

本文引用:刘淑兰,周艺林,林鹏,龚卫平,欧阳锐,夏新华.Box-behnken 响应面法优化紫红生肌软膏的醇提工艺[J].湖南中医药大学学报, 2021,41(4):528-535.

Box-behnken 响应面法优化紫红生肌软膏的醇提工艺

刘淑兰¹,周艺林¹,林鹏¹,龚卫平²,欧阳锐²,夏新华^{1*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.衡阳市诚明中药验方研究所,湖南衡阳421002)

〔摘要〕目的 优选紫红生肌软膏的醇提工艺参数,为紫红生肌软膏的新药开发提供依据。方法 以栀子苷、连翘酯苷A、羟基红花黄色素A为评价指标,在单因素试验的基础上,以乙醇浓度、加醇量、提取时间为考察因素,采用Box-behnken响应面法设计试验,采用层次分析法-熵权法组合赋权确定各指标权重系数并计算综合评分,从而优化紫红生肌软膏醇提工艺参数。结果 紫红生肌软膏最佳醇提工艺为采用70%的乙醇为溶剂提取两次,第1次加9倍量乙醇提取150 min,第2次加7倍量乙醇提取120 min。该工艺参数综合评分的模型实测值为100.70,与模型预测值接近。结论 优选出的紫红生肌软膏最佳醇提工艺稳定可行,可为紫红生肌软膏进一步开发为新药提供依据。

〔关键词〕紫红生肌软膏;Box-behnken响应面;醇提工艺;层次分析法;熵权法;栀子苷;连翘酯苷A;羟基红花黄色素A
〔中图分类号〕R283 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.007

Optimization of Ethanol-extraction Process of Zihong Shengji Ointment Based on Box-behnken Response Surface Design

LIU Shulan¹, ZHOU Yilin¹, LIN Peng¹, GONG Weiping², OUYANG Rui², XIA Xinhua^{1*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hengyang Chengming Institute of Chinese Medicine Prescriptions, Hengyang, Hunan 421002, China)

〔Abstract〕 **Objective** To optimize the alcohol-extraction process parameters of Zihong Shengji Ointment and provide the basis for the new drug development of Zihong Shengji Ointment. **Methods** The geniposide, forsythiaside A, hydroxysafflor yellow A were used as evaluation indexes. On the basis of single factor experiment, the ethanol concentration, the amount of alcohol added and extraction time were used as investigation factors, the experiments were designed by Box-behnken response surface, and the weight coefficients of each index were determined by analytic hierarchy process-information entropy weight method, and the comprehensive score was calculated, so as to optimize the alcohol-extraction process parameters of Zihong Shengji Ointment. **Results** The optimum alcohol-extraction process of Zihong Shengji Ointment was 70% ethanol for two times, the first time was added with 9 times ethanol for 150 min, and the second time was added with 7 times ethanol for 120 min. The measured value of the comprehensive score of the process parameters was 100.70, which was close to the predicted value. **Conclusion** The optimized alcohol-extraction process of Zihong Shengji Ointment is stable and feasible, which can provide basis for the further development of Zihong Shengji Ointment as new drugs.

〔Keywords〕 Zihong Shengji Ointment; Box-behnken response surface; ethanol-extraction process; analytic hierarchy process; information entropy; geniposide; forsythiaside A; hydroxysafflor yellow A

〔收稿日期〕2020-10-10

〔基金项目〕企业新药研发项目(cxy2019020);湖南省重点研发计划项目(2017SK2122);国家重大新药创制专项子课题(2017ZX09309026-001)。

〔作者简介〕刘淑兰,女,在读硕士研究生,研究方向:药物新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准研究。

〔通讯作者〕*夏新华,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:xiaxinhua001@163.com。

糖尿病是一种慢性疾病,在世界范围内发病率呈逐年增长趋势。糖尿病足是由于糖尿病异常代谢引起下肢神经功能障碍、外周血管结构异常,进而导致足部变形、溃疡形成和肢端坏疽^[1-3]。紫红生肌软膏是多年临床实践的经验方,由栀子、连翘、红花等6味中药组成,具有抗炎活血、化腐生肌的功效,临床用于治疗湿热下注型糖尿病足溃疡具有确切疗效^[4]。栀子为方中君药,具有清热利湿作用,其活性成分栀子苷具有抗凋亡、抗炎和抗动脉粥样硬化作用^[4];连翘为方中臣药,具有抗炎、抗菌、抗氧化、清热解毒、消肿散结的作用,也有研究^[5]表明连翘酯苷A通过介导Nrf2和内质网应激通路的激活,对局灶性脑缺血损伤具有保护作用;红花为佐药,其中黄酮类化合物羟基红花黄色素A是血小板活化因子受体拮抗剂,具有散瘀止痛、促进血液循环的作用^[6],还可促进血管生成、减轻炎症反应,促进糖尿病创面愈合,临床上可用于治疗炎症相关疾病^[6-7]。预试验发现,方中药物采用乙醇提取比水提取更利于有效成分的浸出,且醇提浓缩液直接作为水相可比药物细粉加入水相制备出的软膏更细腻、分散更均匀,局部应用于糖尿病足,可发挥消炎镇痛、促进创面愈合等作用。为进一步确定该制剂合理的生产工艺,保证其临床疗效,本试验以栀子苷、连翘酯苷A和羟基红花黄色素A的转移率及浸膏得率为指标综合评分,采用层次分析法-熵权法^[8-10]确定权重系数,结合Box-behnken响应面^[11-13]对提取工艺进行优选,筛选该处方的最佳提取工艺参数,为该制剂的中试放大及工业化生产提供实验依据。

