

中图分类号: R932; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)11-0057-06  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.11.012



# Box - Behnken 响应面法结合信息熵法优化葛枳汤提取工艺\*

郑文丽<sup>1</sup>, 魏艳婷<sup>2</sup>, 李佳佳<sup>2</sup>, 赵玉斌<sup>3</sup>, 彭安堂<sup>4</sup>△

(1. 河北省石家庄市第二医院, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省石家庄市第四医院, 河北 石家庄 050011;  
3. 河北省石家庄市人民医院, 河北 石家庄 050011; 4. 河北省石家庄市中医院, 河北 石家庄 050051)

**摘要:**目的 优化葛枳汤的提取工艺。方法 在单因素试验基础上, 采用 Box - Behnken 响应面法设计试验, 以提取时间、提取次数、加水量为影响因素, 以芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素含量为评价指标, 采用信息熵法赋予权重系数, 计算综合评分, 通过响应面模型分析各影响因素间的交互作用, 得出最佳提取工艺, 并进行验证试验。结果 优化的提取工艺为饮片浸泡 0.5 h, 加 9 倍量水, 提取 3 次, 每次分别提取 90, 45, 45 min; 验证试验结果显示, 芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素含量及综合评分的 RSD 分别为 0.17%, 2.79%, 4.45%, 0.52%, 0.82% (n=3), 与预测值的差异不超过 1%。结论 优化的提取工艺稳定、可靠, 可为葛枳汤提取工艺的研究提供参考, 也可为其新剂型的研发提供理论依据。

**关键词:** Box - Behnken 响应面法; 葛枳汤; 提取工艺; 信息熵法; 综合评分

## Optimization of the Extraction Process of Gezhi Decoction by Response Surface Methodology and Information Entropy Method

ZHENG Wenli<sup>1</sup>, WEI Yanting<sup>2</sup>, LI Jijia<sup>2</sup>, ZHAO Yubin<sup>3</sup>, PENG Antang<sup>4</sup>

(1. The Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei, China 050051; 2. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei, China 050011; 3. Shijiazhuang People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei, China 050011; 4. The Traditional Chinese Medicine Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei, China 050051)

**Abstract: Objective** To optimize the extraction process of Gezhi Decoction. **Methods** On the basis of the single factor experiment, Box - Behnken response surface methodology was used to design the experiment with the extraction time, extraction times, and additional amount of water as the investigation factors, and with the content of rutin, iridin, quercetin and aurantio - obtusin as the evaluation indexes. The weight coefficient was determined by the information entropy method, and the comprehensive score was calculated. The interaction among the influencing factors was analyzed by the response surface model, the optimal extraction process

\*基金项目: 国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培养项目[国中医药人教函[2019]43号]。

第一作者: 郑文丽, 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为中药制剂的新技术与新方法, (电子信箱)852552322@qq.com。

△通信作者: 彭安堂, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药制剂, (电子信箱)578101668@qq.com。

取压力 1.4 MPa。该工艺稳定、可靠, 可为工业化大生产的 DSP 提取提供参考。

### 参考文献

- [1] 陈振兴, 王万军. 药用植物铁皮石斛的研究进展[J]. 生物学教学, 2020, 45(9): 2-3.
- [2] 李琴, 杨彦伶, 彭婵, 等. 药用石斛研究进展[J]. 农学报, 2018, 8(10): 61-64.
- [3] 贺雨馨, 曾宇馨, 祝天添, 等. 金钗石斛超微粉增强免疫力作用研究[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(3): 18-21.
- [4] 张珊珊, 童微, 胡捷伦, 等. 铁皮石斛多糖不同分级组对小鼠免疫调节及肠道健康的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(12): 14-21.
- [5] 陈新谦. 新编药理学(第16版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 380.
- [6] 陈蕤. 石斛多糖提取工艺的研究[J]. 实验研究, 2010, 7(12): 40-43.
- [7] 朱鹏锦, 杨伟林, 谭奕为, 等. 珍稀濒危药用植物石斛研究进展及保护策略[J]. 农业研究与应用, 2013(4): 51-55.
- [8] 廉博雯. 利用斑马鱼模型评价药物对心血管发育及神经行为的影响[D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [9] LIU W, YAN R, ZHANG L. Dendrobium Sonia polysaccharide regulates immunity and restores the dysbiosis of the gut microbiota of the cyclophosphamide - induced immunosuppressed mice[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2019, 17(8): 600-607.
- [10] 郑光耀, 薄采颖, 张景利. 亚临界水萃取技术在植物提取物领域的应用研究进展[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(5): 108-114.
- [11] 白雪, 赵梦娜, 岳小湘, 等. 亚临界水提取植物源生物活性物质的研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(4): 470-477.
- [12] 杨家琛, 张益萍. 亚临界水提取技术在物质提取方面的应用[J]. 化工时刊, 2019, 33(11): 33-37.
- [13] 戈廷茹, 吉顺莉, 张春燕, 等. 微波-亚临界水法提取红景天多糖[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(2): 45-47.
- [14] 杨静, 李爽, 钱芳, 等. 响应面法优选黄蜀葵花多糖的提取工艺[J]. 中国药房, 2013, 24(39): 3688-3690.
- [15] 陈龙, 孙志蓉, 张晓敏, 等. 三种石斛中微量元素测定及多糖提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2013, 27(4): 42-44.
- [16] 杨冰洁, 张雨, 赵婧, 等. 亚临界水萃取、改性多糖的研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(01): 492-499.
- [17] 邓丽娟, 洪霞, 钱滢文, 等. 亚临界水提取黑枸杞花青素工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(12): 14-19.
- [18] 郭妍婷, 黄雪, 吴梓敏, 等. 亚临界水提取生物活性物质的研究进展[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2016, 29(3): 65-71.

