

## 基于 G1-熵权法和正交设计优选黄芪百合颗粒的提取纯化工艺

王继龙<sup>1,2</sup>, 魏舒畅<sup>1,2</sup>, 刘永琦<sup>1,3\*</sup>, 金 辉<sup>1</sup>, 苏 韞<sup>1,3</sup>

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

**摘 要:** **目的** 基于 G1-熵权法和正交设计优选黄芪百合颗粒的提取纯化工艺, 为其工业化生产提供参考。**方法** 采用基于 G1-熵权法的主客观组合赋权法和  $L_9(3^4)$  正交设计, 以提取次数、提取时间和加水量为考察因素, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷、粗多糖、醇浸出物提取量及出膏率为评价指标, 优选黄芪百合颗粒的最佳水提工艺; 以多通道管状陶瓷超滤膜的膜孔径、操作压强和滤过温度为考察因素, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷、粗多糖、醇浸出物保留率及除杂率为评价指标, 优选其最佳超滤纯化工艺。**结果** 黄芪百合颗粒的最佳水提工艺为用总量 20 倍的水加热回流提取 2 次, 每次提取 75 min; 最佳超滤工艺为膜孔径 50 nm, 操作压强 0.10 MPa, 滤过温度 45 °C。在此条件下, 3 批验证试验数据组间均无明显差异。**结论** 优选的提取、纯化工艺稳定可行, 可为黄芪百合颗粒的工业化生产提供实验依据。

**关键词:** 黄芪百合颗粒; 超滤; G1-熵权法; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 橙皮苷; 多糖; 正交设计; 保留率; 除杂率

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)03-0596-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.014

## Optimization of extraction and purification technology for Huangqi Baihe Granules based on G1-entropy method and orthogonal design

WANG Ji-long<sup>1,2</sup>, WEI Shu-chang<sup>1,2</sup>, LIU Yong-qi<sup>1,3</sup>, JIN Hui<sup>1</sup>, SU Yun<sup>1,3</sup>

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Laboratory for TCM New Products Development Engineering of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

3. Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment Research in Colleges and Universities of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

**Abstract: Objective** To determine the optimum extraction and purification technology of Huangqi Baihe Granules (HBG) by using orthogonal design and combination empowerment based on G1-entropy method, so as to provide a reference for the industrial production. **Methods** With the ethanol extraction amount and paste-forming rate of calycosin7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, hesperidin, crude polysaccharide as evaluation index, and with the extraction times, extraction time and the water adding amount as investigate factors, then the combination empowerment method based on G1-entropy method and orthogonal design were used to optimize the extraction technology of HBG. The same combined methods were used to optimize the purification technology of HBG with retention rate and removal rate of impurity of ethanol extract of calycosin7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, hesperidin and crude polysaccharide, as evaluation index, and with the membrane pore diameter, operating pressure and filtration temperature of multi-channel tubular ceramic ultrafiltration membrane as investigate factors. **Results** The test results showed that the optimum extraction technology was as follows: Extracted 2 times with 20 times the amount of water and each for 75 min. The optimum ultrafiltration technology was as follows: Multi-channel tubular inorganic ceramic membrane at 50 nm, operating pressure at 0.10 MPa, filtration temperature at 45 °C. Under such condition, there was no significant difference between verification groups of three batches. **Conclusion** The optimized extraction and purification process is stable and feasible by verification, which can provide experimental basis for industrial production

收稿日期: 2017-09-24

基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (120FKCA169); 陇原青年创新人才扶持计划 (2014-93-72); 甘肃省中药新产品创制工程实验室开放基金项目 (ZYFYZH-KJ-2015-001)

作者简介: 王继龙 (1986—), 男, 讲师, 从事中药制剂与工艺研究。Tel: 18215123103 E-mail: drake1520@163.com

\*通信作者 刘永琦 (1973—), 男, 教授, 从事中医药免疫与干细胞生物学研究。Tel: 13919019578 E-mail: liuyongqi73@163.com

of HBG.

**Key words:** Huangqi Baihe Granules; ultrafiltration; G1-entropy method; calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside; hesperidin; polysaccharide; orthogonal design; retention rate; removal rate of impurity