1 仪器与试药

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);DK-S26型电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司);YP10002型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);XB220A型分析天平(广州市博勒泰贸易有限公司);RZ-2000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

药材饮片均购于康美药业股份有限公司,经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)要求。栀子苷对照品(批号:110749-201919,质量分数97.1%,中国食品药品检定研究院)、连翘酯苷A对照品(批号:111810-201707,质量分数97.2%,中国食品药品检定研究院)、羟基红花黄色素A对照品(批号:111637-201810,质量分数93.1%,中国食品药品检

定研究院),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 栀子苷、羟基红花黄色素A含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Thermo scientific C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(12:88);检测波长:238 nm(栀子苷)、403 nm(羟基红花黄色素A);柱温:30℃;流速:1 mL/min;进样量:5 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品、羟基红花黄色素A对照品适量,加甲醇制成栀子苷95.55 μg/mL、羟基红花黄色素A 24.39 μg/mL的混合对照品溶液。

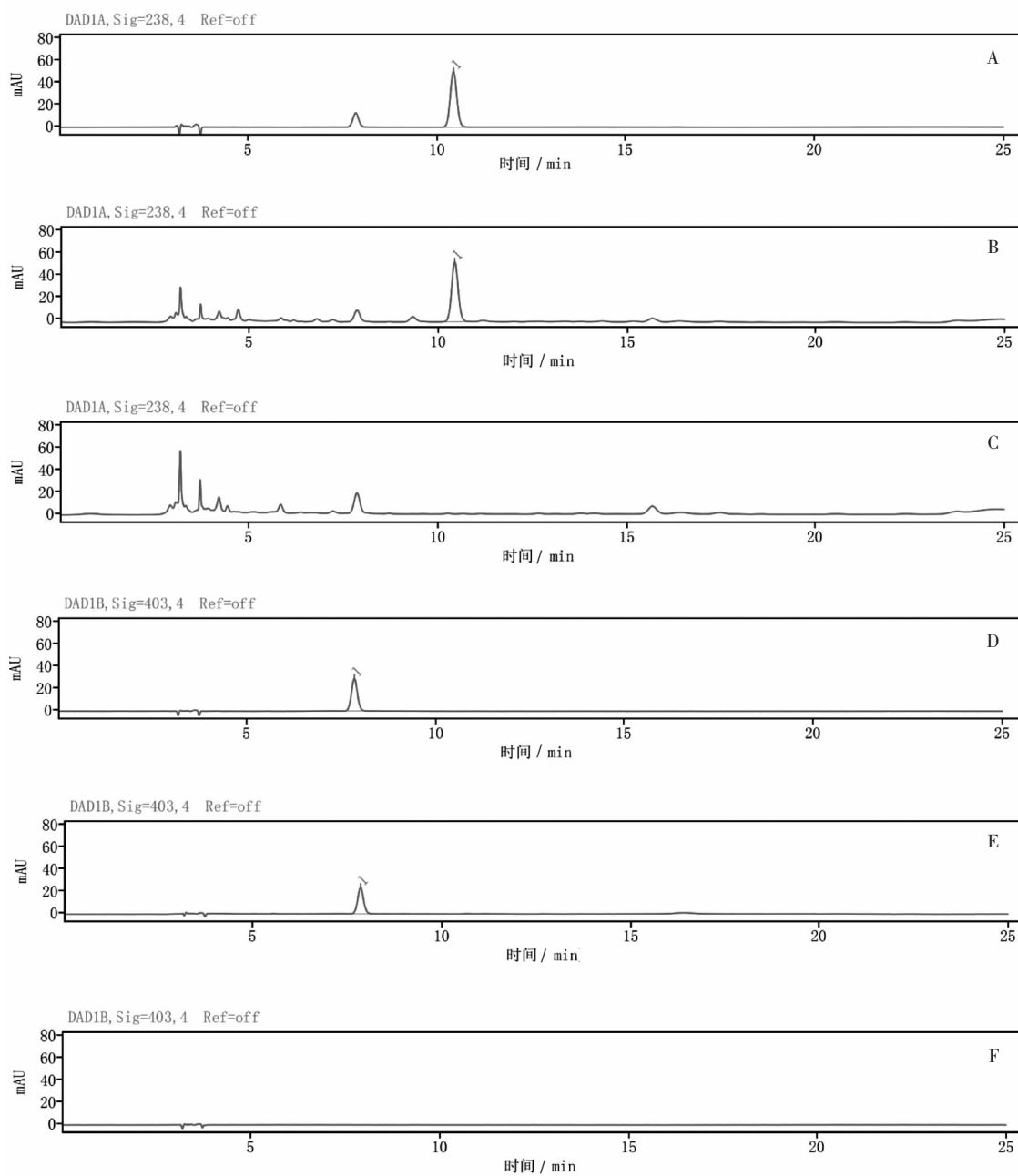
2.1.3 紫红生肌软膏醇提液及供试品溶液的制备 称取处方中栀子、连翘、红花等药材饮片110 g,加70%乙醇提取两次,第1次加8倍量乙醇提取120 min,第2次加6倍量乙醇提取90 min,滤过,合并滤液,浓缩,定容至250 mL,备用。

