

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250711002

层次分析法-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化加味桔梗汤水提醇沉工艺

王君怡¹, 郑敏^{1,2}, 何国华², 程雪梅¹, 王长虹¹

1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室(上海 201203);
2. 嘉兴复道致德医疗科技有限公司(浙江 平湖 314200)

【摘要】 目的 建立加味桔梗汤多成分的超高效液相色谱(UPLC)含量测定方法, 并应用 Box-Behnken 响应面法对其水提醇沉工艺进行优化。方法 采用 UPLC 串联蒸发光散射检测器(UPLC-ELSD)法测定桔梗皂苷 D 的质量分数, UPLC 串联紫外检测器(UPLC-UV)法测定没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的含量; 基于层次分析法(AHP)-熵权法确定各指标的权重系数; 在单因素考察的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法考察浸泡时间、煎煮时间对水提工艺的影响, 并考察乙醇体积分数、醇沉时间、药液密度对醇沉工艺的影响。结果 建立了加味桔梗汤多成分的 UPLC 含量测定方法, 并优选出其最佳水提工艺为不浸泡、加水 12 倍、煎煮 65 min、煎煮 2 次, 最佳醇沉工艺为乙醇体积分数 80%、醇沉 48 h、药液浓度 1.65 g·mL⁻¹。结论 建立的含量测定方法准确可靠, 筛选得到的工艺参数稳定, 可为加味桔梗汤的后续研究开发提供依据。

【关键词】 急性咽炎; 加味桔梗汤; 水提醇沉工艺优化; 含量测定; 中药研究

Optimization of water extraction and ethanol precipitation process for modified Jiegeng Decoction by combination of AHP-entropy weight method and Box-Behnken design-response surface method

WANG Junyi¹, ZHENG Min^{1,2}, HE Guohua², CHENG Xuemei¹, WANG Changhong¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines/Shanghai Key Laboratory of Compound Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Jiaxing Fudao Zhide Medical Technology Co., LTD, Pinghu, Zhejiang 314200, China

Abstract: Objective To establish a validated ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous quantification of multiple components in modified Jiegeng Decoction and to optimize its water extraction and ethanol precipitation processes using the Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM). **Methods** Platycodin D was determined by UPLC coupled with evaporative light scattering detection (UPLC-ELSD), while gallic acid, chlorogenic acid, corilagin, hesperidin, and rosmarinic acid were quantified via UPLC with ultraviolet detection (UPLC-UV). Weight coefficients for each evaluation index were calculated using the analytic hierarchy process (AHP)-entropy weight method. Based on the results of single-factor experiments, BBD-RSM was employed to investigate the effects of soaking time and decoction time on the water extraction process, as well as the impacts of ethanol concentration, precipitation time, and extract density on the ethanol precipitation process. **Results** A UPLC method for

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅新疆丝绸之路经济带创新驱动发展试验区、乌昌石国家自主创新示范区科技发展计划(新疆特色药材资源可持续利用与品质评价关键技术研究)项目(2024LQ03007); 嘉兴复道致德医疗科技有限公司委托项目(2023310031004645)

[作者简介] 王君怡, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础与体内过程研究

[通信作者] 王长虹, 研究员, 博士研究生导师; E-mail: wchcxm@163.com

the simultaneous determination of multiple components in modified Jiegeng Decoction was successfully established and validated. The optimized water extraction conditions were confirmed as follows: no soaking, 12-fold volume of water relative to the raw material, and two rounds of decoction (65 minutes per round). For ethanol precipitation, the optimal parameters were determined to be 80% (V/V) ethanol concentration, 48 hours of precipitation, and an extract density of $1.65 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. **Conclusions** The established UPLC method exhibits high accuracy and reliability, and the optimized extraction-precipitation parameters demonstrate good stability. This study provides a solid technical foundation for subsequent pharmacological research and large-scale industrial production of Modified Jiegeng Decoction.

Keywords: acute pharyngitis; modified Jiegeng Decoction; optimization of water extraction and ethanol precipitation processes; content determination; Chinese materia medica research

急性咽炎(acute pharyngitis, AP)是发生于咽部黏膜及黏膜下组织的急性炎症,具有起病急、发展迅速的特点,临床表现为咽痛、咽干和咳嗽,可伴有发热、乏力、头痛及四肢酸痛等症状^[1]。AP久治不愈,可发展为慢性咽炎^[2]。中医学将急性咽炎归属于“急喉痹”范畴,认为其多因风热邪毒侵袭咽喉,内伤于肺,致咽喉肿塞而痹痛;或邪热壅盛,由肺卫传里,热邪循经灼伤咽喉,治则以疏风清热、宣肺利咽及解毒润喉为主^[3]。现代医学认为,AP多因病毒感染引起,非病毒性病因的比例为15%左右,临床常以糖皮质激素、抗病毒药物、抗生素等进行治疗,易出现不良反应及抗生素滥用现象^[4]。中医药因其不良反应少、治疗效果好等特点,获得了越来越多的认可,利用中医药防治AP具有积极意义。

加味桔梗汤(JJD)由上海中医药大学都广礼教授组方,该方以仲景桔梗汤方为基础,加入紫苏子、陈皮、薄荷、金银花、余甘子、青果6味中药。诸药配伍寒温并用、宣降结合、标本兼顾,既以金银花、薄荷清解上焦郁热,又以紫苏子、陈皮调理肺脾气机,佐余甘子、青果润燥护阴,共奏清热解毒、宣肺化痰、生津利咽之效。课题组前期已完成对JJD的体内外药效学研究,证实JJD对急性咽炎具有一定的治疗作用。本研究以出膏率及桔梗皂苷D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的质量分数为评价指标,采用层次分析法(AHP)-熵权法结合Box-Behnken响应面法对加味桔梗汤的工艺进行优化,以期为其后续制剂的研究开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 甘草(批号:240115)、紫苏子(批号:230801)、陈皮(批号:230727)、薄荷(批号:230317)、金银花(批号:230707),上海康桥中药饮片有限公司;桔梗(批号:240903),上海万仕诚国药制品有限公司;余甘子(批号:230901),安徽惠丰国药

