至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,即得供试品溶液。

2.1.4 系统适用性考察

分别取盐酸小檗碱对照品贮备液和“2.1.3”项下供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。结果显示,盐酸小檗碱的分离度、灵敏度及理论板数均符合要求。

2.1.5 线性关系考察

精密吸取盐酸小檗碱对照品贮备液(质量浓度为 226.00 μg/mL),加流动相稀释制成质量浓度分别为 113.00、56.50、28.25、14.13、7.06 μg/mL 的系列对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定并进行线性回归,

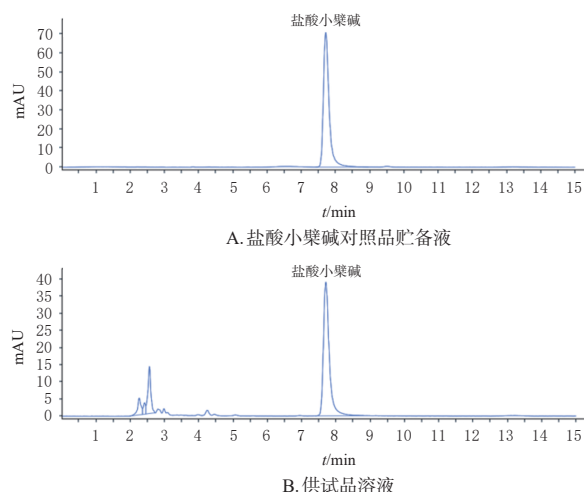


图1 盐酸小檗碱对照品和供试品溶液的 HPLC 图

得回归方程为 $Y=18.365X-46.923$ ($R^2=0.9999$)。结果表明,盐酸小檗碱的检测质量浓度在 7.06~226.00 μg/mL 范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.1.6 精密度试验

取盐酸小檗碱对照品贮备液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,计算峰面积。结果显示,盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 0.38% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验

按“2.1.3”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,记录峰面积,以外标法计算盐酸小檗碱的含量。结果显示,盐酸小檗碱的平均含量为 48.56 mg/g, RSD 为 0.78% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于制备后 0、4、8、12、24、48 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 1.17% ($n=6$),表明供试品溶液在制备后 48 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验

取已知盐酸小檗碱含量的苦参-黄柏提取液 6 份,每份 1 mL,按 1:1(m/m) 精密加入盐酸小檗碱对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备加样回收的供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率。结果显示,盐酸小檗碱的平均加样回收率为 99.77%, RSD 为 2.63% ($n=6$),表明该方法准确度良好。

2.2 苦参-黄柏提取液中苦参碱和氧化苦参碱含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件

采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用三乙胺调 pH 至 6.2 左右)(10:90, V/V);流速为 1 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 220 nm;进样量为 10 μL。

2.2.2 苦参碱、氧化苦参碱对照品贮备液的制备

精密称取苦参碱对照品 0.010 02 g、氧化苦参碱对照品 0.010 13 g, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加流动相超声 (功率 500 W, 频率 45 kHz) 溶解并定容, 即得质量浓度分别为 1.002 mg/mL 的苦参碱对照品贮备液和 1.013 mg/mL 的氧化苦参碱对照品贮备液。

2.2.3 供试品溶液的制备

精密吸取“2.1.3”项下苦参-黄柏提取液 2 mL 至蒸发皿中, 水浴蒸干后, 残渣加 10 mL 水洗至分液漏斗中, 用三氯甲烷萃取 3 次, 每次 15 mL; 分取下层液, 蒸干, 残渣加流动相溶解并定容至 10 mL, 即得供试品溶液。

2.2.4 系统适用性考察

取“2.2.2”项下 2 种对照品贮备液、“2.2.3”项下供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 2)。结果显示, 苦参碱、氧化苦参碱的分离度、灵敏度及理论板数均符合要求。