从醇提液中精密吸取1 mL,加甲醇定容至20 mL,吸取1 mL,0.45 μm微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.1.4 缺栀子阴性、缺红花阴性对照溶液的制备 分别称取处方中除栀子外各味药材、除红花外各味药材,按“2.1.3”项下方法制备,即得。

2.1.5 专属性试验 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液、缺栀子阴性对照溶液、缺红花阴性对照溶液各5 μL,按“2.1.1”项下色谱条件测定,结果表明,供试品色谱中栀子苷与羟基红花黄色素A色谱分离良好,且缺栀子、红花的阴性对照均未见干扰(见图1)。

2.1.6 线性关系考察 精密称取栀子苷对照品、羟基红花黄色素A对照品适量,加甲醇制成浓度分别为191.11 μg/mL、39.03 μg/mL的混合对照品母液。精密吸取上述混合对照品母液1、2、4、6、8、10 mL,甲醇定容至10 mL,得栀子苷浓度分别为19.11、38.22、76.44、114.66、152.88、191.11 μg/mL,羟基红花黄色素A浓度分别为3.90、7.81、15.61、23.42、31.22、39.03 μg/mL的混合对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件测定,以栀子苷或羟基红花黄色素A进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),分别进行线性回归,得栀子苷回归方程为 $Y=1.230\ 9X+1.789$, $R^2=0.999\ 1$,线性范围为95.55~955.55 ng、羟基红花黄色素A回归方程为 $Y=2.570\ 1X-5.795\ 1$,



注:A.混合对照品溶液(238 nm);B.供试品溶液(238 nm);C.缺栀子阴性对照溶液;D.混合对照品溶液(403 nm);E.供试品溶液(403 nm);F.缺红花阴性对照溶液

图1 栀子、红花 HPLC 图谱

$R^2=0.9995$,线性范围为 19.50~195.15 ng。

2.1.7 方法学考察 根据“2.1.1”项下色谱条件,测得栀子苷精密度 RSD 为 1.58%,重复性 RSD 为 0.33%,稳定性 RSD 为 0.28%,平均加样回收率为 103.48%,加样回收率 RSD 为 1.46%;羟基红花黄色素 A 精密度 RSD 为 1.43%,重复性 RSD 为 0.67%,稳定性 RSD 为 0.90%,平均加样回收率为 101.06%,加样回收率 RSD 为 1.59%,表明该方法可用于栀子苷和羟基红花黄色素 A 的含量测定。

2.2 连翘酯苷 A 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Thermo scientific C_{18} 柱

(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.4%冰醋酸溶液(15:85);检测波长:330 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;流速:1 mL/min;进样量:5 μ L。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷 A 对照品适量,加甲醇制成 141.912 μ g/mL 的连翘酯苷 A 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取“2.1.3”项下的醇提液 1 mL,甲醇定容至 10 mL,吸取 1 mL,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 缺连翘阴性对照溶液的制备 称取处方中除连翘外各味药材,按“2.1.3”项下方法制备,即得。

2.2.5 专属性考察 精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液、缺连翘阴性对照溶液各 5 μL ,按“2.2.1”项下色谱条件测定。结果表明供试品色谱中连翘酯苷 A 色谱峰分离良好,且缺连翘的阴性对照未见干扰。见图 2。