有限公司;青果(批号:220201),亳州市京皖中药饮片厂。上述药材均由上海中医药大学王长虹研究员鉴定。

桔梗皂苷D对照品(批号:DST230414-015)、没食子酸对照品(批号:DST240122-008)、绿原酸对照品(批号:DSTD002103)、橙皮苷对照品(批号:DSTDC003803)、迷迭香酸对照品(批号:DST202201001),成都乐美天医药科技有限公司;柯里拉京对照品(批号:N2404027215),四川恒诚致远生物科技有限公司;分析级正丁醇(批号:20180803)、分析级氨水(批号:20210528)、分析级无水乙醇(批号:20250225),国药集团化学试剂有限公司;色谱级甲醇、色谱级乙腈、色谱级甲酸,美国Thermo Fisher Scientific公司;水为自制超纯水。

1.2 主要仪器 超高效液相色谱(UPLC)仪(型号:Waters H-Class),美国Waters公司;超高效液相色谱仪(型号:Agilent 1290,配有蒸发光散射检测器),美国Agilent公司;万分之一电子天平(型号:BP211D),德国Sartorius公司;纯水仪(型号:Milli-Q),德国Merck Millipore公司;涡旋振荡器(型号:VX-200),美国Labnet International公司;台式离心机(型号:CT15RE),日本Hitachi公司。

2 方法与结果

2.1 UPLC法含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取桔梗皂苷D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸对照品适量,精密称定,置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成浓度分别为 $0.367 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.368 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.871 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.872 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.195 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.857 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.2 JJD水提液的制备 称取JJD相应药材,加入10倍量的水,浸泡1 h后,加热煎煮2次,每次2 h,滤过,合并两次滤液。将水提液分批定容、重新混匀,得到1 250 mL JJD水提液,备用。

2.1.3 桔梗皂苷 D 供试品溶液的制备 取“2.1.2”项下 JJD 水提液 50 mL,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 20 mL,合并正丁醇溶液,用氨试液 50 mL 洗涤 1 次,弃去氨液,再用正丁醇饱和的水 50 mL 洗涤 1 次,弃去水液,正丁醇溶液回收溶剂至干,残渣加甲醇适量使溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。同法制备阴性及桔梗单味药供试品溶液。

2.1.4 没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸供试品溶液的制备 取“2.1.2”项下 JJD 水提液适量,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜,即得供试品溶液。同法制备阴性及桔梗、甘草、紫苏子、薄荷、金银花、陈皮、余甘子、青果供试品溶液。

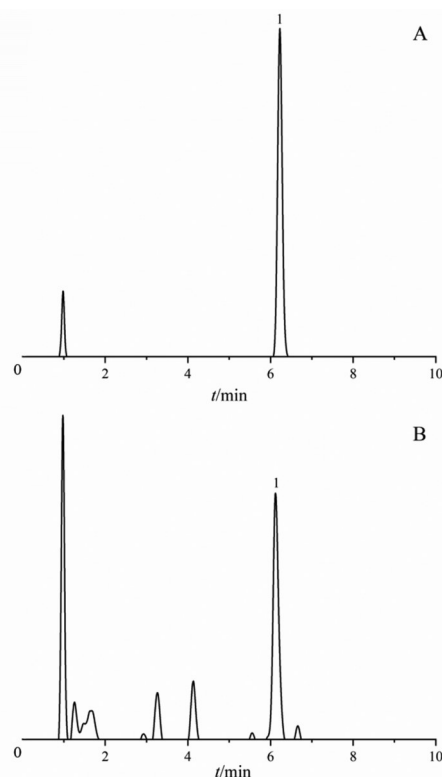
2.1.5 桔梗皂苷 D 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈:水(28:72);蒸发光散射检测器:雾化器温度 30 $^{\circ}\text{C}$,漂移管温度 30 $^{\circ}\text{C}$,气体流量 1.6 标准升每分钟(SLM),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL 。

2.1.6 没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸色谱条件 色谱柱同上,流动相为 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B),流速 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 273 nm,进样量 1 μL ,梯度洗脱(0~3 min, 95% A; 3~7 min, 95%~69% A; 7~17 min, 69%~54% A)。

2.1.7 专属性考察 按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法分别制备 JJD、阴性及桔梗、甘草、紫苏子、薄荷、金银花、陈皮、余甘子、青果供试品溶液,按相应色谱条件进样。结果显示,各成分色谱峰在保留时间内有检出,阴性样品溶液对测试结果无干扰,表明方法专属性良好,结果分别见图 1、图 2。

2.1.8 线性考察 取各成分对照品贮备液,加甲醇分别稀释为不同浓度的对照品溶液,按“2.1.5”和“2.1.6”项下色谱条件进样。桔梗皂苷 D 以样品浓度对数为横坐标(x),峰面积对数为纵坐标(y);其余成分以样品浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,计算回归方程。结果显示,各成分在相应浓度范围内线性关系良好。具体结果见表 1。

2.1.9 精密度考察 取各成分对照品溶液,按“2.1.5”和“2.1.6”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图及样品特征峰峰面积,计算 RSD 。结果显示,桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的 RSD 分别为 1.86%、0.14%、0.13%、0.40%、0.82% 和 0.63%,表明仪器日间精密度良好。



