

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.009

基于信息熵赋权法和正交试验优选乌头桂枝汤提取工艺*

盛竹君¹,杨满琴¹,高玉菊¹,杨晓丹¹,胡蝶¹,徐维平^{2△}

(1. 安徽省针灸医院,安徽 合肥 230061; 2. 安徽省立医院,安徽 合肥 230002)

摘要:目的 基于信息熵赋权法优选乌头桂枝汤提取工艺。方法 以药物浸泡时间、提取时间、加水量为影响因素,以芍药苷、甘草苷、甘草酸单铵盐、单酯型生物碱、桂皮醛含量为评价指标,采用信息熵赋权法确定上述指标的权重系数,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选提取工艺。结果 最佳工艺为加10倍量水浸泡1.0 h,提取时间1.0 h,每1 mL平均含芍药苷、甘草苷、单酯型生物碱、甘草酸单铵盐、桂皮醛分别为0.054 7,0.023 0,0.003 4,0.037 7,0.089 1 mg,平均综合评分为0.126 5。结论 该方法工艺合理、结果稳定,可用于乌头桂枝汤的提取。

关键词:乌头桂枝汤;信息熵赋权法;正交试验;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)21-0040-04

Optimization of Extraction Process of Wutou Guizhi Decoction Based on Information Entropy Weighting and Orthogonal Test

SHENG Zhujun¹, YANG Manqin¹, GAO Yuju¹, YANG Xiaodan¹, HU Die¹, XU Weiping²

(1. Anhui Provincial Acupuncture and Moxibustion Hospital, Hefei, Anhui, China 230061; 2. Anhui Provincial Hospital, Hefei, Anhui, China 230002)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Wutou Guizhi Decoction based on the information entropy weighting method. **Methods** The extraction process was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the soaking time of drugs, extraction time and the amount of water addition as the influencing factors, with the contents of paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid ammonium salt, monoester alkaloids and cinnamaldehyde as the evaluation indexes, and the weight coefficients of the above indexes were determined by the information entropy weighting method. **Results** The optimal process was as follows: the drugs were soaked for 1.0 h with 10 times the amount of water, and extracting for 1.0 h. The average contents of paeoniflorin, liquiritin, monoester alkaloids, glycyrrhizic acid ammonium salt and cinnamaldehyde in per 1 mL of extract of Wutou Guizhi Decoction were 0.054 7, 0.023 0, 0.003 4, 0.037 7 and 0.089 1 mg respectively, with the average comprehensive score of 0.126 5. **Conclusion** The method is reasonable and stable, which can be used for the extraction of Wutou Guizhi Decoction.

Key words: Wutou Guizhi Decoction; information entropy weighting; orthogonal test; extraction process

乌头桂枝汤出自《金匮要略》,由制川乌、桂枝、白芍、炙甘草、生姜和大枣组方。方中,川乌具有祛风除湿、镇痛、抗炎、增强免疫等作用^[1-3];桂枝具有解热、镇痛、抗炎、抗菌、扩血管、调节免疫等作用^[4-6];白芍具有抗炎、镇痛、养血等药理作用,用于调节免疫和治疗风湿免疫疾病等^[7-8];炙甘草具有止痛、补脾益气、调和诸药等功效^[9]。乌头桂枝汤镇痛抗炎作用明显,是治疗各种痹症的代表方剂^[10-11]。由于中药汤剂成分复杂,有效成分较多,采用单一指标评价具有片面性。查阅文献和《中国药典》可确定汤剂中多个有效成分作为评价指标,通常由主观赋权法或客观赋权法获得综合评价指标,进而优选中药汤剂制备工艺。主观赋权法是根据研究者主观意愿赋予权重系数,受主观意识影响较大,具有一定局限性;客观赋权法是基于矩阵的方法,对多个有效指标数据进行整理,计算出权重系数(W_i)。熵起源于热力学,是热能

的变化量与温度的比值,广泛应用于工程技术及经济社会。信息熵(H_i)是信号集的平均信息量,度量系统的不确定性和无序性,广泛用于多指标评价^[12]。本研究中以芍药苷、桂皮醛、甘草苷、甘草酸单铵盐、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱含量为评价指标,采用信息熵赋权法将多项评价指标转换成单一评价指标,并利用正交试验优选汤剂提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有 2966 型二极管阵列检测器、Empower3 色谱工作站;BSA124S 型赛多利斯电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,精度为万分之一)。

1.2 试剂

芍药苷对照品(批号为 AF9030313),桂皮醛对照品

*基金项目:中国博士后科学基金会第69批面上资助项目[2021M693047]。

第一作者:盛竹君,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药制剂与纳米药物制剂,(电子信箱)1083730179@qq.com。