高原病是发生于高原低氧环境的一种特发性疾病,依发病急缓分为急性、慢性 2 大类<sup>[1]</sup>。高寒、低氧、干燥等环境因素是发病的根本原因,气虚兼夹血瘀、阴津不足为高原病的中医基本证候类型<sup>[2]</sup>。随着社会经济的发展及各种先进交通方式的普及,急进高海拔黄河源地区的人数逐年增加,高原病尤其是急性高原病的发病率也是逐年递增<sup>[3]</sup>。高原病治疗不及时危害甚大,甚至威胁生命,目前采用药物预防和治疗高原病仍被公认为是最有效的防治手段。近年来,随着人们对化学药物毒副作用及其治疗疾病局限性的深入认识,在防治高原病方面,相比乙酰唑胺、地塞米松、硝苯地平、西地那非和沙美特罗等化学药物,越来越多的人更倾向于具有多层次、多靶点、整体调节优势的单味中(藏)药或复方,如黄芪、红景天、银杏叶、复方丹参滴丸等。许多单味中(藏)药及复方对于高原病虽具有不同程度的治疗作用,但大多都属于经验用药,与高原病的中医基本证候类型不完全一致,无法达到良好的防治效果<sup>[4-5]</sup>。本研究所用黄芪百合颗粒是以现有的高原病研究成果为基础,结合临床实践经验遣药组方所得的经验方,处方由黄芪、百合、红景天、枸杞子、黄精、陈皮 6 味药食同源及保健中药组成,全方共奏益气活血、健脾润肺、滋阴补肾之功效,具有良好的提高高原低氧环境的适应能力及保健作用。该方成分复杂,有效成分或组分不甚明确,为确保其制剂的精制有效,选取多指标成分同时优选工艺参数,而多指标的权重赋予将直接决定工艺结果的科学性。G1 法是对层次分析法(AHP)进行改进的一种主观赋权法,与 AHP 相比具有计算速度快、无需一致性检验等优点<sup>[6]</sup>,近年来其常与熵权法<sup>[7]</sup>这一客观赋权方法组合,应用于水电能源领域<sup>[8-9]</sup>,然而在中药工艺研究中尚未见报道使用。本研究采用基于 G1 法和熵权法的组合赋权法结合多指标综合评价以摸索优选出合理的、生产可行的提取纯化工工艺条件参数,从而获得质量稳定均一的浸膏,期冀为该制剂的后期研究及工业化生产提供实验依据。

## 1 仪器与材料

Agilent1260 高效液相色谱仪,包括 G1311B 四元泵、G4212B DAD 检测器,美国 Agilent 公司;

UV-2401PC 紫外可见分光光度计,日本岛津公司; SJM-FHM-02 型陶瓷膜分离设备、陶瓷复合膜(19 通道,外径 30 mm,长度 500 mm),合肥世杰膜工程有限责任公司; Biofuge Stratos 高速冷冻离心机,美国科峻仪器公司; BT125D 十万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; UX6200H 电子天平,岛津中国有限公司; DH-6051 型真空干燥箱、DHG-9035A 型鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; HH-S28S 数显恒温水浴锅,金坛市大地自动化仪器厂。

该复方所用中药饮片均购于兰州黄河中药批发有限公司,经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao 的干燥根、百合为百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 的干燥肉质鳞叶、陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮、红景天为景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥根和根茎、枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、黄精为百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 的干燥根茎。毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201505,质量分数 97.1%)、橙皮苷(批号 110721-201316,质量分数 95.3%)、D-无水葡萄糖(批号 110833-201205,质量分数 99.5%),中国食品药品检定研究院;水为超纯水,乙腈为色谱纯,浓硫酸为优级纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷定量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为 0.2%甲酸溶液-乙腈,梯度洗脱:0~20 min, 10%~25%乙腈; 20~30 min, 25%~50%乙腈; 30~40 min, 50%乙腈; 40~50 min, 50%~10%乙腈;检测波长为 260 nm (0~17 min, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、283 nm (17~50 min, 橙皮苷);进样量为 10  $\mu$ L;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30  $^{\circ}$ C;理论塔板数以各成分计均不低于 5 000,色谱图见图 1。

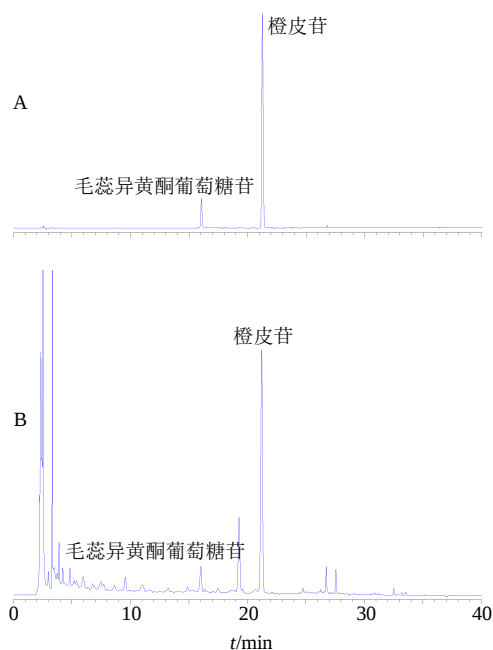


图 1 混合对照品 (A) 与样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of reference substances (A) and sample (B)

