

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.18.009

基于 G1 - 熵权法的正交试验优选菱芍痉挛平颗粒水提工艺*

严国鸿^{1,2}, 许文^{2,3}, 徐伟^{2,3}

(1. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122;
3. 福建中医药大学生物医学研发中心, 福建 福州 350122)

摘要:目的 优选菱芍痉挛平颗粒的水提工艺。方法 在单因素试验基础上,以提取时间、加水量、提取次数为考察因素,菱芍痉挛平颗粒复方提取物中指标成分(芍药苷、甘草苷和甘草酸、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸及重楼皂苷 I + II + VII)的含量及得膏率的综合评分为评价指标,结合 G1 - 熵权法采用正交试验法优化。结果 最佳水提工艺为,加 10 倍量水浸泡 3 h,提取 2 次,每次 2 h。样品中上述成分的含量分别为每份含 398.69, 188.87, 22.83, 15.56, 10.32, 35.53 mg, RSD 为 0.69%~2.09%;平均得膏率为 28.37%, RSD 为 0.19% ($n=3$)。结论 优化的水提工艺操作简单、稳定可行,可为后期菱芍痉挛平颗粒剂的开发利用奠定基础。

关键词:菱芍痉挛平颗粒;水提工艺;正交试验;G1 - 熵权法

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)18-0037-08

Optimization of Water Extraction Process of Loushaojingluanping Granules by the Orthogonal Test Based on G1 - Entropy Weight Method

YAN Guohong^{1,2}, XU Wen^{2,3}, XU Wei^{2,3}

(1. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350004; 2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350122; 3. Centre of Biomedical Research & Development, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350122)

Abstract: **Objective** To optimize the water extraction process of Loushaojingluanping Granules. **Methods** Based on the single factor test, with the extraction time, amount of water addition and extraction times as the factors, and with the content of the index components (paeoniflorin, liquiritin and glycyrrhizic acid, cynaroside, cinnamic acid, ferulic acid and polyphyllin I, polyphyllin II and polyphyllin VII) in the compound extract of Loushaojingluanping Granules and the comprehensive score of the extract yield as the evaluation indexes, the water extraction process of Loushaojingluanping Granules was optimized by the orthogonal test method based on the G1 - entropy weight method. **Results** The optimal water extraction process was as follows: soaking in 10 times amount of water for 3 h, extracting twice with 2 h each time. The contents of the above components in the samples were 398.69, 188.87, 22.83, 15.56, 10.32, 35.53 mg with RSDs of 0.69% - 2.09%. The average extract yield was 28.37% with an RSD of 0.19% ($n=3$). **Conclusion** The optimal water extraction process is simple, stable and feasible, which can lay a foundation for the later development and utilization of hospital preparation of Loushaojingluanping Granules.

Key words: Loushaojingluanping Granules; water extraction process; orthogonal test; G1 - entropy weight method

菱芍痉挛平方^[1]包括瓜蒌、白芍、桂枝、川芎、地龙、华重楼、甘草 7 味药材,干预脑卒中后瘫痪肢体肌肉痉挛疗效确切。由于汤剂的服用量大、携带不便、易发霉变质、口感差等缺点^[2],其应用受到限制。根据福建省《医疗机构制剂注册管理办法》及原国家食品药品监督管理总局《关于对医疗机构应用传统工艺配制中药制剂实施备案管理的公告》(2018 年第 19 号)等要求,拟将菱芍痉挛平方开发成院内制剂菱芍痉挛平颗粒,以扩大临床使用范围。中药复方具有“多成分,多靶点”的治疗特性,评价提取工艺优劣时仅凭单一或少数成分具有局限性,故需进行多成分考察。近年来,超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS/MS)法因其分离速度快、灵敏度高、测定专属性强等优点,广泛用于中药及复方制

剂复杂体系的分析中^[3-6]。为应对目前中药复方提取工艺的瓶颈,本研究中基于质量源于设计(QbD)理念,采用 UPLC - MS/MS 法同时测定菱芍痉挛平颗粒多成分含量,并结合 G1 - 熵权法,通过正交试验优化提取工艺,为后续中药复方的开发利用奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Xevo TQ - S 型超高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司);Milli - Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司);HDM - 2000 型调温恒温电热套(常州国华电器有限公司)。

