

基于 AHP-CRITIC 法正交优选乌甘袋泡茶提取工艺及抗炎作用研究

张 娇, 蒋倩倩, 张伯言, 魏 屹*

西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610000

摘 要:目的 确定指标权重系数, 建立乌甘袋泡茶饮片最佳提取工艺并进行抗炎机制研究。方法 比较层次分析法(AHP)、基于指标相关性的权重确定方法(CRITIC)、AHP-CRITIC 混合加权法确定权重系数, 对正交试验结果进行综合得分比较, 优选乌甘袋泡茶饮片提取工艺。通过 HE 染色观察大鼠咽部黏膜病理变化, 测定血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量变化探讨抗炎作用。结果 AHP-CRITIC 混合加权法科学优选出最佳煎煮工艺参数为饮片浸泡 30 min, 第 1 次加 7 倍量水煎煮 45 min; 第 2、3 次加 6 倍量水煎煮 30 min, 浓缩至饮片质量 5 倍量。乌甘袋泡茶高、中剂量组可以改善咽部黏膜组织病变, 可以降低 L-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 含量。结论 通过 AHP-CRITIC 混合加权法正交试验优选的乌甘袋泡茶饮片提取工艺稳定。此工艺条件下的饮片提取液继续浓缩制备的乌甘袋泡茶对大鼠慢性咽炎有一定的治疗作用, 通过降低炎症因子发挥药效。

关键词: 乌甘袋泡茶; AHP-CRITIC; 正交试验; 慢性咽炎; L-1 β ; IL-6 β ; TNF- α ; 炎症因子

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)08-2177-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.026

Study on extraction process and anti-inflammatory effect of Wugan Tea based on AHP-CRITIC analysis

ZHANG Jiao, JIANG Qian-qian, ZHANG Bo-yan, WEI Yi

School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610000, China

Abstract: Objective To determine the index weight coefficient, establish the best extraction process of Wugan Tea, and study the anti-inflammatory mechanism. **Methods** Compared with analytic hierarchy process (AHP), based on criteria importance through intercriteria correlation (CRITIC) and AHP-CRITIC mixed weighting method to determine weight coefficient, comprehensive score of orthogonal test results was compared to optimize the extraction process of Wugan Tea. The pathological changes of pharyngeal mucosa in rats were observed by HE staining. The changes of serum interleukin-1 (IL)-1 β , IL-6 β , and tumor necrosis factor (TNF- α) levels were observed to explore the anti-inflammatory effects. **Results** The best decoction process parameters were optimized by Mixed weighted AHP-CRITIC method as following: soaking pieces for 30 min, adding seven times of water to boil for 45 min for the first time, adding six times of water to boil for 30 min for the second and third times, and concentrating to five times of pieces mass. The high and medium dose of Wugan Tea can improve the pathological changes of pharyngeal mucosa and reduce the content of L-1 β , IL-6 β and TNF- α . **Conclusion** The extraction process of the tea pieces from Wugan Tea optimized by AHP-CRITIC mixed weighted orthogonal test is stable. The concentrated and prepared pieces has a certain therapeutic effect on chronic pharyngitis in rats, and exerts its efficacy by reducing inflammatory factors.

Key words: Wugan Tea; AHP-CRITIC; orthogonal test; chronic pharyngitis; L-1 β ; IL-6 β ; TNF- α ; inflammatory factors

慢性咽炎 (chronic pharyngitis) 为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症, 病程长, 症状顽固^[1], 不易治愈, 严重影响患者的正常生活。目前, 对于慢性咽炎的治疗有中药与化学药 2 种方式, 但分别

存在起效长、价格昂贵、服用不便及不同程度副作用问题。乌甘袋泡茶是以张仲景《伤寒论》中“桔梗汤”为基础, 加味乌梅、绞股蓝、绿茶, 乌梅、桔梗、甘草、绞股蓝、绿茶以 2 : 1 : 1 : 1 : 1 配方

收稿日期: 2019-11-12

基金项目: 中藏药大健康产品开发创新团队 (2018C031); 川产道地药材 (乌梅) 综合开发与区域发展项目 (2017ZY006)

作者简介: 张 娇 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准与药物分析。Tel: 18380212569 E-mail: 18380212569@163.com

*通信作者 魏 屹 (1966—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量标准与药物分析。Tel: 18828030216 E-mail: weiyiyxy@126.com

而成。乌梅药量加倍,敛肺止咳,为方中君药;桔梗利咽排脓,为臣药;甘草祛痰止咳,同时调和诸药,为佐药;绞股蓝可消炎止咳,绿茶可清热降火,同为使药;绞股蓝、绿茶发挥袋泡茶载体作用,将饮片提取液的浓缩液与载体混合均匀,做成袋泡茶剂型。方中所用药材均为“药食同源”类,安全无毒副作用。同时现代实验研究证实所用药材均对咽炎有一定作用。其复方中总皂苷成分对多种非特异性炎症有明显抗炎作用;甘草酸^[2-3]、甘草次酸^[4]是镇咳祛痰的主要有效成分;桔梗有祛痰^[5-6]、抗炎作用^[7],乌梅中有机酸有抗炎作用^[8],可协同作用于慢性咽炎辅助治疗。

