

Box-Behnken 设计-响应面法结合 G1-熵权法优化黄芪六一汤黄酮组分的提取纯化工艺

陈方圆¹, 王继龙^{2*}

1. 甘肃卫生职业学院, 甘肃 兰州 730207

2. 甘肃省中药制药工艺工程研究中心, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 研究黄芪六一汤 (Huangqi Liuyi Decoction, HLD, 黄芪-甘草 6:1 组成) 黄酮组分的提取和聚酰胺树脂富集纯化工艺。方法 以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素 9 个成分为评价指标, 以 G1-熵权法确定各指标的组合权重, 进行综合评分; 采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 对 HLD 黄酮组分提取的关键影响因素乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数进行优化; 采用单因素实验考察上样药液 pH 值、上样药液质量浓度、上样药液体积流量、上样量、水洗脱用量、洗脱剂乙醇体积分数、洗脱剂体积流量、洗脱剂用量等因素对黄酮组分聚酰胺富集纯化工艺的影响, 采用 Plackett-Burman 设计 (Plackett-Burman design, PBD) 结合 BBD-RSM 筛选显著影响因素并对其进行工艺优化, 比较聚酰胺树脂纯化前后各指标的含量。结果 最优提取工艺为 69% 乙醇回流提取 2 次, 每次 10 倍量乙醇提取 65 min; 最优纯化工艺为 pH 值 4.8、质量浓度 0.20 g/mL 的上样药液以 0.8 mL/min 体积流量按树脂-生药 1:1 的质量比上样, 4 个柱体积 (BV) 纯水以 1.5 mL/min 的体积流量洗脱除杂, 8 BV 体积分数 69% 乙醇以 1.5 mL/min 体积流量洗脱, 所得黄酮组分提取物中 9 个指标成分含量约是纯化前的 14 倍。结论 优选的 HLD 黄酮组分的提取和富集纯化工艺稳定、可行, 可为进一步成药性研究和组方中药研制奠定基础。

关键词: 黄芪六一汤; 组分中药; G1-熵权法; Box-Behnken 设计-响应面法; Plackett-Burman 设计; 聚酰胺树脂; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芹糖甘草苷; 甘草苷; 芹糖异甘草苷; 芒柄花苷; 甘草素; 毛蕊异黄酮; 异甘草素; 芒柄花素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4688-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.007

Optimization of extraction and purification process for flavonoids from Huangqi Liuyi Decoction based on Box-Behnken design-response surface methodology combined with G1-entropy method

CHEN Fangyuan¹, WANG Jilong²

1. Gansu Health Vocational College, Lanzhou 730207, China

2. Gansu Engineering Research Center for Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To study the extraction of flavonoids from Huangqi Liuyi Decoction (HLD, 黄芪六一汤, *Astragali Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 6:1) and the enrichment and purification process of polyamide resin. **Methods** Nine components of calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside, liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin apioside, ononin, liquiritigenin, calycosin, isoliquiritigenin and formononetin were used as evaluation indexes, and the combined weight of each index was determined by G1-entropy method, and the comprehensive score was made. Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to optimize the key factors affecting the extraction of flavonoids from HLD, such as ethanol volume fraction, ethanol dosage, extraction time and extraction times. The effects of pH value, mass concentration, volume flow rate, volume fraction of water, volume flow rate and amount of eluent on the enrichment and purification process of flavonoid component polyamide were investigated by single factor

收稿日期: 2024-01-21

基金项目: 甘肃省科技计划资助项目 (21JR1RA273); 甘肃省教育厅高校教师创新基金项目 (2024A-321); 甘肃省高等学校创新基金项目 (2021A-320); 甘肃省中药制药工艺工程研究中心开放课题 (ZYG202005)

作者简介: 陈方圆, 女, 讲师, 从事中药制剂工艺研究。E-mail: 1032370695@qq.com

*通信作者: 王继龙, 男, 讲师, 从事中药制剂工艺研究。E-mail: wjl8013@163.com

experiment. Plackett-Burman design (PBD) combined with BBD-RSM was used to screen the significant influencing factors, optimize the process, and compare the contents of each index before and after purification of polyamide resin. **Results** The optimal extraction process was that 69% ethanol was refluxed twice, and 10 times of ethanol was extracted for 65 min each time. The optimal purification process is as follows: the pH value is 4.8, the mass concentration is 0.20 g/mL, the volume flow rate is 0.8 mL/min, the resin-crude drug ratio is 1:1, the volume flow rate of four BV pure water is 1.5 mL/min, and the volume flow rate of eight BV 69% ethanol is 1.5 mL/min. The content of nine index component in the obtained flavonoids extract is about 14 times higher than that before purification.

Conclusion The optimized extraction, enrichment and purification process of flavonoids from HLD is stable and feasible, which can lay a foundation for further research on medicinal properties and development of component-based traditional Chinese medicine.

Key words: Huangqi Liuyi Decoction; component-based traditional Chinese medicine; G1-entropy method; Box-Behnken design-response surface methodology; Plackett-Burman design; polyamide resin; calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside; liquiritin apioside; liquiritin; isoliquiritin apioside; ononin; liquiritigenin; calycosin; isoliquiritigenin; formononetin

黄芪六一汤 (Huangqi Liuyi Decoction, HLD) 始载于《太平惠民和剂局方》，由黄芪、甘草以 6:1 比例配伍而成。方中黄芪补气生津为君药，甘草补脾和胃、益气复脉为臣药，全方具有平补气血、安和脏腑等功效，治疗男子、妇人诸虚不足、肢体劳倦、烦悸焦渴等^[1]。现代临床与药理研究表明，HLD 对肝炎病毒、胆汁淤积、酒精、药物等病因所致的慢性肝病及 2 型糖尿病疗效显著^[2-8]。慢性肝病以肝纤维化为主要特征，最终可发展为肝硬化、肝癌，其在全球范围内的发病率较高，但目前临床尚缺乏疗效明确的药物。2 型糖尿病在糖尿病患者中占 90% 以上，据国际糖尿病联盟 (International Diabetes Federation, IDF) 统计，2021 年全球 20~79 岁成年糖尿病患者人数达到 5.37 亿，其中我国患者数量高达 1.409 亿 (全球糖尿病患者的 1/4)，居全球首位^[9]。目前，虽有多种抗糖尿病的化学、生物化学药物 (如双胍类和磺脲类)，但这些药物都有一定的缺点，如引起低血糖、乳酸中毒、胃肠道不良反应、肥胖等。近年来的研究表明，黄酮类成分为 HLD 治疗慢性肝病和 2 型糖尿病的主要功效成分^[10-11]，其中来自黄芪和甘草的黄酮类成分均具有良好的保肝 (抗肝纤维化、改善肝硬化后并发症)、抗糖尿病及其并发症活性^[12-19]。因此，HLD 黄酮组分具有较好的应用和研究前景，制备活性成分含量高、质量稳定的黄酮组分有利于其药理作用、起效机制的进一步研究，有望开发成组分中药^[20]。

为了给后续 HLD 黄酮组分的成药性研究提供参考，本研究采用常用的乙醇回流提取法提取活性混合物黄酮组分，采用比较理想的聚酰胺柱色谱法对其进行富集纯化从而达到去粗取精、提高药效的目的，以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄

酮、异甘草素、芒柄花素 9 个代表成分为评价指标，采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 结合主客观组合赋权方法 G1-熵权法对黄酮组分的提取、纯化工艺进行优化，获得黄酮组分的高效、稳定制备工艺，为 HLD 的进一步开发利用奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1100 型高效液相色谱仪，G1315B DAD 检测器，美国 Agilent 公司；GL-10MD 型大容量冷冻离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；ME55 型十万分之一分析天平，梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司；JA11003N 型电子天平，上海菁海仪器有限公司；Elix Essential 5 型超纯水系统，美国默克密理博公司；DZF-6090 型真空干燥箱，上海齐欣科学仪器有限公司；SB-500DTY 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；HH-S4A 型电热恒温水浴锅，北京科伟永兴仪器有限公司；层析玻璃柱，江阴市创通层析设备有限公司。