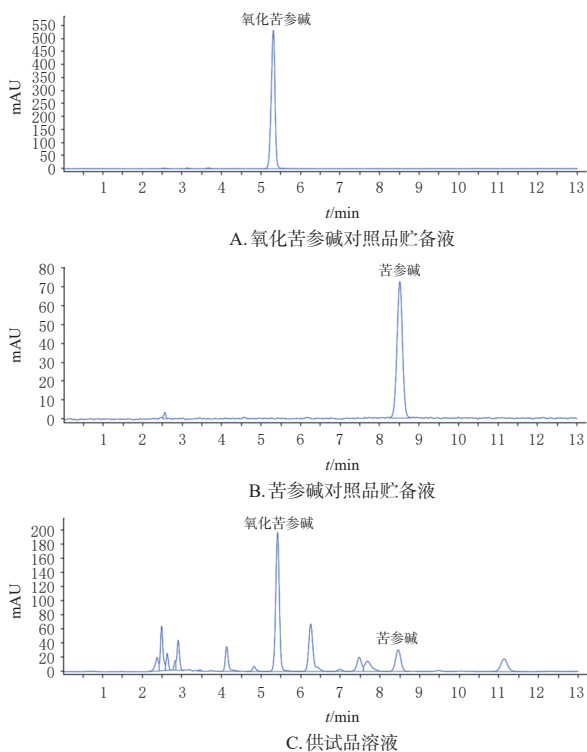


图2 氧化苦参碱、苦参碱对照品和供试品溶液的 HPLC 图

2.2.5 线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下 2 种对照品贮备液, 分别加流动相逐级稀释至苦参碱质量浓度为 501.00、250.50、125.25、62.63、31.31、15.66、7.83、3.91 $\mu\text{g/mL}$, 氧化苦参碱质量浓度为 506.50、253.25、126.63、63.31、31.66、15.83、7.91 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并进行线性回归, 得苦参碱的回归方程为 $Y=5.614 7X+2.715 6$ ($R^2=0.999 9$)、

氧化苦参碱的回归方程为 $Y=7.008 1X+8.620 0$ ($R^2=0.999 9$)。结果表明, 苦参碱、氧化苦参碱的检测质量浓度分别在 3.91~501.00、7.91~506.50 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与各自峰面积成良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验

取苦参碱、氧化苦参碱对照品贮备液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 计算峰面积。结果显示, 氧化苦参碱峰面积的 RSD 为 0.63% ($n=6$), 苦参碱峰面积的 RSD 为 0.81% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验

按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以外标法计算氧化苦参碱、苦参碱的含量。结果显示, 氧化苦参碱的平均含量为 8.28 mg/g, RSD 为 1.93% ($n=6$); 苦参碱的平均含量为 2.22 mg/g, RSD 为 2.32% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于制备后 0、4、8、12、24、48 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, 氧化苦参碱峰面积的 RSD 为 1.13% ($n=6$), 苦参碱峰面积的 RSD 为 0.64% ($n=6$), 表明供试品溶液在制备后 48 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验

取氧化苦参碱、苦参碱含量已知的苦参-黄柏提取液 6 份, 每份 1 mL, 按 1:1 (m/m) 分别精密加入氧化苦参碱和苦参碱对照品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率。结果显示, 氧化苦参碱的平均加样回收率为 97.71%, RSD 为 1.33% ($n=6$); 苦参碱的平均加样回收率为 98.63%, RSD 为 1.91% ($n=6$), 表明该方法准确度良好。

2.3 苦参-黄柏提取液中总黄酮含量测定方法的建立

2.3.1 芦丁对照品贮备液的制备

精密称取芦丁对照品 0.003 67 g, 加 70% 乙醇溶解并定容至 10 mL, 即得质量浓度为 0.367 mg/mL 的芦丁对照品贮备液。

2.3.2 供试品溶液的制备

精密吸取“2.1.3”项下苦参-黄柏提取液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加入 5% NaNO_2 溶液 0.4 mL, 摇匀, 静置 6 min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL, 摇匀, 静置 6 min 后再加入 4% NaOH 溶液 4 mL, 用 70% 乙醇定容, 摇匀, 静置 15 min 待反应显色后作为供试品溶液, 待用。

2.3.3 线性关系考察

精密吸取芦丁对照品贮备液 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 按“2.3.2”项下方法

显色后,用70%乙醇定容,摇匀,放置15 min,以70%乙醇作为参比,在510 nm波长处测定吸光度。以吸光度(A)对芦丁检测质量浓度(C)作回归分析,得线性回归方程为 $A=0.0112C-0.0003$ ($R^2=0.9993$)。结果显示,芦丁检测质量浓度在22.02~66.06 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与吸光度成良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验

取芦丁对照品贮备液1 mL至10 mL量瓶中,按“2.3.2”项下方法处理后,连续进样6次,在510 nm波长处测定吸光度。结果,芦丁吸光度的RSD为0.65%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验