但因中药化学成分较多,煎煮时多种化学成分相互影响,无法准确判断各有效成分对总体药效的贡献率。层次分析法(AHP)^[9]是将人的主观判断用数量形式处理以计算各指标权重,但主观计算权重系数存在误差,缺乏科学性指导。基于指标相关性的权重确定方法(CRITIC)^[10]是采用数学分析方法对多个指标进行客观赋权体现权重,科学严谨,但不能体现中药复方主治功效及组方比列的特点。故本研究将 AHP、CRITIC 2 种方法结合即 AHP-CRIRIC 混合加权法评价正交试验,既注重客观,又不失主观,评价结果更加科学、合理。同时,对乌甘袋泡茶治疗慢性咽炎的抗炎作用进行研究,为患者提供一个安全有效的辅助治疗慢性咽炎的

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2998 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;AUY 220 型电子分析天平,日本 Shimadzu 公司;徠卡-2016 转轮式切片机,德国 Leica 公司;TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机,常州市中威电子仪器有限公司;BMJ-III 型包埋机,常州郊区中威电子仪器厂;PHY-III 型病理组织漂烘仪,常州郊区中威电子仪器厂;BA400 Digital 数码三目摄像显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司。

1.2 材料

对照品枸橼酸(批号 CHB171201)、绿原酸(批号 CHB170713),均购自于成都克洛玛生物科技有限公司;对照品甘草苷(批号 wkq18040902)、桔梗皂苷 D(批号 wkq18052502)、甘草酸铵(批号 wkq18053006)均购自于四川省维克奇生物科技有

限公司;各对照品质量分数均 $\geq 98\%$;白细胞介素-1 β (IL-1 β ,批号 21I161)、IL-6 β (批号 21I136)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 21I141)ELISA(96T)试剂盒购自依科赛生物制品有限公司;慢严舒柠咽炎片(批号 Z61020304),西安科力药业有限公司。乌梅、桔梗、甘草均购自成都荷花池中药材批发市场,经宋良科副教授鉴定分别为乌梅来源于蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实;桔梗来源于桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根;甘草来源于豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎^[11]。

1.3 动物

SPF 级大鼠 48 只,雄性,体质量 180~220 g,购自成都达硕实验动物公司,生产许可证号 SCXK(川)2017-24。

2 方法与结果

2.1 乌甘袋泡茶生产工艺流程

乌甘袋泡茶由乌梅、桔梗、甘草、绞股蓝、绿茶按照 2:1:1:1:1 配方而成。按照比例取乌梅、甘草、桔梗饮片适量于圆底烧瓶,饮片加适量水浸泡后,回流提取一定时间,趁热滤过,合并提取液并浓缩,浓缩液与绞股蓝、绿茶粗粉(50 目)混合均匀,60℃干燥 4 h,灭菌,分装,即得。

2.2 色谱条件

采用 KromstarTM C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~10 min,3%乙腈;10~25 min,3%~12%乙腈;25~40 min,12%~15%乙腈;40~41 min,15%~19%乙腈;41~55 min,19%~30%乙腈;55~56 min,30%~19%乙腈;56~95 min,19%~50%乙腈;进样量 10 μ L;体积流量 0.6 mL/min;柱温 35℃;枸橼酸、绿原酸、桔梗皂苷 D 检测波长为 210 nm,甘草苷、甘草酸检测波长为 237 nm。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密称取枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸铵对照品适量于量瓶,加 50%乙醇溶解,得各对照品储备液,分别移取适量储备液混合,得混合对照品溶液(枸橼酸 4 284.0 mg/L、绿原酸 24.0 mg/L、甘草苷 151.2 mg/L、桔梗皂苷 D 101.8 mg/L、甘草酸 102.7 mg/L(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7),按“2.2”项色谱条件进样,记录色谱图,见图 1。

2.3.2 供试品溶液制备 称取乌梅 50 g 于圆底烧瓶, 甘草、桔梗饮片各 25 g 于圆底烧瓶, 饮片加入一定料液比的水浸泡后, 回流提取一定时间, 趁热滤过, 合并一定次数提取液, 减压浓缩至饮片质量 5 倍量, 得饮片提取液。取饮片提取液 1 mL, 50% 乙醇定容至 10 mL, 超声 (200 W) 45 min, 得供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 2。