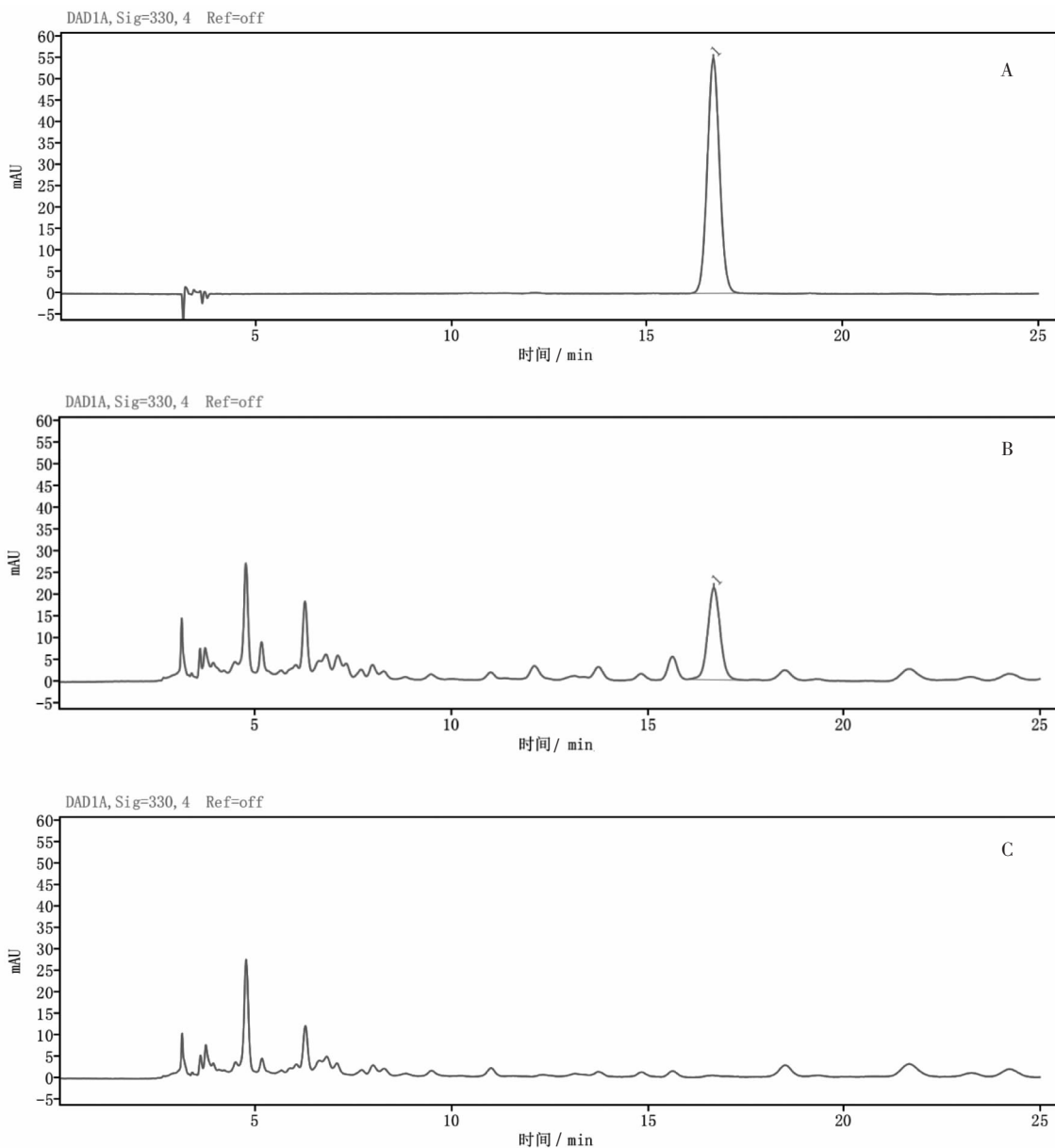
2.2.6 线性关系考察 精密称取连翘酯苷 A 对照品溶液适量,加甲醇制成浓度为 141.912 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL,甲醇定容至 10 mL,制成浓度分别为 14.191、28.382、56.764、85.146、113.528、141.912 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的连翘酯苷 A 对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件测定,以连翘酯苷 A 进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得连翘酯苷 A 回归方程为

$Y=1.597X+6.6548$, $R^2=0.9991$,线性范围为 70.96~709.56 ng。

2.2.7 方法学考察 根据“2.2.1”项下色谱条件,测得连翘酯苷 A 精密度 RSD 为 0.72%,重复性 RSD 为 0.98%,稳定性 RSD 为 0.66%,平均加样回收率为 103.19%,加样回收率 RSD 为 0.98%,表明该方法可用于连翘酯苷 A 的含量测定。

2.3 浸膏得率的测定

精密吸取“2.1.3”项下醇提液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 3 h,置干燥器中冷却 0.5 h,迅速称重,计算浸膏得率 $Y_4^{[11]}$ 。



注:A.连翘酯苷 A 对照品;B.供试品溶液;C.缺连翘阴性对照

图 2 连翘 HPLC 图谱

2.4 单因素考察

2.4.1 乙醇浓度考察 称取处方中栀子、连翘、红花等饮片 110 g, 固定提取次数为 2 次, 第 1 次加 8 倍量乙醇提取 90 min, 第 2 次加 6 倍量乙醇提取 60 min, 考察不同乙醇浓度 (50%、60%、70%、80%、90%) 对各项指标的影响 (见图 3)。由图 3 可知, 当乙醇浓度增加到 70% 时, 各项指标值呈下降趋势, 因此选取乙醇浓度为 50%~70% 作为考察范围。