按“2.3.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别在510 nm波长处测定吸光度。结果显示,总黄酮的平均含量(以芦丁计)为20.46 mg/g,RSD为1.18%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,按“2.3.2”项下方法处理后,分别于10、20、30、40、50、60 min在510 nm波长处测定吸光度。结果显示,芦丁吸光度的RSD为0.96%($n=6$),表明供试品溶液在显色后60 min内稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验

取已知总黄酮含量(以芦丁计)的苦参-黄柏提取液6份,按1:1(m/m)精密加入芦丁对照品溶液,按“2.3.2”项下方法处理后,分别在510 nm波长处测定吸光度,计算加样回收率。结果显示,芦丁的平均加样回收率为100.77%,RSD为1.96%($n=6$),表明该方法准确度良好。

2.4 浸膏得率的测定

精密量取25 mL苦参-黄柏提取液至已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后置于105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥3 h,冷却30 min后迅速精密称定质量,按下式计算浸膏得率:浸膏得率(%)=(干燥3 h后蒸发皿质量-恒重空皿质量)/(量取体积 \times 药材质量) $\times 100\%$ 。

2.5 AHP法确定苦参-黄柏药对提取工艺评价指标的权重系数

以盐酸小檗碱含量、苦参碱与氧化苦参碱总含量(即苦参总碱含量)、总黄酮含量及浸膏得率为评价指标,参考林亚美等^[9]采用的AHP九级标度法判断矩阵,指标优先顺序按盐酸小檗碱含量=苦参总碱含量>总黄酮含量>浸膏得率进行打分,所得各指标的判断矩阵见表1、权重指标见表2。一般而言,一致性比率(consistency ratio,CR)值越小,表明判断矩阵的一致性越好,其中 $\text{CR}<0.1$ 表明通过一致性检验,而 $\text{CR}\geq 0.1$ 表明不具

有一致性,应对判断矩阵进行适当调整后再次进行分析^[10]。本研究中, $\text{CR}=0.016$ (<0.1),表明判断矩阵通过一致性检验,计算所得权重具有一致性。

表1 苦参-黄柏药对提取工艺评价指标的判断矩阵

指标	苦参总碱	盐酸小檗碱	总黄酮	浸膏得率
苦参总碱含量	1	1	3	5
盐酸小檗碱含量	1	1	3	5
总黄酮含量	1/3	1/3	1	6
浸膏得率	1/5	1/5	1/6	1

表2 苦参-黄柏药对提取工艺评价指标的AHP权重指标

指标	特征向量	权重系数	最大特征根	CI	RI	CR
苦参总碱含量	1.968	0.39				
盐酸小檗碱含量	1.968	0.39	4.043	0.014	0.890	0.016
总黄酮含量	0.760	0.15				
浸膏得率	0.340	0.07				

CI:一致性指标(consistency index);RI:随机一致性指标(radom index)。

2.6 AHP-EWM综合权重系数的计算

参考文献[11]进行综合权重的计算:

$$Z_j = \frac{r_j^1 r_j + w_j^1 w_j}{\sum_{j=1}^n (r_j^1 r_j + w_j^1 w_j)}$$

式中, Z_j 为归一化处理后的综合权重; r_j 为第 j 个指标的AHP权重; w_j 为第 j 个指标的EWM权重; r_j^1 、 w_j^1 分别为AHP、EWM计算所得权重的耦合权重。

根据以上公式计算得各指标综合权重系数分别为:苦参总碱含量0.31、盐酸小檗碱含量0.31、总黄酮含量0.20、浸膏得率0.18。

2.7 苦参-黄柏药对提取工艺的单因素考察

采用单因素实验初步考察浸泡时间、乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数各影响因素对苦参总碱含量、盐酸小檗碱含量、总黄酮含量、浸膏得率综合得分的影响。

2.7.1 浸泡时间考察

固定料液比为1:8(g/mL)、乙醇体积分数为70%、提取时间为60 min、提取次数为1次,分别考察浸泡时间为0、30、60 min时的综合评分。结果显示,浸泡30 min时的综合评分最高(图3A),故选择浸泡时间为30 min。

2.7.2 乙醇体积分数考察

固定料液比为1:8(g/mL)、浸泡时间为30 min、提取时间为60 min、提取次数为1次,分别考察乙醇体积分数为40%、50%、60%、70%、80%时的综合评分。结果显示,60%乙醇的综合评分最高(图3B),故选择50%~70%体积分数的乙醇进行Box-Behnken设计-响应面实验。