* 基金项目:福建省科技计划项目[2019Y0032]。

第一作者:严国鸿,男,大学本科,主任药师,副教授,研究方向为药物新剂型及新技术,(电子信箱)13799327517@163.com。

1.2 试药

芍药苷对照品(批号为 110736-201842,含量 97.4%),甘草苷对照品(批号为 111610-201908,含量 95.0%),木犀草苷对照品(批号为 111720-201810,含量 98.2%),肉桂酸对照品(批号为 110786-201503,含量 97.9%),阿魏酸对照品(批号为 110773-201915,含量 99.4%),甘草酸对照品(批号为 110731-202021,含量 97.7%),重楼皂苷Ⅶ对照品(批号为 100081-201610,含量 98.1%),重楼皂苷Ⅱ对照品(批号为 111591-201604,含量 98.4%),重楼皂苷Ⅰ对照品(批号为 111590-201604,含量 98.3%),均购于中国食品药品检定研究院。甲酸为色谱纯,甲醇、乙腈为质谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。瓜蒌根药材饮片(批号为 180701)、白芍药材饮片(批号为 201101)、地龙药材饮片(批号为 200801),均购于北京本草方源(亳州)药业科技有限公司;桂枝药材饮片(亳州市慈济堂中药饮片有限公司,批号为 2010012);川芎药材饮片(安国市一方药业有限公司,批号为 20090303);重楼药材饮片(湖北金贵中药饮片有限公司,批号为 A201105);甘草药材饮片(厦门燕来福制药有限公司,批号为 201126)。饮片均经福建中医药大学药用植物实验室范世明高级实验师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为 Waters CORTECS C₁₈柱(100 mm×2.1 mm,1.6 μm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min 时 87%B;0.5~4.5 min 时 87%B→80%B;4.5~6.5 min 时 80%B→68%B;6.5~9.0 min 时 68%B→10%B);流速为 0.25 mL/min;柱温为 40℃;进样量为 2 μL。

质谱条件:电喷雾正负离子多反应监测模式;毛细管电压 2.5 kV;锥孔电压 3.00 V;脱溶剂气流为氮气,流速 800 L/h,脱溶剂温度 500℃;锥孔气流为氮气,流速 50 L/h;离子源温度 150℃;提取因子(Extractor) 3.00 V;碰撞气体为氩气。各成分质谱检测其他参数见表 1(其中 ES⁺ 为正离子模式,ES⁻ 为负离子模式)。

2.1.2 溶液制备

取芍药苷、甘草苷、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸、甘草酸、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅰ对照品各适量,精密称定,加 20% 甲醇溶解制成上述成分质量浓度分别为 1.038,0.782,1.072,0.741,0.944,1.128,0.992,1.052,1.058 mg/mL 的单一对照品贮备液。精密量取各适量,加 20% 甲醇稀释得上述成分质量浓度分别为 103.80,15.64,5.36,7.41,4.72,56.40,4.96,

表 1 各成分质谱检测参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters of each component

成分	化学式	保留时间(min)	离子模式	定量离子对质荷比	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
A	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	3.15	ES ⁻	525.10→121.05	40	25
B	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	4.07	ES ⁻	417.10→255.32	28	20
C	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4.37	ES ⁻	447.10→285.11	30	35
D	C ₉ H ₈ O ₂	4.57	ES ⁻	147.04→103.05	30	10
E	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	5.53	ES ⁻	193.04→149.05	30	25
F	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	8.30	ES ⁻	821.20→351.30	30	40
G	C ₃₁ H ₄₂ O ₂₁	8.62	ES ⁺	1053.40→907.20	40	60
H	C ₃₁ H ₄₂ O ₂₀	9.21	ES ⁺	1037.30→891.43	40	60
I	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	9.39	ES ⁺	877.20→731.21	40	55

注:A 为芍药苷,B 为甘草苷,C 为木犀草苷,D 为肉桂酸,E 为阿魏酸,F 为甘草酸,G 为重楼皂苷Ⅶ,H 为重楼皂苷Ⅱ,I 为重楼皂苷Ⅰ。表 2-3,5-6,8,10 同。

Note:A is paeoniflorin,B is liquiritin,C is cynaroside,D is cinnamic acid,E is ferulic acid,F is glycyrrhizic acid,G is polyphyllin Ⅶ,H is polyphyllin Ⅱ,I is polyphyllin Ⅰ (for Tab. 1-3,5-6,8,10).

