

## 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

曾海蓉<sup>1</sup>, 李婷娜<sup>1</sup>, 冉倩<sup>1</sup>, 王琳<sup>1</sup>, 任媛媛<sup>1</sup>, 彭伟<sup>1</sup>, 高永翔<sup>2</sup>, 黄勤挽<sup>1\*</sup>, 谭瑾<sup>3</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 611137
3. 好医生药业集团有限公司, 四川 成都 610073

**摘要:** 目的 优选桂枝芍药知母颗粒的提取参数。方法 采用 HPLC 法和 Elisa 法, 以桂皮醛、芍药苷、芒果苷、甘草酸提取率, 出膏率及炎症因子白细胞介素-6 (IL-6) 水平为评价指标, 采用熵权法确定各指标权重系数, 结合 Box-Behnken 响应面法结果优化桂枝芍药知母颗粒提取工艺参数。结果 桂皮醛、芍药苷、芒果苷、甘草酸分别在 3.27~104.64、8.16~261.03、1.39~89.27、1.00~33.00  $\mu\text{g/mL}$  内呈良好的线性关系,  $r$  分别为 0.999 9、1.000 0、0.999 9、0.999 9; 桂枝芍药知母提取液具有抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 MH7A 细胞 (由 TNF- $\alpha$  造模) 增殖的作用, 半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为 1.02 mg/mL, 且具有抗炎活性, 采用信息熵赋权法确定各指标的客观权重, 按照其确定的权重系数进行综合评价, 且考虑实际情况, 确定桂枝芍药知母颗粒的最佳提取工艺条件为加 16 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。验证试验结果显示预测值与实测值相比, RSD 小于 3%。结论 优选后的工艺稳定可行, 重复性好, 可用于大批量生产。

**关键词:** 桂枝芍药知母颗粒; Box-Behnken 响应面法; 多指标; 权重分析; 熵权法; 抗炎

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)01-0084-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.013

## Optimization of extraction process of Compound Guizhi Shaoyao Zhimu Granules by combination of response surface methodology with entropy weight method

ZENG Hai-rong<sup>1</sup>, LI Ting-na<sup>1</sup>, RAN Qian<sup>1</sup>, WANG Lin<sup>1</sup>, REN Yuan-yuan<sup>1</sup>, PENG Wei<sup>1</sup>, GAO Yong-xiang<sup>2</sup>, HUANG Qin-wan<sup>1</sup>, TAN Jin<sup>3</sup>

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Basic Medical School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
3. Good Doctor Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengdu 610073, China

**Abstract: Objective** To optimize the extraction process parameters of Guizhi Shaoyao Zhimu Granules (GSZG). **Methods** Using high performance liquid chromatography and Elisa, the extraction rate of *trans*-cinnamaldehyde, paeoniflorin, mangiferin, glycyrrhizic acid, the dry extract yield of extracted herbs and inflammatory factor IL-6 were comprehensively evaluated. The information entropy weighting method was used to determine the objective weight of each index, and response surface methodology was adopted to optimize the extraction process parameters of GSZG. **Results** The method had good linear relationship within the range of 3.27—104.64  $\mu\text{g/mL}$  for *trans*-cinnamaldehyde ( $r = 0.999\ 9$ ), 8.16—261.03  $\mu\text{g/mL}$  for paeoniflorin ( $r = 1.000\ 0$ ), 1.39—89.27  $\mu\text{g/mL}$  for mangiferin ( $r = 0.999\ 9$ ), and 1.00—33.00  $\mu\text{g/mL}$  for glycyrrhizic acid ammonium salt ( $r = 0.999\ 9$ ). Guizhi-Shaoyao-Zhimu extraction had the effect of inhibiting the proliferation of MH7A cells (molded by TNF- $\alpha$ ) with  $\text{IC}_{50}$  of 1.02 mg/mL, and had anti-inflammatory activity. Entropy method was more scientific, reasonable and stable. According to the comprehensive scoring results and practical situation, it was determined that the best extraction process of the preparation was to add 16 times the amount of water, and decocted three times for 1 h each time. The RSD of the predicted value was less than 3% compared with the measured value. **Conclusion** The preferred process has high extraction rate, with good stability and repeatability, which is

收稿日期: 2019-08-08

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09721004-009)

作者简介: 曾海蓉 (1994—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药炮制和制剂研究。Tel: 18408257742 E-mail: Zenghairong123@126.com

\*通信作者 黄勤挽, 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药炮制和制剂研究。Tel: (028)61800231 E-mail: hqw2163@163.com

suitable for the mass production of GSZG.