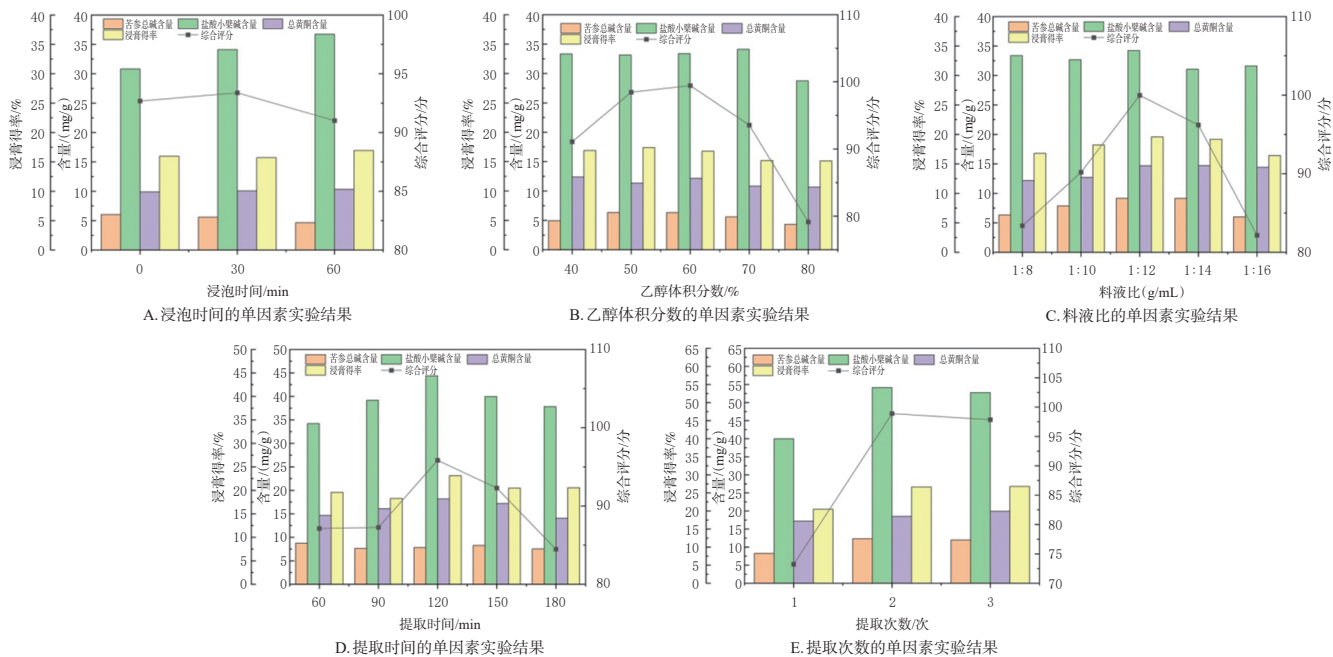


图3 苦参-黄柏药对提取工艺的单因素实验结果

2.7.3 料液比考察

固定乙醇体积分数为60%、浸泡时间为30 min、提取时间为60 min、提取次数为1次,分别考察料液比为1:8、1:10、1:12、1:14、1:16(g/mL)的综合评分。结果显示,料液比为1:12(g/mL)时的综合评分最高(图3C),因此选择料液比1:10~1:14(g/mL)进行Box-Behnken设计-响应面实验。

2.7.4 提取时间考察

固定料液比为1:12(g/mL)、乙醇体积分数为60%、浸泡时间为30 min、提取次数为1次,分别考察提取时间为60、90、120、150、180 min时的综合评分。结果显示,提取120 min时的综合评分最高(图3D),因此选择90~150 min进行Box-Behnken设计-响应面实验。

2.7.5 提取次数考察

固定料液比为1:12(g/mL)、乙醇体积分数为60%、浸泡时间为30 min、提取时间为120 min,分别考察提取1、2、3次时的综合评分。结果显示,提取2次时的综合评分最高(图3E),因此选择提取次数为2次。

2.8 Box-Behnken设计-响应面法优化苦参-黄柏药对提取工艺

2.8.1 Box-Behnken设计-响应面法实验设计及结果

在单因素实验的基础上,以AHP-EWM所得综合权重系数计算出的苦参总碱含量、盐酸小檗碱含量、总黄酮含量、浸膏得率的综合评分为评价指标,以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)为影响因素,采用Design Expert 13软件对Box-Behnken设计-响应面法实验方案进行设计。综合评分(Y)计算公式为: $Y=(\text{苦参总碱含量} \times \text{苦参总碱含量综合权重系数} / \text{苦参总碱含量}$