5.26,5.29 μg/mL 的混合对照品溶液。按后续提取工艺提取蒺藜芍药平颗粒,将所得提取液(含 1 个处方量 75 g 药材饮片:瓜蒌、白芍药材饮片各 18 g,桂枝、川芎、地龙药材饮片各 9 g,重楼、甘草药材饮片各 6 g)浓缩,加水定容至 100 mL,精密吸取 0.1 mL,置 50 mL 容量瓶中,加 20% 甲醇定容,经 0.22 μm 滤膜滤过,即得供试品溶液。以 20% 甲醇作为空白对照溶液。

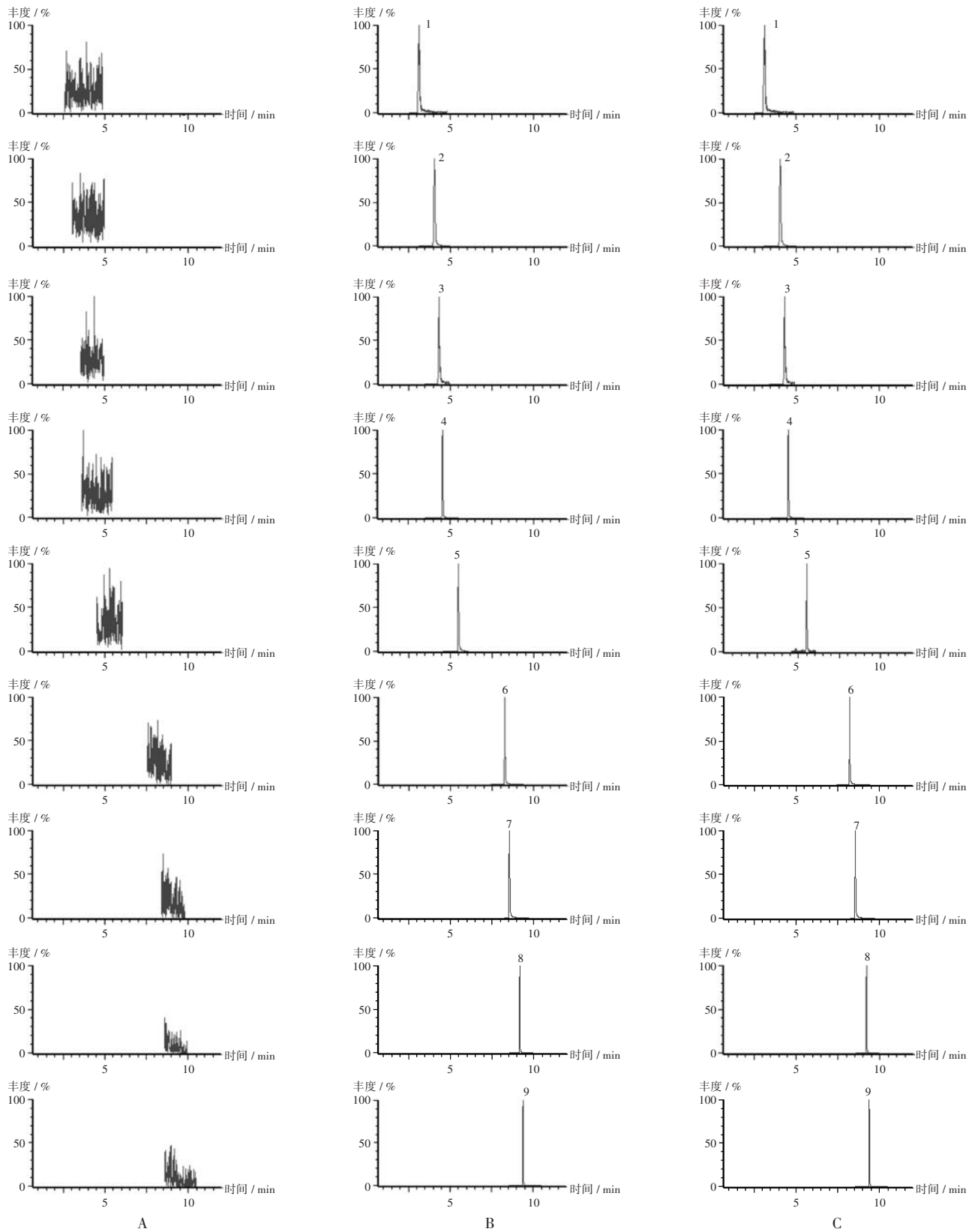
2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.1.2 项下除单一对照品贮备液外的 3 种溶液各适量,按 2.1.1 项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液相应位置有相应吸收峰。详见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 20,50,100,200,400,1 000 μL,分别置 10 mL 容量瓶中,加 20% 甲醇定容,摇匀,分别取适量,按 2.1.1 项下试验条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X,ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,回归方程和线性范围见表 2。

检测限和定量限考察:取 9 种待测成分的单一对照品贮备液各适量,逐一稀释,按 2.1.1 项下试验条件进样测定,记录峰面积,以信噪比(S/N)为 3 和 10 时待测成分的质量浓度分别记作检测限和定量限。结果见表 2。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按 2.1.1 项下试验条件,1 d 内连续进样测定 6 次,以及连续 3 d、每天进样测定 3 次,记录峰面积。结果芍药苷、甘草苷、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸、甘草酸、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅰ日内精密度的 RSD 分别为 3.21%,2.31%,3.42%,2.49%,2.02%,2.22%,1.59%,1.12%,