△通信作者:徐维平,男,博士研究生,主任药师,研究方向为纳米药物制剂、药理学与抗炎免疫,(电子信箱)wpXu@mail.ustc.edu.cn。

(批号为20051753),甘草苷对照品(批号为AF20071952),甘草酸单铵盐对照品(批号为AF20031131),苯甲酰新乌头原碱对照品(批号为AF8052807),苯甲酰次乌头原碱对照品(批号为AF9112602),苯甲酰乌头原碱对照品(批号为AF20033001),均购于成都埃法生物科技有限公司,采用面积归一化法检测的纯度均大于98%;乙腈(色谱纯,成都市诺尔施科技有限责任公司);三乙胺(分析纯,上海易恩化学技术有限公司);磷酸(分析纯,科隆化学品有限公司);水为怡宝纯净水;制川乌(批号为356391),桂枝(批号为357151),白芍(批号为357158),炙甘草(批号为357359),生姜(批号为357601),大枣(批号为356516),均购于亳州市沪谯药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate LP-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:流动相A为乙腈,流动相B为磷酸+三乙胺混合溶液(0.5 mL磷酸和0.5 mL三乙胺,pH 6.5),梯度洗脱(0~30 min时20%A→60%A,30~31 min时60%A→80%A,31~35 min时80%A,35~36 min时80%A→20%A,36~45 min时20%A);检测波长:230 nm(芍药苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱),237 nm(甘草苷),290 nm(桂皮醛),254 nm(甘草酸单铵盐);柱温:35℃;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

精密称取芍药苷13.5 mg,用甲醇溶解定量至25 mL,精密称取桂皮醛15.5 mg,用甲醇溶解定量至25 mL,精密称取甘草苷13 mg,用甲醇溶解定量至25 mL;精密称取甘草酸单铵盐10.8 mg,用甲醇溶解定量至10 mL;精密称取苯甲酰新乌头原碱8 mg,用甲醇溶解定量至200 mL,精密称取苯甲酰次乌头原碱9.2 mg,用甲醇溶解定量至200 mL,精密称取苯甲酰乌头原碱3.2 mg,用甲醇溶解定量至200 mL,分别配制终质量浓度为0.540,0.620,0.520,1.080,0.040,0.046,0.016 mg/mL的对照品溶液。

精密称取芍药苷1.1 mg,桂皮醛1.0 mg,甘草苷0.8 mg,甘草酸单铵盐1.0 mg,苯甲酰新乌头原碱0.9 mg,苯甲酰次乌头原碱0.6 mg和苯甲酰乌头原碱0.6 mg,用甲醇溶解定量至10 mL,配制成混合对照品溶液。

取制川乌20 g,桂枝12 g,白芍9 g,炙甘草6 g,生姜9 g,大枣9枚,置圆底烧瓶中,加水浸泡后煎煮,取煎煮液定容至1000 mL。取样品5 mL,45℃水浴超声10 min,

混匀,放冷,0.45 μm针头滤器滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密吸取2.1.2项下对照品溶液10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定。以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,结果见表1。以待测成分响应值分别为3倍和10倍信噪比(S/N)时的质量浓度为检测限和定量限。结果见表1。

表1 线性关系考察与检测限、定量限确定结果

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ

待测成分	回归方程	R ²	线性范围 (mg/mL)	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
芍药苷	Y=121.44X-26.922	0.999 0	0.108~0.540	8	33
桂皮醛	Y=231.06X-38.012	0.999 8	0.124~0.620	6	26
甘草苷	Y=109.53X-34.787	0.999 3	0.052~0.240	3	15
甘草酸单铵盐	Y=139.19X-16.409	0.999 6	0.216~1.080	10	29
苯甲酰新乌头原碱	Y=9.620 3X-1.423 9	0.999 8	0.005 0~0.040	15	47
苯甲酰次乌头原碱	Y=11.67X-1.673 6	0.999 5	0.009 2~0.046	17	50
苯甲酰乌头原碱	Y=4.910 9X-0.441	0.999 9	0.003 2~0.016	17	52

2.2 提取工艺优化

2.2.1 正交试验设计与结果

以药物浸泡时间(A)、提取时间(B)、加水量(C)为影响因素,每个因素选取3个水平,以芍药苷、甘草苷、甘草酸单铵盐、单酯型生物碱、桂皮醛含量为评价指标,其中单酯型生物碱以苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱的总含量计,进行L₉(3⁴)正交试验^[13]。因素与水平见表2,试验设计与结果见表3。