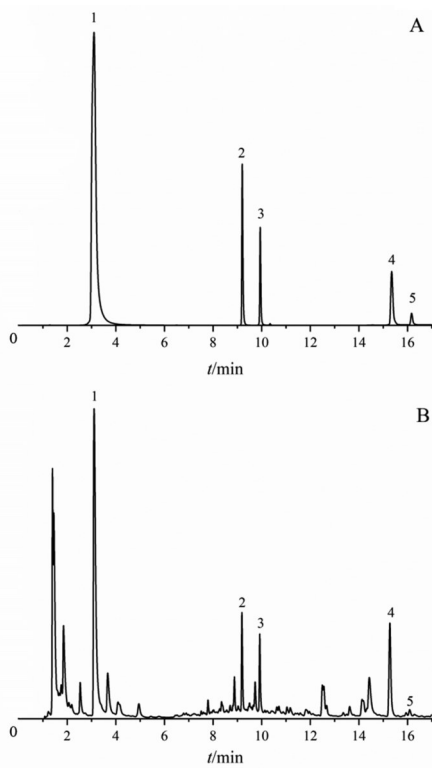
注:1为桔梗皂苷D。

图1 桔梗皂苷D对照品(A)和加味桔梗汤(JJD)样品(B)的超高效液相色谱(UPLC)图谱

连续 3 d 测试,记录色谱图及样品特征峰峰面积,计算 RSD 。结果显示,桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的 RSD 分别为 2.49%、1.78%、1.61%、1.46%、1.04% 和 1.64%,表明仪器日间精密度良好。

2.1.10 稳定性考察 取同一 JJD 供试品溶液,室温下分别于 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h 进样,按“2.1.5”和“2.1.6”项下色谱条件检测记录色谱图及样品特征峰峰面积,计算 RSD 。结果显示,桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的 RSD 分别为 1.19%、0.30%、0.62%、0.63%、0.90% 和 1.43%,检测表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.11 重复性考察 取同一批 JJD 水提液,按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法分别制备成供试品溶液,平行 6 份,按“2.1.5”和“2.1.6”项下色谱条件进样检测,记录色谱图及样品特征峰峰面积,根据含量计算 RSD 。结果显示,桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的平均含量分别为 0.521 9 μg 、0.284 8 μg 、0.160 8 μg 、0.061 4 μg 、0.116 2 μg 和 0.012 3 μg , RSD 分别为 2.26%、0.95%、0.65%、1.18%、0.69% 和 1.36%,表明方法重复性良好。



注:1为没食子酸,2为绿原酸,3为柯里拉京,4为橙皮苷,5为迷迭香酸。

图2 混合对照品(A)和加味桔梗汤(JJD)样品(B)的超高效液相色谱(UPLC)图

表1 6种成分线性回归方程

成分	回归方程	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)	r
桔梗皂苷D	y=2.089 6x+8.936 3	0.073~0.245	0.999 6
没食子酸	y=70 848x+318.76	0.027~0.410	0.999 8
绿原酸	y=28 745x-48.639	0.017~0.261	0.999 8
柯里拉京	y=53 703x-247.03	0.009~0.087	0.999 7
橙皮苷	y=40 796x+139.78	0.012~0.146	0.999 4
迷迭香酸	y=76 047x-23.795	0.002~0.034	0.999 8

2.1.12 加样回收率考察 精密量取已知含量的JJD水提液,按理论含量的50%、100%、150%精密加入各对照品溶液,平行3份,按“2.1.3”和“2.1.4”项下方法分别制备成供试品溶液,按“2.1.5”和“2.1.6”项下色谱条件进样检测,计算回收率及RSD。具体结果见表2。

2.2 出膏率的测定 根据单因素及响应面设计,煎煮得到相应JJD水提液,并将其定容至相同体积。精密量取JJD水提液25 mL,置于干燥蒸发皿中(质量为m₁),105 °C烘箱烘至干燥,冷却后迅速精密称定质量(m₂),计算出膏率^[5]。

$$\text{出膏率}(\%) = \frac{(m_2 - m_1) \times V}{25 \times M} \times 100\%$$

其中,V为水提液总体积,M为药材质量。

表2 6种成分加样回收率实验结果

成分	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
桔梗皂苷D			0.323 6	92.87		
		0.110 1	0.324 4	93.59	92.89	0.73
			0.322 9	92.23		
			0.425 6	92.73		
	0.221 4	0.220 2	0.432 6	95.92	95.06	2.14
			0.433 9	96.52		
			0.582 7	98.44		
		0.407 8	0.583 0	98.54	99.12	1.11
			0.589 8	100.39		
		0.089 2	0.255 6	95.15	95.91	0.69
没食子酸			0.256 5	96.25		
		0.089 2	0.255 6	95.15	95.91	0.69
			0.256 6	96.33		
			0.356 5	104.17		
	0.170 7	0.178 3	0.355 9	103.87	104.14	0.25
			0.356 9	104.39		
			0.449 1	104.06		
		0.267 5	0.448 8	103.96	104.10	0.16
			0.449 6	104.28		
			0.124 0	100.09		
绿原酸		0.041 0	0.123 8	99.72	99.79	0.27
			0.123 7	99.56		
			0.163 2	97.91		
	0.082 9	0.082 0	0.163 0	97.65	97.99	0.40
			0.163 6	98.42		
			0.204 1	98.46		
		0.123 1	0.203 3	97.86	98.34	0.44
			0.204 4	98.71		
			0.064 0	95.86		
		0.017 8	0.064 6	99.03	97.89	1.80
柯里拉京			0.064 6	98.77		
			0.082 2	98.87		
	0.047 0	0.035 6	0.082 5	99.89	99.58	0.62
			0.082 6	99.99		
			0.099 2	97.85		
		0.053 3	0.099 1	97.63	97.85	0.23
			0.099 3	98.08		
			0.091 1	99.53		
		0.029 2	0.090 5	97.46	98.03	1.33
			0.090 4	97.11		
橙皮苷	0.062 0		0.118 5	96.81		
			0.058 3	96.80	96.54	0.48
			0.118 0	96.00		
		0.087 5	0.148 8	99.19	99.62	0.44

表 2 (续)

成分	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
迷迭香酸	0.008 5	0.010 3	0.149 2	99.61	104.01	1.18
			0.149 6	100.07		
			0.013 9	104.54		
			0.013 9	104.88		
			0.013 8	102.60		
			0.019 2	104.39		
			0.019 2	104.73		
			0.019 3	104.79		
			0.024 1	101.00		
			0.015 4	0.023 9		
0.024 0	100.77					