1. 芍药苷 2. 甘草苷 3. 木犀草苷 4. 肉桂酸 5. 阿魏酸 6. 甘草酸 7. 重楼皂苷Ⅶ 8. 重楼皂苷Ⅱ 9. 重楼皂苷Ⅰ
A. 空白对照溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 超高效液相色谱串联质谱图

1. Paeoniflorin 2. Liquiritin 3. Cynaroside 4. Cinnamic acid 5. Ferulic acid 6. Glycyrrhizic acid 7. Polyphyllin VII 8. Polyphyllin II 9. Polyphyllin I
A. Blank reference solution B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig.1 UPLC-MS/MS chromatograms

表2 线性关系及检测限、定量限考察结果
Tab. 2 Results of linear relation test, limit of detection and limit of quantitation

成分	回归方程	线性范围 (ng / mL)	r	检测限 (ng / mL)	定量限 (ng / mL)
A	$Y_1 = 74.622 X_1 + 16\,853$	207.60 ~ 10\,380.00	0.999 9	1.73	5.19
B	$Y_2 = 89.752 X_2 - 94.923$	31.28 ~ 1\,564.00	0.999 2	0.26	0.78
C	$Y_3 = 1\,065.8 X_3 - 194.51$	10.72 ~ 536.00	0.998 9	0.14	0.27
D	$Y_4 = 599.38 X_4 - 334.24$	14.82 ~ 741.00	0.999 8	0.19	0.37
E	$Y_5 = 753.53 X_5 + 688.69$	9.44 ~ 472.00	0.999 6	0.12	0.24
F	$Y_6 = 235.4.5 X_6 + 3\,232.9$	112.80 ~ 5\,640.00	0.999 4	1.41	2.82
G	$Y_7 = 433.86 X_7 - 593.09$	9.92 ~ 496.00	0.999 5	0.13	0.25
H	$Y_8 = 118.05 X_8 - 209.33$	10.52 ~ 526.00	0.999 1	0.13	0.26
I	$Y_9 = 847.37 X_9 - 215.62$	10.58 ~ 529.00	0.999 4	0.12	0.26

3.23% ($n = 6$) ; 日间精密度的 RSD 分别为 2.57%, 1.39%, 2.72%, 3.11%, 1.52%, 2.51%, 2.61%, 3.27%, 1.51% ($n = 3$) , 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取供试品溶液适量, 室温下分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果芍药苷、甘草苷、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸、甘草酸、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅰ峰面积的 RSD 分别为 3.51%, 2.89%, 2.22%, 3.23%, 2.44%, 2.12%, 3.48%, 2.11%, 1.79% ($n = 6$) , 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 精密吸取同一样品提取液 0.1 mL, 共 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果芍药苷、甘草苷、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸、甘草酸、重楼皂苷Ⅶ、重楼皂苷Ⅱ、重楼皂苷Ⅰ的平均含量分别为每 0.1 mL 含 393.86, 31.74, 18.94, 15.88, 10.18, 36.86, 14.92, 7.88, 8.96 μg , RSD 分别为 3.48%, 3.02%, 3.63%, 3.82%, 4.19%, 2.71%, 2.34%, 3.29%, 3.21% ($n = 6$) , 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密吸取已知含量的样品提取液 0.05 mL, 分别加入各成分对照品适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 3。

2.2 得膏率测定

1 个 芫花 芫花 平颗粒 处方量的 药材饮片 经后续最佳提取工艺提取后, 离心, 滤过, 精密吸取 25 mL, 60 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩得浸膏, 真空干燥 48 h 得干浸膏, 计算得膏率。得膏率 = $(m_{\text{干}} \times V) / (25 \times m_{\text{总}}) \times 100\%$, 其中 $m_{\text{干}}$ 为干燥膏质量 (g), V 为提取液体积 (mL), $m_{\text{总}}$ 为复方提取饮片总质量 (g)。

2.3 提取工艺研究

2.3.1 单因素考察

浸泡时间: 称取 1 组 芫花 芫花 平颗粒 药材饮片 (每

组 2 份, 每份 75 g), 加 10 倍量水 (约 750 mL) 浸泡, 分别于 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h 时取出, 称定质量, 计算吸水率。结果见表 4。可见, 浸泡 3 h 后吸水率几乎达到峰值, 且随浸泡时间延长吸水率趋于平缓, 故浸泡时间确定为 3 h。