**Key words:** Guizhi Shaoyao Zhimu Granules; Box-Behnken response surface method; multi-indexes; weight analysis; entropy weight method; anti-inflammation

桂枝芍药知母颗粒 (Guizhi Shaoyao Zhimu Granules, GSZG) 是由桂枝、白芍、知母、甘草、防风、白术、生姜、麻黄和附子 (炮) 9 味饮片组成的复方制剂, 处方出自《金匱要略·中风历节病脉证治篇》, 为治疗痹症的经典名方, 具有祛风除湿、温经散寒、滋阴清热的功效, 有较大研究价值。经过本草考证, 现代处方和剂量为桂枝 12 g、白芍 9 g、知母 12 g、防风 12 g、白术 15 g、麻黄 6 g、甘草 6 g、生姜 15 g、炮附片 6 g。

清·徐彬在《金匱要略论注》<sup>[1]</sup>阐述了“桂枝行阳, 知芍养阴, 独摯以此 3 味为方名者, 以此为治阴阳俱痹也。”郭洪涛<sup>[2]</sup>证明了桂枝芍药知母方具有调节血清中白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1、IL-10 以及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等免疫因子的作用, 并可减轻氧化损伤。覃艺等<sup>[3]</sup>发现桂枝芍药知母汤中芍药苷、芒果苷、肉桂酸含量的高低与 DPPH 自由基清除活性呈负相关性。中药制剂提取工艺评价中, 常用出膏率及有效成分或指标成分含量进行综合评价, 因此本制剂选择出膏率、桂皮醛、芍药苷、芒果苷、甘草酸以及炎症因子 IL-6 作为提取工艺的评价指标。

中药提取工艺研究中, 对多指标的合理综合评价, 直接影响提取工艺参数的确定<sup>[4-7]</sup>。而综合评价中, 确定各个评价因素的权重系数又是科学、合理地作出评价的基础。本实验采用熵权法<sup>[8-12]</sup>对 Box-Behnken 响应面法结果进行综合评价, 确定 GSZG 的最佳提取工艺参数, 旨在为 GSZG 的后续研究开发提供参考。

### 1 仪器与材料

岛津 LC-2030C3D 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; FA1204C 电子天平, 上海越平科学仪器有限公司; UPH-I-10T 优普超纯水器, 成都超纯科技有限公司; SB-3200DT 超声波清洗机, 宁波新艺超声波设备有限公司; DZTW 电子调温电热套, 邦西仪器科技(上海)有限公司; Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); Shimadzu Shim-pack GIST-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5

$\mu$ m); Emax Plus 酶标仪, Biochrom Ltd. Cambrigde.

本研究中所用的饮片均由好医生药业集团有限公司提供, 如表 1 所示, 经成都中医药大学卢先明教授鉴定, 桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎, 炮附片为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根加工品白附片的炮制加工品。按《中国药典》2015 年版方法检测, 均符合相关项下规定。对照品桂皮醛 (批号 110710-201821, 质量分数 99.6%)、芍药苷 (批号 110736-201842, 质量分数 97.4%)、芒果苷 (批号 111607-201704, 质量分数 98.1%)、甘草酸铵 (批号 110731-201619, 质量分数 93.0%) 均购于中国食品药品检定研究院; 乙腈, 色谱纯, Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯, 实验用水为实验室自制超纯水。类风湿关节炎滑膜成纤维细胞 MH7A 购于苏州北纳创联生物技术有限公司; IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 A30690153)、MTT Cell Proliferation Assay Kit (批号 A86710643) 均购于杭州联科生物技术有限公司。

### 2 方法与结果

#### 2.1 桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸的定量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 分别精密称取桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸铵 (甘草酸质量 = 甘草酸

表 1 GSZG 的饮片来源

Table 1 Sources of substance decoction of GSZG

饮片	产地	批号	饮片	产地	批号
桂枝	广东肇庆	180511	麻黄	甘肃古浪	180501
白芍	浙江磐安	180512	甘草	甘肃陇西	180511
知母	安徽亳州	180506	生姜	四川犍为	180501
防风	山西绛县	180512	炮附片	四川江油	180514
白术	四川雅安	180501			