2.3 AHP-熵权法计算综合评分

2.3.1 AHP 法确定权重 以出膏率及桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的含量为评价指标。采用 1~9 标度法(表 3)确定各指标重要性为:桔梗皂苷 D>绿原酸>没食子酸>橙皮苷>迷迭香酸>柯里拉京>出膏率,利用 SPSSPRO 工具(<https://www.spsspro.com>)构建判断矩阵,采用和积法计算得到上述指标的权重 W_{j1} 分别为 0.056、0.269、0.159、0.184、0.083、0.140、0.111,一致性比例为 $0.04 < 0.10$,表明构建矩阵合理可行^[6-8]。具体结果见表 4。

表 3 1~9 标度法评分

标度	含义
1	表示两个元素相比,具有同样的重要性
3	表示两个元素相比,前者比后者稍重要
5	表示两个元素相比,前者比后者明显重要
7	表示两个元素相比,前者比后者极其重要
9	表示两个元素相比,前者比后者强烈重要
2,4,6,8	表示上述相邻判断的中间值
1~9 的倒数	表示相应两因素交换次序比较的重要性

表 4 各指标判断矩阵及权重

指标	出膏率	桔梗皂苷 D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸	权重
出膏率	1	1/3	1/3	1/3	1/2	1/3	1/2	0.056
桔梗皂苷 D	3	1	2	2	3	2	3	0.269
没食子酸	3	1/2	1	1	2	1	2	0.159
绿原酸	3	1/2	1	1	3	1	3	0.184
柯里拉京	2	1/3	1/2	1/3	1	1/2	1	0.083
橙皮苷	3	1/2	1	1	2	1	1/2	0.140
迷迭香酸	2	1/3	1/2	1/3	1	2	1	0.111

2.3.2 熵权法确定权重 利用公式(1)对原始数据进行标准化处理,以消除各指标的量纲差异,并将

各指标数值压缩在[0-1]区间内。

$$X'_{ij} = (X_{ij} - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (1)$$

其中, X'_{ij} 为各指标的标准化数据, X_{ij} 为第 j 个指标下第 i 个样本的原始数据, X_{\min} 为各组指标数据的最小值, X_{\max} 为各组指标数据的最大值。

利用公式(2)、(3)和(4)计算熵值 E_j 。

$$P_{ij} = X'_{ij} / \sum_{i=1}^m X'_{ij} \quad (2)$$

$$k = 1 / \ln(m) \quad (3)$$

$$E_j = -k \times \sum_{i=1}^m P_{ij} \times \ln(P_{ij}) \quad (4)$$

其中, P_{ij} 为第 j 个指标下第 i 个样本的数值比重 ($0 \leq P_{ij} \leq 1$), m 为实验样本数 ($k > 0, E_j \geq 0$)。

利用公式(5)计算变异指数 D_j 。

$$D_j = 1 - E_j (j=1, 2, \dots, n) \quad (5)$$

利用公式(6)计算权重系数 W_{j2} 。

$$W_{j2} = D_j / \sum_{j=1}^n D_j \quad (6)$$

利用上述公式,计算得到各指标的权重 W_{j2} 分别为 0.179、0.147、0.113、0.096、0.190、0.142、0.133^[9]。

2.3.3 综合评分(W)计算^[10-11]

$$W_j = W_{j1} W_{j2} / \sum_{j=1}^m W_{j1} W_{j2} \quad (7)$$

$$W = \sum_{j=1}^m (100 W_j X_{ij}) / X_{ij\max} \quad (8)$$

2.4 水提工艺的单因素考察 以浸泡时间、加水倍数、煎煮时间、煎煮次数^[12]为考察因素,以出膏率及桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的质量分数为考察指标,根据单因素实验结果确定响应面实验的中心点。

2.4.1 浸泡时间考察 按处方配比称取所需药材,以加水 10 倍、煎煮 60 min、提取 1 次为固定量,分别在提取前浸泡 0 min、30 min、60 min,考察浸泡时间对综合评分的影响。结果如图 3A 所示,随着浸泡时间的增加,综合评分变化不大,以 30 min 时最高,选择浸泡 30 min 作为响应面实验的中心点。

2.4.2 加水倍数考察 按处方配比称取所需药材,以浸泡 30 min、煎煮 60 min、提取 1 次为固定量,分别加水 6、8、10、12、14 倍,考察加水倍数对综合评分的影响。结果如图 3B 所示,随着加水倍数的增加,综合评分持续上升,在加水 10 倍时增速放缓,且考虑节约生产资源,选择加水 10 倍作为响应面实验的中心点。

2.4.3 煎煮时间考察 按处方配比称取所需药材,以加水 10 倍、浸泡 30 min、提取 1 次为固定量,分别煎煮 30 min、60 min、90 min、120 min、180 min,考察煎煮时间对提取效果的影响。结果如图 3C 所示,随着煎煮时间的增加,综合评分先上升后下降,在

60 min 时达到最高,选择煎煮 60 min 作为响应面实 验的中心点。

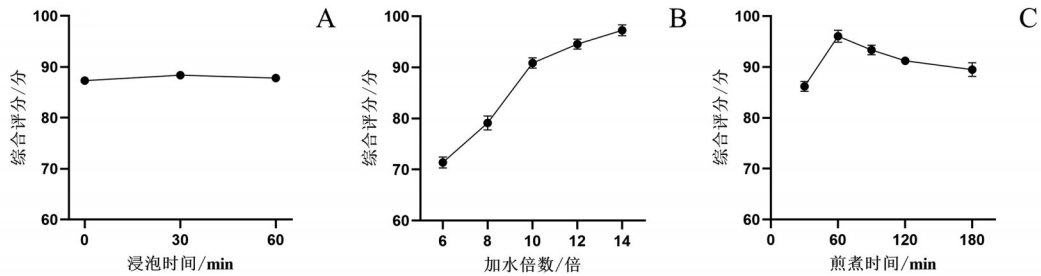


图3 浸泡时间(A)、加水倍数(B)、煎煮时间(C)对综合评分的影响(n=3)