提取时间: 取 芫花 芫花 平颗粒 药材饮片 适量 (每组平行 2 次), 共 5 组, 加 8 倍量水, 浸泡 3 h, 分别加热回流 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h (保持微沸), 提取 1 次, 按 2.1 项下 UPLC - MS / MS 法测定 9 个成分的含量, 计算得膏率。结果见表 5。

加水量: 取 芫花 芫花 平颗粒 药材饮片 适量 (每组平行 2 次), 共 5 组, 分别加入 6, 8, 10, 12, 15 倍量水, 浸泡 3 h, 加热回流 2 h (保持微沸), 提取 1 次, 同法测定 9 个成分的含量, 计算得膏率。结果见表 5。

提取次数: 取 芫花 芫花 平颗粒 中药饮片 适量 (每组平行 2 次), 共 3 组, 分别加入 8 倍量水, 浸泡 3 h, 加热回流 1.5 h (保持微沸), 分别提取 1, 2, 3 次, 同法测定 9 个成分的含量, 计算得膏率。结果见表 5。

2.3.2 综合评分 (P_j) 计算

各指标权重赋值采用评价指标 G1 法主观赋权和熵权法客观赋权相结合的组合赋权法。

G1 法^[7-8]: 设同级评价指标为 $\{x_1, x_2, \dots, x_m\}$, 确定各指标顺序关系。设 r_k 为 w_{k-1} 于 w_k 的重要程度之比, 且 $k = m, m-1, \dots, 2$, 则 $w_{k-1} = r_k w_k$ ($k = m, m-1, \dots, 2$)。计算权重系数 w_k , 公式如下。

$$w_k = 1 / (1 + \sum_{k=2}^m \prod_{r=k}^m r_i)$$

熵权法^[9-10]: 对实验数据矩阵归一化, 设 m 个评价指标, n 个评价对象的试验数据矩阵为 $X = (x_{ij})_{n \times m}$, 对其归一化后得到属性矩形 $R = (r_{ij})_{n \times m}$, 对效益型属性 (指属性值愈大愈好的指标) 而言, 进行归一化, 公式如下。

$$r_{ij} = (x_{ij} - x_{j\min}) / (x_{j\max} - x_{j\min})$$

其中 x_{ij} 为第 i 个评价对象的第 j 项指标数据,

表 3 加样回收试验结果 (n = 6)
Tab. 3 Results of the recovery test (n = 6)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$	成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	$RSD(\%)$
A	196.93	207.60	401.54	98.56	97.94	2.28	F	5.09	4.72	9.54	94.28	98.59	2.68
	196.93	207.60	405.76	100.59				5.09	4.72	9.77	99.15		
	196.93	207.60	395.24	95.53				5.09	4.72	9.51	93.64		
	196.93	207.60	401.50	98.54				68.43	67.68	134.46	97.56		
	196.93	207.60	394.03	94.94				68.43	67.68	136.15	100.06		
	196.93	207.60	403.39	99.45				68.43	67.68	137.69	102.33		
B	15.87	15.64	31.51	100.00	98.67	4.11	G	68.43	67.68	132.85	95.18	95.65	3.54
	15.87	15.64	30.75	95.14				68.43	67.68	136.04	99.90		
	15.87	15.64	31.46	99.68				68.43	67.68	133.76	96.53		
	15.87	15.64	31.50	99.94				7.46	7.94	15.07	95.84		
	15.87	15.64	30.40	92.90				7.46	7.94	15.55	101.89		
	15.87	15.64	32.19	104.35				7.46	7.94	14.84	92.95		
C	9.47	10.72	19.34	92.07	96.32	3.63	H	7.46	7.94	15.03	95.34	101.15	2.59
	9.47	10.72	19.65	94.96				7.46	7.94	14.79	92.32		
	9.47	10.72	19.98	98.04				7.46	7.94	15.05	95.59		
	9.47	10.72	20.14	99.53				3.94	4.21	8.06	97.86		
	9.47	10.72	20.23	100.37				3.94	4.21	8.13	99.52		
	9.47	10.72	19.43	92.91				3.94	4.21	8.23	101.90		
D	7.94	7.41	15.77	105.67	102.16	3.09	I	3.94	4.21	8.35	104.75	98.78	3.77
	7.94	7.41	15.63	103.78				3.94	4.21	8.13	99.52		
	7.94	7.41	15.31	99.46				3.94	4.21	8.29	103.33		
	7.94	7.41	15.39	100.54				4.48	4.23	8.81	102.36		
	7.94	7.41	15.74	105.26				4.48	4.23	8.59	97.16		
	7.94	7.41	15.22	98.25				4.48	4.23	8.88	104.02		
E	5.09	4.72	9.92	102.33	97.10	3.35		4.48	4.23	8.64	98.35		
	5.09	4.72	9.68	97.25				4.48	4.23	8.46	94.09		
	5.09	4.72	9.62	95.97				4.48	4.23	8.57	96.69		