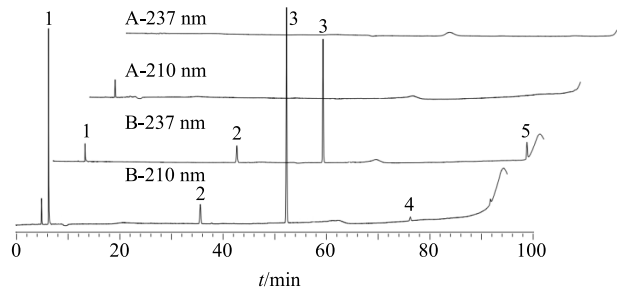


图 1 空白溶剂 (A) 和混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of blank solvent (A) and mixed reference substances (B)

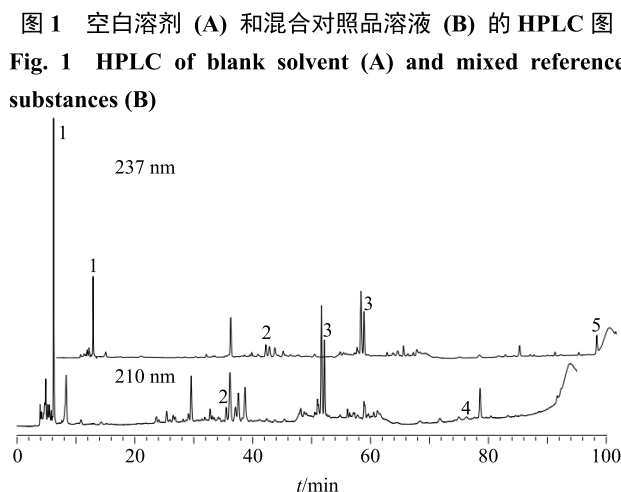


图 2 饮片提取液供试品溶液 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of extract of drinking pieces for sample solution

2.3.3 阴性供试品溶液制备 取乌甘袋泡茶配方与比例下饮片, 按照“2.3.2”项供试品溶液制备方法, 分别提取缺乌梅、缺桔梗、缺甘草共 3 份阴性提取液, 取阴性提取液 1 mL, 50% 乙醇定容至 10 mL, 超声 (200 W) 45 min, 得阴性供试品溶液, 按“2.2”项色谱条件进样分析, 记录色谱图, 见图 3。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项混合对照品溶液分别稀释 2、3、4、6、12、30 倍, 进样 10 μ L, 以峰面积为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得枸橼酸、绿原酸、

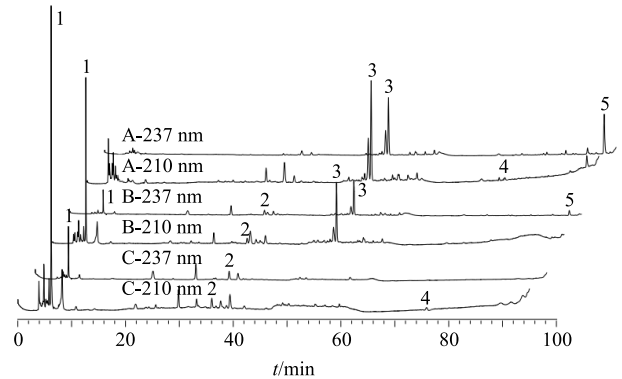


图 3 缺乌梅 (A)、缺桔梗 (B)、缺甘草 (C) 阴性供试品溶液 HPLC 图
Fig. 3 HPLC of negative test solution of lack of *Mume Fructus* (A), *Platycodonis Radix* (B), and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (C)

甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸的线性回归方程分别为 $Y_1=1\,254\,372\,X-163\,154$ ($r^2_1=0.999\,3$), $Y_2=48\,001\,784\,X+1\,039$ ($r^2_2=0.999\,9$), $Y_3=37\,592\,105\,X-34\,757$ ($r^2_3=0.999\,9$), $Y_4=2\,449\,610\,X-4\,145$ ($r^2_4=0.999\,9$), $Y_5=8\,590\,785\,X-11\,516$ ($r^2_5=0.999\,8$), 分别在 142.8~4\,284.0、0.8~24.0、5.0~151.2、3.4~101.8、3.4~102.7 mg/L 内线性关系良好。

2.4.2 专属性考察 按照“2.2”项色谱条件, 测定 50% 乙醇空白溶剂和“2.3.3”项阴性供试品溶液, 记录色谱图, 相关色谱图如图 1 和图 3 所示, 空白、阴性均无明显干扰, 该色谱方法专属性良好。从阴性供试品色谱图可知, 1、2 号峰 (枸橼酸、绿原酸) 来自乌梅, 3、5 号峰 (甘草苷、甘草酸) 来自甘草, 4 号峰 (桔梗皂苷 D) 来自桔梗。

2.4.3 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液, 按照“2.2”项色谱条件, 进样 6 次, 枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.22%、0.10%、1.88%、1.14%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批次饮片提取液供试品溶液分别放置 0、2、4、8、12、24 h, 按照“2.2”项色谱条件进样, 在 24 h 内枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.34%、2.34%、0.57%、1.19%、0.48%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取同一批饮片, 平行制备 6 批饮片提取液供试品溶液, 按照“2.2”项色谱条件进样, 枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸质量分数 RSD 分别为 0.43%、2.42%、0.50%、