2.4.4 煎煮次数考察 按处方配比称取所需药材,以加水 10 倍、浸泡 30 min、煎煮 60 min 为固定量,分别提取 1、2、3 次,考察煎煮次数对提取效果的影响。结果显示,随着煎煮次数的增加,综合评分持续上

升,但提取 2 次与提取 3 次差别不大。因煎煮次数为非连续变量,最终选择提取 2 次,后续不再加入响应对应面优化。具体结果见表 5。

表 5 煎煮次数对各指标的影响

煎煮次数/次	出膏率/%	含量/(mg·g ⁻¹ ,以复方量计)					
		桔梗皂苷 D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸
1	26.56	0.282 2	3.246 4	2.908 3	2.402 4	0.637 7	0.415 9
2	32.18	0.251 8	4.312 8	3.003 7	2.674 3	0.939 7	0.466 6
3	34.67	0.244 2	4.617 2	3.132 3	2.924 8	1.158 9	0.496 8

2.5 水提工艺的 Box-Behnken 响应面实验

2.5.1 设计及结果 在单因素考察的基础上,选择浸泡时间(X₁)、加水倍数(X₂)、煎煮时间(X₃)为自变量,综合评分为因变量,采用 Design Expert.10 软件设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面实验^[13-14]。具体见表 6、表 7,3D 响应面图如图 4 所示。

表 6 Box-Behnken 响应面水提工艺因素设计表

因素	-1	0	1
X ₁ /min	0	30	60
X ₂ /倍	10	12	14
X ₃ /min	30	60	90

2.5.2 回归模型的建立及方差分析 采用 Design Expert.10 软件对实验数据进行拟合,得到回归方

程: $W=86.51-2.21 \times X_1+4.72 \times X_2+1.50 \times X_3-2.04 \times X_1 X_2-6.22 \times X_1 X_3-6.16 \times X_2 X_3+0.60 \times X_1^2-3.17 \times X_2^2-7.08 \times X_3^2$, $R^2=0.947 0$,对该模型进行方差分析,结果见表 8。以综合评分 Max 为筛选目标,预测得到最佳工艺为浸泡 2.5×10⁻⁶ min、加水 11.86 倍、煎煮 64.24 min,结合实际生产,选择最佳工艺为不浸泡、加水 12 倍,煎煮 65 min 进行工艺验证。

2.5.3 水提工艺验证 按照最佳水提条件进行 3 次验证实验。结果显示,验证实验综合评分均值为 93.79,与理论最佳工艺样品的综合评分 93.01 基本吻合,表明优化得到的水提工艺条件稳定可靠。结果见表 9。

2.6 浓缩温度考察 常用浓缩方式有常压浓缩、减压浓缩、冷冻干燥等,为降低成本、提高效率,本研

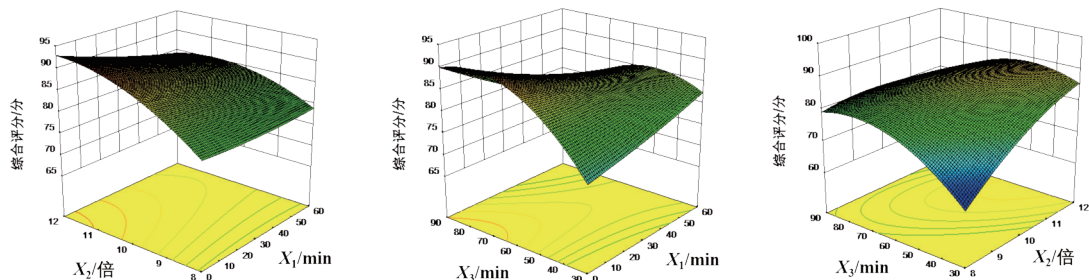


图 4 加味桔梗汤(JJD)水提工艺各因素交互作用的 3D 响应面图

表 7 Box-Behnken 响应面实验结果

序号	X_1	X_2	X_3	出膏率/%	含量/(mg·g ⁻¹ ,以复方量计)						综合评分
					桔梗皂苷 D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸	
1	1	-1	0	23.98	0.820 7	3.093 5	2.043 6	1.526 3	0.616 9	0.275 6	77.70
2	-1	1	0	28.39	0.874 1	3.766 8	2.692 5	1.835 2	0.788 1	0.376 9	94.26
3	1	1	0	26.43	0.798 4	3.560 3	2.504 8	1.882 5	0.661 5	0.305 0	85.93
4	0	1	1	26.40	0.718 0	2.993 1	2.349 6	1.434 9	0.486 3	0.303 0	74.29
5	-1	0	-1	26.05	0.696 9	3.008 8	2.361 9	1.442 4	0.488 8	0.304 6	73.99
6	0	0	0	27.16	0.721 3	3.586 6	2.665 2	1.862 7	0.902 6	0.292 6	89.11
7	-1	-1	0	23.34	0.711 1	3.456 4	2.401 4	1.602 9	0.602 5	0.260 5	77.90
8	-1	0	1	27.42	0.773 9	3.110 0	2.761 5	1.814 9	0.952 5	0.328 1	90.67
9	0	0	0	26.77	0.793 7	3.605 3	2.632 0	1.640 7	0.829 0	0.254 7	86.58
10	0	0	0	26.68	0.875 3	3.594 0	2.594 8	1.622 7	0.829 3	0.271 4	88.78
11	0	1	-1	23.24	0.687 4	3.661 8	2.643 8	1.653 3	0.845 0	0.276 6	84.85
12	1	0	1	27.06	0.686 6	3.389 9	1.838 7	1.569 5	0.600 6	0.230 2	73.66
13	0	0	0	27.93	0.786 5	3.661 4	2.579 1	1.639 7	0.543 8	0.311 7	82.90
14	0	-1	1	26.74	0.678 5	3.507 6	2.164 5	1.715 7	0.669 0	0.299 0	79.99
15	1	0	-1	24.69	0.952 0	2.937 3	2.349 4	1.420 7	0.633 7	0.289 0	81.85
16	0	0	0	27.20	0.777 3	3.609 1	2.520 6	1.513 6	0.827 5	0.266 1	85.20
17	0	-1	-1	23.62	0.619 0	2.689 0	2.173 1	1.378 2	0.398 4	0.262 4	65.93