$\text{最大值} + \text{盐酸小檗碱含量} \times \text{盐酸小檗碱含量综合权重系数} / \text{盐酸小檗碱含量最大值} + \text{总黄酮含量} \times \text{总黄酮含量综合权重系数} / \text{总黄酮含量最大值} + \text{浸膏得率} \times \text{浸膏得率综合权重系数} / \text{浸膏得率最大值}) \times 100\%$ 。Box-Behnken设计-响应面法实验的因素与水平见表3、方案与结果见表4。

表3 Box-Behnken设计-响应面法实验的因素与水平

水平	A/%	B(g/mL)	C/min
-1	50	1:10	90
0	60	1:12	120
1	70	1:14	150

表4 Box-Behnken设计-响应面法实验的方案与结果

序号	A/%	B(g/mL)	C/min	苦参总碱含量/(mg/g)	盐酸小檗碱含量/(mg/g)	总黄酮含量/(mg/g)	浸膏得率/%	综合评分/分
1	70	1:12	90	9.07	45.91	18.51	23.28	78.05
2	60	1:14	90	9.20	59.79	19.95	24.81	87.75
3	50	1:10	120	9.98	55.67	20.17	25.26	88.06
4	60	1:12	120	12.54	53.35	19.06	26.56	92.98
5	70	1:12	150	10.08	57.62	22.40	25.74	91.64
6	60	1:12	120	12.72	57.52	18.98	25.75	94.90
7	60	1:10	90	10.57	49.13	20.61	24.84	86.30
8	60	1:14	150	10.51	50.04	22.37	24.98	88.30
9	50	1:12	150	8.65	53.06	19.79	24.97	82.98
10	60	1:12	120	12.37	55.55	20.63	25.99	94.71
11	50	1:12	90	10.58	60.38	20.56	25.76	92.61
12	70	1:14	120	9.12	54.32	18.59	25.21	83.82
13	70	1:10	120	10.35	55.84	18.55	24.70	87.19
14	50	1:14	120	9.90	54.68	21.71	25.81	89.15
15	60	1:10	150	12.22	47.66	19.02	26.01	88.90
16	60	1:12	120	11.73	56.89	21.28	25.92	94.38
17	60	1:12	120	12.05	55.54	21.02	26.22	94.44

2.8.2 模型拟合与方差分析

采用Design Expert 13软件对表4实验结果进行回归拟合分析,得到二次多项回归拟合方程 $A=93.98-$

$1.51A - 0.1782B + 8.894C - 1.11AB + 5.8AC - 0.5121BC - 4.21A^2 - 2.72B^2 - 3.45C^2$ 。由方差分析结果(表5)可知,模型的 P 值小于0.05,失拟项的 P 值大于0.05, $R^2=0.9895$,表明模型的拟合优度较高;校正决定系数(R^2_{adj})为0.9780,预测决定系数(R^2_{pred})为0.9736,两者值均接近1且差值小于0.2,表明模型能充分说明工艺过程;响应面变异系数(CV%)为0.80%(<10%),表明本实验的可信度高;精密密度为28.92(>4),表明该模型合理。

表5 Box-Behnken设计-响应面法实验模型拟合的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	338.83	9	37.65	73.64	<0.0001
A	18.32	1	18.32	35.84	0.0005
B	0.25	1	0.25	0.50	0.5037
C	6.33	1	6.33	12.38	0.0097
AB	4.96	1	4.96	9.71	0.0169
AC	134.67	1	134.67	263.42	<0.0001
BC	1.05	1	1.05	2.05	0.1952
A ²	74.47	1	74.47	145.67	<0.0001
B ²	31.07	1	31.07	60.78	0.0001
C ²	50.16	1	50.16	98.11	<0.0001
残差	3.58	7	0.51		
失拟项	1.32	3	0.44	0.78	0.5636
纯误差	2.26	4	0.56		
总相关	342.41	16			

各因素交互作用对苦参-黄柏药对提取工艺综合评分影响的响应面图及等高线图见图4。响应面曲线越陡

证明该因素越显著;等高线图越接近椭圆则证明两因素的交互作用越强,若越接近圆形则相反;等高线的密度越大,证明对应因素的影响程度越显著。图4B对应的曲面较其他2组图更为陡峭,表明该交互项AC对综合评分有显著影响,且交互项AC的等高线图(图4b)也较图4a、图4c更接近椭圆,其结果与表5结果一致。