1.12%、0.48%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的饮片提取液供试品溶液 0.5 mL，精密加入等量对照品储备液，平行制备 6 批供试品溶液，按照“2.2”项色谱条件进样，枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸的加样回收率分别为 99.24%、103.61%、98.48%、97.23%、97.91%，RSD 分别为 3.29%、0.78%、3.69%、2.36%、1.84%，表明该实验方法准确可靠。

2.5 出膏率测定

精密移取饮片提取液 10 mL，置已干燥至恒定质量的蒸发皿中，水浴蒸干移至 105 ℃烘箱 3 h，取出，置干燥器冷却 30 min，称定质量，计算出膏率^[12] [出膏率=(M_1-M_0)/ m ， M_1 为干膏与蒸发皿总质量， M_0 为空蒸发皿总质量， m 为提取药材质量]。

2.6 正交试验设计

2.6.1 考察指标的选择 在《中国药典》2015 年版^[11]中乌梅含量检测指标是枸橼酸，桔梗含量检测指标是桔梗皂苷 D，甘草含量检测指标是甘草酸和甘草苷。且参考文献报道^[2,4-5,7-8]上述成分均是饮片提取液镇咳祛痰、抗炎的药效成分，故以枸橼酸(X_1)、绿原酸(X_2)、甘草苷(X_3)、桔梗皂苷 D(X_4)、甘草酸(X_5)的提取率及饮片提取液出膏率(Y)为量化考察指标。

提取率=提取液中成分提取质量/提取药材质量

2.6.2 正交因素选择及设计 通过前期单因素试验结果，确立了以第 1 次提取时间(A)、浸泡时间(B)、加水倍量(C)、提取次数(D) 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交试验，正交因素水平见表 1。按照处方中乌梅、甘草、桔梗比例，称取各饮片适量，回流提取，合并提取液减压浓缩至饮片 5 倍量，得饮片提取液。

2.7 综合评分计算方法的选择

2.7.1 AHP 法确定综合评分权重系数 AHP 法是根据指标成对比较的优先判断矩阵方法。根据实验所用乌甘茶处方中药味剂量比及各药味中特征成分含量的多少，将各个指标进行量化，分为 5 个层次，

表 1 正交因素水平

Table 1 Orthogonal factor level

水平	因素			
	A/min	B/min	C/倍	D/次
1	30	20	7	1
2	45	30	8	2
3	60	40	9	3

其优先顺序为枸橼酸提取率(X_1)>甘草酸提取率(X_5)=甘草苷提取率(X_3)>桔梗皂苷 D 提取率(X_4)>绿原酸提取率(X_2)>出膏率(Y)，判断矩阵评分表^[13]见表 2。经 AHP 层次研究确定枸橼酸、绿原酸、甘草苷、桔梗皂苷 D、甘草酸、出膏率权重系数分别为 0.340 9、0.076 2、0.205 4、0.122 6、0.205 4、0.049 6。一致性比列因子(CR)=0.011<0.10，即指标优先比较判断矩阵具有一致性，权重系数有效。

表 2 判断矩阵评分

Table 2 Judgment matrix scoring table

特征成分	枸橼酸	甘草酸	甘草苷	桔梗皂苷 D	绿原酸	出膏率
枸橼酸	1	2	2	3	4	5
甘草酸	1/2	1	1	2	3	4
甘草苷	1/2	1	1	2	3	4
桔梗皂苷 D	1/3	1/2	1/2	1	2	3
绿原酸	1/4	1/3	1/3	1/2	1	2
出膏率	1/5	1/4	1/4	1/3	1/2	1

2.7.2 CRIRIC 法确定权重系数 CRIRIC 法是以评价指标间的对比强度及冲突性作为基础，通过标准差的形式将对对比强度体现出来，指标间的相关性将冲突性体现出来，是一种能客观反映指标权重的计算方法。将数据经线性插值进行标准化处理 [指标成分=(实测值-最小值)/(最大值-最小值)]^[14]，根据 SPSS 20.0 软件处理数据得 (6×6) 相关系数矩阵(A)。由 C_j 、 W_j ^[15]公式得各特征性成分及出膏率权重系数分别为 0.161 1、0.133 5、0.179 6、0.211 8、0.200 3、0.113 6。

$$A = \begin{bmatrix} 1.000 & 0.699 & 0.507 & 0.689 & 0.475 & 0.947 \\ 0.699 & 1.000 & 0.688 & 0.748 & 0.344 & 0.742 \\ 0.507 & 0.688 & 1.000 & 0.349 & 0.679 & 0.608 \\ 0.689 & 0.748 & 0.349 & 1.000 & 0.310 & 0.672 \\ 0.475 & 0.344 & 0.679 & 0.313 & 1.000 & 0.639 \\ 0.947 & 0.742 & 0.608 & 0.671 & 0.639 & 1.000 \end{bmatrix}$$

$$C_j = \delta_j \sum_{i=1}^n (1 - r_{ij})$$

$$W_j = C_j / \sum_{j=1}^m C_j$$

C_j 表示第 j 个指标所包含的信息量， δ_j 表示标准化后列向量的标准差， r_{ij} 表示 i 与 j 之间的相关系数， W_j 表示第 j 个指标的客观权重