(收稿日期: 2022-07-05; 修回日期: 2023-01-20)

was obtained, and the validation test was carried out. **Results** The optimal extraction process was as follows: the decoction pieces were soaked for 0.5 h, added nine times the amount of water, extracted three times, and extracted for 90, 45, and 45 min each time. The validation test results showed that the *RSDs* of rutin, iridin, quercetin and aurantio - obtusin content and comprehensive score were 0.17%, 2.79%, 4.45%, 0.52%, and 0.82% ( $n = 3$ ), respectively, and the difference with the predicted value was not more than 1%. **Conclusion** The optimal extraction process is stable and reliable, which can provide a reference for the research of the extraction process of Gezhi Decoction and a theoretical basis for the development of its new dosage form.

**Key words:** Box - Behnken response surface methodology; Gezhi Decoction; extraction process; information entropy method; comprehensive score

葛积汤由葛花、桑椹、枳椇子、决明子等药味组方,具有解酒保肝、明目解毒功效<sup>[1-2]</sup>,临床应用效果良好,故对其提取工艺进行优化,为其新剂型的开发和利用提供理论依据。Box - Behnken 响应面法可连续分析试验的各个水平,减少试验次数,还可考察影响因素间的交互作用,所得结果直观、可靠<sup>[3]</sup>。本研究中对葛积汤的4种指标成分进行含量测定,在单因素试验基础上,运用 Box - Behnken 响应面法优化提取工艺,以信息熵法赋予权重系数,计算综合评分,优化响应面试验结果,并进行验证试验,得最佳提取工艺。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

LC - 20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),配有 SPD - 20A 型紫外检测器;98 - 1B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);YP2002 型电子天平(上海津平科学仪器有限公司,精度为 10 mg);TG328B 型分析天平(上海精科仪器厂,精度为万分之一);RE - 52 型旋转薄膜蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HCP - 100 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市金穗机械制造有限公司)。

### 1.2 试剂

桑椹、葛花、枳椇子、决明子等中药饮片均购自石家庄乐仁堂药店,均经河北中医学院侯芳洁副教授鉴定为正品;芦丁对照品(批号为 100080 - 200707,含量为 90.5%),槲皮素对照品(批号为 100081 - 201610,含量为 99.1%),橙黄决明素对照品(批号为 111900 - 201605,含量为 98.3%),均购自中国食品药品检定研究院;鸢尾苷对照品(成都普思生物科技有限公司,批号为 F1180581,含量为 98.0%);乙腈、甲醇均为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 水提液制备

按处方工艺称取葛积汤各组方中药饮片,加 8 倍量水,浸泡 0.5 h,补足吸水量,提取 2 h,滤过,滤渣加 8 倍量水,提取 1 h,滤过,合并滤液,即得。

### 2.2 高效液相色谱法测定指标成分含量

#### 2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Extend - C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min 时 5%A → 15%A, 10~17 min 时 15%A → 19%A, 17~27 min 时 19%A, 27~50 min 时 19%A → 40%A, 50~70 min 时 40%A → 50%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:245 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。理论板数以鸢尾苷峰计不低于 3 000,各色谱峰与相邻峰间的分离度均大于 1.5。

#### 2.2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取各对照品适量,精密称定,置 5 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素质量浓度分别为 0.160, 0.200, 0.192, 0.128 mg/mL 的单一对照品溶液,冷藏,备用。取上述单一对照品溶液各适量,加甲醇制成芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的质量浓度分别为 48, 80, 36, 1.95 μg/mL 的混合对照品溶液,冷藏,备用。