1.2 试剂

对照品甘草苷 (批号 111610-201908，质量分数 95.0%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201505，质量分数 $\geq 97.1\%$)，中国食品药品检定研究院；对照品芒柄花苷 (批号 20160825)、毛蕊异黄酮 (批号 20160910)、芒柄花素 (批号 20160915)，质量分数均 $\geq 98\%$ ，天津万象恒远科技有限公司；对照品甘草素 (批号 07002-202108)、异甘草素 (批号 250234-202204)、异甘草苷 (批号 250026-202108)、芹糖甘草苷 (批号 170108-202112)、芹糖异甘草苷 (批号 170109-202111)，质量分数均 $\geq 98\%$ ，上海鸿永生物科技有限公司；聚酰胺 (批号 20211223，30~60 目)，台州市路桥四甲生化塑料厂；色谱纯乙腈，Sigma-

Aldrich 公司；色谱纯甲醇、甲酸，天津市大茂化学试剂厂；水为自制超纯水，其他试剂均为分析纯。

黄芪饮片（批号 20201204）来自甘肃复兴厚生物医药科技有限公司，甘草饮片（批号 201005）来自甘肃安源药业有限公司，经甘肃卫生职业学院付兴锋副教授鉴定，分别为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao 的干燥根和豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 9 个指标成分含量测定方法的建立

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素对照品适量，用体积分数为 70% 的乙醇溶液溶解并稀释，得到质量浓度分别为 83.20、188.80、139.18、64.80、58.66、112.00、47.92、26.00、21.36 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备

(1) 提取工艺研究供试品溶液的制备：取各工艺条件下的乙醇回流提取液，以 4 000 r/min 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 15 min，取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

(2) 柱后流出液供试品溶液的制备：取上柱流出液，用等体积醋酸乙酯萃取 3 次，醋酸乙酯液蒸干，残渣用体积分数为 70% 乙醇溶液溶解、定容，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

(3) 洗脱液供试品溶液的制备：取各工艺条件下的乙醇洗脱液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 260 nm；进样量 10 μL ；体积流量 1 mL/min；流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液，梯度洗脱：0~30 min, 16%~32% 乙腈；30~55 min, 32%~62% 乙腈；55~60 min, 62%~16% 乙腈；色谱图见图 1。

2.1.4 线性关系考察 用体积分数为 70% 乙醇溶液将混合对照品溶液稀释成不同质量浓度后按上述色谱条件进样测定，以质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得回归方程：毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=31.775X-2.5371$, $r=0.9999$, 线性范围 1.04~41.60 $\mu\text{g/mL}$ ；芹糖甘草苷 $Y=14.054X-9.5517$, $r=0.9999$, 线性范围 2.36~94.40 $\mu\text{g/mL}$ ；

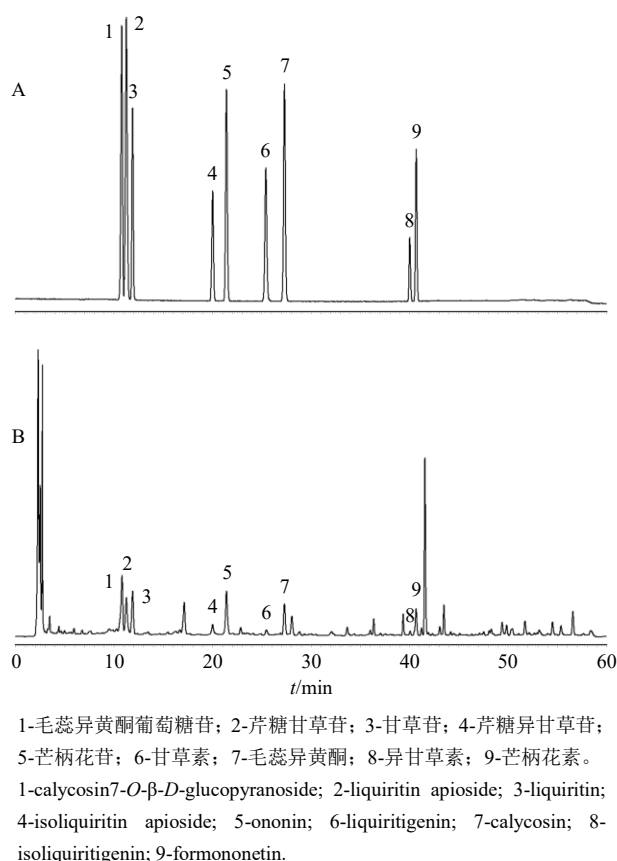


图 1 混合对照品 (A) 和 HLD 提取液 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and HLD extract (B)

甘草苷 $Y=12.426X+2.6483$, $r=0.9999$, 线性范围 1.74~69.59 $\mu\text{g/mL}$ ；芹糖异甘草苷 $Y=14.336X+1.7662$, $r=0.9998$, 线性范围 1.62~64.80 $\mu\text{g/mL}$ ；芒柄花苷 $Y=38.038X+14.029$, $r=0.9999$, 线性范围 0.73~29.33 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草素 $Y=10.028X+8.61$, $r=0.9997$, 线性范围 1.40~56.00 $\mu\text{g/mL}$ ；毛蕊异黄酮 $Y=47.72X+5.7464$, $r=0.9999$, 线性范围 0.60~23.96 $\mu\text{g/mL}$ ；异甘草素 $Y=19.583X+6.615$, $r=0.9997$, 线性范围 0.65~26.00 $\mu\text{g/mL}$ ；芒柄花素 $Y=59.781X+1.5368$, $r=0.9999$, 线性范围 0.53~21.36 $\mu\text{g/mL}$ ；结果表明，以上 9 个指标成分在各自的线性范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取混合对照品溶液按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次，分别计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素 9 个指标成分峰面积的 RSD 值，结果依次为 0.72%、0.86%、0.45%、0.49%、0.24%、0.31%、0.22%、0.60%、0.37%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取提取工艺研究供试品溶液(试验 1)按“2.1.3”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定,计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素 9 个指标成分的峰面积 RSD 值,结果依次为 1.21%、1.47%、0.89%、1.93%、1.74%、1.36%、0.95%、1.67%、1.06%,表明在 24 h 内供试品溶液中上述各指标成分稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一 HLD 提取液(试验 1)及 pH 为 5 的柱后流出液,分别按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,进样测定,分别计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素 9 个指标成分质量分数的 RSD 值,结果依次为 0.87%、1.01%、0.56%、0.94%、0.80%、0.73%、0.49%、0.68%、0.50%及 1.13%、1.52%、0.74%、0.89%、1.05%、1.20%、0.83%、0.97%、1.32%,表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取 9 份“2.1.7”项下已测定指标成分含量的 HLD 提取液(试验 1)及柱后流出液,加入相当于各自指标成分含量 50%、100%、150%的各对照品溶液,每个加样量平行制备 3 份供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件分别进样测定,计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素 9 个指标成分的加样回收率,结果平均加样回收率依次为 100.71%、99.10%、100.17%、98.92%、101.35%、100.93%、99.62%、99.36%、100.41%及 98.48%、97.69%、100.82%、102.77%、98.06%、99.21%、101.58%、97.15%、99.73%,RSD 分别为 1.75%、1.81%、1.44%、1.98%、2.32%、1.87%、1.90%、2.01%、1.63%及 1.92%、2.50%、1.17%、2.14%、2.86%、1.91%、1.59%、2.72%、1.28%。