铵质量/1.020 7) 对照品适量, 加甲醇配制成质量浓度分别为 105.060、268.000、182.000、291.000  $\mu\text{g/mL}$  的对照品储备液。分别精密移取对照品储备液适量, 加甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液, 备用。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密量取复方水提液 25 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.1.3 阴性样品溶液的制备** 按照 GSZG 处方剂量, 分别称取缺桂枝、缺白芍、缺知母、缺甘草的阴性处方量饮片 4 份, 加 16 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 精密量取缺桂枝、缺白芍、缺知母、缺甘草的阴性提取液 25 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

#### 2.1.4 色谱条件

(1) 桂皮醛<sup>[13]</sup>: 岛津 LC-2030C3D 高效液相色谱仪; Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 以乙腈-水 (32:68) 为流动相; 检测波长 290 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 体积流量 1.0 mL/min。

(2) 芍药苷<sup>[13]</sup>: Agilent 1260 高效液相色谱仪; Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 以乙腈-0.1%磷酸水溶液 (14:86) 为流动相; 检测波长 230 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 体积流量 1.0 mL/min。

(3) 芒果苷<sup>[13]</sup>: 岛津 LC-2030C3D 高效液相色谱仪; Shimadzu Shim-pack GIST-C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 以乙腈-0.2%冰醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~5 min, 10%~14%乙腈; 5~10 min, 14%~15%乙腈; 10~20 min, 15%乙腈; 检测波长 258 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 体积流量 1.0 mL/min。

(4) 甘草酸<sup>[13]</sup>: Agilent 1260 高效液相色谱仪; Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 以乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~8 min, 19%乙腈; 8~35 min, 19%~50%乙腈; 35~36 min, 50%~100%乙腈; 36~40 min, 100%~19%乙腈; 检测波长 237 nm; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 体积流量 1.0 mL/min。

GSZG 样品及各对照品的色谱图见图 1~4。

**2.1.5 线性关系考察** 分别精密吸取对照品系列质量浓度的溶液, 按“2.1.4”项下色谱条件进样检测分析, 以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 各自峰

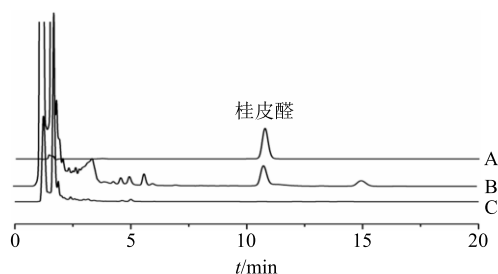


图 1 桂皮醛对照品 (A)、GSZG 样品 (B) 及缺桂枝阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of *trans*-cinnamaldehyde (A), GSZG sample (B), and negative control without *Cinnamomi Ramulus* (C)

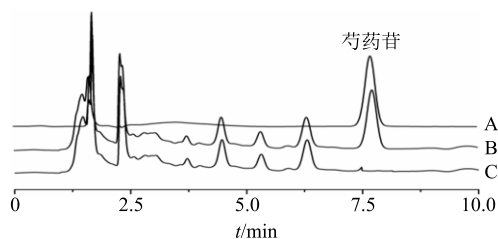


图 2 芍药苷对照品 (A)、GSZG 样品 (B) 及缺白芍阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of paeoniflorin (A), GSZG sample (B), and negative control without *Paeoniae Radix Alba* (C)

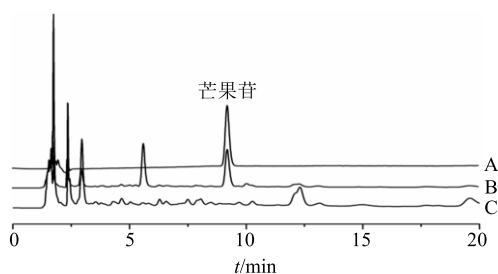


图 3 芒果苷对照品 (A)、GSZG 样品 (B) 及缺知母阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of mangiferin (A), GSZG sample (B), and negative control without *Anemarrhenae Rhizoma* (C)