供试品溶液:取 2.1 项下水提液,离心,取上清液,旋转浓缩至每 1 mL 含 1 g 饮片量,取浓缩液 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,充分振荡使溶解,静置 5 min,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

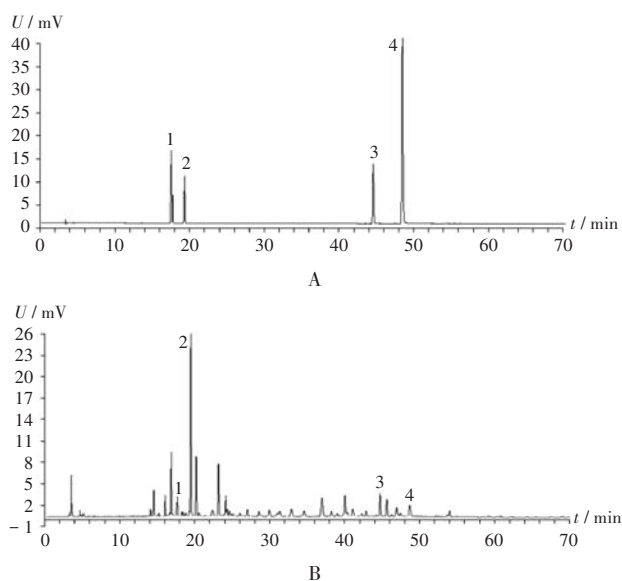
#### 2.2.3 方法学考察

专属性试验:取空白对照溶液(甲醇溶液)及 2.2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有对应色谱峰,表明方法专属性强。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密吸取 2.2.2 项下单一对照品溶液各适量,分别用甲醇稀释并定容,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以各成分的质量浓度( $X$ , μg/mL)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

检测限与定量限确定:取 2.2.2 项下单一对照品溶液各适量,用甲醇逐级稀释,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,分别以信噪比( $S/N$ )为 3:1 和 10:1 时的质量浓度为检测限和定量限。结果见表 1。

精密度试验:精密量取 2.2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素峰面积



1. 芦丁 2. 鸢尾苷 3. 槲皮素 4. 橙黄决明素

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Rutin 2. Iridoid 3. Quercetin 4. Aurantio-obtusin

A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察及检测限与定量限确定结果

Tab. 1 Results of the linear relation test, limit of detection and limit of quantification

成分	回归方程	$R^2$	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测限 ( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/mL}$ )
芦丁	$Y = 12\,670X + 8\,072.4$	0.9997	4.8~96.0	0.14	0.48
鸢尾苷	$Y = 39\,425X + 554\,653$	0.9994	20~160	0.06	0.20
槲皮素	$Y = 207\,033X - 442.59$	0.9996	1.824~7.296	0.05	0.18
橙黄决明素	$Y = 67\,092X + 8\,904.2$	0.9994	0.13~3.84	0.02	0.07

的RSD分别为1.68%, 1.98%, 1.96%, 0.95% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

重复性试验:取2.1项下水提液适量,按2.2.2项下方法制备供试品溶液6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素峰面积的RSD分别为1.91%, 1.76%, 1.65%, 1.94% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,分别于2, 6, 10, 12, 24 h时按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素峰面积的RSD分别为1.28%, 1.87%, 1.31%, 0.96% ( $n = 5$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:精密量取2.1项下已知含量的水提液1 mL,平行6份,分别按芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素含量的1:1加入对照品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按线性回归方程分别计算各成分的含量,并计算加

样回收率。结果芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的平均加样回收率分别为99.88%, 99.99%, 99.93%, 100.38%, RSD分别为0.29%, 0.10%, 0.48%, 0.95% ( $n = 6$ ),表明方法准确度良好。

### 2.3 提取工艺单因素考察

粉碎粒度:按处方工艺称取各中药饮片3份,进行饮片、粗粉、细粉3种粉碎粒度处理,分别加入8倍量水,浸泡0.5 h,提取2次,提取3 h,即得水提液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液。根据指标成分芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的峰面积,通过信息熵权重<sup>[4]</sup>确定合理粉碎粒度。结果综合评分随饮片粉碎粒度减小而降低,粉碎粒度为饮片时综合评分最高,故选择粉碎粒度为原药材饮片。详见图2 A。

浸泡时间:按处方工艺称取各中药饮片5份,将饮片分别浸泡0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 h,分别加入8倍量水,提取2次,提取3 h,即得水提液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液。根据指标成分芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的峰面积,通过信息熵权重确定合理浸泡时间。结果综合评分随浸泡时间的延长先上升后下降,饮片浸泡0.5 h时的综合评分最高,故选择浸泡时间为0.5 h。详见图2 B。