2.8.3 最优提取工艺确定

采用Design Expert 13软件拟合得苦参-黄柏药对的最优提取工艺参数:乙醇体积分数为57.758%、料液比为1:12.037(g/mL)、提取时间为118.161 min。结合实际生产所需,将其提取工艺参数调整为:乙醇体积分数为58%、料液比为1:12(g/mL)、浸泡时间为30 min、提取时间为120 min、提取2次。

2.8.4 验证实验

按1:1(m/m)称取苦参、黄柏饮片,照“2.8.3”项下最优提取工艺参数进行提取,平行进行3次验证。结果显示,苦参总碱含量为(11.85±0.62) mg/g,盐酸小檗碱含量为(54.69±0.67) mg/g,总黄酮含量为(20.10±0.25) mg/g,浸膏得率为(25.77±0.13)%,综合评分为(92.38±1.32)分,RSD为1.38%(n=3)。综合评分与模型预测值94.12分接近,其相对误差为1.88%,表明所得最优提取工艺稳定、可行。

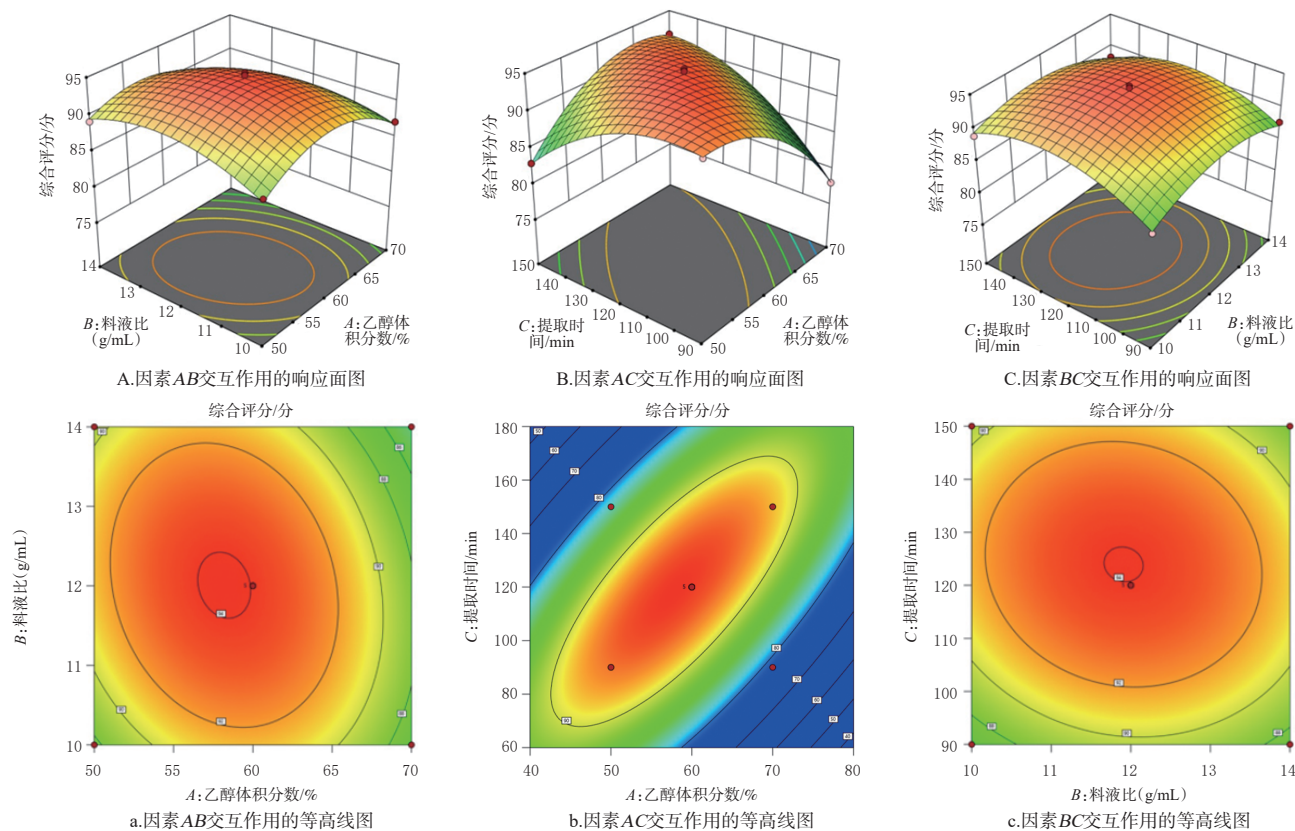


图4 各因素交互作用对苦参-黄柏药对提取工艺综合评分的影响

3 讨论

临床中应用苦参-黄柏药对为君药的处方治疗肛肠疾病均发挥出了显著疗效。徐莉等^[12]以二黄苦参洗剂联合痔疮膏用于痔疮患者的治疗,总有效率达93.33%。陈国宝^[13]以复方黄柏洗剂应用于各类痔疮、痔疮术后及肛门疼痛的治疗,有效率均在90%以上。许建成等^[14]使用痛痒消洗剂治疗肛周脓肿患者后发现,该制剂可调节辅助型T细胞1、辅助型T细胞2的免疫平衡,抑制炎症因子表达,缓解水肿和疼痛,促进肉芽生长和创面愈合,改善肛周脓肿患者的肛门功能。因此,本课题组参考《外科正宗》中“诸疮一扫光”方中苦参-黄柏药对的处方比例,采用Box-Behnken设计-响应面法研究了该药对的提取工艺,以期用于治疗肛肠疾病的新药开发提供参考依据。

Box-Behnken设计-响应面法是在提取实验中应用较广的寻优方法,与正交设计及均匀设计相比具有精度高、试验周期短、可研究多因素交互等特点,研究者可从二维等高线图及三维曲面图更为直观地分析试验的最佳条件。但目前应用于工艺研究时,该方法常以单一指标为响应值,而当评分体系为多指标时,需将各指标对应的最优参数组合后进行分析比较,过程较为繁琐,因而具有一定的局限性^[15]。因此,多能互补的综合评分体系在提取工艺优化过程中就起到了重要作用。各指标权重系数是科学、合理进行综合评分的基础,目前的赋权方法是以AHP为主的主观赋权法和以EWM、主成分分析法为主的客观赋权法。主观赋权法是根据研究者的主观价值对指标进行评判,缺少与实验数据的联系;客观赋权法在指标大量的数据基础上,通过统计方法处理获得权重,能够客观地反映不同指标之间的差异性和重要程度,减少主观因素干扰,但易忽略各指标的特征及相关性^[16]。因此,本研究将AHP与EWM 2种赋权方法结合起来,用于确定各指标的权重,可兼顾研究者的主观判断与实验数据的客观性,起到优缺互补的作用,从而提高了提取工艺参数的科学性。

综上,本课题组通过AHP-EWM确定各指标权重系数,再结合Box-Behnken设计-响应面法研究最佳提取工艺,建立了苦参-黄柏药对提取工艺的综合评价模型。该药对的最优提取工艺为以12倍量58%乙醇浸泡30 min后提取2次,每次120 min。验证实验的结果与预测值较为接近,表明所得提取工艺稳定可行,可为苦参-黄柏药对的进一步应用与新药开发提供参考。