2.7.3 AHP-CRIRIC 混合加权法确定权重系数 CRITIC 法相对于 AHP 法能更客观评价相应指标

的权重系数, 将 2 种方法结合计算综合权重, 即 $\omega_{\text{AHP-CRITIC}} = \omega_{\text{AHP}_j} \times \omega_{\text{CRITIC}_j} / \sum \omega_{\text{AHP}_j} \omega_{\text{CRITIC}_j}^{[14]}$, AHP-CRITIC 法计算各特征性成分及出膏率权重系数分别为 0.317 2、0.058 7、0.213 0、0.150 0、0.237 6、0.032 5。

2.7.4 3 种评分结果比较及综合评分公式确立 选用上述 3 种评分系数分别对正交试验结果综合评分, 各方法得分见表 3。

采用 SPSS 20.0 统计软件对 3 种评分结果的分数进行相关系数分析。AHP 法与 AHP-CRITIC 法的得分相关系数为 1.000, CRITIC 法与 AHP-CRITIC 法的得分相关系数为 0.993, AHP 法与 CRITIC 法的得分相关系数为 0.992, 3 者相关性显著 ($P < 0.05$)。AHP 法与 CRITIC 法权重系数的相关系数为 0.439, 相关性不显著 ($P = 0.395$), 说明 2 种方法所反映的信息不具有叠加性, AHP-CRITIC 混合加权法从主、客观 2 方面考虑, 所体现的信息更为科学合理, 故选择 AHP-CRITIC 法来计算综合评分 (Z)。

$$Z = (0.317\ 2\ X_1/X_{1\max} + 0.058\ 7\ X_2/X_{2\max} + 0.213\ 0\ X_3/X_{3\max} + 0.150\ 0\ X_4/X_{4\max} + 0.237\ 6\ X_5/X_{5\max} + 0.032\ 5\ Y/Y_{\max}) \times 100$$

2.8 正交试验结果

2.8.1 提取工艺确立 乌甘袋泡茶的饮片回流提取 $L_9(3^4)$ 正交试验结果见表 4, 方差分析结果见表 5。

由表 4 可得 $A_3B_2C_1D_3$ 为最佳提取工艺提提条件, 即加水 7 倍量饮片浸泡 30 min, 第 1 次提取 60 min, 第 2、3 次分别加 6 倍水, 提取 30 min, 合并

表 3 3 种评分方法得分结果

Table 3 Results of three scoring methods

实验序号	AHP	CRITIC	AHP-CRITIC
1	51.57	48.77	51.29
2	59.79	61.46	59.35
3	75.61	70.16	74.63
4	79.22	77.61	78.60
5	52.51	51.16	51.15
6	73.30	72.67	72.82
7	78.32	77.59	76.96
8	97.63	97.38	98.75
9	47.68	48.33	47.20

3 次提取液, 减压浓缩至饮片质量 5 倍量。

由表 5 可知, A (提取时间) 对各成分提取无显著影响, 为节约工业生产时间成本与能源, 选择缩短提取时间至 45 min。最佳工艺确定 $A_2B_2C_1D_3$ 即饮片加 7 倍量水浸泡 30 min, 第 1 次提取 45 min; 第 2、3 次均加 6 倍量水提取 30 min; 合并 3 次煎液后减压浓缩至饮片质量 5 倍量, 得饮片提取液。

2.8.2 验证实验 为验证正交试验结果的准确性, 保证乌甘茶袋泡茶饮片提取工艺的合理可靠, 按正交试验选出 $A_2B_2C_1D_3$ 工艺进行 3 次重复性验证实验。验证结果见表 6。结果表明, 各成分提取率 RSD 均在 3% 以内, 表明 $A_2B_2C_1D_3$ 提取工艺稳定, 可用于下一步研究。