加水量:按处方工艺称取各中药饮片5份,固定饮片浸泡0.5 h,分别加入6, 8, 10, 12, 14倍量水,提取2次,提取3 h,即得水提液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液。根据指标成分芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的峰面积,通过信息熵权重确定合理加水量。结果综合评分随加水量的增加先上升后下降,加8倍量水时的综合评分最高,故选择加8倍量水。详见图2 C。

提取时间:按处方工艺称取各中药饮片5份,固定饮片浸泡0.5 h,加8倍量水,分别提取1, 2, 3, 4, 5 h,提取2次,即得水提液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液。根据指标成分芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的峰面积,通过信息熵权重确定合理提取时间。结果综合评分随提取时间的延长呈上升-平缓-下降趋势,提取时间为3, 4 h时的综合评分最高,考虑到实际生产,故选择提取3 h。详见图2 D。

提取次数:按处方工艺称取各中药饮片3份,固定饮片浸泡0.5 h,加8倍量水,分别提取1次、2次、3次,提取3 h,即得水提液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液。根据指标成分芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的峰面积,通过信息熵权重确定合理提取次数。结果综合评分随提取次数的增加先上升后平缓,提取2次时的综合评分最高,故选择提取2次。详见图2 E。

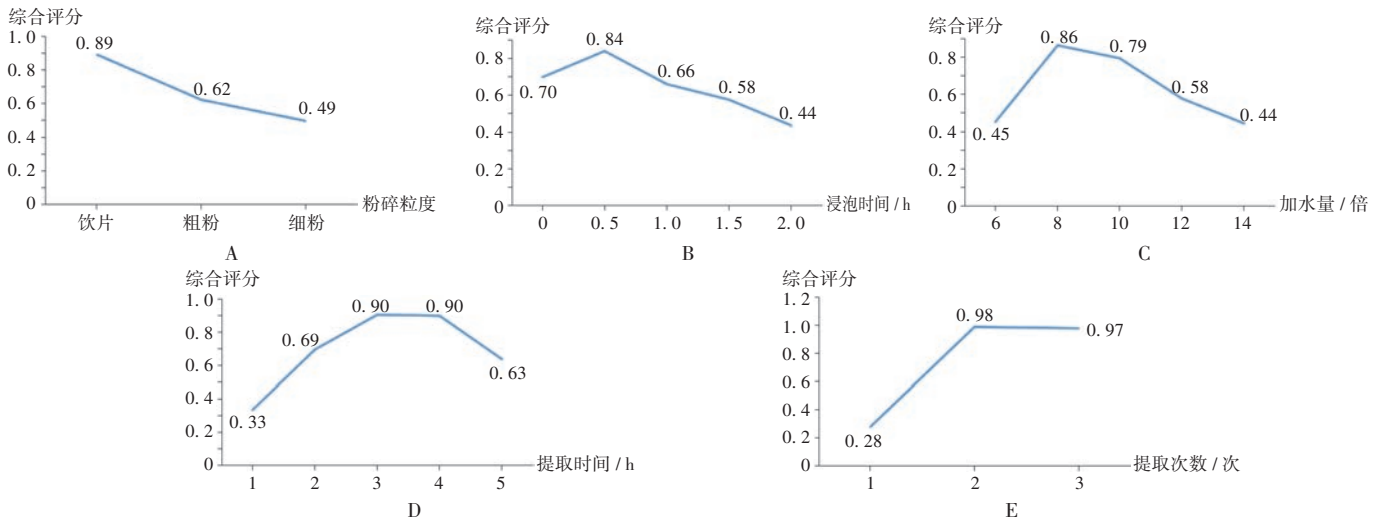


图2 单因素试验考察结果

A. Crushing particle size B. Soaking time C. Water addition amount D. Extraction time E. Extraction times

Fig. 2 Results of the single factor test

## 2.4 响应面法优化提取工艺

### 2.4.1 试验设计与结果

为提高试验结果的严谨性与科学性,更客观、准确地了解各成分在不同提取条件下的变化规律,减少主观因素对试验结果的干扰,在单因素试验基础上,采用 Design - Expert. V8. 0. 6. 1 软件,选取提取时间(因素 A)、提取次数(因素 B)和加水量(因素 C)3 个重要影响因素为变量,以芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素的含量为评价指标,运用 Box - Behnken 模型设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面分析试验<sup>[5]</sup>,其中 12 个析因试验、5 个中心试验。Box - Behnken 试验因素与水平见表 2,试验设计与结果见表 3。