表2 因素与水平

Tab. 2 Factors and their levels

水平	因素A(h)	因素B(h)	因素C(倍)
1	0	0.5	8
2	1.0	1.0	10
3	2.0	1.5	12

2.2.2 信息熵赋权法确定W_i

1)构建原始评价指标矩阵(X_{ij})_{mn}

$$X = \begin{pmatrix} 0.0319 & 0.0724 & 0.0566 & 0.0600 & 0.0515 & 0.0593 & 0.0521 & 0.0617 & 0.0551 \\ 0.0286 & 0.0277 & 0.0270 & 0.0306 & 0.0289 & 0.0248 & 0.0242 & 0.0248 & 0.0248 \\ 0.0021 & 0.0161 & 0.0139 & 0.0118 & 0.0126 & 0.0141 & 0.0119 & 0.0156 & 0.0140 \\ 0.0218 & 0.0496 & 0.0415 & 0.0647 & 0.0462 & 0.0430 & 0.0440 & 0.0438 & 0.0382 \\ 0.0270 & 0.0494 & 0.0331 & 0.0207 & 0.0793 & 0.0465 & 0.0273 & 0.0596 & 0.0482 \end{pmatrix}$$

2)将(X_{ij})_{mn}转化为概率矩阵(P_{ij})_{mn}

$$P_{ij} = \frac{X_{ij}}{\sum_{j=1}^n X_{ij}}, \text{其中 } P_{ij} \text{ 为 } j \text{ 实验中 } i \text{ 指标下的概率。}$$

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

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

编号	因素				含量(mg/mL)					综合评分
	A	B	C	D(空白)	芍药苷	甘草苷	单酯型生物碱	甘草酸单铵盐	桂皮醛	
1	1	1	1	1	0.0319	0.0286	0.0021	0.0218	0.0270	0.0498
2	1	2	2	2	0.0724	0.0277	0.0161	0.0496	0.0494	0.1338
3	1	3	3	3	0.0566	0.0270	0.0139	0.0415	0.0331	0.1045
4	2	1	2	3	0.0600	0.0306	0.0118	0.0647	0.0207	0.0953
5	2	2	3	1	0.0515	0.0289	0.0126	0.0462	0.0793	0.1481
6	2	3	1	2	0.0593	0.0248	0.0141	0.0430	0.0465	0.1196
7	3	1	3	2	0.0521	0.0242	0.0119	0.0440	0.0273	0.0924
8	3	2	1	3	0.0617	0.0248	0.0156	0.0438	0.0596	0.1382
9	3	3	2	1	0.0551	0.0248	0.0140	0.0382	0.0482	0.1183
K_1	0.2881	0.2375	0.3076	0.3162						
K_2	0.3630	0.4201	0.3474	0.3458						
K_3	0.3489	0.3424	0.3450	0.3380						
R	0.0749	0.1826	0.0398	0.0296						

$P=$	0.0637	0.1446	0.1131	0.1199	0.1029	0.1185	0.1041	0.1233	0.1101
	0.1185	0.1147	0.1118	0.1268	0.1197	0.1027	0.1002	0.1027	0.1027
	0.0186	0.1436	0.1240	0.1053	0.1124	0.1258	0.1062	0.1392	0.1249
	0.0555	0.1263	0.1057	0.1647	0.1176	0.1095	0.1120	0.1115	0.0973
	0.0690	0.1263	0.0846	0.0529	0.2028	0.1189	0.0698	0.1524	0.1232

3) 计算 H_i

$$H_i = - \frac{\sum_{j=1}^n P_{ij} \ln P_{ij}}{\ln n}$$

$$H_i = |0.9917 \ 0.9985 \ 0.9683 \ 0.9861 \ 0.9638|$$

4) 计算 W_i

$$W_i = \frac{1 - H_i}{\sum_{i=1}^m (1 - H_i)}$$

$$W_i = |0.0906 \ 0.0164 \ 0.3461 \ 0.1517 \ 0.3952|$$

5) 计算综合评分 (M_m)

$$M_m = P_{1m} \times W_1 + P_{2m} \times W_2 + P_{3m} \times W_3 + \dots + P_{mn} \times W_n$$

由表3和公式计算结果可知,当 H_i 越小、 W_i 越大时,评价指标在综合评价中作用力度越大;反之,越小。芍药苷、甘草苷、单酯型生物碱、甘草酸单铵盐与桂皮醛的 H_i 分别为0.9917, 0.9985, 0.9683, 0.9861, 0.9638, W_i 分别为0.0906, 0.0164, 0.3461, 0.1517, 0.3952。可见,桂皮醛含量的 H_i 小、 W_i 大,在不同试验条件下变化最显著,在综合评价中作用力度最大;甘草苷含量则相反。