**2.1.2 混合对照品溶液的制备** 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 19.52、273.61  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 精密称取各工艺条件下药液经低温减压干燥所得细粉适量置具塞锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，密塞，称定质量，超声处理 (30  $^{\circ}\text{C}$ ，350 W) 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过，取续滤液，即得。

**2.1.4 线性关系的考察** 分别精密吸取上述混合对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8、9 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，按“2.1.1”项下条件进样测定，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，得回归方程：毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $Y = 29\,658\,X + 0.669\,5$ ， $r = 0.999\,9$ ，线性范围 0.98~15.61  $\mu\text{g/mL}$ ；橙皮苷  $Y = 16\,908\,X + 12.896$ ， $r = 0.999\,8$ ，线性范围 13.68~246.25  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.1.5 精密度试验** 取混合对照品溶液按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷峰面积 RSD 分别为 0.41%、0.57%，表明精密度良好。

**2.1.6 稳定性试验** 取供试品溶液分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷峰面积 RSD 分别为 0.86%、1.17%，表明供试品溶液在 24 h 内

稳定。

**2.1.7 重复性试验** 取同一工艺条件下所得干膏，按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，分别按“2.1.1”项下色谱条件进样，结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷提取量 RSD 分别为 0.79%、1.05%，表明方法重复性良好。

**2.1.8 加样回收率试验** 取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷对照品适量，加入已知指标成分量的干膏中，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析。结果显示，毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷平均加样回收率分别为 99.21%、98.68%，RSD 分别为 1.65%、1.92%，表明方法准确性良好。

**2.1.9 样品测定** 取待测供试品溶液按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷和橙皮苷的色谱峰面积，分别代入“2.1.4”项下对应回归方程计算各成分在供试品溶液中的质量浓度，并以对应药材量计算其在供试品中的质量。

## 2.2 粗多糖定量测定

**2.2.1 多糖供试品溶液的制备** 取不同工艺条件下的药液离心处理 (4 000 r/min，15 min)，将上清液浓缩至药液比 1:2.5。精密吸取浓缩液 5 mL 于离心管中，加乙醇使含醇量为 30%，低温静置 24 h 后离心 (10 000 r/min，10 min，下同)，上清加乙醇使含醇量为 80%，低温静置 24 h 后离心，沉淀用纯水溶解定容至 100 mL 量瓶中，摇匀，精密吸取 1.4 mL 稀释定容至 50 mL 量瓶中，摇匀，即得。

**2.2.2 显色条件的考察** 首先采用单因素试验对苯酚液质量分数 (3%、4%、5%、6%、7%)、硫酸液体积 (4、5、6、7、8 mL) 和沸水浴时间 (0、5、10、15、20、25、30 min) 等显色条件进行了考察，结果显示，随着各条件取值的增大，吸光度值均呈先增大后减小的趋势，最大吸光度值对应苯酚液质量分数为 5%、硫酸液体积为 6 mL、沸水浴加热 10 min，故以此组合为最佳显色条件。

**2.2.3 线性关系的考察** 精密称取葡萄糖对照品适量，加纯水制成质量浓度为 0.34 mg/mL 的对照品溶液，从中精密吸取 0.5、1、2、3、4、5、10 mL 稀释定容至 10 mL 量瓶中，分别精密吸取各质量浓度稀释液 1 mL (各 2 份) 于不同具塞试管中，采用差示酚磺法在上述最佳显色条件下测定<sup>[10]</sup>：一份精密加入 5% 苯酚液 1 mL、体积分数 83.3% 硫酸液 6 mL，摇匀后于沸水浴加热 10 min，取出，冷却至室温，

在 490 nm 处测得吸光度值  $A_1$ ；另一份加入体积分数 83.3% 硫酸液 6 mL，于沸水浴加热 10 min，取出，冷却至室温后加入 5% 苯酚液 1 mL，摇匀后测得吸光度值  $A_2$ ；以吸光度差值 ( $\Delta A = A_1 - A_2$ ) 对葡萄糖质量浓度 ( $C$ ) 进行线性回归，得回归方程  $\Delta A = 6.1848C + 0.0111$ ， $r = 0.9999$ ，线性范围为 16.9~339.1  $\mu\text{g/mL}$ 。

**2.2.4 样品测定** 精密吸取待测多糖供试品溶液 1 mL，按“2.2.3”项下条件显色测定，计算  $\Delta A$ ，根据回归方程计算粗多糖在供试品溶液中的质量浓度，并以对应药材量计算其在供试品中的质量。

### 2.3 醇溶性浸出物测定

精密吸取“2.2.1”项下浓缩液 5 mL 于离心管中，加乙醇使含醇量为 80%，静置 24 h 后离心，取上清于恒定质量蒸发皿中，水浴挥干溶剂，105  $^{\circ}\text{C}$  干燥至恒定质量。