表2 Box - Behnken 试验因素与水平

Tab. 2 Factors and levels of the Box - Behnken test

水平	因素 A(h)	因素 B(次)	因素 C(倍)
- 1	2. 5	1	7
0	3. 0	2	8
1	3. 5	3	9

### 2.4.2 信息熵法确定各指标权重系数及综合评分<sup>[6]</sup>

根据公式(1)对表 3 中 4 个指标成分的含量的数据进行处理,建立原始评价指标矩阵  $(X_{ij})_{mn}$  和概率矩阵  $(P_{ij})_{mn}$ 。根据公式(2)计算各指标成分的  $H_i$ , 结果  $H_i = [0. 985 8, 0. 969 8, 0. 978 5, 0. 962 8]$ ; 根据公式(3)计

表3 Box - Behnken 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the Box - Behnken test

序号	因素			含量(μg)				综合评分
	A(h)	B(次)	C(倍)	芦丁	鸢尾苷	槲皮素	橙黄决明素	
1	0	- 1	1	0. 139 6	0. 241 8	0. 018 8	0. 004 8	0. 233 8
2	- 1	0	1	0. 607 0	1. 005 4	0. 047 8	0. 019 4	0. 867 7
3	0	0	0	0. 343 6	0. 431 4	0. 025 4	0. 007 3	0. 387 5
4	1	0	1	0. 559 1	0. 846 6	0. 063 7	0. 015 5	0. 803 3
5	0	0	0	0. 445 3	0. 528 1	0. 034 0	0. 013 6	0. 564 4
6	0	0	0	0. 413 5	0. 394 0	0. 030 8	0. 008 4	0. 425 6
7	0	0	0	0. 417 3	0. 397 8	0. 040 1	0. 007 9	0. 450 5
8	1	0	- 1	0. 495 8	0. 523 2	0. 053 9	0. 011 2	0. 597 9
9	- 1	- 1	0	0. 557 6	0. 384 1	0. 022 3	0. 007 0	0. 399 7
10	1	- 1	0	0. 411 8	0. 329 3	0. 023 2	0. 005 4	0. 334 4
11	0	1	1	0. 717 6	1. 050 1	0. 058 1	0. 022 3	0. 981 9
12	- 1	1	0	0. 538 3	0. 648 2	0. 038 4	0. 015 8	0. 664 8
13	0	0	0	0. 433 1	0. 465 3	0. 036 4	0. 015 4	0. 581 0
14	0	- 1	- 1	0. 369 7	0. 234 4	0. 025 4	0. 004 3	0. 288 9
15	0	1	- 1	0. 557 1	0. 649 2	0. 041 3	0. 013 7	0. 645 4
16	- 1	0	- 1	0. 551 0	0. 606 0	0. 036 8	0. 012 9	0. 603 1
17	1	1	0	0. 597 1	0. 659 1	0. 059 2	0. 020 2	0. 818 4

算各指标成分的权重系数  $W_i$ , 结果  $W_i = [0. 137 7, 0. 292 9, 0. 208 6, 0. 360 8]$ 。根据公式  $M = (\text{芦丁含量} / \text{芦丁含量}_{\max}) \times W_1 + (\text{鸢尾苷含量} / \text{鸢尾苷含量}_{\max}) \times$

$$X = \begin{bmatrix} 0.1396 & 0.6070 & 0.3436 & 0.5591 & 0.4453 & 0.4135 & 0.4173 & 0.4958 & 0.5576 & 0.4118 & 0.7176 & 0.5383 & 0.4331 & 0.3697 & 0.5571 & 0.5510 & 0.5971 \\ 0.2418 & 1.0054 & 0.4314 & 0.8466 & 0.5281 & 0.3940 & 0.3978 & 0.5232 & 0.3841 & 0.3293 & 1.0501 & 0.6482 & 0.4653 & 0.2344 & 0.6492 & 0.6060 & 0.6591 \\ 0.0188 & 0.0478 & 0.0254 & 0.0637 & 0.0340 & 0.0308 & 0.0401 & 0.0539 & 0.0223 & 0.0232 & 0.0581 & 0.0384 & 0.0364 & 0.0254 & 0.0413 & 0.0368 & 0.0592 \\ 0.0048 & 0.0194 & 0.0073 & 0.0155 & 0.0136 & 0.0084 & 0.0079 & 0.0112 & 0.0070 & 0.0054 & 0.0223 & 0.0158 & 0.0154 & 0.0043 & 0.0137 & 0.0129 & 0.0202 \end{bmatrix}$$