2.2 G1-熵权法确定指标权重^[21-22]

2.2.1 G1 法主观赋权 根据 HLD 药味君臣配伍结合各指标成分的药效作用以及含量,对 9 个评价指标的重要程度进行排序。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素源自君药黄芪,甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素、异甘草素源自臣药甘草,而芒柄花苷^[23]、毛蕊异黄酮^[24]则为黄芪和甘草的共有成分,口服 HLD 后 9 个指标成分均进入人体血浆,均具有明确或潜在的抗肝纤维化^[10]和抗糖尿病作

用,可见以处方组成和药效不足以衡量各指标的重要程度,可主要通过指标含量差异进行排序。

黄芪与甘草的比例虽为 6:1,但甘草苷的含量远高于毛蕊异黄酮葡萄糖苷,芹糖甘草苷介于二者之间,三者的含量之和占指标含量总和的绝大多数;芒柄花苷和芹糖异甘草苷含量相当,毛蕊异黄酮、甘草素和异甘草素含量相当,前者大于后者;芒柄花素含量最低。因此,9 个评价指标的顺序关系为甘草苷(1)>芹糖甘草苷(2)>毛蕊异黄酮葡萄糖苷(3)>芒柄花苷(4)=芹糖异甘草苷(5)>毛蕊异黄酮(6)=甘草素(7)=异甘草素(8)>芒柄花素(9),并根据权重评价标度 r_k 的理性赋值依据(表 1)确定相邻指标之间的相对重要程度为 $r_2=1.6$, $r_3=1.4$, $r_4=r_6=1.1$, $r_5=r_7=r_8=1.0$, $r_9=1.2$,按公式(1)计算各指标的 G1 主观权重(w_1)。

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

$$w_{k-1}=r_kw_k, \quad k=m, m-1, \dots, 2$$

表 1 权重评价标度的理性赋值依据^[25]

Table 1 Rational assignment basis of weight evaluation scale^[25]

r_k	含义
1.0	指标 x_{k-1} 与 x_k 同样重要
1.1	指标 x_{k-1} 比 x_k 介于同样重要和稍微重要之间
1.2	指标 x_{k-1} 比 x_k 稍微重要
1.3	指标 x_{k-1} 比 x_k 介于稍微重要与明显重要之间
1.4	指标 x_{k-1} 比 x_k 明显重要
1.5	指标 x_{k-1} 比 x_k 介于明显重要与强烈重要之间
1.6	指标 x_{k-1} 比 x_k 强烈重要
1.7	指标 x_{k-1} 比 x_k 介于强烈重要与极端重要之间
1.8	指标 x_{k-1} 比 x_k 极端重要

2.2.2 熵权法客观赋权 依据各工艺条件下获得的指标数据,按公式(2)计算各指标的客观权重(w_2)。

$$w_j=(1-s_j)/(m-\sum_{j=1}^ms_j) \quad (2)$$

2.2.3 组合权重的确定 按公式(3)计算各指标的组组合权重(w)。

$$w_j=w_1jw_2j/\sum_{j=1}^mw_1jw_2j \quad (3)$$

2.2.4 综合评分计算 按公式(4)计算各工艺条件下指标的 Y 值。

$$Y_j=\sum_{j=1}^m100w_jy_j/y_{j\max} \quad (4)$$

2.3 BBD-RSM 优化黄酮组分的提取工艺

2.3.1 BBD 试验 HLD 黄酮组分采用乙醇回流提取, 各试验投料量为黄芪 240 g、甘草 40 g, 以影响提取的关键工艺因素乙醇体积分数 (X_1)、提取次数 (X_2)、单次乙醇用量 (X_3)、单次提取时间 (X_4) 为自变量并参考文献报道^[26-27]设置合适的水平, 以指标成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (Y_1)、芹糖甘草苷 (Y_2)、甘草苷 (Y_3)、芹糖异甘草苷 (Y_4)、芒柄花苷 (Y_5)、甘草素 (Y_6)、毛蕊异黄酮 (Y_7)、异甘草素 (Y_8)、芒柄花素 (Y_9) 提取量的综合评分 (Y) 为因变量,

设计 4 因素 3 水平的 BBD 试验, 试验设计方案与结果见表 2。

2.3.2 模型拟合及检验 利用 Design-Expert V8.0.6 软件对 4 个自变量与因变量进行多元回归拟合, 得到 2 次回归模型方程 $Y = -620.230\ 00 + 15.575\ 23 X_1 + 74.840\ 67 X_2 + 8.423\ 33 X_3 + 1.267\ 74 X_4 + 0.217\ 50 X_1 X_2 + 0.040\ 50 X_1 X_3 - 3.141\ 67 \times 10^{-3} X_1 X_4 - 2.386\ 25 X_2 X_3 - 0.064\ 833 X_2 X_4 + 0.025\ 667 X_3 X_4 - 0.117\ 11 X_1^2 - 12.238\ 92 X_2^2 - 0.339\ 73 X_3^2 - 8.484\ 91 \times 10^{-3} X_4^2$, 模型方差分析结果见表 3。结果显示模型