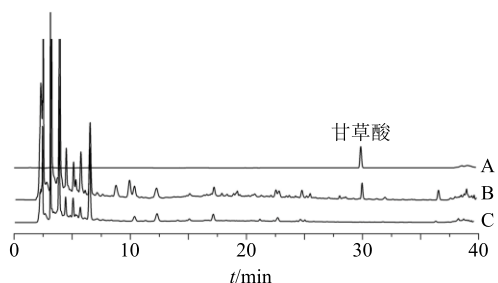


图 4 甘草酸对照品 (A)、GSZG 样品 (B) 及缺甘草阴性样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of glycyrrhizic acid (A), GSZG sample (B), and negative control without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C)

面积为纵坐标 (Y), 分别进行线性回归, 得各成分线性回归方程、相关系数 (r) 及线性范围, 分别为桂皮醛  $Y=76\ 166 X+31\ 265$ ,  $r=0.999\ 9$ , 线性范围  $3.27\sim 104.64\ \mu\text{g/mL}$ ; 芍药苷  $Y=14.031 X+9.251\ 7$ ,  $r=1.000\ 0$ , 线性范围  $8.16\sim 261.03\ \mu\text{g/mL}$ ; 芒果苷  $Y=44\ 122 X+19\ 406$ ,  $r=0.999\ 9$ , 线性范围  $1.39\sim 89.27\ \mu\text{g/mL}$ ; 甘草酸  $Y=6\ 385.4 X+1.775\ 6$ ,  $r=1.000\ 0$ , 线性范围  $1.00\sim 33.00\ \mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 在相应进样质量浓度范围内各成分线性关系良好。

**2.1.6 精密度试验** 取对照品溶液 (桂皮醛  $13.08\ \mu\text{g/mL}$ 、芍药苷  $32.63\ \mu\text{g/mL}$ 、芒果苷  $11.16\ \mu\text{g/mL}$ 、甘草酸  $8.29\ \mu\text{g/mL}$ ) 按“2.1.4”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定各成分色谱峰峰面积。结果桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.12%、1.47%、0.89%、0.35%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 测定桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸各成分峰面积, 结果桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸峰面积的 RSD 分别为 1.01%、0.72%、0.36%、1.44%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.1.8 重复性试验** 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.1.4”项下色谱条件测定。计算求得桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸的平均质量分数分别为 0.505、2.595、0.705、1.414 mg/g, RSD 分别为 1.42%、1.62%、1.69%、0.05%, 表明该方法重复性良好。

**2.1.9 加样回收率试验** 精密吸取已经测定的供试品溶液 1 mL, 共 6 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 精密加入对照品溶液 1 mL, 甲醇 2 mL, 依次测定峰面积并计算各成分加样回收率。结果桂皮醛、芍药苷、芒果苷和甘草酸的平均加样回收率分别为 99.29%、101.09%、102.33%、103.03%, RSD 分别为 0.54%、1.17%、1.53%、0.54%, 表明该方法回收率良好。

**2.1.10 样品测定** 取“2.4.1”项下 17 批水提液, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.4”项下色谱条件测定, 采用外标一点法进行计算, 得各成分含量。

**2.2 出膏率测定**

精密吸取复方水提液 25 mL, 置已恒定质量的蒸发皿中, 蒸干, 于  $105\ ^\circ\text{C}$  干燥 3 h, 取出, 置干

燥器中冷却 30 min, 精密称定质量, 计算出膏率。

$$\text{出膏率} = \text{干膏量} / \text{药材量}$$

**2.3 炎症因子 IL-6 的测定**

**2.3.1 供试品溶液制备** 取桂枝芍药知母汤复方水提液 200 mL, 真空冷冻干燥, 制得桂枝芍药知母汤物质基准冻干粉。精密称取冻干粉 0.25 g, 加蒸馏水配制成质量浓度为  $0.125\ \text{g/mL}$  的溶液作为储备液。

**2.3.2 MTT 检测** 消化离心, 细胞重悬, 计数, 5 000 个每孔种于 96 孔板; 用 DMEM 培养基 [含有 10% 胎牛血清 (FBS)] 培养 12 h 后, 细胞贴壁, 吸弃培养基, 换上含有  $50\ \text{ng/mL}$  TNF- $\alpha$  和不同质量浓度 (0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL) 的含药培养基 (100  $\mu\text{L}$ /孔), 培养 24 h; 避光条件下, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 的 MTT 液体, 继续培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  Formazan 溶解液二甲基亚砷 (DMSO), 轻轻震荡至 Formazan 全部溶解, 在 570 nm 测定吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