2.2.3 方差分析

由表3可知,各因素对乌头桂枝汤综合评分的影响主次顺序为提取时间 > 浸泡时间 > 加水量。乌头桂枝汤提取最优工艺为 $A_2B_2C_2$, 即加10倍量水浸泡

1.0 h, 提取1.0 h。采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行方差分析,结果见表4。可见,提取时间有统计学意义($P < 0.05$),浸泡时间和加水量均无统计学意义($P > 0.05$)。

表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	F值	P
因素A	0.001	2	0.129	> 0.05
因素B	0.006	2	0.027	< 0.05
因素C	0.000	2	0.321	> 0.05
因素D(误差)	0.000	2		

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

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

2.3 验证试验

按优选最佳工艺提取3批乌头桂枝汤进行验证试验,结果见表5。可见,提取工艺、数据评价方法具有可行性。

表5 验证试验结果

Tab. 5 Results of the verification test

编号	含量(mg/mL)					综合评分
	芍药苷	甘草苷	单酯型生物碱	甘草酸单铵盐	桂皮醛	
1	0.0538	0.0227	0.0036	0.0375	0.0882	0.1259
2	0.0547	0.0236	0.0032	0.0388	0.0936	0.1311
3	0.0555	0.0226	0.0033	0.0369	0.0854	0.1224
\bar{X}	0.0547	0.0230	0.0034	0.0377	0.0891	0.1265

3 讨论

3.1 评价指标选择

参考2020年版《中国药典(一部)》,本研究中以白芍中芍药苷,制川乌中苯甲酰新乌头原碱,苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱,桂枝中桂皮醛^{[14]288},炙甘草中甘草苷^{[14]89}和甘草酸单铵盐^{[14]200}为评价指标。制川乌毒性较大,煎煮后由毒性较高的双酯型生物碱水解成毒性较低的单酯型生物碱^[15]。苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱是制川乌中的单酯型生物碱,具有镇痛、抗炎、抗肿瘤等作用^[16-17]。芍药苷具有抗炎、增强免疫力、抗氧化等药理作用^[18]。桂皮醛具有抗肿瘤、抗糖尿病、抗炎等药理作用^[19]。甘草苷具有抗凋亡、抗炎、降糖、调脂等药理作用^[20]。甘草酸单铵盐具有良好的抗炎与抗肿瘤等药理作用^[21]。本研究中并未评价乌头桂枝汤在基础研究中的其他活性物质,所选评价指标不能全面优选提取工艺。

3.2 检测波长选择

芍药苷、桂皮醛、甘草苷、甘草酸单铵盐、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰乌头原碱的混合对照品溶液在200~800 nm范围内进行全波长扫描,

检测波长为各有效成分的最大吸收波长,可确保检测方法的正确性。

3.3 正交试验设计

正交试验利用“均匀分散”挑选在考察范围内的少量试验点,以及应用“整齐可比”更方便分析试验结果,找出最佳制备工艺。为了保证试验结果的“整齐可比”,需要较多的试验点。运用正交试验^[22-23]优化乌头桂枝汤提取工艺,考察浸泡时间、提取时间、加水量三因素三水平。在乌头桂枝汤的优化工艺中,需兼顾多个有效成分作为评价指标,具有复杂性和难度性。

3.4 信息熵赋权法

H_i 是不确定性和无序性的一种量度,熵权法以 H_i 为理论依据,对多种指标评价赋权,得出综合评分,可作为多指标数据评价的理论依据^[24]。在药物多个效应评价的试验中,将多个效应评价指标通过信息熵理论进行客观赋权,建立综合效应评价指标,综合效应评价指标可清晰反映药物剂量对多个效应评价指标的整体影响,避免各个效应评价指标的互相影响,提升了试验多评价指标数据处理的科学性和严谨性^[25]。

3.5 评价指标处理

中药汤剂成分复杂,有效成分较多,本研究中通过查阅文献和药典确定汤剂中多个有效成分为评价指标, W_i 是汤剂优选工艺多指标评价的关键。采用信息熵赋权法计算各指标含量的 W_i ,将多项评价指标转换成单一评价指标。但单纯使用客观赋权法也有一定局限性,可能会造成中药复方的主要成分权重过低或次要成分权重过高。故在实际操作中还应根据具体研究确定是否和主观赋权法联用。