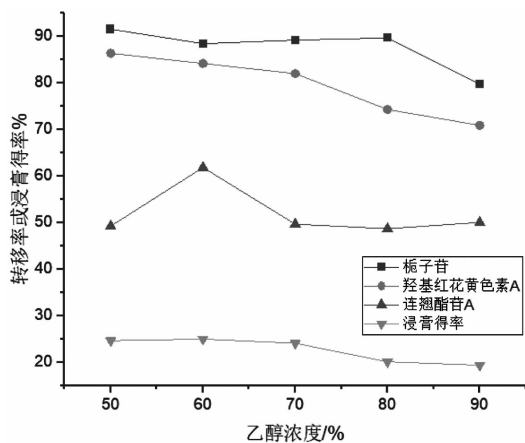


图 3 乙醇浓度对各项指标的影响

2.4.2 加醇倍量考察 称取处方中栀子、连翘、红花等饮片 110 g, 固定提取次数为 2 次, 乙醇浓度为 70%, 提取时间为第 1 次 90 min、第 2 次 60 min, 考察不同加醇量 (第 1 次分别为 6、8、10、12 倍, 第 2 次分别为 4、6、8、10 倍) 对各项指标的影响 (见图 4)。由图 4 可知, 随着加醇倍量增加, 各项指标值变化不明显或略有增加, 结合经济角度考虑, 选取加醇倍量为 10~18 倍作为考察范围。

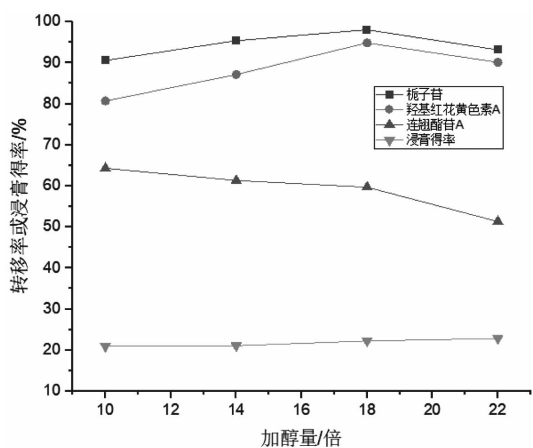


图 4 加醇倍量对各项指标的影响

2.4.3 提取时间考察 称取处方中栀子、连翘、红花等饮片 110 g, 固定提取次数为 2 次, 乙醇浓度为 70%, 加醇量为第 1 次 8 倍量, 第 2 次 6 倍量, 考察不同提取时间 (第 1 次分别为 60 min、90 min、120 min、150 min; 第 2 次分别为 30 min、60 min、

90 min、120 min) 对各项指标的影响 (见图 5)。由图 5 可知, 随着提取时间的增加, 栀子苷、羟基红花黄色素 A 转移率先增加后基本保持平稳, 连翘酯苷 A 提取 210 min 时转移率达最大值, 浸膏得率变化不明显, 故选取提取时间为 150~270 min 作为考察范围。

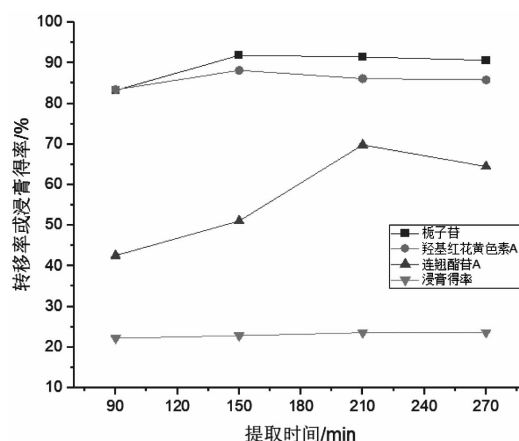


图 5 提取时间对各项指标的影响

2.5 Box-Behnken 响应面法优化紫红生肌软膏的醇提工艺

2.5.1 Box-Behnken 响应面试验设计 在单因素试验基础上, 选择乙醇浓度 (A)、加醇倍量 (B) 和提取时间 (C) 作为考察因素, 提取次数为 2 次, 采用 Box-Behnken 响应面法进行试验设计, 试验因素与水平见表 1。称取处方中栀子、连翘、红花等饮片 110 g, 共 17 份, 分别按相应条件提取, 收集提取液, 测定各项指标值。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平表