结果如表 2 所示, 桂枝芍药知母汤复方水提液具有抑制 MH7A (由 TNF- $\alpha$  造模) 增殖的作用, 半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 为 1.02 mg/mL, 故确定后续给药质量浓度为 0.125~1.000 mg/mL。

**2.3.3 IL-6 试剂盒测定炎症因子** 消化离心, 细胞重悬, 计数, 5 000 个每孔种于 96 孔板; 用 DMEM 培养基 (含有 10% FBS) 培养 12 h 后, 细胞贴壁, 吸弃培养基, 换上含有  $50\ \text{ng/mL}$  TNF- $\alpha$  和不同质量浓度 (0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL) 的含药培养基 (100  $\mu\text{L}$ /孔), 培养 24 h 后取上清液, 按 Elisa 试剂盒操作说明书进行测定, Elisa 测定结果除以细

表 2 桂枝芍药知母汤复方水提液对细胞存活率和炎症因子 IL-6 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of different doses of extract on cell viability and content of inflammatory factor IL-6 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

给药质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	细胞存活率/%	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )
空白	100.00 ± 12.14	60.27 ± 12.86
模型	99.29 ± 1.35	145.60 ± 13.11 <sup>#</sup>
0.125	93.19 ± 2.42	116.27 ± 4.46*
0.25	86.51 ± 2.46*	91.93 ± 3.44*
0.5	67.73 ± 3.00**	83.83 ± 7.77**
1.0	52.26 ± 3.51**	64.67 ± 4.31**
2.0	15.38 ± 1.25**	

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与空白组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs blank group

胞存活率即为炎症因子 IL-6 的质量浓度, 结果见表 2。表 2 结果表明桂枝芍药知母提取液具有抗炎活性, 且呈剂量依赖性, 且给药质量浓度为 1 mg/mL 时, 抗炎活性最强, 故以该质量浓度进行后续不同工艺提取液中 IL-6 炎症因子的测定。

**2.4 Box-Behnken 响应面法优化 GSZG 提取工艺**

**2.4.1 Box-Behnken 响应面法试验方案** 根据药物性质、结合生产实际及前期预实验, 以料液比 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C) 为考察因素, 取桂枝 12 g、白芍 9 g、知母 12 g、防风 12 g、白术 15 g、麻黄 6 g、甘草 6 g、生姜 15 g、附子 (炮) 6 g, 共 93 g, 17 份, 按 Box-Behnken 试验设计条件进行回流提取, 实验设计与结果见表 3。

**2.4.2 Box-Behnken 响应面法试验结果** 按“2.1.10”项下方法进行样品测定, 得 4 种指标成分含量, 按“2.2”项下条件测定出膏率, 按“2.3.3”项下条件测定 IL-6, 结果见表 3。

**2.4.3 信息熵方法对数据的分析** 信息熵是系统不确定性和无序程度的度量, 除了度量数据包含的信息量, 还可用于在多指标评价系统中用来确定各指标权重。该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, 其取值变异程度越大, 越

无序, 提供的信息量越多, 该指标就越重要; 反之该指标就越不重要。用熵权法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  $R=(x_{ij})_{mn}$ , 对大者为优的评价指标而言, 按照以下公式进行归一化。 $X_{ij}=(a_{ij}-\min_j\{a_{ij}\})/(\max_j\{a_{ij}\}-\min_j\{a_{ij}\})$ ,  $X_{ij}$  表示第  $i$  次试验时第  $j$  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  $(X_{ij})_{mn}$  做归一化处理, 经处理后的矩阵可视为评价指标的概率矩阵。其中  $P_{ij}$  表示第  $j$  次试验在第  $i$  个评价指标下的概率。