$$P = \begin{bmatrix} 0.0171 & 0.0744 & 0.0421 & 0.0686 & 0.0546 & 0.0507 & 0.0512 & 0.0608 & 0.0684 & 0.0505 & 0.0880 & 0.0660 & 0.0531 & 0.0453 & 0.0683 & 0.0676 & 0.0732 \\ 0.0257 & 0.1070 & 0.0459 & 0.0901 & 0.0562 & 0.0419 & 0.0423 & 0.0557 & 0.0409 & 0.0351 & 0.1118 & 0.0690 & 0.0495 & 0.0250 & 0.0691 & 0.0645 & 0.0702 \\ 0.0287 & 0.0729 & 0.0388 & 0.0971 & 0.0519 & 0.0469 & 0.0612 & 0.0822 & 0.0340 & 0.0353 & 0.0887 & 0.0586 & 0.0555 & 0.0388 & 0.0630 & 0.0561 & 0.0903 \\ 0.0235 & 0.0948 & 0.0355 & 0.0758 & 0.0664 & 0.0409 & 0.0386 & 0.0544 & 0.0340 & 0.0265 & 0.1088 & 0.0769 & 0.0751 & 0.0209 & 0.0670 & 0.0627 & 0.0983 \end{bmatrix}$$

$W_2 + (\text{槲皮素含量} / \text{槲皮素含量}_{\max}) \times W_3 + (\text{橙黄决明素含量} / \text{橙黄决明素含量}_{\max}) \times W_4$  计算综合评分, 结果见表3。

$$P_{ij} = X_{ij} / \left( \sum_{j=1}^n X_{ij} \right) \quad (1)$$

$$H_i = (-1 / \ln N) \sum_{i=1}^n (P_{ij} \times \ln P_{ij}) \quad (2)$$

$$W_i = (1 - H_i) / \sum_{i=1}^m (1 - H_i) \quad (3)$$

### 2.4.3 模型建立与方差分析

经 Design - Expert. V8.0.6.1 软件对表3中的综合评分进行多元拟合分析, 得  $Y$  对提取时间(A)、提取次数(B)、加水量(C)3个变量的二次多元回归模型  $Y = 12.124 - 3.014A - 0.664B - 1.768C + 0.109AB - 0.030AC + 0.098BC + 0.506A^2 - 0.054B^2 + 0.110C^2$ 。由表4可知, 建立的回归方程模型  $F = 10.01, P = 0.0031 < 0.05$ , 表明此拟合模型差异有统计学意义; 失拟项  $P = 0.4624 > 0.05$ , 差异不显著, 表明未知因素对结果干扰较小、试验误差小。故可判断所建立的回归模型具有参考性, 可用于葛枳汤提取工艺的理论预测<sup>[7]</sup>。由  $F$  值可知, 在各因素水平范围内, 对成分提取的影响程度由大至小排序依次为  $B > C > A$ , 即提取次数 > 加水量 > 提取时间, 其中提取次数和加水量有显著影响 ( $P < 0.05$ )。  $R^2 = 0.9279, R^2_{\text{adj}} = 0.8352$ , 表明该模型可解释 83.52% 响应值的变化。