2.9 药效学研究

慢性咽炎的发生可能与急性咽炎多次复发、上

表 4 正交试验设计与结果

Table 4 Orthogonal experiment design and results

序号	A	B	C	D	$X_1/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$X_2/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$X_3/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$X_4/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$X_5/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	Y/%	Z
1	1	1	1	1	124.560	0.292	2.235	2.026	9.824	19.84	51.29
2	1	2	2	2	160.886	0.387	1.103	4.526	8.709	29.23	59.35
3	1	3	3	3	200.869	0.367	2.582	2.507	15.511	37.77	74.63
4	2	1	2	3	208.948	0.401	2.728	4.786	11.140	37.71	78.60
5	2	2	3	1	150.594	0.360	1.217	2.561	7.785	27.99	51.51
6	2	3	1	2	207.238	0.403	1.282	5.077	11.674	34.78	72.82
7	3	1	3	2	199.223	0.520	3.484	4.427	7.815	34.91	76.96
8	3	2	1	3	196.802	0.493	4.559	5.156	20.961	40.17	98.75
9	3	3	2	1	120.667	0.332	1.158	2.837	8.448	23.32	47.20
K_1	61.76	68.95	74.29	49.88							
K_2	67.52	69.75	61.72	69.71							
K_3	74.05	64.88	67.58	83.99							
R	13.98	4.34	12.57	34.11							

表 5 方差分析
Table 5 Anova analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	F	显著性
A	236.642	2	5.791	
B (误差)	40.862	2	1.000	
C	237.363	2	5.809	
D	1 760.962	2	43.095	$P < 0.05$

表 6 工艺验证结果

Table 6 Process validation results

编号	枸橼酸/(mg·g ⁻¹)	绿原酸/(mg·g ⁻¹)	甘草苷/(mg·g ⁻¹)	桔梗皂苷 D/(mg·g ⁻¹)	甘草酸/(mg·g ⁻¹)	出膏率/%
1	188.734	0.473	2.129	5.587	17.724	37.18
2	189.885	0.453	2.217	5.717	17.736	38.03
3	190.452	0.469	2.220	5.733	17.643	37.64
平均值	189.691	0.465	2.189	5.679	17.701	37.62
RSD/%	0.46	2.26	2.37	1.41	0.28	1.13

种主要由单核巨噬细胞产生的重要细胞因子和多肽调节因子,是导致炎症的一种重要因子。炎症的良好生物标志物是 C-反应蛋白 (CRP),其主要依赖于 IL-6 的表达。TNF- α 能使毛细血管通透性增加,刺激淋巴细胞增殖和分化,导致炎症反应和组织损伤^[17]。当炎症发生,炎症因子浓度会增加,故以 2.5% 氨水长时间刺激造模,检测 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α ^[18] 指标进行实验研究。

2.9.1 慢性咽炎模型的建立及给药 按照正交试验优选出饮片最佳提取工艺 A₂B₂C₁D₃,进行 10 倍放大实验研究。取放大实验饮片提取液继续减压浓缩(-0.08 MPa, 58 °C)至适量,与绞股蓝、绿茶粗粉混合,干燥,得乌甘袋泡茶。参照文献方法^[19]给药,同时根据《中国药典》2015 年版一部中乌梅、桔梗、甘草推荐每日服用量,乌甘袋泡茶(批次 20190411)推荐成人每日服用量为 8.0 g,(按 70 kg 体质量计)。取乌甘袋泡茶适量,加 10 倍量水回流提取 2 次,减压浓缩至 0.114 g/mL,实验前用蒸馏水分别稀释 2 倍和 3 倍。乌甘袋泡茶低、中、高剂量(0.36、0.72、1.14 g/kg)分别为正常量的 0.5、1、2 倍。取规格为 0.25 g/片的慢严舒柠咽炎片适量,临用研磨成粉,精密称定,给药剂量 0.34 g/kg,作为阳性药,空白组给予等容积蒸馏水。大鼠适应性喂养 1 周,随机将 SD 大鼠分为空白组、模型组、慢严舒柠咽炎片阳性药组及乌甘袋泡茶高、中、低剂量组,每组各 8 只。取 8 只做为空白组,其余大鼠固定后用镊子拉出鼠舌,用止血钳压住并撬开口,暴露咽部,使

呼吸道慢性炎症或长期受物理化学刺激、用嗓过度有关。本实验所用 2.5%氨水喷咽部造模,模拟长期受化学刺激因素所引发的慢性咽炎模型。长时间低浓度氨水刺激,可造成咽部红肿,形成炎症^[16]。通过 HE 病理切片观察咽部黏膜下组织可直观反映模型是否成功,乌甘袋泡茶是否有效。生化指标 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 的检测可间接反映药效。IL-1 β 是一

用喉头喷雾器给予 2.5%氨水喷咽部造模,每日上、下午各 1 次,每次 3 揞^[20-21],空白组同法,用蒸馏水喷咽部,连续 15 d。造模后第 16 天起,每日早晚各 ig 给药 1 次,给药容积为 0.01 mL/g,连续给药 7 d。