表 4 浸泡时间考察结果 (n = 2)

Tab. 4 Results of the investigation of soaking time (n = 2)

时间(h)	质量(g)	增加质量(g)	吸水率(%)
0	75		
0.5	142.06	67.06	89.41
1.0	143.20	68.20	90.93
2.0	154.95	79.95	106.60
3.0	170.51	95.51	127.35
4.0	170.60	95.60	127.47
5.0	170.85	95.85	127.80

x_{jmax} 、 x_{jmin} 分别为 x_{ij} 的最大值、最小值, $i = 1, 2, \cdots, n$;
 $j = 1, 2, \cdots, m$ 。

求取指标熵值 s_j , 公式如下。

$$s_j = -k \sum_{i=1}^n f_{ij} \ln f_{ij}, f_{ij} = r_{ij} / \sum_{i=1}^n r_{ij}, k = 1 / \ln n$$

其中 f_{ij} 为正交数据经矩阵排列后第 j 项指标下第 i 个样本值占该指标的比重, 当 $f_{ij} = 0$ 时, $x_{ij} \ln n = 0$ 。并计算各指标权重系数 w_j , 公式如下。

表 5 提取时间、加水量及提取次数考察结果 (n = 2)

Tab. 5 Results of the investigation of extraction time, water addition and extraction times (n = 2)

因素		含量(mg)						得膏率
		A	B + F	C	D	E	G + H + I	(%)
提取时间(h)	1.0	223.06	134.56	10.98	9.89	8.91	18.97	21.65
	1.5	224.42	135.64	11.43	13.43	9.32	24.21	21.91
	2.0	313.73	140.05	14.56	14.43	9.43	26.42	23.05
	2.5	314.98	142.09	15.72	14.68	9.48	28.56	23.16
	3.0	310.84	138.12	16.43	14.55	9.53	27.59	23.28
加水量(倍)	6	321.06	136.56	11.98	10.89	9.11	25.76	23.46
	8	335.42	137.64	12.43	13.47	9.23	25.31	24.05
	10	347.73	143.05	18.56	14.13	9.45	26.23	24.54
	12	354.98	148.09	19.72	13.89	9.56	28.78	24.74
	15	356.84	150.12	18.43	14.74	9.67	28.04	25.01
提取次数	1	351.34	154.56	14.98	14.39	8.97	25.74	23.34
	2	364.87	165.09	18.72	14.56	9.46	28.71	28.03
	3	376.65	168.12	18.43	14.74	9.64	28.11	27.99

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

G1 - 熵权法的组合权重确定^[11]: 设定由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 , 组合权重 w_j 计算公式如下。

$$w_j = w_1 w_{2j} / \sum_{j=1}^m w_1 w_{2j}$$

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7个评价指标的重要性依次为得膏率(源于全方) > 木犀草苷(源于瓜蒌) > 芍药苷(源于白芍) = 肉桂酸(源于桂枝) > 重楼皂苷(I + II + VII源于华重楼) > 阿魏酸(源于川芎) > 甘草苷 + 甘草酸(源于甘草), 权重评价标度分别为 r_2 (得膏率及木犀草苷) = 1.5、 r_3 (木犀草苷及芍药苷) = 1.2、 r_4 (芍药苷及肉桂酸) = 1.0、 r_5 (肉桂酸及重楼皂苷 I + II + VII) = 1.2、 r_6 (重楼皂苷 I + II + VII及阿魏酸) = 1.2、 r_7 (阿魏酸及甘草苷、甘草酸) = 1.2, 求得7个指标主观权重值 w_1 , 再用熵权法计算各指标客观权重值 w_2 , 然后计算组合权重值 w 和综合评分 P_j , 计算公式如下, 权重值见表6。

$$P_j = \sum_{j=1}^m (100 w_j x_j / x_{j \max})$$

表6 提取工艺评价指标权重值

Tab. 6 Weight value of evaluation indexes of the extraction process

评价指标	w_1	w_2	w
A含量	0.140 7	0.112 2	0.111 7
B + F含量	0.081 4	0.209 3	0.120 6
C含量	0.168 9	0.120 3	0.143 7
D含量	0.140 7	0.123 8	0.123 3
E含量	0.097 7	0.123 2	0.085 2
G + H + I含量	0.117 3	0.148 0	0.122 8
得膏率	0.253 3	0.163 3	0.292 7