表 8 响应面模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	822.23	9	13.90	0.001 1**
X_1	39.05	1	5.94	0.045 0*
X_2	178.53	1	27.16	0.001 2**
X_3	17.97	1	2.73	0.142 2
X_1X_2	16.58	1	2.52	0.156 3
X_1X_3	154.59	1	23.51	0.001 9**
X_2X_3	151.54	1	23.05	0.002 0**
X_1^2	1.54	1	0.23	0.643 1
X_2^2	42.37	1	6.44	0.038 7*
X_3^2	210.91	1	32.08	0.000 8***
失拟项	19.35	3	0.97	0.490 5
剩余	46.02	7		
纯误差	26.68	4		
校正总和	868.25	16		

注:*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

究选择减压浓缩方式。按最佳水提工艺制备得到 JJD 水提液,并分别在 50 °C、60 °C、70 °C 下减压浓缩

至药液密度为 0.5 g·mL⁻¹(以生药量计),考察减压浓缩温度对综合评分的影响。结果如图 5 所示,50 °C 和 70 °C 综合评分无显著差异,60 °C 综合评分略低于二者。推测温度升高,有效成分发生热分解,故 60 °C 评分下降;70 °C 成分热分解加剧,但浓缩时间缩短,导致最终评分高于 60 °C。考虑到工业生产的大批量投料和长时间浓缩,选择 50 °C 浓缩更为稳妥。

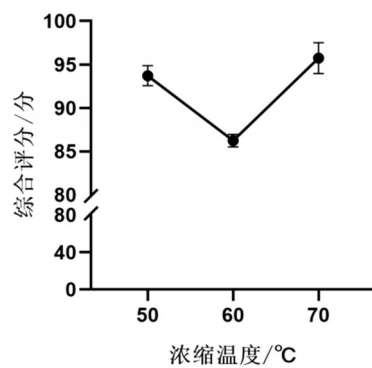


图 5 浓缩温度对综合评分的影响(n=3)

表 9 水提工艺验证结果

序号	出膏率/%	质量分数/(mg·g ⁻¹ ,以复方量计)						综合评分	平均值	RSD/%
		桔梗皂苷 D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸			
1	27.37	0.854 3	3.721 8	2.655 7	1.822 4	0.776 5	0.368 4	92.60		
2	28.42	0.882 1	3.798 3	2.704 6	1.847 9	0.793 2	0.379 8	94.89	93.79	1.23
3	27.85	0.877 5	3.772 1	2.681 3	1.823 6	0.784 7	0.372 1	93.88		

2.7 醇沉工艺的单因素考察 JJD 提取液成分复杂,影响药液澄清度及稳定性,故选用醇沉法对 JJD 进行纯化处理。以乙醇体积分数、醇沉时间、药液密度为考察因素,以干膏去除率及桔梗皂苷 D、没食子酸、绿原酸、柯里拉京、橙皮苷、迷迭香酸的含量为考察指标,根据单因素实验结果确定响应面实验的中心点。

$$\text{干膏去除率}(\%) = (1 - \frac{\text{醇沉后干膏量}}{\text{醇沉前干膏量}}) \times 100\%$$

2.7.1 乙醇体积分数考察 取适量药液密度为 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 JJD 浓缩液,快搅慢加加入无水乙醇,至乙醇体积分数分别为 40%、50%、60%、70%、80%、90%, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置 24 h 后取出, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液定容至相同体积,氮气吹干乙醇,加水复溶,按“2.1”项下方法制样、分析。结果如图 6A 所示,随着

乙醇体积分数的增加,综合评分先上升后下降,在 80% 时达到最高,选择 80% 乙醇体积分数为响应面优化的中心点。

2.7.2 醇沉时间考察 固定药液密度 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 70%, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱分别静置 4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h,考察醇沉时间对综合评分的影响。结果如图 6B 所示,随着醇沉时间的增加,综合评分先下降再升高,选择 36 h 为响应面优化的中心点。

2.7.3 药液密度考察 固定乙醇体积分数 70%、醇沉时间 24 h,在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 下分别减压浓缩至药液密度为 $0.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.8 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,考察药液密度对综合评分的影响。结果如图 6C 所示,随着药液密度的增加,综合评分持续上升,选择 $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为响应面优化的中心点。

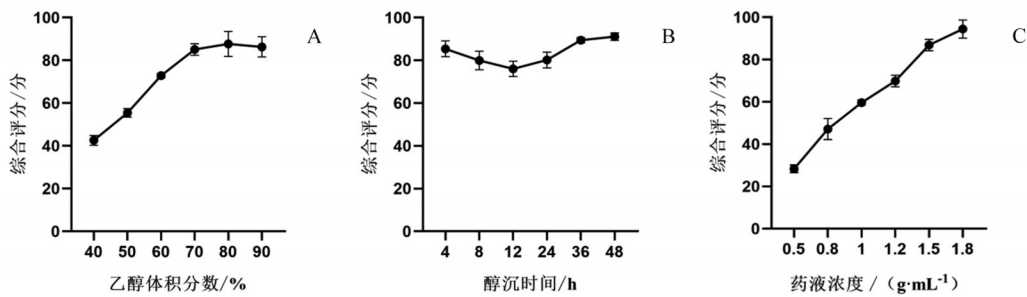


图6 乙醇体积分数(A)、醇沉时间(B)、药液密度(C)对综合评分的影响 (n=3)

2.8 醇沉工艺的 Box-Behnken 响应面实验

2.8.1 实验设计及结果 以乙醇体积分数(A)、醇沉时间(B)、药液密度(C)为自变量,综合评分为因变量,采用 Design Expert.10 软件设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面实验。具体见表 10、表 11, 3D 响应面图如图 7 所示。