水平	醇浓度/%	加醇量/倍	提取时间/min
-1	50	6, 4	90, 60
0	60	8, 6	120, 90
1	70	10, 8	150, 120

2.5.2 指标权重的确定

2.5.2.1 层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP) 确定权重 AHP 是指将与决策总是有关的元素分解成目标、准则、方案等层次, 在此基础上进行定性和定量分析的决策方法^[14-15]。在本试验中, 将综合评分设为决策目标, 将栀子苷、连翘酯苷 A、羟基红花黄色素 A 的转移率及浸膏得率设为方案层, 根据紫红生肌处方的君臣佐使、配伍规律、各成分药效作用强弱, 将 4 种指标成分作为权重指标予以量化。栀子苷记为 1; 为处方君药栀子的有效成分, 连翘酯苷 A 记为 2; 红花有效成分羟基红花黄色素 A, 记

为3;浸膏得率非常重要,记为4。各指标的优先顺序为: 栀子苷转移率>连翘酯苷 A 转移率>羟基红花黄色素 A 转移率>浸膏得率。指标成对比较的判断优先矩阵见表2。

表2 指标成对比较的判断优先矩阵

权重指标	栀子苷	连翘酯苷 A	羟基红花黄色素 A	浸膏得率
栀子苷	1	2	3	4
连翘酯苷 A	1/2	1	2	3
羟基红花黄色素 A	1/3	1/2	1	2
浸膏得率	1/4	1/3	1/2	1

根据测定结果,用 spssau 计算得到栀子苷转移率、连翘酯苷 A 转移率、羟基红花黄色素 A 转移率、浸膏得率 4 项指标权重系数分别为 0.465 8、0.277 1、0.161 1、0.096 0,根据公式 $CR=CI/RI$ (CR :随机一致性比率, CI :一致性指标, RI :平均随机一致性指标), $CR=0.012<0.10$,即指标优先比较判断矩阵具有良好的一致性,权重系数有效。

2.5.2.2 信息熵权法确定权重 信息熵权法是一种根据各指标原始数据所提供信息量的大小来确定各指标权重的客观赋权法。该指标的原始数据差异越大,其熵值越小,提供的信息量就越大,其在综合评价中所起的作用也越大,即所占权重就越大,反之,其所占权重就越小^[11-13]。

根据测定结果,采用 EvaGear 2.1.7486 软件分

别计算栀子苷转移率、连翘酯苷 A 转移率、羟基红花黄色素 A 转移率、浸膏得率 4 个评价指标的权重系数为 0.212 7、0.423 4、0.152 9、0.211 0。

2.5.2.3 AHP-熵权法组合权重 根据紫红生肌软膏功能主治及复方的君臣佐使分析,AHP 法量化了评价指标两两比较判断的优先信息,得到了以主观信息为基础的权重系数,基本体现了紫红生肌软膏各指标的主次顺序及复方君臣佐使的顺序;同时采用熵权法求得相应指标的客观权重系数,不仅考虑到了各样本数据的变异性及指标间的相关性对赋权的影响,也避免了主观赋权存在的偏颇,故而将二者结合起来,根据公式 $W_{组合 ij} = W_{AHPj} W_{熵权法 ij}$ 计算组合权重,以期得到更加客观、真实的评价结果。按上述公式计算得到栀子苷转移率、连翘酯苷 A 转移率、羟基红花黄色素 A 转移率、浸膏得率 4 项指标组合权重系数分别为 0.379 2、0.449 0、0.094 3、0.077 5。

2.5.3 响应面试验结果与分析 根据各项指标测定值和“2.5.2.3”确定的权重系数,按公式计算:

$$综合评分 = (Y_1/Y_{1max} \times 0.397 2 + Y_2/Y_{2max} \times 0.449 0 + Y_3/Y_{3max} \times 0.094 3 + Y_4/Y_{4max} \times 0.077 5) \times 100\%$$

应用 Design Expert 8.0.6.1 软件,将表 3 中综合评分与乙醇浓度、加醇倍量、提取时间进行响应面

表3 Box-behnken 试验设计与结果

试验号	A/%	B/倍	C/min	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /%	Y_4 /%	综合评分
1	50	10	210	76.28	53.00	84.61	22.72	83.26
2	70	10	210	73.30	63.54	58.94	22.21	86.26
3	60	14	210	87.25	64.85	91.53	24.91	97.19
4	60	18	270	83.45	65.86	84.47	24.15	95.31
5	60	14	210	88.72	62.82	90.79	24.08	96.12
6	50	18	210	84.20	54.47	82.17	24.62	87.92
7	70	14	150	80.84	54.19	69.87	23.72	84.78
8	50	14	270	86.33	52.12	86.34	23.04	87.19
9	60	14	210	90.05	64.36	92.07	24.47	97.96
10	60	10	270	80.52	53.23	63.54	23.72	83.36
11	70	18	210	87.91	67.20	78.65	24.16	97.49
12	70	14	270	87.58	68.82	81.52	24.17	98.73
13	60	14	210	89.61	63.58	91.05	24.84	97.27
14	60	18	150	87.19	51.52	87.06	24.04	87.53
15	60	10	150	78.07	51.69	74.37	24.76	82.73
16	60	14	210	90.06	64.21	90.87	24.49	97.75
17	50	14	150	72.55	58.51	87.36	22.27	85.52