参考文献

[1] 梁彪,施展,王建东,等. 加味苦参汤熏洗对湿热下注型混合痔术后患者的临床疗效[J]. 中成药,2022,44(12):

4084-4086.

LIANG B, SHI Z, WANG J D, et al. Clinical effect of modified Kushen decoction fumigating and washing on postoperative patients with damp-heat downward mixed hemorrhoids[J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(12): 4084-4086.

[2] 李明哲,柳越冬,陈萌,等. 清热利湿方联合美沙拉嗪治疗湿热内蕴证糖尿病肠病临床疗效观察[J/OL]. 中华中医药学刊, 2023 (2023-10-23) [2024-01-04]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20231020.1728.006>.

LI M Z, LIU Y D, CHEN M, et al. Clinical observation on the therapeutic effect of Qingre lishi decoction and mesalazine on diabetes enteropathy with damp heat syndrome[J/OL]. Chin Arch Trad Chin Med, 2023 (2023-10-23) [2024-01-04]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20231020.1728.006>.

[3] 白克运,解广东,白煜杨,等. 基于中医传承辅助平台分析痔术后熏洗中药复方的用药规律[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(12): 2819-2824.

BAI K Y, XIE G D, BAI Y Y, et al. Analysis of medication regularity of fumigation and washing Chinese herbal compound prescription after hemorrhoids operation based on traditional Chinese medicine inheritance assistant platform[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2019, 21(12): 2819-2824.

[4] 吴琼,高记华,戚文月,等. 基于数据挖掘探讨中药熏洗促进肛瘘术后创面愈合用药规律[J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(2): 20-25.