表 2 提取工艺 BBD 试验方案与结果

Table 2 BBD experimental scheme and results of extraction process

试验号	X_1 / %	X_2 / 次	X_3 / 倍	X_4 / min	提取量/(mg·g ⁻¹)									Y
					Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	
1	70	2	10	60	0.382 5	0.927 5	1.990 2	0.259 7	0.256 1	0.065 6	0.068 1	0.042 1	0.017 3	96.98
2	80	3	10	60	0.348 9	0.840 0	1.794 9	0.233 2	0.235 4	0.057 8	0.062 2	0.038 6	0.016 1	87.98
3	70	2	12	30	0.337 3	0.785 1	1.734 8	0.219 8	0.231 5	0.056 9	0.060 8	0.037 6	0.015 7	85.00
4	80	2	12	60	0.340 2	0.822 5	1.764 9	0.231 3	0.226 6	0.055 9	0.060 1	0.039 2	0.016 4	86.52
5	60	2	12	60	0.357 7	0.868 0	1.840 0	0.238 1	0.239 4	0.058 7	0.063 1	0.036 8	0.015 4	89.00
6	70	2	8	90	0.360 6	0.878 5	1.855 0	0.243 0	0.242 3	0.059 5	0.064 0	0.039 4	0.016 5	90.87
7	70	2	10	60	0.397 1	0.950 6	2.035 2	0.264 6	0.267 7	0.062 9	0.070 5	0.043 4	0.018 1	99.31
8	70	2	10	60	0.376 7	0.910 0	1.952 6	0.254 8	0.254 1	0.064 4	0.069 7	0.041 9	0.017 6	96.08
9	70	1	12	60	0.318 3	0.770 0	1.652 2	0.215 6	0.214 7	0.052 8	0.056 7	0.034 9	0.014 6	80.49
10	70	1	8	60	0.248 2	0.623 0	1.276 7	0.174 4	0.169 4	0.041 6	0.044 7	0.027 5	0.011 5	63.51
11	60	2	8	60	0.346 0	0.829 5	1.779 9	0.232 3	0.232 5	0.057 1	0.061 4	0.033 6	0.014 1	85.42
12	70	1	10	90	0.275 9	0.640 5	1.389 4	0.179 3	0.186 2	0.045 9	0.049 3	0.030 2	0.012 7	68.69
13	60	1	10	60	0.265 7	0.647 5	1.366 8	0.181 3	0.179 3	0.043 8	0.047 1	0.024 0	0.010 6	65.42
14	70	3	12	60	0.379 6	0.903 0	1.952 6	0.252 8	0.256 1	0.063 2	0.067 9	0.041 6	0.017 3	95.44
15	70	3	10	90	0.373 8	0.892 5	1.900 0	0.249 9	0.252 2	0.062 0	0.066 6	0.040 6	0.017 0	93.64
16	80	2	10	90	0.332 9	0.798 0	1.712 3	0.223 4	0.221 6	0.054 5	0.058 5	0.037 6	0.015 7	83.93
17	80	2	8	60	0.309 5	0.742 0	1.592 1	0.207 8	0.206 9	0.052 0	0.055 9	0.038 2	0.016 0	79.70
18	70	3	10	30	0.362 1	0.889 0	1.885 0	0.248 9	0.244 3	0.060 0	0.064 5	0.039 7	0.016 5	91.91
19	70	3	8	60	0.389 8	0.920 5	1.990 2	0.257 7	0.263 0	0.064 6	0.069 4	0.042 7	0.017 6	97.55
20	60	2	10	30	0.280 3	0.672 0	1.441 9	0.188 2	0.193 1	0.047 9	0.051 2	0.030 9	0.012 9	71.18
21	60	2	10	90	0.353 3	0.847 0	1.817 4	0.237 2	0.236 4	0.058 1	0.062 4	0.035 7	0.014 9	87.63
22	70	2	10	60	0.397 0	0.953 8	2.039 0	0.267 1	0.268 0	0.065 1	0.069 2	0.043 3	0.018 2	99.62
23	70	2	10	60	0.397 9	0.947 5	2.043 5	0.265 6	0.267 6	0.063 4	0.067 1	0.043 5	0.017 9	98.92
24	70	2	8	30	0.341 6	0.812 0	1.757 3	0.227 4	0.231 5	0.056 5	0.060 7	0.037 6	0.015 7	85.94
25	60	3	10	60	0.348 9	0.839 3	1.794 9	0.233 2	0.235 4	0.057 8	0.062 1	0.038 2	0.016 0	87.87
26	70	2	12	90	0.382 5	0.913 5	1.953 4	0.255 8	0.258 1	0.063 4	0.068 1	0.041 9	0.017 6	96.09
27	80	2	10	30	0.278 9	0.658 0	1.426 9	0.184 2	0.188 1	0.046 7	0.050 2	0.033 6	0.014 3	71.25
28	80	1	10	60	0.208 1	0.490 0	1.089 0	0.151 9	0.145 8	0.036 3	0.040 6	0.030 4	0.012 9	56.82
29	70	1	10	30	0.237 3	0.577 5	1.201 6	0.161 7	0.155 6	0.038 2	0.040 3	0.025 6	0.011 1	59.18

表 3 提取工艺模型方差分析
 Table 3 Variance analysis of extraction process model

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	4 382.92	14	53.76	<0.000 1	X_1X_4	3.55	1	0.61	0.447 7	X_4^2	378.26	1	64.95	<0.000 1
X_1	34.37	1	5.90	0.029 2	X_2X_3	91.11	1	15.64	0.001 4	残差	81.53	14		
X_2	2 141.07	1	367.66	<0.000 1	X_2X_4	15.13	1	2.60	0.129 3	失拟项	71.78	10	2.95	0.154 7
X_3	72.77	1	12.50	0.003 3	X_3X_4	9.49	1	1.63	0.222 6	纯误差	9.75	4		
X_4	264.99	1	45.50	<0.000 1	X_1^2	889.67	1	152.77	<0.000 1	总差	4 464.45	28		
X_1X_2	18.92	1	3.25	0.093 0	X_2^2	971.62	1	166.85	<0.000 1					
X_1X_3	2.62	1	0.45	0.512 9	X_3^2	11.98	1	2.06	0.173 5					

极显著 ($P<0.01$), 失拟项不显著 ($P>0.05$), 说明该模型具有统计学意义; $R^2=0.981\ 7$, $R_{adj}^2=0.963\ 5$, $R_{pred}^2=0.904\ 0$, $CV=2.85\%$, 说明该模型对提取工艺过程实际情况拟合度较高, 误差较小。模型中因素 X_1 显著 ($P<0.05$), X_2 、 X_3 、 X_4 极显著 ($P<0.01$), 各因素对 Y 的影响顺序为 $X_2>X_4>X_3>X_1$; 交互项 X_2X_3 极显著 ($P<0.01$), 说明 X_2 与 X_3 之间有极显

著的交互作用, 因素间交互作用的三维响应面见图 2。

2.3.3 最优提取工艺及验证 模型预测的最优提取工艺为乙醇体积分数 69%、提取 2 次, 每次 10 倍量乙醇提取 65 min。对该工艺进行 3 批验证试验, 单批投料量为黄芪 600 g、甘草 100 g, 结果见表 4。验证试验的 Y 值均在 99 以上, RSD 为 0.18%, 表明

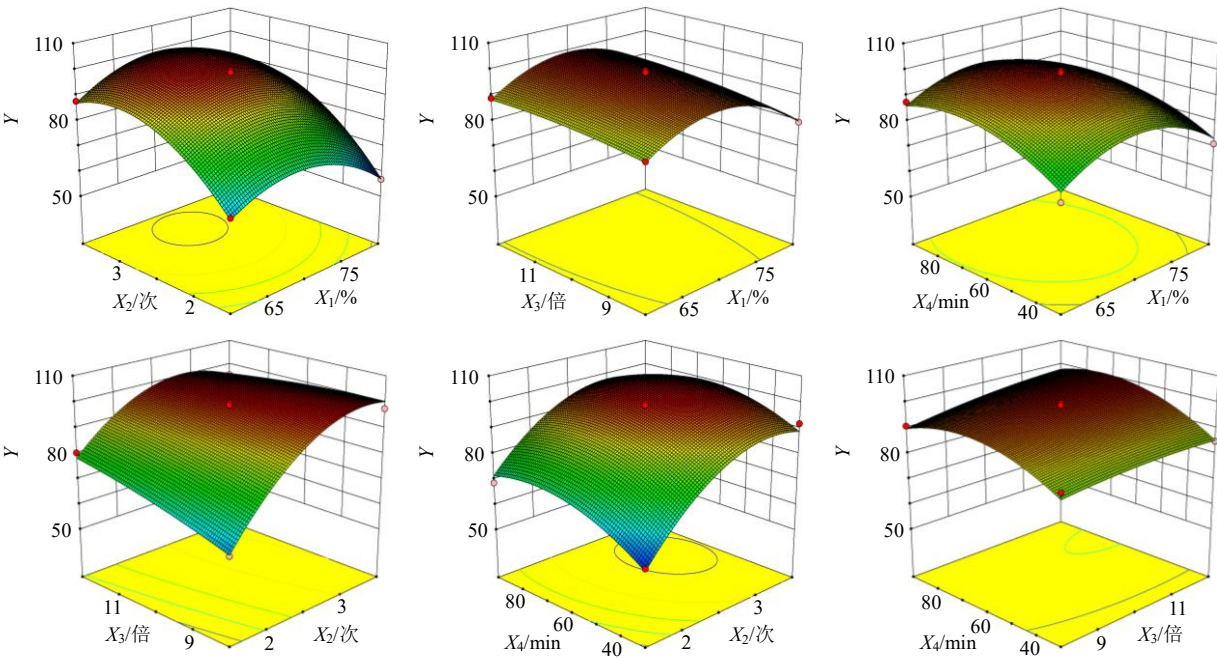


图 2 各因素间交互作用对提取工艺响应值影响的三维响应面图
 Fig. 2 3D response surface for interaction effect of each factor on response value of extraction process