注:A:乙醇浓度;B:加醇倍量;C:提取时间; Y_1 :栀子苷转移率; Y_2 :连翘酯苷 A 转移率; Y_3 :羟基红花黄色素 A 转移率; Y_4 :浸膏得率

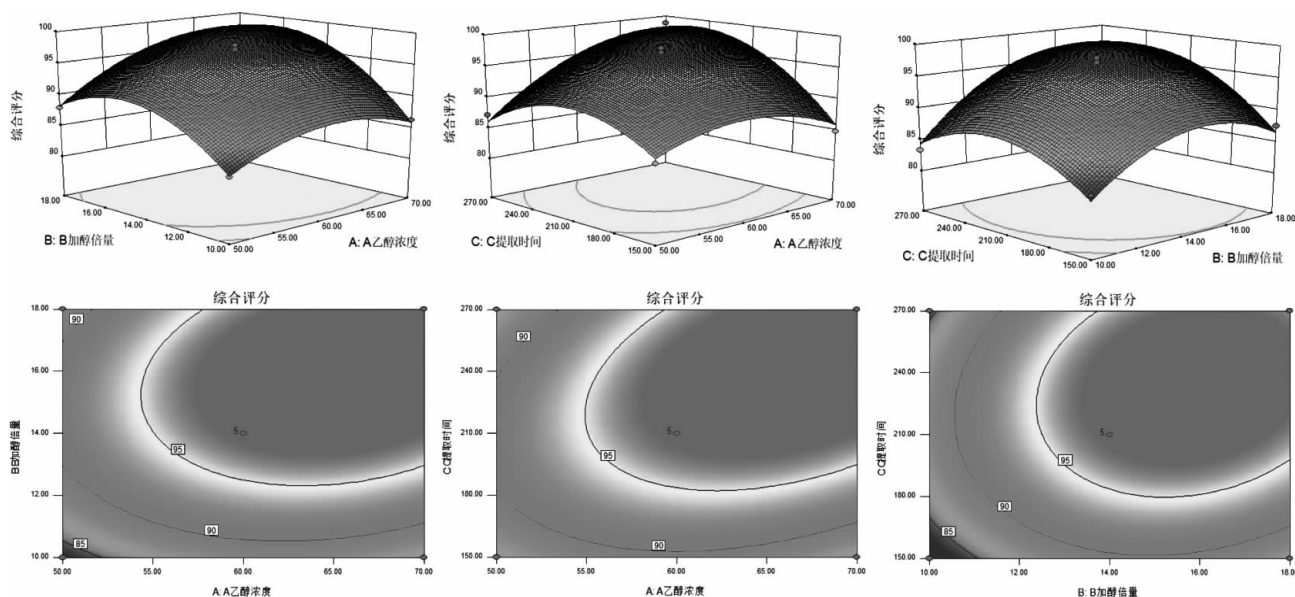


图6 两因素交互作用的响应面图及等高线图

回归分析,得到二次回归方程为 $Y=97.26+2.92A+4.08B+3.00C+1.64AB+3.07AC+1.79BC-3.35A^2-5.17B^2-4.85C^2$, $R^2=0.9857$,对模型进行方差分析,结果见表4。由表4可知,以综合评分为响应值时,该二次方程模型极显著($F=53.75, P<0.0001$),回归方程失拟项无统计学意义($P=0.0880$),表明未知因素对实验结果干扰很小。模型中因素A、B、C、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 有极显著影响($P<0.01$),因素AB、BC有显著影响($P<0.05$)。根据F值可知,各因素对综合评分影响的大小顺序为B(加醇倍量)>C(提取时间)>A(乙醇浓度)。利用模型优化出的最佳方案为采用70%乙醇为溶剂提取2次,第1次加9倍量乙醇提取150 min,第2次加7倍量乙醇提取120 min,综合评分为101.05。

表4 响应面方差分析

方差来源	均方和	自由度	离差平方和	F值	P值
模型	623.16	9	69.24	53.75	<0.0001
A	68.27	1	68.27	53.00	0.0002
B	133.17	1	133.17	103.39	<0.0001
C	72.18	1	72.18	56.04	0.0001
AB	10.79	1	10.79	8.38	0.0232
AC	37.70	1	37.70	29.27	0.0010
BC	12.78	1	12.78	9.92	0.0162
A^2	47.29	1	47.29	36.72	0.0005
B^2	112.72	1	112.72	87.51	<0.0001
C^2	99.10	1	99.10	76.94	<0.0001
残差	9.02	7	1.29		
失拟项	6.98	3	2.33	4.58	0.0880
纯误差	2.03	4	0.51		