### 2.4 评价指标的组合赋权

**2.4.1 G1 法主观赋权** G1 法是对 AHP 法进行改进的一种计算速度快、无需一致性检验的主观评价方法，具体步骤如下。

步骤 1：确定序关系。建立评价指标  $y_1, y_2, \dots, y_m$  相对于某评价准则（或目标）的序关系，记为  $y_1 > y_2 > \dots > y_m$ 。

步骤 2：确定相邻指标之间的相对重要程度。设专家关于评价指标  $y_{k-1}$  与  $y_k$  的重要性程度之比  $r_k$ ，即权重评价标度的理性判断为公式 (1)。

$$r_k = w_{k-1}/w_k, k=m, m-1, \dots, 2 \quad (1)$$

步骤 3：权重系数  $w_k$  的计算。

$$w_k = (1 + \sum_{k=2}^m \prod_{i=k}^m r_i)^{-1} \quad (2)$$

$$w_{k-1} = r_k w_k, k=m, m-1, \dots, 2 \quad (3)$$

**2.4.2 熵权法客观赋权** 熵权法是一种根据各项指标观测值所提供信息量的大小来确定指标权重的方法。熵是系统无序程度或混乱程度的度量，若指标的熵值越小，则它所蕴涵的信息量越大，在综合评价中所起作用也越大，其权重也应越高，具体步骤如下。

步骤 1：原始数据矩阵归一化。设  $m$  个评价指标、 $n$  个评价对象的原始数据矩阵为  $Y = (y_{ij})_{n \times m}$ ，对其归一化后得到属性矩阵  $R = (r_{ij})_{n \times m}$ ，对效益型属性（指属性值愈大愈好的指标）而言，进行归一化，见公式 (4)。

$$r_{ij} = (y_{ij} - y_j^{\min}) / (y_j^{\max} - y_j^{\min}) \quad (4)$$

$y_{ij}$  代表第  $i$  个评价对象的第  $j$  项指标数据； $y_j^{\max}$ 、 $y_j^{\min}$  分别为  $y_{ij}$  的最大值和最小值； $i=1, 2, \dots, n$ ； $j=1, 2, \dots, m$

步骤 2：求取指标熵值。

$$s_j = -k \sum_{i=1}^n f_{ij} \ln f_{ij} \quad (5)$$

$$f_{ij} = r_{ij} / \sum_{i=1}^n r_{ij}, k = 1/\ln n, \text{ 当 } f_{ij} = 0 \text{ 时, } y_{ij} \ln n = 0$$

步骤 3：计算指标权重系数。

$$w_j = (1 - s_j) / (m - \sum_{j=1}^m s_j) \quad (6)$$

**2.4.3 组合权重的确定** 设由 G1 法得到的主观权重为  $w_1$ ，熵权法得到的客观权重为  $w_2$ ，则组合权重为公式 (7)。

$$w_j = w_1 w_{2j} / \sum_{j=1}^m w_1 w_{2j} \quad (7)$$

### 2.5 提取工艺研究

**2.5.1 正交试验** 按处方 (39 g) 4 倍药量称取相应中药饮片 9 份，以提取次数 (A)、提取时间 (B)、加水量 (C) 为主要考察因素，以毛蕊异黄酮葡萄糖苷和橙皮苷提取量（供试品中该成分的质量/对应黄芪或陈皮药材的质量）、粗多糖提取量（供试品中该成分的质量/对应处方药材的质量）、醇浸出物量（醇浸出物质量/对应处方药材的质量）及出膏率（干膏质量/对应处方药材质量）为评价指标，采用  $L_9(3^4)$  正交设计优选黄芪百合颗粒的复方水提工艺，试验设计与结果见表 1。

依据复方“君臣佐使”配伍原则及功效相关药效物质，由 G1 法确定 5 个评价指标的顺序关系为粗多糖提取量 > 毛蕊异黄酮葡萄糖苷提取量 > 橙皮苷提取量 = 醇浸出物量 > 出膏率；并确定各指标的权重评价标度，其中  $r_2 = 1.6$ ， $r_3 = 1.2$ ， $r_4 = 1.0$ ， $r_5 = 1.4$ ，求得各指标的主观权重值 ( $w_1$ )。利用获取的提取工艺研究数据，采用熵权法计算各指标的客观权重值 ( $w_2$ )。最后由式 (7) 计算得到各指标的组合权重值 ( $w$ )，并进一步得到各试验条件的指标综合评分  $P_i$ ，再进行直观分析和方差分析。组合权重见表 2，直观分析见表 1，方差分析见表 3，综合评分  $P_i$  计算公式为公式 (8)。

$$P_j = \sum_{j=1}^m (100 w_j y_j) / y_j^{\max} \quad (8)$$

由表 1 直观分析可知，各因素对实验结果综合评分的作用主次为  $C > B > A$ ，且  $C_3 > C_2 > C_1$ ， $B_3 > B_2 > B_1$ ， $A_2 > A_1 > A_3$ ；由方差分析可知，各因素在