表 4 提取工艺验证结果
 Table 4 Results of extraction process verification experiments

批次	提取量/(mg·g ⁻¹)									Y	RSD/ %
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9		
1	0.398 5	0.954 0	2.038 8	0.265 2	0.268 3	0.064 6	0.068 9	0.043 1	0.018 0	99.18	0.18
2	0.399 2	0.950 5	2.047 6	0.267 2	0.266 9	0.066 6	0.070 0	0.043 7	0.017 4	99.53	
3	0.395 4	0.955 1	2.043 9	0.268 4	0.269 6	0.065 9	0.069 2	0.042 8	0.017 6	99.27	

该提取工艺稳定、可靠。

2.4 聚酰胺树脂纯化工艺单因素考察

2.4.1 上样药液 pH 值考察 取最优提取工艺所得提取液,减压浓缩至无醇味,用纯水定容至不同体积,得不同生药质量浓度的上样药液。称定 5 份干质量为 5.0 g 预处理好的聚酰胺树脂湿法装柱,取质量浓度为 0.20 g/mL 的上样药液 25 mL,用稀盐酸或稀氨水调节 pH 值分别为 3、4、5、6、7 后以 1 mL/min 的体积流量上样,分别收集并测定流出液中 9 个指标成分的含量,计算吸附率,进一步计算出综合评分(Y),结果对应的 Y 值分别为 86.28、88.62、93.21、87.75、81.96。结果表明, Y 值随着 pH 值的增加先升后降,当 pH 值为 5 时 Y 值最大,由于该 pH 值与上样药液自身 pH 值(4.8)较为接近,综合实际情况和吸附效果考虑,选取上样药液自身 pH 值进行后续工艺参数考察。

$$\text{吸附率} = (C_0V_0 - C_1V_1) / C_0V_0$$

C_0 为上样药液中黄酮质量浓度, C_1 为流出液中黄酮质量浓度, V_0 为上样药液体积, V_1 为流出液体积

2.4.2 上样药液质量浓度考察 称定 5 份干质量为 5.0 g 预处理好的聚酰胺树脂湿法装柱,取质量浓度分别为 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 g/mL 的上样药液,以 1 mL/min 的体积流量按树脂与生药 1:1 的质量比上样,测定流出液中 9 个指标成分的含量,计算吸附率及 Y ,结果 Y 值分别为 81.58、87.35、91.83、92.96、93.49。结果表明, Y 值随着上样药液质量浓度的升高而增大,在 0.20 g/mL 后趋于平缓。然而当上样药液浓缩程度较高时目标成分易析出损失。

2.4.3 上样药液体积流量考察 称定 5 份干质量为 5.0 g 预处理好的聚酰胺树脂湿法装柱,取质量浓度为 0.20 g/mL 的上样药液 25 mL,分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 的体积流量上样,测定流出液中 9 个指标成分的含量,计算吸附率及 Y 。结果对应的 Y 值分别为 94.71、92.90、85.18、76.52、68.36, Y 值随着上样体积流量的升高而减小。

2.4.4 上样量考察 称定干质量为 5.0 g 预处理好的聚酰胺树脂湿法装柱,取质量浓度 0.20 g/mL 上样药液以 1.0 mL/min 的体积流量上样,流出液每 5 mL 收集 1 份,测定 9 个指标成分的含量,计算 Y 值。结果 1~10 份流出液的 Y 值分别为 0.00、0.00、0.75、2.18、4.52、11.75、39.98、60.21、72.66、79.40,可见指标成分的泄露量随着上样量的增加呈上升趋势,其中第 1~5 份流出液泄漏量较少,第 5 份(树

脂-生药质量比 1:1)以后泄漏量显著增加。

2.4.5 水洗脱用量考察 按“2.4.4”项下条件装柱、上样,分别用 2、3、4、5、6 个柱体积(BV)纯水以 1.5 mL/min 的体积流量洗脱除杂,再用 5 BV 70%乙醇以 1 mL/min 的体积流量洗脱,测定乙醇洗脱液中 9 个指标成分的含量,计算解吸率及 Y 。结果对应的 Y 值分别为 90.24、89.75、88.87、88.05、87.91, Y 值随着水洗脱用量的升高而下降,当水洗脱 4 BV 后,流出液几乎无色,继续洗脱对结果影响不大。

$$\text{解吸率} = C_2V_2 / (C_0V_0 - C_1V_1)$$

C_2 为乙醇洗脱液中黄酮质量浓度, V_2 为乙醇洗脱液体积

2.4.6 洗脱剂乙醇体积分数考察 按“2.4.4”项下条件装柱、上样,用 4 BV 纯水以 1.5 mL/min 的体积流量洗脱除杂,再分别用 5 BV 体积分数为 30%、50%、70%、90%的乙醇以 1 mL/min 体积流量洗脱,收集洗脱液,测定 9 个指标成分的含量,计算解吸率及 Y 。结果对应的 Y 值分别为 29.46、77.65、93.87、81.53, Y 值随着乙醇体积分数的升高先增大后下降,在 70%时达到最高。

2.4.7 洗脱剂体积流量考察 按“2.4.6”项下条件装柱、上样、除杂,用 5 BV 体积分数 70%乙醇分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 的体积流量洗脱,测定洗脱液中 9 个指标成分的含量,计算解吸率及 Y 。结果对应的 Y 值分别为 85.61、85.24、83.96、79.51、75.82,乙醇体积流量越高, Y 值越低,综合考虑工作效率和 Y 值,洗脱剂体积流量选取 1.5 mL/min。

2.4.8 洗脱剂用量考察 按“2.4.6”项下条件装柱、上样、除杂,分别用 2、4、6、8、10 BV 体积分数 70%乙醇以 1.5 mL/min 的体积流量洗脱,测定洗脱液中 9 个指标成分的含量,计算解吸率及 Y 。结果对应的 Y 值分别为 52.13、77.81、88.27、89.92、90.35, Y 值随着洗脱剂用量的升高而增加,在 6 BV 后趋于平缓。

2.5 Plackett-Burman 设计 (Plackett-Burman design, PBD) 筛选纯化工艺关键影响因素

2.5.1 PBD 试验 在单因素实验结果基础上,选取上样药液质量浓度(X_1)、上样药液体积流量(X_2)、上样量(X_3)、水洗脱用量(X_4)、洗脱剂乙醇体积分数(X_5)、洗脱剂体积流量(X_6)、洗脱剂用量(X_7) 7 个因素进行 PBD,以 9 个指标成分回收率(回收率 = C_2V_2 / C_0V_0)的综合评分(Y)为响应值筛选纯化

工艺关键影响因素, 试验设计方案及结果见表 5。

2.5.2 模型拟合及检验 利用 Design-Expert V8.0.6 软件对表 5 结果进行分析, 得回归模型方程 $Y=86.510\ 83+1.229\ 17\ X_1-5.055\ 83\ X_2-0.289\ 17\ X_3+0.390\ 83\ X_4+3.374\ 17\ X_5+0.034\ 167\ X_6+3.697\ 50\ X_7$, 模型方差分析结果见表 6。结果显示模型极显著 ($P<0.000\ 1$), $R^2=0.997\ 8$, $R_{adj}^2=0.992\ 8$, $R_{pred}^2=$

0.976 5, $CV=0.74\%$, 说明该模型对纯化工艺过程实际情况拟合度较高, 误差较小。模型中因素 X_1 、 X_2 、 X_5 、 X_7 为显著影响因素 ($P<0.01$), 后续可采用 BBD-RSM 试验进一步优化。