表8 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 8 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素				含量(mg)						得膏率 (%)	P_j (分)
	X	Y	Z	V(空白)	A	B + F	C	D	E	G + H + I		
1	1	1	1	1	220.77	133.34	8.87	9.39	8.83	19.52	20.24	63.99
2	1	2	2	2	364.68	165.75	17.24	13.61	9.73	26.14	26.52	88.73
3	1	3	3	3	361.10	151.79	18.06	12.88	9.35	27.30	25.50	86.67
4	2	1	3	2	353.09	172.76	14.84	14.04	9.60	31.21	27.14	90.03
5	2	2	1	3	300.38	130.19	14.45	12.07	10.09	24.31	21.63	76.05
6	2	3	2	1	387.02	181.37	22.46	14.50	9.60	33.93	28.26	98.97
7	3	1	2	3	375.10	175.62	18.04	15.12	9.69	29.47	27.59	93.70
8	3	2	3	1	368.88	170.51	19.66	14.15	9.35	34.24	27.58	94.84
9	3	3	1	2	312.28	146.60	18.85	11.64	9.48	25.53	23.27	81.57
K_1	239.39	247.72	221.61	257.79								
K_2	265.06	259.63	281.40	260.34								
K_3	270.12	267.21	271.54	256.42								
R	30.73	19.49	49.93	3.92								

2.3.3 正交试验设计与结果

根据单因素试验考察结果, 以加水量(X)、提取时间(Y)、提取次数(Z)为考察因素, 以芍药苷、甘草苷 + 甘草酸、木犀草苷、肉桂酸、阿魏酸、重楼皂苷 I + II + VII的含量及得膏率的综合评分 P_j 为评价指标, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计。因素和水平见表7, 试验设计和结果见表8, 方差分析结果见表9。由表8及表9可知, 因素X、Y、Z对萎芍痉挛平颗粒水提工艺均有显著影响($P < 0.05$), 且影响强度为 $Z > X > Y$ 。因此, 确定最佳工艺为 $X_3Y_3Z_2$, 即每次水提时, 加10倍量水, 浸泡3 h, 提取2次, 每次2.0 h。

表7 因素与水平

Tab. 7 Factors and their levels

水平	因素X(倍)	因素Y(h)	因素Z(次)
1	6	1.0	1
2	8	1.5	2
3	10	2.0	3

2.2.4 验证试验

分别称取3份处方量药材饮片, 共225 g, 按最佳工艺条件进行水提, 并计算得膏率, 结果见表10。可见, 9个成分含量的RSD值均小于2.50% ($n = 3$), 表明该方法稳定、可行。

3 讨论

3.1 评价指标选择

萎芍痉挛平方是福建中医药大学附属人民医院梁晖主任临床经验方, 由经典方栝蒌(瓜蒌)桂枝汤加减而成, 方中君药瓜蒌, 味甘、微苦, 性寒, 入肺胃二经, 清热泻火、润燥柔筋, 用于此方, 既能清热降火以消热之

表9 方差分析结果

Tab. 9 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
X	180.862	2	90.431	68.992	0.014
Y	64.342	2	32.171	24.544	0.039
Z	685.008	2	342.504	261.305	0.004
V(误差)	2.621	2	1.311		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$; $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

表10 验证试验结果($n=3$)

Tab. 10 Results of the verification test ($n=3$)

指标	1	2	3	$\bar{X}$	RSD(%)
A(mg/份)	396.58	401.78	397.72	398.69	0.69
B+F(mg/份)	188.47	191.41	186.72	188.87	1.25
C(mg/份)	23.20	22.47	22.81	22.83	1.60
D(mg/份)	15.93	15.41	15.33	15.56	2.09
E(mg/份)	10.26	10.47	10.24	10.32	1.23
G+H+I(mg/份)	36.10	35.44	35.06	35.53	1.48
得膏率(%)	28.31	28.41	28.39	28.37	0.19