表 1 提取工艺正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test of extraction technology

| 试验号   | A      | B/h    | C/倍    | D(空白)  | 毛蕊异黄酮葡萄糖<br>苷提取量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 橙皮苷提取<br>量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 粗多糖提取<br>量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 醇浸出物<br>量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 出膏率/% | 综合评分  |
|-------|--------|--------|--------|--------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|-------|-------|
| 1     | 1(1)   | 1.5(1) | 12(1)  | (1)    | 218.85                                               | 8.65                                         | 137.22                                       | 234.61                                      | 41.11 | 68.87 |
| 2     | 1(1)   | 2.0(2) | 16(2)  | (2)    | 281.69                                               | 11.87                                        | 169.07                                       | 264.91                                      | 47.81 | 87.51 |
| 3     | 1(1)   | 2.5(3) | 20(3)  | (3)    | 289.09                                               | 14.38                                        | 175.63                                       | 268.55                                      | 50.08 | 95.75 |
| 4     | 2(2)   | 1.5(1) | 16(2)  | (3)    | 274.75                                               | 8.88                                         | 164.81                                       | 267.36                                      | 48.93 | 79.07 |
| 5     | 2(2)   | 2.0(2) | 20(3)  | (1)    | 258.04                                               | 13.39                                        | 182.75                                       | 281.64                                      | 51.71 | 92.73 |
| 6     | 2(2)   | 2.5(3) | 12(1)  | (2)    | 288.02                                               | 10.50                                        | 158.81                                       | 271.48                                      | 47.60 | 83.30 |
| 7     | 3(3)   | 1.5(1) | 20(3)  | (2)    | 231.16                                               | 11.76                                        | 197.89                                       | 272.50                                      | 51.86 | 88.38 |
| 8     | 3(3)   | 2.0(2) | 12(1)  | (3)    | 243.09                                               | 9.20                                         | 163.99                                       | 272.30                                      | 49.32 | 77.88 |
| 9     | 3(3)   | 2.5(3) | 16(2)  | (1)    | 200.35                                               | 8.80                                         | 193.87                                       | 292.07                                      | 53.89 | 79.18 |
| $K_1$ | 252.13 | 236.32 | 230.05 | 240.78 |                                                      |                                              |                                              |                                             |       |       |
| $K_2$ | 255.10 | 258.12 | 245.76 | 259.19 |                                                      |                                              |                                              |                                             |       |       |
| $K_3$ | 245.44 | 258.23 | 276.86 | 252.70 |                                                      |                                              |                                              |                                             |       |       |
| R     | 9.66   | 21.91  | 46.81  | 18.41  |                                                      |                                              |                                              |                                             |       |       |

表 2 提取工艺评价指标的权重值

Table 2 Weight value of indices for extraction technology

| 评价指标         | $W_1$   | $W_2$   | $W$     |
|--------------|---------|---------|---------|
| 毛蕊异黄酮葡萄糖苷提取量 | 0.205 7 | 0.185 7 | 0.195 1 |
| 橙皮苷提取量       | 0.171 4 | 0.421 2 | 0.368 8 |
| 粗多糖提取量       | 0.329 1 | 0.152 0 | 0.255 6 |
| 醇浸出物量        | 0.171 4 | 0.118 8 | 0.104 0 |
| 出膏率          | 0.122 4 | 0.122 3 | 0.076 5 |

表 3 提取工艺方差分析

Table 3 Analysis of variance for extraction technology

| 误差来源  | 偏差平方和     | 自由度 | F 值     | 显著性 |
|-------|-----------|-----|---------|-----|
| A     | 16.321 4  | 2   | 0.280 8 | 无   |
| B     | 106.144 5 | 2   | 1.826 1 | 无   |
| C     | 378.354 5 | 2   | 6.509 2 | 无   |
| D(误差) | 58.126 1  | 2   |         |     |

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

$\alpha=0.05$  时对实验结果的综合评分均无显著性影响。为了最大限度地提取出该复方的起效物质, 保证临床疗效, 选取各因素较高水平组合  $A_2B_3C_3$  为最佳提取工艺, 即总量为 20 倍的水加热回流提取 2 次, 共 2.5 h, 75 min/次。

**2.5.2 验证试验** 按处方 (39 g) 72 倍药量称取相应中药饮片 3 份, 采用优选的水提工艺条件进行提取, 取提取液适量分别按“2.1”“2.2”及“2.3”项下方法处理, 各指标测定方法、结果分析同“2.5.1”, 结果见表 4。3 批试验数据之间无明显差异, 表明该提取工艺稳定可靠。