2.6 BBD-RSM 优化黄酮组分的纯化工艺

2.6.1 BBD 试验 根据 PBD 试验结果, 以影响指标成分回收率的关键因素上样药液质量浓度 (X_1)、

表 5 PBD 试验方案与结果

Table 5 PBD experimental scheme and results

试验号	$X_1/$	$X_2/$	$X_3/$	$X_4/$	$X_5/$	$X_6/$	$X_7/$	回收率/%									Y
	(g·mL ⁻¹)	(mL·min ⁻¹)	mL	BV	%	(mL·min ⁻¹)	BV	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	
1	0.25 (+1)	0.5 (-1)	25 (+1)	6 (+1)	50 (-1)	2 (+1)	8 (+1)	83.18	81.52	82.74	82.01	81.65	70.86	72.11	72.02	67.57	93.82
2	0.15 (-1)	0.5 (-1)	15 (-1)	6 (+1)	50 (-1)	2 (+1)	8 (+1)	79.85	79.26	80.06	79.53	79.38	68.41	69.26	70.18	65.60	90.81
3	0.25 (+1)	0.5 (-1)	25 (+1)	6 (+1)	90 (+1)	1 (-1)	4 (-1)	77.91	78.12	78.24	78.90	79.16	76.68	75.83	76.30	73.54	92.50
4	0.15 (-1)	0.5 (-1)	15 (-1)	4 (-1)	50 (-1)	1 (-1)	4 (-1)	73.52	73.81	73.16	72.54	72.39	64.42	63.98	60.33	60.21	83.20
5	0.25 (+1)	1.5 (+1)	25 (+1)	4 (-1)	50 (-1)	1 (-1)	8 (+1)	70.64	70.23	69.96	69.42	69.11	66.25	65.51	64.95	63.73	81.68
6	0.25 (+1)	1.5 (+1)	15 (-1)	4 (-1)	50 (-1)	2 (+1)	4 (-1)	65.62	65.20	65.83	64.81	64.60	62.73	61.24	57.86	58.05	76.00
7	0.25 (+1)	1.5 (+1)	15 (-1)	6 (+1)	90 (+1)	2 (+1)	4 (-1)	66.94	67.31	67.57	68.25	68.53	71.20	73.02	74.65	71.32	82.62
8	0.15 (-1)	1.5 (+1)	25 (+1)	6 (+1)	50 (-1)	1 (-1)	4 (-1)	64.17	63.51	63.48	62.03	61.56	60.04	59.57	55.58	54.82	73.31
9	0.15 (-1)	1.5 (+1)	25 (+1)	4 (-1)	90 (+1)	2 (+1)	8 (+1)	70.73	70.08	70.45	71.11	70.84	77.92	77.16	78.21	75.05	86.77
10	0.15 (-1)	1.5 (+1)	15 (-1)	6 (+1)	90 (+1)	1 (-1)	8 (+1)	71.41	71.62	72.01	72.35	72.06	79.84	78.49	78.58	76.86	88.35
11	0.15 (-1)	0.5 (-1)	25 (+1)	4 (-1)	90 (+1)	2 (+1)	4 (-1)	74.68	74.87	75.42	75.26	75.91	74.56	74.20	74.14	72.18	89.25
12	0.25 (+1)	0.5 (-1)	15 (-1)	4 (-1)	90 (+1)	1 (-1)	8 (+1)	83.11	84.36	86.12	84.58	84.96	83.79	82.25	80.13	79.20	99.82

表 6 PBD 试验方差分析

Table 6 Variance analysis of PBD experiment

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	628.40	7	218.40	<0.000 1	X_4	1.83	1	4.46	0.102 3	残差	1.64	4		
X_1	18.13	1	44.11	0.002 7	X_5	136.62	1	332.38	<0.000 1	总差	630.04	11		
X_2	306.74	1	746.24	<0.000 1	X_6	0.01	1	0.034	0.862 5					
X_3	1.00	1	2.44	0.193 2	X_7	164.06	1	399.13	<0.000 1					

上样药液体积流量 (X_2)、洗脱剂乙醇体积分数 (X_3)、洗脱剂用量 (X_4) 为自变量, 以 9 个指标成分回收率的综合评分 (Y) 为因变量, 设计 4 因素 3 水平的 BBD 试验, 试验设计方案与结果见表 7。

2.6.2 模型拟合及检验 对 4 个自变量与因变量进行多元回归拟合, 得到 2 次回归模型方程 $Y=-138.707\ 98+283.395\ 00\ X_1+12.622\ 67\ X_2+4.616\ 26\ X_3+9.723\ 71\ X_4-15.800\ 00\ X_1X_2+0.022\ 50\ X_1X_3+2.125\ 00\ X_1X_4+0.026\ 00\ X_2X_3-9.992\ 01\times 10^{-15}\ X_2X_4-0.014\ 938\ X_3X_4-645.633\ 33\ X_1^2-7.376\ 33\ X_2^2-0.031\ 641\ X_3^2-0.586\ 02\ X_4^2$, 模型方差分析结果见表 8。结果显示模型极显著 ($P<0.01$), 失拟项

不显著 ($P>0.05$), 说明该模型具有统计学意义; $R^2=0.993\ 0$, $R_{adj}^2=0.986\ 0$, $R_{pred}^2=0.970\ 0$, $CV=0.93\%$, 说明该模型对纯化工艺过程实际情况拟合度较高, 误差较小。该模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 4 个因素极显著 ($P<0.01$), 各因素对 Y 的影响顺序为 $X_4>X_3>X_2>X_1$; 因素间交互作用的三维响应面图见图 3, 交互项不显著 ($P>0.05$)。

2.6.3 最优纯化工艺及验证 模型预测的 4 个因素的最优工艺参数为上样药液质量浓度 0.20 g/mL, 上样药液体积流量 0.8 mL/min, 洗脱剂乙醇体积分数 69%, 洗脱剂用量 8 BV。因此, 黄酮组分的最优纯化工艺为 pH 值 4.8、质量浓度 0.20 g/mL 的上样药