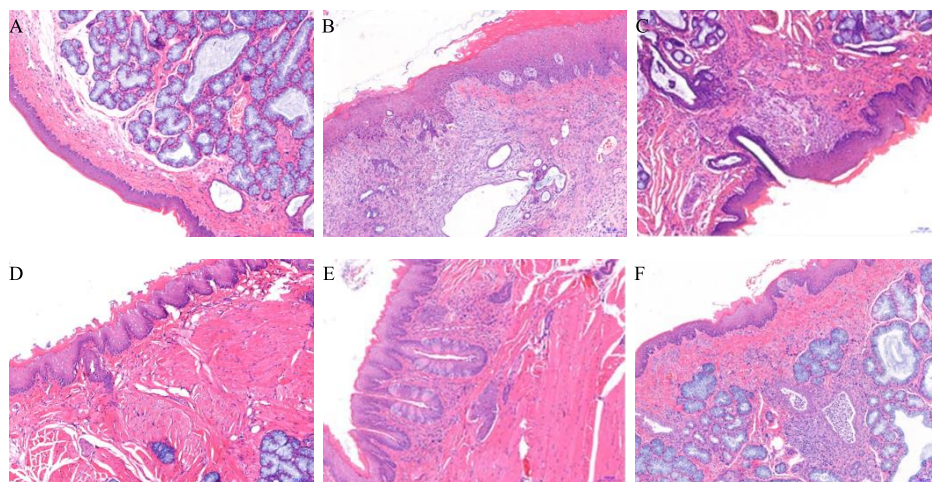
2.9.2 咽部病理学观察 ig 给药 7 d 后,大鼠股动脉取血(静置 30 min,待凝固后,4 °C,3 000 r/min 离心 15 min,分离上层血清置 2 mL 离心管中,密封,-80 °C 冷冻保存,4 d 内测定),取血后立即断头,取咽部黏膜组织,10%甲醛液中固定 24 h 后,取材,常规脱水,石蜡包埋,切片,用 HE 染色后于光镜下观察,结果见图 4。

由图 4 结果分析,模型组大鼠黏膜上皮增生、固有层腺上皮细胞变性、轻微出血、炎细胞浸润和纤维增生等病理改变,说明动物慢性咽炎模型造模成功。空白组和乌甘袋泡茶高剂量组未见明显病理变化;阳性药组黏膜上皮层结构较完整,结缔组织内见少量纤维组织增生和中性粒细胞浸润;乌甘袋泡茶中剂量组有黏膜上皮增生现象;低剂量组局部固有层内较多炎细胞浸润并伴有少量纤维组织增生现象。与模型组相比,乌甘袋泡茶各剂量组对大鼠咽部黏膜损伤均有不同程度改善,其中高剂量药效优于阳性药组,低剂量效果不明显,说明乌甘袋泡茶对慢性咽炎有一定改善作用,可用于对慢性咽炎的辅助治疗。

2.9.3 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 水平检测 将-80 °C 冷冻保存的各组血清置室温下复融,3 000 r/min 离

心 5 min, 吸取血清, 置 1 mL 离心管中, 采用 ELISA 法分别测定血清中 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α , 按照试剂盒说明操作。结果见表 7。

统计学处理用 SPSS 20.0 统计软件分析数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。



A-空白组 B-模型组 C-阳性药组 D-乌甘袋泡茶高剂量组 E-乌甘袋泡茶中剂量组 F-乌甘袋泡茶低剂量组
A-blank group B-model group C-positive drug group D-high dose of Wugan Tea group E-medium dose of Wugan Tea group F-low dose of Wugan Tea group

图 4 各给药组对慢性咽炎大鼠咽部黏膜病理变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 4 Effects of different dosage groups on pathological changes of pharyngeal mucosa in rats with chronic pharyngitis (HE, $\times 100$)

表 7 乌甘袋泡茶对大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effects of Wugan Tea on serum IL-1 β , IL-6 β and TNF- α levels of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
空白	—	26.20 $\pm$ 7.02	40.98 $\pm$ 14.63	11.00 $\pm$ 4.72
模型	—	38.30 $\pm$ 17.19*	63.45 $\pm$ 11.18*	15.10 $\pm$ 8.77*
慢严舒柠咽炎片	0.34	25.39 $\pm$ 8.85 [#]	43.44 $\pm$ 15.41 [#]	10.92 $\pm$ 4.95 [#]
乌甘袋泡茶	1.14	25.15 $\pm$ 16.99 [#]	48.66 $\pm$ 17.39 [#]	9.24 $\pm$ 5.19 [#]
	0.72	26.14 $\pm$ 17.16 [#]	50.43 $\pm$ 10.97 [#]	11.30 $\pm$ 2.68
	0.36	30.30 $\pm$ 11.55	52.77 $\pm$ 19.75 [#]	11.27 $\pm$ 4.07

与空白组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank group; [#] $P < 0.05$ vs model group