源,又能生津柔筋以缓脉急,益阴分津液,养其筋经,标本兼顾。辅以桂枝、芍药为臣药,桂枝味辛、甘,性温,入血分,温经通脉活络;芍药味酸、甘,性寒,养阴舒筋,益君药养阴柔肝,舒筋止痛。佐以华重楼,其味苦,性微寒,归肝经,清热解毒,凉肝定惊;川芎味辛,性温,入肝、胆心包经,活血行气,祛风止痛;地龙味咸,性寒,归肝、脾经,清热凉血、通络止痛,擅治高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肢体麻木、半身不遂;以炙甘草为使药,调和诸药,益气和中。全方具有清热养阴、柔筋缓急、活血通络之效。以2020年版《中国药典(一部)》与现代药理学研究为指导,瓜蒌在药典中虽无指标性成分,但研究表明,其中木犀草苷成分能抑制脑组织核因子 κB 激活信号,从而发挥重要的神经保护作用,为脑缺血治疗提供有效方法^[12]。白芍中芍药苷可作为一种新型的抗血小板药物,通过调节血管性血友病因子与血小板糖蛋白Ib(GP Ib)的相互作用,抑制剪切应力诱导的血小板聚集和扩张血管,促进血液流通^[13],又能抑制神经炎症蛋白ASK1磷酸化,从而减轻神经病理性疼痛^[14],对于脑卒中的治疗具有重要意义。桂枝的指标性成分肉桂酸,在桂枝中含量较高^[15],且具有通过内皮依赖的方式松弛血管,诱导血管舒张,达到促进血流通畅的作用^[13]。川芎中阿魏酸能抑制Toll样受体/髓样分化因子88信号通路,并对氧供应不足和血流恢复不足的脑缺血疾病起到保护作用^[16];华重楼中的重楼皂苷(I, II, VII)可抑制内皮素的分泌,降低血压,保护心血管系统^[17]。甘草中甘草苷和甘草酸具有很强的抗炎活性,能通过减少巨噬细胞炎症因子的释放和抑制前列腺素 E_2

合成的花生四烯酸代谢途径中的关键酶^[18],缓解脑卒中引发的神经炎症。因此,综合全方的指标性成分,最终选择用于优化提取工艺的指标成分为木犀草苷、芍药苷、肉桂酸、重楼皂苷I+II+VII、阿魏酸、甘草苷+甘草酸。

3.2 主客观赋权结合正交试验设计

为获得全方活性成分最佳提取工艺参数,先通过单因素试验,以浸泡时间、加水量、提取时间以及提取次数为考察因素,再通过正交试验优化提取工艺条件。因该方前期临床采用汤剂,且患者使用后有确切疗效,结合预试验结果,确定本课题沿用水作为提取溶剂。在该过程中,赋予各指标权重直接关系到结果的科学性。本试验中采用了近些年在中药提取工艺领域常用的G1-熵权法^[19-21],其中,G1法为主观赋权法,该方法依据处方中“君臣佐使”配伍规律进行赋权,木犀草苷、芍药苷、肉桂酸、重楼皂苷I+II+VII、阿魏酸及甘草苷+甘草酸的主观权重系数分别为0.1689,0.1407,0.1407,0.1173,0.0977,0.0814。得膏率可直观反映水溶性成分的总含量,因此加大其主观权重系数为0.2533。熵权法为客观赋权法,该方法的权重系数由试验数据综合评判而来,最后将主观与客观权重系数相结合,得到组合权重系数。该方法既可避免只根据专家主观评判而忽视试验数据特征,又可避免忽视专家经验的主观信息而过于依赖数据,使结果更科学、合理。

综上所述,蒺藜芍药平颗粒最佳提取工艺为,药材饮片加10倍量水浸泡3h,煎煮2次,每次2h。该工艺数据可为后期蒺藜芍药平颗粒申报院内制剂奠定基础。

参考文献

[1] 许文,吴献,黄鸣清,等. 栝楼桂枝汤的血清药物化学研究[J]. 中草药,2017,48(10):2033-2043.
[2] 郝云芳,倪艳,李先荣. 中药配方颗粒的质量控制方法研究进展[J]. 药物评价研究,2013,36(4):307-310.
[3] 甄亚钦,田伟,支雅婧,等. UPLC-MS/MS分析薄荷配方颗粒与传统饮片中非挥发性成分的相关性[J]. 中国中药杂志,2021,46(5):1134-1140.
[4] 白思宇,陈倩雯,冯伟红,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定中药何首乌中10种真菌毒素的含量[J]. 世界中医药,2021,16(17):2533-2541.
[5] 李玲慧,李丹,黄汉明,等. UPLC-MS/MS法同时测定蒺藜平异合剂中7种成分[J]. 中成药,2021,43(2):321-326.
[6] 李鸢,刘杰,吴献,等. 基于UPLC-MS/MS法的栝楼桂枝汤使药甘草配伍研究[J]. 临床合理用药杂志,2019,12(5):25-27.
[7] 常艳梅,陈义华. 基于指数标度的G1法及其应用[J]. 重庆理工大学学报(自然科学),2013,27(8):131-134.
[8] 刘建,郑双忠,邓云峰,等. 基于G1法的应急能力评估指标权重的确定[J]. 中国安全科学学报,2006,16(1):30-33.