表7 纯化工艺 BBD 试验方案与结果

Table 7 BBD experimental scheme and results of purification process

试验号	$X_1/$ (g·mL ⁻¹)	$X_2/$ (mL·min ⁻¹)	$X_3/\%$	X_4/BV	回收率/%									Y
					Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	
1	0.20	1.0	70	6	89.28	89.96	92.23	90.92	90.35	91.02	91.46	88.71	88.40	98.01
2	0.25	1.5	70	6	86.06	87.83	88.50	86.90	86.79	88.17	87.93	86.36	85.82	94.59
3	0.20	1.0	90	4	76.21	76.90	77.36	77.71	77.94	76.21	75.58	75.75	73.28	82.89
4	0.25	1.0	90	6	80.17	80.31	80.74	81.52	81.16	79.40	78.52	77.84	76.63	86.50
5	0.15	1.0	90	6	78.55	78.68	79.23	79.00	79.28	78.08	77.64	77.10	75.66	84.86
6	0.20	1.0	50	8	81.31	81.39	82.02	81.67	81.10	73.25	74.12	73.06	68.93	85.42
7	0.20	1.0	70	6	87.76	89.30	90.25	89.80	89.27	89.90	89.99	87.84	87.21	96.58
8	0.20	1.0	70	6	90.14	90.61	93.01	91.45	91.30	90.68	90.95	88.47	87.94	98.46
9	0.20	0.5	90	6	80.68	80.56	81.12	81.88	81.35	80.63	80.30	78.24	77.75	87.13
10	0.20	0.5	50	6	78.98	79.02	79.55	79.81	79.63	69.40	69.79	69.01	67.41	82.59
11	0.15	1.0	50	6	76.95	77.18	77.86	78.03	78.14	66.55	66.83	65.08	64.62	80.26
12	0.20	0.5	70	8	90.35	91.56	93.63	92.95	92.72	93.01	92.64	91.15	90.68	99.83
13	0.15	0.5	70	6	87.62	88.34	89.31	87.02	86.85	87.62	87.30	85.27	84.05	94.82
14	0.20	1.5	90	6	77.04	77.30	77.98	78.73	78.91	79.87	78.92	78.05	77.29	84.46
15	0.20	1.5	70	8	85.78	87.52	88.03	86.54	86.18	92.23	92.05	90.80	90.36	95.62
16	0.25	1.0	70	8	90.16	91.10	93.37	92.78	92.66	92.75	92.48	90.56	89.52	99.47
17	0.25	1.0	50	6	78.79	78.82	79.34	79.36	79.42	67.64	67.91	66.53	65.70	81.81
18	0.20	1.5	70	4	79.48	79.74	80.22	80.28	79.90	83.61	82.82	80.24	79.54	87.05
19	0.20	1.5	50	6	75.21	74.94	75.13	74.67	74.25	68.99	69.06	67.08	66.33	78.88
20	0.15	1.0	70	4	81.64	82.13	82.97	82.14	81.97	82.75	81.87	79.16	78.41	88.57
21	0.15	1.0	70	8	87.03	87.91	88.50	89.25	89.56	92.28	92.10	89.22	88.85	96.32
22	0.20	1.0	70	6	89.95	91.50	93.34	91.71	91.44	92.32	92.18	89.20	88.72	99.09
23	0.20	1.0	70	6	88.70	90.21	92.58	88.46	88.71	91.28	91.59	89.04	88.50	97.78
24	0.20	1.0	50	4	73.65	73.94	73.85	72.69	72.46	64.48	64.02	60.65	60.37	76.12
25	0.15	1.5	70	6	84.02	85.68	86.43	85.75	85.48	86.83	86.28	84.53	83.61	92.60
26	0.20	1.0	90	8	81.83	82.96	84.64	83.25	83.40	83.19	82.04	81.50	80.46	89.80
27	0.25	1.0	70	4	83.46	85.31	85.79	83.72	83.53	84.45	83.71	79.98	79.02	90.87
28	0.25	0.5	70	6	90.42	91.58	94.20	91.69	91.34	88.76	88.52	86.52	85.97	98.39
29	0.20	0.5	70	4	83.71	85.55	86.24	84.01	83.89	84.70	83.96	80.49	79.83	91.26

表8 纯化工艺模型方差分析

Table 8 Variance analysis of purification process model

变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	变异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	1 383.64	14	141.37	<0.000 1	X_1X_4	0.18	1	0.26	0.619 2	X_4^2	35.64	1	50.98	<0.000 1
X_1	16.80	1	24.04	0.000 2	X_2X_3	0.27	1	0.39	0.544 0	残差	9.79	14		
X_2	36.12	1	51.67	<0.000 1	X_2X_4	0.00	1	0.00	1.000 0	失拟项	6.32	10	0.73	0.688 1
X_3	77.83	1	111.33	<0.000 1	X_3X_4	1.43	1	2.04	0.174 9	纯误差	3.46	4		
X_4	205.84	1	294.45	<0.000 1	X_1^2	16.90	1	24.17	0.000 2	总差	1 393.42	28		
X_1X_2	0.62	1	0.89	0.360 8	X_2^2	22.06	1	31.55	<0.000 1					
X_1X_3	0.00	1	0.00	0.957 8	X_3^2	1 039.06	1	1 486.33	<0.000 1					

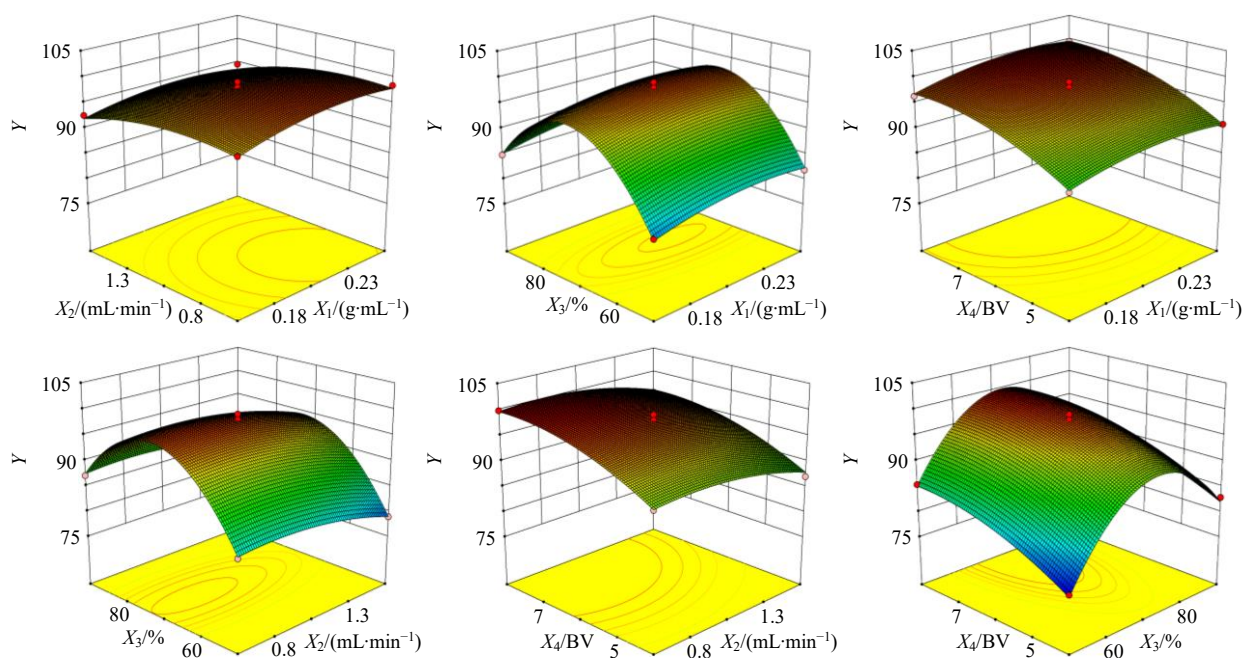


图 3 各因素间交互作用对纯化工艺响应值影响的三维响应面图

Fig. 3 3D response surface for interaction effect of each factor on response value of purification process

液以 0.8 mL/min 体积流量按树脂-生药 1:1 的质量比上样, 4 BV 纯水以 1.5 mL/min 的体积流量洗脱除杂, 8 BV 体积分数 69%乙醇以 1.5 mL/min 体积流量洗脱。按以上工艺重复 3 次进行验证, 每次上样生药量 100 g, 结果见表 9。验证试验的 Y 值均在 99 以上, RSD 为 0.48%, 表明该纯化工艺稳定、可靠。纯化工艺验证结果虽与 BBD 试验的 12 号结果相

当, 但上样药液体积流量高于 12 号, 有利于纯化工作效率的提高。

将纯化前的提取液、纯化后的洗脱液分别浓缩干燥得黄酮组分提取物, 精密称取纯化前后的提取物, 用体积分数 69%乙醇溶解, 测定提取物中 9 个指标成分的含量, 结果见表 10, 黄酮组分纯化后含量约为纯化前的 14 倍。

表 9 纯化工艺验证结果

Table 9 Results of purification process verification experiments

批次	回收率/%									Y	RSD/%
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9		
1	90.15	91.32	93.74	92.76	92.74	92.84	92.53	91.05	90.59	99.77	0.48
2	89.48	90.39	92.70	92.36	92.25	92.41	92.17	90.73	90.32	99.07	
3	90.34	91.65	94.15	92.95	92.68	93.00	92.65	91.13	90.55	99.99	

表 10 聚酰胺树脂纯化前后提取物中指标成分的含量

Table 10 Content of index component in extracts of polyamide resin before and after purification