## 2.6 纯化工艺研究

**2.6.1 正交试验** 为了提高制剂品质、减少服用剂量、降低纯化成本, 本研究选择可大量除去大分子杂质而又使多糖等相对分子质量较大的有效成分及指标成分损失最小、且适用于大工业化生产的大孔径多通道无机陶瓷膜超滤技术对黄芪百合颗粒提取液进行纯化。

表 4 提取工艺验证试验结果

Table 4 Results of verification of extraction technology

| 批次    | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷提取量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 橙皮苷提取量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 粗多糖提取量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 醇浸出物量/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) | 出膏率/% |
|-------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------|
| 1     | 293.98                                           | 14.54                                    | 213.78                                   | 302.87                                  | 54.38 |
| 2     | 290.60                                           | 14.50                                    | 212.15                                   | 307.49                                  | 53.72 |
| 3     | 294.91                                           | 14.88                                    | 214.07                                   | 307.18                                  | 54.62 |
| RSD/% | 0.77                                             | 1.43                                     | 0.49                                     | 0.84                                    | 0.86  |

影响超滤效果的工艺参数主要有膜孔径、操作压强、药液温度、浓缩程度、黏度等,鉴于现有工业用陶瓷超滤膜滤过效率较高,本研究在超滤前将对提取液不再浓缩,取上清直接滤过。首先采用前期研究获得的超滤临界压力预测模型<sup>[11]</sup>预测提取液超滤时的临界压力,然后将“2.5.2”项下 3 批水提液上清混匀后平均分为 9 份,使膜组件在临界压力以下进行滤过操作。以膜孔径(A)、操作压强(B)和滤过温度(C)为考察因素,以透过液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、橙皮苷、粗多糖、醇浸出物的保留率(透过液中该成分的量/水提液中该成分的量)及除杂率(水提液与透过液出膏率的差值/水提液出膏率)为评价指标,采用 G1(序关系和权重评价标度同“2.5.1”)-熵权组合赋权法对以上指标进行权重系数分配,由式(8)计算指标综合得分,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计优选黄芪百合颗粒复方水提液的超滤纯化工艺,试验设计与结果见表 5,组合权重见表 6,方

差分析见表 7。

由表 5 直观分析可知,各因素对实验结果综合作用的作用主次为 A>C>B,且 A<sub>2</sub>>A<sub>1</sub>>A<sub>3</sub>,C<sub>3</sub>>C<sub>2</sub>>C<sub>1</sub>,B<sub>1</sub>>B<sub>2</sub>>B<sub>3</sub>;由表 7 方差分析可知,因素 A、B、C 对实验结果综合评分均有显著性差异(P<0.05)。故取各因素较高水平组合 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>为黄芪百合颗粒最佳超滤纯化工艺,即膜孔径 50 nm,操作压强 0.10 MPa,滤过温度 45 ℃。

**2.6.2 验证试验** 取处方(39 g)180 倍药量按最优水提工艺进行提取,将水提液混匀后平均分为 3 份,按最佳超滤工艺进行纯化,分别按“2.1”“2.2”及“2.3”项下方法对水提液和超滤透过液进行处理,各指标测定方法、结果分析同“2.6.1”项,结果见表 8。3 批试验数据之间无明显差异,表明优选的超滤纯化工艺稳定可行。