### 2.4.4 响应面分析及优化

采用 Design - Expert. V8.0.6.1 软件对表3中的试验结果作图, 固定某一因素, 可得任意2个因素交互作

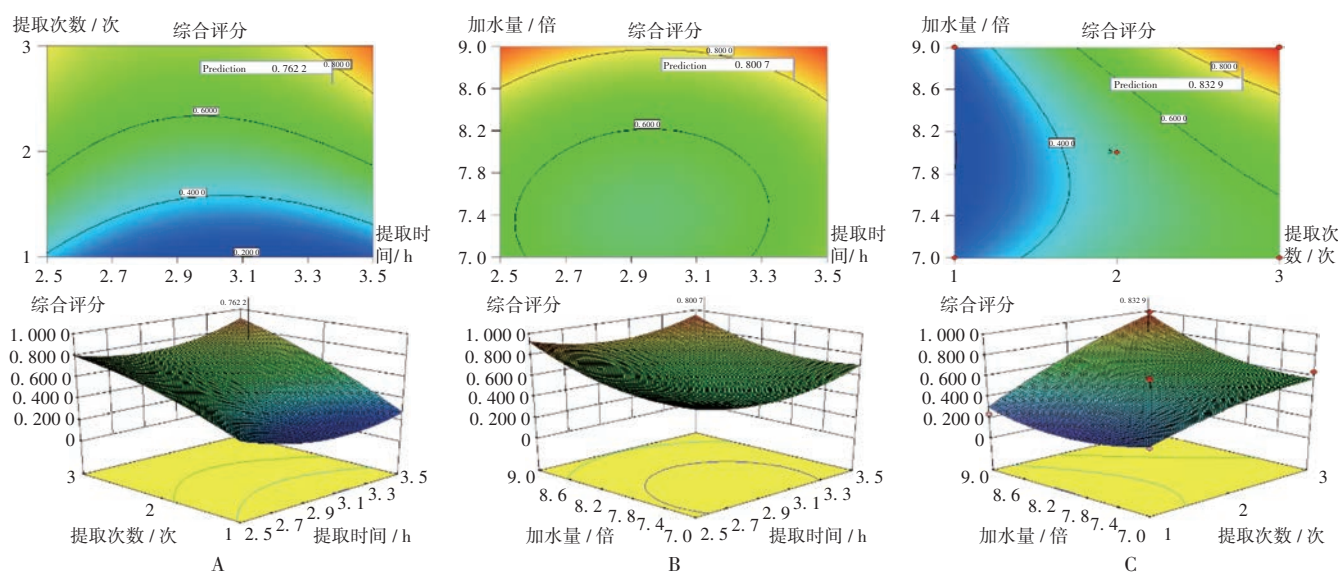
表4 方差分析结果

Tab. 4 Results of the analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.680	9	0.076	10.01	0.0031	显著
A	$4.347 \times 10^{-5}$	1	$4.347 \times 10^{-5}$	$5.734 \times 10^{-3}$	0.9418	
B	0.430	1	0.430	56.65	0.0001	
C	0.071	1	0.071	9.31	0.0186	
AB	0.012	1	0.012	1.58	0.2491	
AC	$8.779 \times 10^{-4}$	1	$8.779 \times 10^{-4}$	0.12	0.7436	
BC	0.038	1	0.038	5.06	0.0593	
A <sup>2</sup>	0.067	1	0.067	8.89	0.0205	
B <sup>2</sup>	0.012	1	0.012	1.62	0.2441	
C <sup>2</sup>	0.051	1	0.051	6.68	0.0362	
残差	0.053	7	$7.581 \times 10^{-3}$			
失拟项	0.023	3	$7.791 \times 10^{-3}$	1.05	0.4624	不显著
纯误差	0.030	4	$7.424 \times 10^{-3}$			
总误差	0.740	16				

用对综合评分影响的二维等高线图和三维响应面图<sup>[8]</sup>, 详见图3。可见, 因素 AB 和 BC 间的交互作用对综合评分影响较强, 因素 AC 间交互作用影响较弱, 交互项影响强弱顺序为  $BC > AB > AC$ ; 提取次数(B)对综合评分的影响最显著, 加水量(C)对综合评分的影响较弱, 提取时间(A)对综合评分的影响所对应的曲面坡度为非线性, 表明其对综合评分的影响不显著, 与表4回归方程模型的显著性检验结果一致。

通过 Design - Expert. V8.0.6.1 软件分析得葛枳汤最优提取工艺为加9倍量水, 提取3次, 每次分别提取 90, 45, 45 min。此优化提取工艺的综合评分为 0.9819。



A. 提取次数与提取时间 B. 加水量与提取时间 C. 加水量与提取次数  
图3 各影响因素交互作用对综合评分影响的二维等高线和三维响应面图

A. Extraction times and extraction time B. Water addition amount and extraction time C. Water addition amount and extraction times

Fig. 3 The 2D contour map and 3D response surface map of the interaction of various influencing factors on the comprehensive scores

### 2.4.5 验证试验

按2.4.4项下优化得到的提取工艺进行3次验证试验,结果芦丁、鸢尾苷、槲皮素、橙黄决明素含量和综合评分的RSD分别为0.17%,2.79%,4.45%,0.52%,0.82%( $n=3$ ),与预测值的差异不超过1%,表明所建立的模型预测性良好。故基于响应面法结合信息熵理论优化的提取工艺稳定可行,具有一定的实际应用价值。详见表5。

表5 验证试验结果

Tab. 5 Results of the verification test

序号	含量( $\mu\text{g}$ )				综合评分
	芦丁	鸢尾苷	槲皮素	橙黄决明素	
1	0.7157	1.0357	0.0621	0.0220	0.9845
2	0.7137	0.9928	0.0577	0.0222	0.9714
3	0.7160	1.0470	0.0574	0.0220	0.9861
$\bar{x}$	0.7151	1.0252	0.0591	0.0221	0.9807

## 3 讨论

### 3.1 指标成分选择

葛枳汤化学成分复杂,单一成分作为含量测定指标不能很好地反映中药复方的特点,且单一成分的含量在饮片和制剂中不一定相同,制剂中各成分可能相互影响,故选择多成分作为含量测定指标评价葛枳汤的提取工艺具有一定科学性。