由表 7 分析, 与空白组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 浓度均明显增加, 呈显著性差异 ($P < 0.05$) 说明咽部有一定程度炎症, 大鼠慢性咽炎模型造模成功。与模型组相比, 乌甘袋泡茶高剂量组血清中 IL-1 β 、IL-6 β 、TNF- α 浓度显著降低 ($P < 0.05$), IL-1 β 、TNF- α 浓度与阳性药组接近, 药效与阳性药组接近。中剂量组 IL-1 β 、IL-6 β 与模型组有显著性差异 ($P < 0.05$)。低剂量组除 IL-6 β 与模型组呈显著性差异 ($P < 0.05$) 外, 其他炎症因子与模型组并无差异性, 综合考虑说明, 乌甘袋泡茶低剂量对慢性咽炎的治疗效果欠佳。乌甘袋泡茶中、高剂量均对慢性咽炎有一定治疗作用,

以高剂量药效最佳, 通过降低或抑制血清中炎症因子浓度, 改善慢性咽炎病症。

3 讨论

乌甘袋泡茶以经典方“桔梗汤”为基础, 疗效确切, 加味乌梅进行药效成分提取, 加味绞股蓝、绿茶粗粉做成袋泡茶剂型, 解决传统中药汤剂服用不方便的问题。研究中为保证乌甘袋泡茶提取工艺稳定性, 实验以多种特征成分提取率及出膏率为考察指标, 为避免工艺研究中主观赋予指标权重缺乏科学性的问题, 采用主观评分结合科学分析的 AHP-CRIRIC 混合加权法确定多指标权重系数, 确定最佳提取工艺。通过氨水刺激建立慢性咽炎模型, 观

察咽部黏膜病理切片及检测相关炎症因子水平,证明乌甘袋泡茶对慢性咽炎有一定治疗作用,期望可为患者提供一个安全、有效可长期服用的辅助治疗方式。

实验中乌甘袋泡茶提取工艺稳定,但在实际工业生产中饮片质量存在差异性,无法保证乌甘袋泡茶质量稳定。后续可研究饮片-提取液-乌甘袋泡茶中特征成分量值传递关系,确立特征成分的转移率及提取率范围,实现从饮片到成品质量可控,为其他中药制剂提供新的质量标准研究思路。

参考文献

- [1] 蒙慧菊,梁逸,何月洁,等.慢性咽炎的治疗与预防研究进展[J].中国临床新医学,2013,6(12): 1221-1225.
- [2] Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, et al. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression *in vivo* and *in vitro* [J]. *Pharmacol Sci*, 2010, 113(1): 76-83.
- [3] 黄群荣,马哲.甘草酸的药理作用研究进展[J].药物评价研究,2011,34(5): 384-387.
- [4] 王本祥.现代中药药理与临床[M].天津:天津科技翻译出版公司,2004.
- [5] 朱继孝,曾金祥,张亚梅,等.不同产地桔梗镇咳祛痰作用比较研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2015,17(5): 976-980.
- [6] 单进军,杨瑞,张新庄,等.桔梗汤止咳祛痰的网络药理学研究[J].中草药,2018,49(15): 3501-3508.
- [7] 隋美娇,姚琳,隋文霞,等.桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠肺组织 SP-A 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9): 156-159.
- [8] 张华月,李琦,付晓伶.乌梅化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2017,51(S1): 296-300.
- [9] 莫平莉,王洛临,卢泳,等.基于药效实验和层次分析法的参芪强心片提取工艺优选[J].中草药,2019,50(11): 2589-2597.
- [10] 张琳,周欣,闫丹,等.基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选陈皮饮片炮制工艺[J].中草药,2018,49(16): 3829-3834.
- [11] 中国药典[S].一部.2015.
- [12] 郑文青,张显,余婷婷,等.桑葛降糖粉的生产工艺与体外活性研究[J].食品工业科技,2018,39(8): 178-183.
- [13] 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): 2577-258.
- [14] 张琳,周欣,闫丹,等.基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选陈皮饮片炮制工艺[J].中草药,2018,49(16): 3829-3834.
- [15] 黄潇,刘婧,付小梅,等.基于 CRITIC 法计算权重系数的 Box-Behnken 响应面法优化栀子炭微波炮制工艺研究[J].中草药,2017,48(6): 1133-1138.
- [16] 薛淑媛,朱丹,姚兴凤,等.急、慢性咽炎动物实验研究概况[J].北方药学,2016,13(10): 121-122.
- [17] 苗明三,常兵杰,白明,等.急性咽炎动物模型制备规范(草案)[J].中药药理与临床,2018,34(1): 175-178.
- [18] 孔庆新,东方,李思阳,等.荔枝草提取物治疗慢性咽炎的作用及机制研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(1): 109-113.
- [19] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [20] 蒋兆梅,杨应亮,胡必凤,等.桉木精油对实验性慢性咽炎动物模型的作用机制研究[J].广西中医药大学学报,2019,22(1): 1-5.
- [21] 南淑玲,谢丹,章建,等.养阴清肺汤对慢性咽炎大鼠病理形态学及血液流变学实验观察[J].吉林中医药,2010,30(9): 813-815.