WU Q, GAO J H, QI W Y, et al. Discussion on the medication law of TCM fumigating and washing promoting wound healing after anal fistula based on data mining[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2023, 30(2): 20-25.

[5] 梁彪,高家治,滕卉茹,等. 基于数据挖掘和网络药理学探讨国家专利中药复方治疗肛周湿疹的用药规律及作用机制[J]. 中医临床研究, 2022, 14(4): 1-10.

LIANG B, GAO J Z, TENG H R, et al. Exploring medication rules and action mechanism of the national patents TCM compound on perianal eczema based on data mining and network pharmacology[J]. Clin J Chin Med, 2022, 14(4): 1-10.

[6] SUN X Y, JIA L Y, RONG Z, et al. Research advances on matrine[J]. Front Chem, 2022, 10: 867318.

[7] LI S P, WANG Y A, WANG S T, et al. In situ gelling hydrogel loaded with berberine liposome for the treatment of biofilm-infected wounds[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023, 11: 1189010.

- [8] 王玲燕,夏桂阳,夏欢,等.天然生物碱类镇痛成分的研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(24):5829-5839.
WANG L Y, XIA G Y, XIA H, et al. Research progress of natural alkaloids with analgesic activity[J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(24): 5829-5839.
- [9] 林亚美,支红欣,孙霁曩,等.基于层次分析-熵权法优化刺五加多组分超声提取工艺[J].食品工业科技,2023,44(20):239-249.
LIN Y M, ZHI H X, SUN J X, et al. Optimization of the ultrasonic extraction process of *Acanthopanax senticosus* multiple components based on a coupling methodology of analytic hierarchy process and entropy weight method[J]. Sci Technol Food Ind, 2023, 44(20): 239-249.
- [10] 张帅,张守琳,邹迪,等.基于德尔菲法及层次分析法构建IgA肾病气阴两虚证条目权重[J].世界科学技术-中医药现代化,2023,25(8):2752-2758.
ZHANG S, ZHANG S L, ZOU D, et al. Construction of item weights of Qi Yin deficiency syndrome in IgA nephropathy based on Delphi method and analytic hierarchy process[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2023, 25(8): 2752-2758.
- [11] 曾海蓉,李婷娜,冉倩,等.基于熵权法结合Box-Behnken响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J].中草药,2020,51(1):84-90.
ZENG H R, LI T N, RAN Q, et al. Optimization of extraction process of Compound guizhi shaoyao zhimu granules by combination of response surface methodology with entropy weight method[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(1): 84-90.
- [12] 徐莉,范红莉.二黄苦参洗剂联合痔疮膏治疗痔疮的疗效观察[J].时珍国医国药,2017,28(6):1399.
XU L, FAN H L. Observation on therapeutic effect of Erhuang kushen lotion combined with hemorrhoid ointment on hemorrhoids[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(6): 1399.
- [13] 陈国宝.复方黄柏洗剂的制备及临床应用[J].时珍国医国药,2006,17(2):230-231.
CHEN G B. Preparation and clinical application of Compound Cortex Phellodendri lotion[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(2): 230-231.
- [14] 许建成,师晨松,张海深,等.痛痒消洗剂对肛周脓肿术后患者的临床疗效[J].中成药,2023,45(2):439-443.
XU J C, SHI C S, ZHANG H S, et al. Clinical effects of Tongyangxiao lotion on postoperative patients with perianal abscess[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(2): 439-443.
- [15] 卢新颖,毕嘉谣,李明慧,等.Box-Behnken响应面法结合基准关联度和AHP-EWM优化经典名方易黄汤的提取工艺[J].中国中药杂志,2023,48(21):5798-5808.
LU X Y, BI J Y, LI M H, et al. Optimization of extraction process for classic prescription Yihuang decoction based on Box-Behnken design-response surface methodology, standard relation, and analytic hierarchy process combined with entropy weight method[J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(21): 5798-5808.
- [16] 夏提古丽·塔西买买提,赵媛,刘艺,等.熵权法-层次分析法结合Box-Behnken响应面法优化雪莲益肾方的提取工艺[J].中国药房,2023,34(15):1858-1862.
Xiatiguli·Taximaimaiti, ZHAO Y, LIU Y, et al. Optimization of the extraction process for Xuelian yishen formula by the combination of entropy weight method-analytic hierarchy process with Box-Behnken response surface methodology[J]. China Pharm, 2023, 34(15): 1858-1862.

(收稿日期:2023-09-26 修回日期:2024-03-20)

(编辑:胡晓霖)