本研究中依据中药处方的君臣佐使理论,选取主要有效成分进行含量测定,并通过信息熵法赋予各指标成分权重系数,得到综合评分,所优选的工艺参数稳定、可靠。现代药理学研究表明,鸢尾苷作为君药葛花的主要有效成分,对酒精代谢障碍及肝功能有改善作用,对酒精引起的脏器障碍及消化道功能障碍也有一定改善作用<sup>[9]</sup>;槲皮素为臣药枳椇子的主要有效成分,对肝细胞的保护作用明显,可减轻乙醇对肝组织的损伤<sup>[10]</sup>;芦丁和橙黄决明素为佐使药桑椹和决明子的主要有效成分,具有抗氧化、调血脂、保肝明目、降血糖等药理作用<sup>[11-12]</sup>。故选取葛枳汤中鸢尾苷、槲皮素、芦丁、橙黄决明素为指标成分对提取工艺进行优化,既可兼顾指标间的协同作用,又符合中医用药的整体观念。

### 3.2 检测波长选择

对葛枳汤中的4个指标成分进行紫外光谱扫描,发现橙黄决明素、芦丁、鸢尾苷、槲皮素分别在285,210,265,245 nm波长处有最大紫外吸收。经试验发现,于245 nm波长处被测成分均能出峰,且芦丁、橙黄决明素检测灵敏度好,色谱峰峰形较好,各色谱峰分离度适中。为使各组分在同一波长下都能有较好吸收,达到吸收强、干扰小的目的,最终选择245 nm作为检测波长。

### 3.3 试验方法选择

本研究中首先进行单因素试验考察,确定对结果产生主要影响的因素及水平,为响应面试验设计提供参考;响应面试验设计充分考虑各因素的交互作用,所得结果具有一定客观性,且预测值与真实值较接近,可信度较好,试验精确度较高<sup>[13]</sup>。信息熵理论能科学地赋予各指标权重系数,避免主观因素对结果的干扰。验证试验可证实优选的提取工艺是否稳定、可行。故本研究中选择在单因素试验的基础上,应用Box-Behnken响应面法结合信息熵法优选提取工艺,并对优选的提取工艺进行验证试验,最终得到最佳提取工艺为饮片浸泡0.5 h,加9倍量水,提取3次,每次分别提取90,45,45 min。

### 参考文献

- [1] 胡晓阳,赵启腾,朴圣爱. 葛花解酲汤及其拆方组对急性酒精中毒小鼠保护作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2020,22(1):18-21.
- [2] 张明昊,赵珍珍,潘晓丽. 葛花解酲汤对小鼠醉酒模型解酒护肝作用研究[J]. 中医药导报,2018,24(5):42-44.
- [3] 文 冉,吕青涛,李 娜,等. 基于综合加权评分-Box-Behnken响应面法优化半枝莲的提取工艺[J]. 中药材,2020,43(5):1181-1185.
- [4] 谢 凡,施崇精,杨秀清,等. 基于信息熵理论的正交设计结合指纹图谱优选加味四妙颗粒的提取工艺[J]. 中草药,2018,49(6):1331-1337.
- [5] 王 萍,王宇鹤,辛爱洁,等. Box-Behnken响应面法优化粉葛配方颗粒提取工艺[J]. 中成药,2017,39(6):1293-1296.
- [6] 顿佳颖,郑 鹏,李佳佳,等. 响应面法结合信息熵理论优化桃核承气汤水提取工艺[J]. 中国药房,2019,30(16):2210-2215.
- [7] 忻晓东,张秀芳,王舒琪,等. 艾叶挥发油提取工艺研究[J]. 中药材,2020,43(1):150-154.
- [8] 王玲娇,郝玉佩,刘坤申,等. Box-Behnken响应面法结合多指标综合评分法优选柴胡安心胶囊的水提工艺[J]. 中国药房,2019,30(5):632-637.
- [9] 裴香萍,王 瑶,杨文珍,等. 葛花的化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 山西中医,2018,34(3):57-60.
- [10] 马 纳,李亚静,范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(8):221-224.
- [11] 王 娜,范作卿,朱 琳,等. 桑椹的化学成分及应用研究进展[J]. 现代农业科技,2017(9):261-263.
- [12] 杨 冰,任 娟,秦昆明,等. 决明子药理作用及其机制研究进展[J]. 中药材,2018,41(5):1247-1251.
- [13] 陈 洁,戴衍朋,孙立立,等. Box-Behnken设计-效应面法优选甘草切制工艺[J]. 中草药,2013,44(12):1579-1583.

(收稿日期:2022-07-13;修回日期:2022-12-25)