### 3 讨论

中药复方(方剂)充分体现了中医整体论治的

表 5 超滤工艺正交试验设计与结果

Table 5 Design and results of orthogonal test of ultrafiltration technology

| 试验号            | A/nm    | B/MPa    | C/℃    | D(空白)  | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率/% | 橙皮苷保留率/% | 粗多糖保留率/% | 醇浸出物保留率/% | 除杂率/% | 综合评分  |
|----------------|---------|----------|--------|--------|----------------|----------|----------|-----------|-------|-------|
| 1              | 10 (1)  | 0.10 (1) | 25 (1) | (1)    | 66.43          | 71.33    | 71.05    | 86.76     | 22.65 | 85.55 |
| 2              | 10 (1)  | 0.15 (2) | 35 (2) | (2)    | 72.36          | 74.70    | 65.65    | 83.41     | 26.78 | 84.82 |
| 3              | 10 (1)  | 0.20 (3) | 45 (3) | (3)    | 82.47          | 92.91    | 64.82    | 86.20     | 10.72 | 85.67 |
| 4              | 50 (2)  | 0.10 (1) | 35 (2) | (3)    | 80.62          | 83.53    | 78.38    | 88.94     | 19.93 | 93.68 |
| 5              | 50 (2)  | 0.15 (2) | 45 (3) | (1)    | 77.31          | 81.70    | 71.12    | 86.36     | 24.18 | 89.65 |
| 6              | 50 (2)  | 0.20 (3) | 25 (1) | (2)    | 86.74          | 90.20    | 55.04    | 79.45     | 26.97 | 83.86 |
| 7              | 100 (3) | 0.10 (1) | 45 (3) | (2)    | 80.17          | 84.91    | 69.71    | 84.67     | 21.10 | 88.80 |
| 8              | 100 (3) | 0.15 (2) | 25 (1) | (3)    | 56.07          | 64.45    | 57.39    | 80.55     | 21.26 | 73.81 |
| 9              | 100 (3) | 0.20 (3) | 35 (2) | (1)    | 69.62          | 76.46    | 52.41    | 78.18     | 33.45 | 78.52 |
| K <sub>1</sub> | 256.04  | 268.03   | 243.22 | 253.72 |                |          |          |           |       |       |
| K <sub>2</sub> | 267.19  | 248.28   | 257.02 | 257.48 |                |          |          |           |       |       |
| K <sub>3</sub> | 241.13  | 248.05   | 264.12 | 253.16 |                |          |          |           |       |       |
| R              | 26.06   | 19.98    | 20.90  | 4.32   |                |          |          |           |       |       |

表 6 超滤工艺评价指标的权重值

Table 6 Weight value of indices for ultrafiltration technology

| 评价指标         | w <sub>1</sub> | w <sub>2</sub> | w       |
|--------------|----------------|----------------|---------|
| 毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率 | 0.205 7        | 0.160 8        | 0.158 0 |
| 橙皮苷保留率       | 0.171 4        | 0.192 8        | 0.157 9 |
| 粗多糖保留率       | 0.329 1        | 0.252 9        | 0.397 7 |
| 醇浸出物保留率      | 0.171 4        | 0.240 6        | 0.197 0 |
| 除杂率          | 0.122 4        | 0.152 7        | 0.089 3 |

表 7 超滤工艺方差分析

Table 7 Analysis of variance for ultrafiltration technology

| 误差来源  | 偏差平方和     | 自由度 | F 值      | 显著性    |
|-------|-----------|-----|----------|--------|
| A     | 113.972 7 | 2   | 30.976 8 | P<0.05 |
| B     | 87.701 8  | 2   | 23.836 6 | P<0.05 |
| C     | 75.295 6  | 2   | 20.464 7 | P<0.05 |
| D(误差) | 3.679 3   | 2   |          |        |

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

表 8 超滤工艺验证试验结果

Table 8 Results of verification for ultrafiltration technology

| 批次    | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率/% | 橙皮苷保留率/% | 粗多糖保留率/% | 醇浸出物保留率/% | 除杂率/% |
|-------|----------------|----------|----------|-----------|-------|
| 1     | 91.49          | 92.67    | 77.51    | 91.19     | 25.68 |
| 2     | 91.71          | 91.70    | 78.16    | 91.52     | 26.83 |
| 3     | 92.94          | 93.54    | 78.94    | 91.88     | 26.25 |
| RSD/% | 0.85           | 0.99     | 0.92     | 0.38      | 2.19  |

思想和中医药理论的精华,是中医临床应用最主要的手段。如何最大限度地提取和保留黄芪百合颗粒原有临床起效物质,兼顾去粗取精是本实验提取纯化研究过程中首先要面临的问题。由于该复方成分复杂,临床起效物质究竟有多少很难得知,单一指标成分难以控制其制剂的内在质量,因此,本研究结合该复方的功能主治、临床用途及组成药材的理化属性,选择多糖和醇浸出物<sup>[12-16]</sup>、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和橙皮苷的提取量与保留率及出膏率与除杂率分别作为其提取与纯化的评价指标,可较全面地评价所选工艺参数的优劣。

在黄芪百合颗粒提取纯化工艺多指标决策中,权重问题的研究占有重要地位,其合理性直接影响着多指标决策排序的准确性。目前确定权重的方法一般有主观赋权法和客观赋权法 2 大类:主观赋权法主要由决策者根据经验主观判断来确定评价指标的权重及排序,中药领域应用较多的是经验法和 AHP 法,此类赋权法随意性较大,但解释性较强。G1 法是对 AHP 法进行改进的一种主观赋权法,与 AHP 相比具有计算速度快、无需一致性检验、同一层次中元素个数的伸展性强、具有保序性等优点,目前在中药领域尚未见使用报道。客观赋权法则是依据指标测评过程中原始数据之间的联系,采用一定的数学理论方法来计算权重,中药领域应用较多的为熵权法,该类赋权法的决策准确性和可靠性较强,但有时会与实际相悖,难以对所得结果给出合理的解释,尤其是对黄芪百合颗粒等存在“君臣佐使”配伍规律的中药复方难以体现出足够的样本区分度。针对上述主观或客观赋权法的局限性,本研究采用基于 G1 法和熵权法的主客观组合赋权方法,可同时兼顾决策者的主观性和待评价对象各指标的内在联系,将使黄芪百合颗粒提取纯化工艺的多指标综合评价结果更加科学合理。