参考文献

[1] 庞坦,李小锦,庄朋伟.白及与川乌配伍对大鼠卡拉胶模型血流速度和镇痛效果的影响[J].天津中医药大学学报,2018,37(1):49-52.
[2] 林路秀,郑凤英,黄桂珍,等.基于抗风湿关节炎相关微量元素生物可利用性优化制川乌和白芍配伍研究[J].中国中药杂志,2020,45(23):5770-5776.
[3] 郑世超,严小英,陈菊,等.基于蛋白互作网络分析法祛风湿药川乌的抗炎机制[J].中国中药杂志,2017,42(9):1747-1751.
[4] 王晓明,许良葵,罗佳波.麻黄-桂枝药对抗炎、镇痛作用研究[J].中药新药与临床药理,2020,31(2):179-184.
[5] 陈纪焯,周国锋,王永,等.桂枝汤桂枝-白芍不同比例配伍通过调节TGF- β_1 /Smads信号通路及慢性炎症改善盐敏感高血压大鼠心肌纤维化[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(1):50-58.
[6] 吴鹏,魏盼,李恋曲,等.桂枝汤通过抑制淋巴细胞向Th2细胞分化抑制变应性接触性皮炎[J].中国药理学通报,2019,35(10):1461-1466.
[7] 梅寒颖,刘炬,汤曾耀.基于TLR4/MyD88/NF- κ B信

号通路探讨白芍总苷抑制干燥综合征模型小鼠炎症的作用机制[J].中药新药与临床药理,2021,32(9):1293-1299.
[8] 张迪,马胜锁,孙建鑫,等.基于网络药理学探讨白芍镇痛机制[J].吉林中医药,2019,39(12):1654-1658.
[9] 姚玲玲,柯昌强,刘佳,等.不同炮制程度中药饮片蜜炙甘草的次生代谢化学成分组学研究[J].药学学报,2021,56(5):1444-1452.
[10] 周春言,董海成.自拟桂枝乌头汤联合艾拉莫德治疗类风湿关节炎50例疗效观察[J].四川中医,2018,36(10):160-163.
[11] 谢昊.针灸联合桂枝附子乌头汤治疗风寒湿痹型类风湿关节炎临床观察[J].光明中医,2019,34(7):1034-1036.
[12] 李森,王星星,康小东,等.基于信息熵理论的哮喘方水提取工艺优选研究[J].中草药,2016,47(12):2113-2117.
[13] 钱海燕,曹杨.多指标正交试验法优选清气解毒合剂浓煎剂提取工艺[J].中国药业,2021,30(17):42-45.
[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
[15] 王峰峰,宋兆辉,张兰兰,等.乌头碱、新乌头碱、次乌头碱水解和醇解产物的研究[J].中国中药杂志,2012,37(11):1564-1569.
[16] ZHOU CK, GAO J, JI HY, et al. Benzoylaconine modulates LPS-induced responses through inhibition of Toll-like receptor-mediated NF- κ B and MAPK signaling in RAW264.7 cells[J]. Inflammation, 2021,44(5):2018-2032.
[17] WU JJ, ZHU YF, GUO ZZ, et al. Aconitum alkaloids, the major components of Aconitum species, affect expression of multi-drug resistance-associated protein 2 and breast cancer resistance protein by activating the Nrf2-mediated signalling pathway[J]. Phytomedicine, 2017,44:87-97.
[18] 赵洪霄,李英,张金颖,等.芍药苷对糖尿病肾病模型大鼠肾脏的保护作用及作用机制[J].中国药业,2022,31(3):31-35.
[19] 赵景茹,董立朋,霍甜甜,等.桂皮醛对局灶性脑缺血小鼠血-脑脊液屏障的保护作用及抗炎作用[J].脑与神经疾病杂志,2019,27(10):602-606.
[20] 王海强,刘一宁,陆晓燕,等.甘草中抑制脂多糖诱导小鼠RAW264.7产生NO的活性成分研究[J].中草药,2016,47(23):4155-4159.
[21] 陈艳,温贤秀,周晨燕,等.甘草酸单铵盐调节急性早幼粒细胞白血病细胞NB4肿瘤干细胞特性、氧化应激及线粒体的功能[J].中国实验血液学杂志,2022,30(1):22-29.
[22] 袁强华,呼梅,谈静.化偏方标准汤剂制备工艺[J].中成药,2019,41(7):1672-1675.
[23] 徐玉玲,谭悦琪,彭艳,等.基于标准汤剂的川黄柏配方颗粒中间体工艺的优化[J].中成药,2019,41(2):424-427.
[24] 王星星,李森,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.
[25] 杨敬鸿,陈晓兰,杨晓梅,等.基于信息熵理论和方差分析比较猪牙皂不同组分对小鼠缺血缺氧及血脑屏障通透性影响[J].中药药理与临床,2018,34(6):83-86.

(收稿日期:2022-03-17;修回日期:2022-05-24)