$$P_{ij} = X_{ij} / \sum_{j=1}^n X_{ij}$$

(3) 计算指标的熵值, 确定第  $i$  个评价指标的信息熵  $(H_i)$ 。

$$H_i = -k \sum_{j=1}^n P_{ij} \ln P_{ij}, k = 1 / \ln n$$

(4) 计算指标的熵权系数  $(W_j)$ 。

表 3 响应面设计试验方案及结果

Table 3 Design and results of response surface design test

试验号	A	B/h	C	桂皮醛/ (mg·g <sup>-1</sup> )	芍药苷/ (mg·g <sup>-1</sup> )	芒果苷/ (mg·g <sup>-1</sup> )	甘草酸/ (mg·g <sup>-1</sup> )	出膏率/%	IL-6/ (pg·mL <sup>-1</sup> )	综合评分 (Y <sub>j</sub> )
1	14 (0)	1.5 (0)	3 (0)	0.977	2.619	0.789	0.912	32.00	54.3	85.330 7
2	14	2.0 (+1)	4 (+1)	0.991	2.664	0.985	1.109	30.94	67.6	90.291 1
3	14	1.5	3	1.164	2.616	0.801	1.021	32.13	69.6	88.167 8
4	14	2.0	2 (-1)	0.887	2.408	0.747	1.110	31.67	66.9	83.389 7
5	14	1.5	3	1.050	2.874	0.855	0.966	32.52	67.6	88.787 9
6	14	1.5	3	1.129	2.595	0.763	0.896	30.90	80.9	82.614 1
7	16 (+1)	1.5	2	0.900	2.503	0.709	0.878	30.05	70.9	78.213 8
8	14	1.0 (-1)	2	0.978	2.558	0.709	0.879	28.52	64.9	79.604 3
9	12 (-1)	1.0	3	1.126	2.512	0.701	1.126	30.51	60.9	87.051 3
10	14	1.5	3	1.078	2.614	0.687	1.126	30.88	59.9	87.158 1
11	12	1.5	4	0.892	2.678	0.740	0.982	31.97	70.3	82.788 9
12	12	2.0	3	0.775	2.702	0.848	1.159	33.20	85.6	84.896 9
13	14	1.0	4	1.076	2.861	0.946	1.051	33.03	71.6	91.892 7
14	16	1.5	3	1.254	2.695	0.653	0.897	30.16	52.9	86.285 4
15	16	1.0	4	1.130	2.958	0.896	1.014	34.27	54.3	94.743 4
16	12	1.5	2	0.842	2.570	0.566	0.974	30.57	68.9	77.488 2
17	16	2.0	3	1.092	2.865	0.826	1.039	33.27	90.3	87.615 6

$$W_j = 1 - H_i / \sum_{i=1}^m (1 - H_i), \quad \sum_{j=1}^m W_j = 1, \quad 0 \leq W_j \leq 1$$

由此公式可知，当信息熵值越小，熵权系数越大，即当  $X_{ij}$  值相差越大，表明该指标传递的信息量越多，作用越大，其权重值越大。通过计算，结果见表 4。

运用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表中的数据进行 2 次多元回归拟合分析（表 5），得到料液比（A）、提取时间（B）、提取次数（C）与综合评分（Y）之间的 2 次多元回归模型方程： $Y_j = 7.695 64 + 9.526 99 A - 22.718 24 B + 11.081 13 C + 0.113 23$

表 4 各成分相关评价指标计算结果

Table 4 Results of relevant evaluation indexes of each component

指标	$H_i$	$W_j$	指标	$H_i$	$W_j$
桂皮醛	1.075 5	0.179 5	甘草酸	1.081 4	0.193 6
芍药苷	1.084 5	0.200 9	干膏率	1.083 9	0.199 5
芒果苷	1.070 2	0.166 9	IL-6	1.025 0	0.059 5

$$AB + 0.903 94 AC - 2.900 41 BC - 0.413 74 A^2 + 9.805 42 B^2 - 2.459 64 C^2.$$

模型  $F=7.90$ ,  $P<0.01$ , 表明 2 次多元回归模型良好，而  $r^2=0.910 3$ ,  $r_{adj}^2=0.795 1$ , 差异系数 (CV) = 2.47%，表明模型模拟程度良好，相关度良好，试验误差较小； $F_{失拟}=0.35$ ,  $P=0.794 9>0.05$ , 模型失拟度不显著，可以用此模型进行分析和预测。由表中  $F$  值可知，模型的 1 次项 C 呈极显著影响；交互项及 2 次项均不显著。各因素对 GSZG 提取工艺影响的主次顺序为 C（提取次数）>A（料液比）>B（提取时间）。