为了提高制剂品质,减少服用剂量,降低纯化成本,本研究采用无机陶瓷膜超滤技术对黄芪百合

颗粒提取液进行纯化。依据课题组前期研究经验和本研究所得结果,与传统水提醇沉工艺相比,超滤纯化工艺除了节能、高效、环保等优点以外,能有效保留多糖等分子量较大的有效成分,很好的保持复方中原有化学物质的组成比例及药液的原汁原味,且能显著改善复方中药提取物的溶解性,在中药复方的纯化中具有独特的优势。此外,为了有效防止膜污染的发生,延长膜清洗周期,保证工艺优化结果的可靠性和超滤效率,本研究首先按照文献方法<sup>[11]</sup>对复方水提液超滤的临界压力进行了考察,使各超滤过程均在低于临界压力的工艺参数下操作,同时在超滤前后按文献方法<sup>[17]</sup>对膜组件进行清洗使膜通量得以恢复,使上述问题的解决获得了满意的效果。

醇浸出物测定中,课题组前期考察了 80%乙醇回流、超声和沉淀法 3 种方式对干膏和浓缩液中醇溶性物质浸出率的影响。对同等生药量的干膏和浓缩液(药液比 1:2.5),前者分别采用 80%乙醇回流、超声 30 min,后者采用乙醇沉淀并使终点醇浓度达到 80%,且保证 3 种方式含相同体积的 80%乙醇,结果醇浸出物得率次序为沉淀法>回流>超声,且沉淀法和回流所得浸出物量差异较小。为了缩短工艺研究周期,提高工作效率,本研究采用沉淀法测定醇浸出物。

由于红景天在复方中所占比例较低(1/13),药液中红景天苷的浓度亦相对较低,加之同等质量浓度下红景天苷的液相色谱响应信号远低于毛蕊异黄酮葡萄糖苷和橙皮苷,故本实验没有列入考察项,红景天苷在黄芪百合颗粒提取纯化过程中的转移情况需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 我国高原病命名、分型及诊断标准 [J]. 高原医学杂志, 2010, 20(1): 9-11.
- [2] 李豫青, 王东林, 马红茹, 等. 高原病的中医证候类型探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(4): 653-656.

- [3] 魏婧韬. 高寒低氧环境下旅游人群急性高原病发病率调查 [J]. 社区医学杂志, 2017, 15(7): 22-24.
- [4] 冯 博, 刘 震, 邢雁伟, 等. 传统中 (藏) 药物防治急性高原病研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1876-1880.
- [5] 蔡钟奇, 李 泱. 急性高原病药物防治临床试验研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(34): 28-29.
- [6] 李连结, 姚建刚, 龙立波, 等. 组合赋权法在电能质量模糊综合评价中的应用 [J]. 电力系统自动化, 2007, 31(4): 56-60.
- [7] 田彦芳, 万海同, 朱紫烨, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(7): 1118-1125.
- [8] 陈 端, 曹 阳, 夏 辉, 等. 基于熵权法和 G1 法的大坝监测指标权重融合 [J]. 水电能源科学, 2012, 30(6): 92-94.
- [9] 曾 江, 蔡东阳. 基于组合权重的蒙特卡洛电压暂降评估方法 [J]. 电网技术, 2016, 40(5): 1469-1475.
- [10] 魏舒畅, 王继龙, 李 昶, 等. 改良差示酚磺法测定红芪粗多糖的方法研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 634-636.
- [11] 王继龙, 刘晓霞, 魏舒畅, 等. 基于 BP 神经网络的纤维性根茎药材酶解提取-超滤纯化的临界通量与压力预测 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(4): 586-590.
- [12] 姚美村, 齐 莹, 毕开顺, 等. 黄芪药效物质基础研究 [J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(2): 33-36.
- [13] 胡敏敏, 蔡宝昌, 张志杰, 等. 百合多糖的药效学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(2): 107-109.
- [14] 李 林, 张志杰, 蔡宝昌. 中药百合有效部位的药效学筛选 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(3): 175-177.
- [15] 龙 怡, 李佳川, 孟宪丽. 红景天有效成分对缺氧缺糖心肌细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 24-25.
- [16] 刘 娟, 王 莉. 枸杞子、红景天对小鼠耐力影响的研究 [J]. 农业科学研究, 2011, 32(2): 92-94.
- [17] 朱应怀, 刘晓霞, 王继龙, 等. 基于陶瓷膜超滤技术的甘草酸和甘草苷同步提取纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4173-4178.