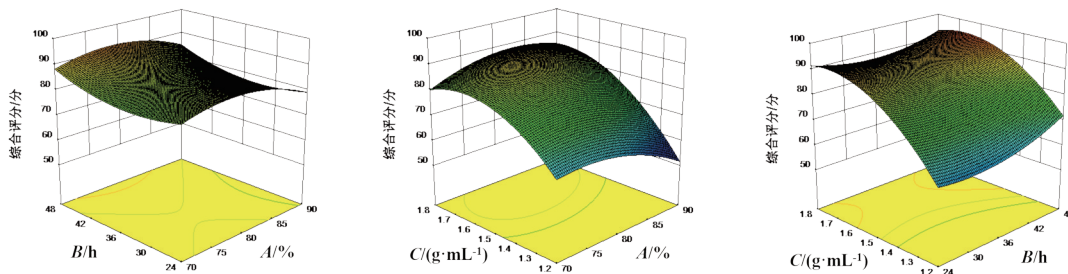
2.8.2 回归模型的建立及方差分析 采用 Design

表 10 Box-Behnken 响应面醇沉工艺因素设计表

因素	-1	0	1
A/%	70	80	90
B/h	24	36	48
C/(g·mL ⁻¹)	1.2	1.5	1.8

注:A为乙醇体积分数,B为醇沉时间,C为药液密度。

Expert.10 软件对实验数据进行拟合,得到回归方程:



注:A为乙醇体积分数,B为醇沉时间,C为药液密度。

图7 JJD 醇沉工艺各因素交互作用的 3D 响应面图

表 11 Box-Behnken 响应面实验结果

序号	A	B	C	干膏去除率/%	含量/(mg·L ⁻¹)						综合评分/分
					桔梗皂苷D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸	
1	-1	-1	0	48.44	72.318	62.599	21.593	22.496	14.372	5.857	78.65
2	1	-1	0	60.89	77.023	61.808	18.203	17.370	12.750	5.162	75.36
3	-1	1	0	45.78	74.308	64.008	22.223	23.084	14.171	6.187	80.32
4	1	1	0	60.00	84.086	61.525	18.295	18.903	13.410	4.717	77.96
5	-1	0	-1	44.44	56.113	51.684	19.427	18.784	10.661	4.139	63.16
6	1	0	-1	64.44	48.599	37.433	12.716	14.761	7.113	3.084	50.79
7	-1	0	1	66.67	68.522	56.691	18.844	18.214	12.128	4.489	71.23
8	1	0	1	67.41	77.978	63.355	18.369	16.669	13.514	4.507	75.77
9	0	-1	-1	60.00	47.766	42.226	14.861	15.559	8.243	3.398	53.62
10	0	1	-1	53.33	62.023	50.137	17.156	17.450	10.231	4.786	64.77
11	0	-1	1	65.19	87.986	69.925	21.302	20.152	15.308	6.289	87.08
12	0	1	1	56.30	91.284	76.129	23.150	21.563	16.810	6.494	91.30
13	0	0	0	59.11	68.063	58.039	18.915	18.727	12.155	5.230	72.09
14	0	0	0	52.00	79.956	70.478	22.216	21.527	15.174	5.821	83.39
15	0	0	0	56.44	72.062	64.303	20.415	20.009	13.569	5.308	76.61
16	0	0	0	56.44	77.388	68.073	21.591	21.103	14.546	5.592	81.22
17	0	0	0	54.67	76.885	68.308	21.828	21.351	14.649	5.552	81.15

注:A为乙醇体积分数,B为醇沉时间,C为药液密度。

$W=78.89-1.69\times A+2.46\times B+11.63\times C+0.23\times AB+4.23\times AC-1.73\times BC-4.89\times A^2+4.07\times B^2-8.77\times C^2$; $R^2=0.9015$, 对该模型进行方差分析,结果见表12。以综合评分Max为筛选目标,预测得到最佳工艺为乙醇体积分数79.90%、醇沉时间48 h、药液浓度1.65 g·mL⁻¹,结合实际生产,选择乙醇体积分数80%、醇沉时间48 h、药液浓度1.65 g·mL⁻¹进行工艺验证。

2.8.3 醇沉工艺验证 按照最佳醇沉条件进行3次验证实验。结果如表13所示,验证实验综合评分均值为95.07,与预测评分94.98基本吻合。此外,通过检测醇沉前浓缩液中各指标成分的含量,并与醇沉液进行对比,得到6种成分的醇沉损失率,结果如表14所示。醇沉工艺能够在去除50%干膏的同时,保留至少80%的指标成分,表明优化得到的醇沉工艺稳定可靠。

$$\text{醇沉损失率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{醇沉液各成分含量}}{\text{浓缩液各成分含量}}\right) \times 100\%$$

表 12 响应面模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F值	P值
Model	1 727.45	9	7.12	0.008 5**
A	22.74	1	0.84	0.389 1
B	48.23	1	1.79	0.223 0
C	1 081.94	1	40.11	0.000 4***
AB	0.22	1	8.08×10 ⁻³	0.930 9
AC	71.49	1	2.65	0.147 5
BC	12.02	1	0.45	0.525 9
A ²	100.53	1	3.73	0.094 8
B ²	69.72	1	2.58	0.151 9
C ²	323.65	1	12.00	0.010 5*
失拟项	106.61	3	1.73	0.298 6
剩余	188.81	7		
纯误差	82.20	4		
校正总和	1 916.26	16		

注:*表示P<0.05,**表示P<0.01,***表示P<0.001。

表 13 醇沉工艺验证结果

序号	干膏去除率/%	含量/(mg·L ⁻¹)						综合评分	平均值	RSD/%
		桔梗皂苷D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸			
1	56.67	104.386	77.767	23.550	21.656	17.360	7.268	95.43		
2	57.33	105.900	79.813	23.345	21.256	17.538	7.048	95.37	95.07	0.61
3	56.44	102.986	79.304	23.802	21.562	17.313	7.029	94.39		