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件得到 2 次回归方程等高线及响应曲面图评价试验因素之间的交互强度，来确定最佳炮制工艺参数。等高线的形状可以反映出交互效应的强弱，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，结果见图 5。根据模型拟合结果同实际生产，将 GSZG 最优提取工艺设为料液比 16，提取 1 h，提取 3 次。

表 5 回归模型方差分析

Table 5 ANOVA for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	318.190	9	35.350	7.900	0.006 3	A <sup>2</sup>	11.380	1	11.380	2.540	0.154 9
A	21.090	1	21.090	4.710	0.066 6	B <sup>2</sup>	19.670	1	19.670	4.390	0.074 3
B	0.310	1	0.310	0.068	0.801 3	C <sup>2</sup>	19.800	1	19.800	4.420	0.073 5
C	150.020	1	150.020	33.510	0.000 7	残差	31.340	7	4.480		
AB	0.040	1	0.040	0.009	0.927 4	失拟项	6.460	3	2.150	0.350	0.794 9
AC	10.180	1	10.180	2.270	0.175 3	纯误差	24.880	4	6.220		
BC	8.800	1	8.800	1.970	0.203 7	总误差	349.530	16			

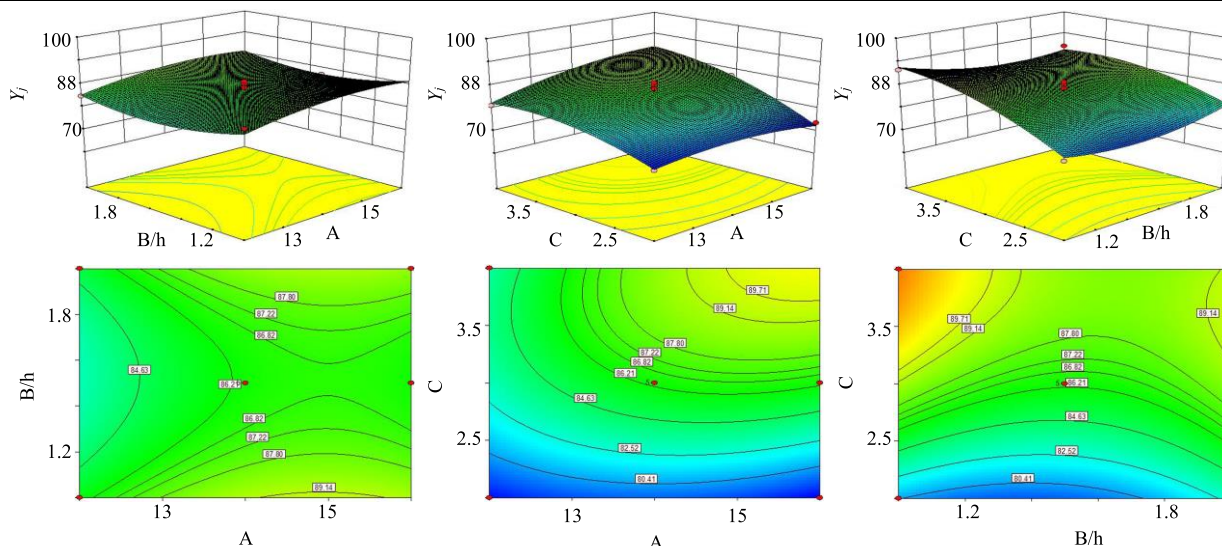


图 5 3D 响应面图及等高线图

Fig. 5 3D response surface and contour map

## 2.5 提取工艺验证

根据软件拟合的最优提取工艺条件进行验证实验,按处方称取 3 份饮片,置于烧瓶,按优选的最优工艺参数进行提取,考虑到实际操作情况,将预测的最优工艺参数微调料液比 16,提取 1 h,提取 3

次,结果见表 6。料液比 16,提取 1 h,提取 3 次时预测值同实测值比较,  $RSD < 3\%$ ,表明模型预测性好。说明 Box-Behnken 试验设计响应面法适用于 GSZG 的提取工艺优化,其建立的提取工艺稳定和重复性较好,可操作性强,具有一定的实际应用价值。