提取物	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	9 个指标总和
纯化前	1.79	4.26	9.17	1.20	1.20	0.30	0.31	0.20	0.08	18.50
纯化后均值	24.86	59.94	132.53	17.14	17.10	4.27	4.48	2.75	1.09	264.16
纯化后/纯化前	13.90	14.07	14.45	14.32	14.30	14.33	14.28	14.05	13.98	14.28

3 讨论

黄酮类成分作为 HLD 治疗慢性肝病、2 型糖尿病及其并发症的主要药效物质, 其化学组成和作用

机制相对明确。通过对黄酮组分的制备有望研制出针对上述病症的组分中药——一种在中医药理论和方剂配伍理论指导下, 采用现代制药技术, 由有效

组分配伍而成的物质基础和作用机制相对清楚的现代中药。组分中药实现了从饮片配伍到组分配伍的转变,既保持了中药方剂的优势,又具有相对满足现代药物质量可控,安全性、有效性证据较充分的特征,提高了中药制剂质控水平,是中药现代化的重要体现形式^[20]。

HLD 所含黄酮类成分多,结构类型多样(黄酮类、异黄酮类、二氢黄酮类、二氢黄酮醇类、黄酮醇类、查耳酮类、异黄烷类、紫檀素型黄酮类等),其中异黄酮、二氢黄酮及查耳酮为其主要黄酮结构类型。本研究以含量相对较高、极性差异较大、有保肝和抗糖尿病活性的代表性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芹糖甘草苷、甘草苷、芹糖异甘草苷、芒柄花苷、甘草素、毛蕊异黄酮、异甘草素、芒柄花素为工艺评价指标,可更确切地反映提取和纯化效果。在工艺优化多指标决策中,权重的确定至关重要,为了同时兼顾主观赋权法解释性强、客观赋权法精度高的优势,本研究采用计算方便、具有保序性等优点的 G1 法^[21,25]作为主观赋权方法,采用中药研究中常用的熵权法作为客观赋权方法,通过构建 G1-熵权法组合赋权方法对各指标进行赋权,兼顾了决策者的主观性和各评价指标的内在联系,使得 HLD 黄酮组分的提取、纯化工艺研究结果更加科学合理,更具有可参考性。

聚酰胺树脂是纯化类黄酮的优良吸附剂,可与富含酚羟基的黄酮类化合物形成氢键缔合而产生吸附作用^[28]。本研究在采用聚酰胺树脂富集纯化 HLD 黄酮组分的过程中,首先对影响纯化效果的 8 个主要工艺因素(上样药液 pH 值、上样药液质量浓度、上样药液体积流量、上样量、水洗脱用量、洗脱剂乙醇体积分数、洗脱剂体积流量、洗脱剂用量)进行单因素实验考察,确定各因素的取值范围;其次利用 PBD 试验从上述众多因素中筛选出上样药液质量浓度、上样药液体积流量、洗脱剂乙醇体积分数、洗脱剂用量 4 个显著影响因素;再利用 BBD 试验找出 4 个因素的最优工艺参数搭配。通过上述系统研究建立了重现性较好的 HLD 黄酮组分富集纯化工艺,所得组分活性成分含量高(纯化后含量约为纯化前的 14 倍),质量稳定。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 宋·太平惠民和剂局原著. 元·朱震亨原著. 王琳, 李成文, 马艳春主编. 太平惠民和剂局方 [M]. 北京: 人民

卫生出版社, 2017: 152.

- [2] 王浩艺, 成扬. 黄芪汤及方中单味药研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(8): 99-103.
- [3] Cheng Y, Liu P, Hou T L, *et al.* Mechanisms of Huangqi Decoction Granules (黄芪汤颗粒剂) on hepatitis B cirrhosis patients based on RNA-Sequencing [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(7): 507-514.
- [4] Wu J S, Liu Q, Fang S H, *et al.* Quantitative proteomics reveals the protective effects of Huangqi Decoction against acute cholestatic liver injury by inhibiting the NF- κ B/IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *J Proteome Res*, 2020, 19(2): 677-687.
- [5] 蒋微, 徐莹, 王晓柠, 等. 黄芪汤上调肝组织 BAMBI 表达改善 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(3): 74-80.
- [6] 王浩艺, 黄广建, 刘从进, 等. 黄芪汤对肝硬化门静脉高压症大鼠门静脉压力的影响及作用机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(8): 48-53.
- [7] Xu J, Jiang Z H, Liu X B, *et al.* Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics reveals Huangqiliuyi Decoction attenuates abnormal metabolism as a novel therapeutic opportunity for type 2 diabetes [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(68): 39858-39870.
- [8] 王群, 唐甜甜, 刘文, 等. 黄芪六一汤抗糖尿病肾病的药效组分筛选研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 730-745.
- [9] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, *et al.* IDF diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [10] Wang Y H, Li Y Y, Zhang H, *et al.* Pharmacokinetics-based comprehensive strategy to identify multiple effective components in Huangqi Decoction against liver fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153513.
- [11] Wang Q, Shi Y, Wu Z G, *et al.* Effects of Huangqi Liuyi Decoction in the treatment of diabetic nephropathy and tissue distribution difference of its six active constituents between normal and diabetic nephropathy mouse models [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 934720.
- [12] 李艳, 伊航, 蔡轶伦, 等. 黄芪总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(7): 1710-1713.
- [13] An L, Lin Y F, Li L Y, *et al.* Integrating network pharmacology and experimental validation to investigate the effects and mechanism of *Astragalus* flavonoids against hepatic fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 618262.
- [14] 张峰, 李燕, 李伟华. 黄芪总黄酮对肝硬化大鼠肝组织

- 病理、代谢指标及 NF- κ B 表达的影响 [J]. 解剖学杂志, 2022, 45(6): 526-531.
- [15] Wang Z, Li X L, Hong K F, *et al.* Total flavonoids of *Astragalus* ameliorated bile acid metabolism dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6675567.
- [16] Li X L, Zhao T T, Gu J L, *et al.* Intake of flavonoids from *Astragalus membranaceus* ameliorated brain impairment in diabetic mice via modulating brain-gut axis [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 22.
- [17] Gou S H, He M, Li B B, *et al.* Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in liver injury mice [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(24): 6083-6087.
- [18] Du J L, Cao L P, Gao J C, *et al.* Protective effects of *Glycyrrhiza* total flavones on liver injury induced by *Streptococcus agalactiae* in *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Antibiotics*, 2022, 11(11): 1648.
- [19] Yang L, Jiang Y, Zhang Z X, *et al.* The anti-diabetic activity of licorice, a widely used Chinese herb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113216.
- [20] 张俊华, 樊官伟, 张晗, 等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4054-4058.
- [21] 王继龙, 魏舒畅, 刘永琦, 等. 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 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 596-603.
- [22] 陈方圆, 王继龙, 魏舒畅, 等. 基于 Box-Behnken 响应面法结合 G1-熵权法的黄芪百合颗粒浸膏减压干燥工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5100-5106.
- [23] 冷晶, 朱云祥, 陈璐琳, 等. 甘草中 2 个新三萜皂苷 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1576-1582.
- [24] 包芳, 白海英, 彭静文, 等. 栽培甘草的化学成分及其抗菌活性研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 577-582.
- [25] 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.
- [26] 袁惠君, 李欣, 贾鸿震, 等. 响应面法优化黄芪总黄酮提取工艺及初步纯化 [J]. 草业科学, 2019, 36(6): 1683-1691.
- [27] 万嘉洋, 丁志山, 张宇燕, 等. 甘草中黄酮类成分提取工艺的优化研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(10): 2326-2328.
- [28] 苏慧珊, 张琳, 张一帆, 等. 聚酰胺在黄酮类化合物分离纯化中的应用 [J]. 广州化工, 2019, 47(22): 23-24.

[责任编辑 郑礼胜]