表 14 6 种成分的醇沉损失率

序号	醇沉损失率/%					
	桔梗皂苷 D	没食子酸	绿原酸	柯里拉京	橙皮苷	迷迭香酸
1	7.50	5.61	17.60	18.35	2.92	9.12
2	4.71	3.05	18.21	18.49	2.65	12.00
3	10.05	3.64	17.14	18.45	3.13	12.24

3 讨论

3.1 实验设计 针对中药复方多指标优化的复杂性,本研究采用 AHP-熵权法计算综合评分,能够融合主客观权重,使得评分结果更合理可靠。与正交实验等相比,Box-Behnken 响应面法通过二次模型拟合非线性关系,更契合实际工艺的交互效应,能够提高参数优化的精确度^[15]。因此,本研究基于 AHP-熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化 JJD 水提醇沉工艺,为其进一步研究开发提供实验依据。

3.2 指标成分的选择 指标成分的选择应具有代表性,且尽可能覆盖全方药材。然而,在液相色谱中未能找到薄荷的特征峰,而甘草的可指认峰未能通过方法学考察,故最终未能将二者的成分纳入指标成分中。桔梗中的桔梗皂苷 D 具有抗炎、抗病毒、抗氧化等作用^[16];没食子酸、柯里拉京是余甘子、青果的代表性成分,具有解热镇痛、抗炎、抗氧化等作用^[17-19];绿原酸、橙皮苷及迷迭香酸分别为金银花、陈皮、紫苏子的重要药效成分之一,均有良好的抗炎作用^[20-22]。结合急性咽炎治则,并参考《中华人民共和国药典(2020 年版):一部》^[23],将上述成分选作指标成分具有合理性。

3.3 色谱条件的优化 因桔梗皂苷 D 没有紫外吸收,且需要进行特殊的样品处理,故采用蒸发光散射检测器单独检测。乙腈的洗脱能力约为甲醇的 2 倍,而《中华人民共和国药典(2020 年版):一部》^[23]在检测余甘子中的没食子酸时,选用 5% 甲醇作为初始有机相,本研究若选用乙腈为有机相,且保证没食子酸能够洗脱分离出来,初始有机相比比例过低(2% 左右),容易损坏色谱柱,依此考虑,选用甲醇-0.1% 甲酸水为流动相,并考察了柱温(30 °C、35 °C、40 °C)、流速(0.1 mL·min⁻¹、0.2 mL·min⁻¹、0.3 mL·min⁻¹)及检测波长(210 nm、254 nm、273 nm、300 nm、330 nm),最终确定现行方法。

3.4 所选工艺的合理性 课题组前期药效学预实验发现,处方水提液对大鼠急性咽炎的治疗效果要优于醇提液,故选用水为溶媒进行提取工艺优化。

在中药复方提取工艺的优化过程中,测定提取率有助于更全面地评价工艺对指标成分的保留情况,为优选方案提供有力支持。然而,因部分药材指标成分的含量测定方法未进行方法学验证,难以获得原药材中相关成分的准确含量并计算提取率,故本研究采用了出膏率结合各指标成分含量的评价体系。为降低患者服药量并提高药液稳定性和澄清度,本研究在水提基础上进行了浓缩、醇沉处理,在去除 50% 以上干膏的同时保留了至少 80% 的指标成分。优化得到的水提醇沉工艺成本低廉、操作简单且效果良好,可为后续 JJD 制剂开发提供依据。

参考文献:

- [1] 赵飞燕,高蕊,刘静,等.急性咽炎中医病证诊断与疗效评价专家共识[J].中国循证医学杂志,2025,25(9):993-1000.
- [2] 张芬芬.中医治疗慢性咽炎的数据挖掘、网络药理及文献计量研究[D].南昌:江西中医药大学,2024.
- [3] 胡晶,吴雪,阮岩,等.金嗓开音制剂治疗急性咽炎/喉炎的临床综合评价[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(14):96-104.
- [4] PELLEGRINO R, TIMITILLI E, VERGA M C, et al. Acute pharyngitis in children and adults: descriptive comparison of current recommendations from national and international guidelines and future perspectives[J]. Eur J Pediatr, 2023, 182(12): 5259-5273.
- [5] 刘文静,李燕,李文艳,等.消肿止痒方提取工艺优化[J].中成药,2024,46(12):3945-3949.
- [6] 杨秋琛,张琼琼,王桂群,等.基于 UPLC 四神丸方中 19 种有效成分定量测定以及提取工艺优化研究[J].中草药,2024,55(11):3679-3688.
- [7] 李俊江,徐志伟,毕映燕,等.舒肝利胆浓缩丸提取工艺优化[J].中成药,2023,45(9):3037-3041.
- [8] 张雨,范蒙蒙,李红伟,等.川楝子醋制工艺优化[J].中成药,2024,46(5):1470-1475.
- [9] 李素丽,曹岚岚,周泉,等.鹿红方颗粒提取工艺的优化[J].中成药,2022,44(11):3619-3622.
- [10] 石双慧,王梦琳,魏晓彤,等.AHP-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选黄精酒制工艺及其炮制前后药效对比研究[J].中草药,2023,54(14):4467-4480.
- [11] 牛乐,范蒙蒙,张雨,等.AHP-熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选肉豆蔻曲发酵工艺[J].中药材,2025,48(1):80-85.
- [12] 毛小文,顾志荣,王园园,等.双叶枇杷颗粒水提工艺优化[J].中成药,2024,46(9):3093-3098.
- [13] 王星栋,李娟,方建国,等.基于响应面和熵权法优选黄银颗粒的提取工艺[J].医药导报,2024,43(5):778-785.
- [14] 张星,赖文静,林夏,等.Box-Behnken 设计-响应面法优化经典名方四妙勇安汤煎煮工艺研究[J].中草药,2023,54(10):3109-3119.
- [15] 刘胜春,赵学刚,陈迎春,等.通络膏方提取工艺优化[J].中成药,2025,47(2):568-572.

(下转第 87 页)