表 6 工艺验证结果

Table 6 Process validation results

试验号	桂皮醛/(mg·g <sup>-1</sup> )	芍药苷/(mg·g <sup>-1</sup> )	芒果苷/(mg·g <sup>-1</sup> )	甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	干膏率/%	IL-6/(pg·mL <sup>-1</sup> )	综合评分
1	1.24	2.66	0.79	0.89	32.81	53.90	89.543 8
2	1.26	2.72	0.80	0.90	32.69	54.10	90.485 9
3	1.21	2.69	0.76	0.91	32.80	54.20	89.079 2
RSD/%	2.03	1.12	2.66	1.11	0.20	0.28	0.80

## 3 讨论

在体现中医药动物模型不完善的情况下,采用多成分为指标的综合比较加体外细胞实验方式应是重要的评价手段之一<sup>[14-16]</sup>。本实验通过成分同疗效相结合,较为全面地优选最优提取工艺条件。

权重系数的选择:复方制剂提取工艺研究时,不论是指标的筛选还是权重系数的确定都比较困难。主观权重系数往往凭借个人对分析对象的各个因素重要程度以及依照经验主观确定系数,易受学者知识深度和广度的影响,主观性较强。客观权重系数是指经过对实际发生的资料进行整理,计算和分析,从而得出的权重系数,例如熵权法,CRITIC法和标准离差法。熵权法精度较高,客观性更强,能够更好地解释所得结果。本实验首次采用熵权法计算综合权重优选 GSZG 提取工艺,使计算出的权重具有稳定性和可靠性,综合评价实验结果也更赋有科学性和合理性。

前期预试验,采用单因素法考察了料液比、提取时间、提取次数对提取工艺的影响,得出每个因素相对较好的参数。通过 Box-Behnken 试验设计响应面法结果分析,筛选出的提取工艺简单可行、质量稳定,为 GSZG 的提取工艺提供参考。

### 参考文献

- [1] 周扬俊,赵以德.金匱玉函经二注[M].北京:人民卫生出版社,1990.
- [2] 郭洪涛.桂枝芍药知母汤治疗类风湿关节炎述要[J].河南中医,2013,33(11):1859-1860.
- [3] 覃艺,曾海蓉,王琳,等.经方桂枝芍药知母汤物质基准的 HPLC 指纹图谱及清除 DPPH 谱效关系的研究[J].中国中药杂志,2019,44(14):3042-3048.
- [4] 常占瑛,古丽巴哈尔·卡吾力,王梅,等.基于多指

标权重分析和正交设计法优选复方必清颗粒的提取工艺[J].中国现代应用药学,2019,36(1):64-68.

- [5] 刘小妹,程中琴,施崇精,等.基于 AHP-CRITIC 法的正交设计优选参膝口服液提取工艺[J].中草药,2018,49(11):2577-2583.
- [6] 刘小妹,王姗姗,施崇精,等.基于 AHP-CRITIC 权重分析的 Box-Behnken 响应面法优化参膝口服液提取工艺研究[J].中药材,2019,42(1):150-155.
- [7] 王淳,宋志前,夏磊,等.HPLC 法测定桂枝芍药知母汤中 5 种有效成分[J].中草药,2014,45(21):3105-3108.
- [8] 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.
- [9] 曲彤,袁培培,张琳,等.基于 AHP-熵权法结合 D-最优设计响应面法优化玄参蒸制工艺[J].中草药,2019,50(10):2325-2331.
- [10] 王星星,李淼,康小东,等.基于信息熵赋权法优化哮喘方醇提工艺[J].中成药,2017,39(7):1391-1394.
- [11] 邢增智,李帅,张爱军.基于信息熵赋权法的正交试验优化七味蟾参方提取工艺研究[J].中国药房,2019,30(3):376-380.
- [12] 陈丽津,汤浩,石磊,等.基于信息熵理论的正交设计优化消乳增胶囊的提取工艺[J].中草药,2019,50(14):3345-3350.
- [13] 中国药典[S].一部.2015.
- [14] 蓝梧涛,吴雪辉,章文,等.油茶叶多酚的提取工艺优化及其体外抗氧化性的研究[J].中国油脂,2019,44(2):118-122.
- [15] 王欢,陈长宝,张波,等.响应面法优化黄绿卷毛菇子实体多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].菌物学报,2019,doi:org/10.13346/j.mycosystema.190137.
- [16] 梁兆超,郭显炜,宋艳娟,等.响应面法优化双孢蘑菇多糖提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J].农业科技导报,2019,21(8):161-168.