响应面分析见图6。由图6可知,因素AB、BC、AC响应曲面均稍陡峭,且AB、BC、AC等高线呈椭圆,表明其交互作用均较强^[13-14];当固定加醇量为16(9,7)倍时,综合评分随着乙醇浓度的增加而升高,到达临界值后减小,且随着乙醇浓度变化稍明显,表明两者交互作用较强;当固定提取时间为270(150、120) min时,综合评分随着乙醇浓度增加而显著升高,到达临界值后减小,且随着乙醇浓度变化明显,表明两者交互作用强;当固定乙醇浓度为70%时,综合评分随着提取时间增加而升高,随后减小,且随着乙醇浓度变化稍明显,表明两者交互作用较强;各因素交互作用强弱依次为AC>BC>AB,与方差分析结果一致。

2.5.4 醇提工艺最佳参数选择与验证 选取响应面最高点对应水平为最佳工艺参数,即乙醇浓度70%、第1次加9倍量乙醇提取150 min,第2次加7倍量乙醇提取120 min。称取醇提处方量饮片3份,按上述最佳工艺条件进行3次平行试验验证。结果见表5。由表5可知,3次验证试验平均综合评分为100.70, RSD为0.45%,与模型预测值(101.05)接近,说明该醇提工艺的准确性与稳定性良好。

表5 验证试验结果

序号	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$	综合评分
1	89.94	68.58	91.89	24.77	100.81
2	91.88	67.89	90.97	24.83	101.09
3	91.04	67.18	90.90	24.64	100.20
均值	90.95	67.88	91.25	24.75	100.70
RSD	1.07%	1.03%	0.61%	0.39%	0.45%

3 讨论

中药复方成分复杂,采用单一指标评价复方的内在质量具有极大的片面性,因此,本试验选择方中多个活性成分的转移率和浸膏得率作为提取工艺的评价指标,符合中药复方多成分多靶点起效的特点。

本试验比较了不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸、乙腈-0.1%磷酸)体系下羟基红花黄色素A与栀子苷的分离情况,结果表明乙腈-0.1%磷酸作为流动相时羟基红花黄色素A与栀子苷分离效果好。采用DAD检测器对羟基红花黄色素A与栀子苷进行全波长扫描,根据两者最大吸收波长及吸收曲线,选择403 nm波长处测定羟基红花黄色素A含量,238 nm波长处测定栀子苷含量。双波长同时检测羟基红花黄色素A与栀子苷,具有操作简便快捷,准确可靠、灵敏度高的特点。

结合文献与预试验结果,固定提取次数为2次,通过单因素试验考察了不同乙醇浓度、不同加醇倍数、不同提取时间对各指标成分的影响,实验结果表明上述3个因素对浸膏得率无明显影响,确定乙醇浓度考察范围为50%~70%,加醇倍量为10~18倍,提取时间为150~270 min。通过单因素试验能合理地安排实验点,减少实验次数,为后续响应面设计提供依据。

Box-Behnken响应面设计是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法,可以建立连续变量曲面模型,对影响因子及其交互作用进行评价,确定最佳水平范围。本试验采用层次分析法与熵权法组合赋权计算综合评分,作为Box-Behnken响应面设计的响应值,既能够将转移率等指标的重要性转化为量化的权重系数,又能够通过熵权法体现样本客观数据信息,消除人为设定量化指标的主观性。采用Box-Behnken响应面设计筛选出的最佳工艺为采用70%乙醇为溶剂提取2次,第1次加9倍量乙醇提取150 min,第2次加7倍量乙醇提取120 min。优化后的提取工艺结果稳定可靠,可为该处方的工业化生产及进一步开发提供重要依据,同时也可今后中药提取工艺响应面设计因素选择提供参考。

参考文献

- [1] PAISEY R B, ABBOTT A, PAISEY C F, et al. Diabetic foot ulcer incidence and survival with improved diabetic foot services: An 18-year study[J]. *Diabetic Medicine*, 2019, 36(11): 1424-1430.
- [2] 汤 洋,简华刚.糖尿病足慢性溃疡的治疗方法新进展[J].*重庆医学*,2019,48(18):3180-3183.
- [3] LIN C J, LAN Y M, OU M Q, et al. Expression of miR-217 and HIF-1 α /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats[J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2019, 42 (11): 1307-1317.
- [4] AO H, FENG W W, PENG C. Hydroxysafflor yellow A: A promising therapeutic agent for a broad spectrum of diseases[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 8259280.
- [5] GAO S Q, CHANG C, LI J J, et al. Co-delivery of deferoxamine and hydroxysafflor yellow A to accelerate diabetic wound healing via enhanced angiogenesis[J]. *Drug Delivery*, 2018, 25(1): 1779-1789.
- [6] MA S L, ZHANG C, ZHANG Z Y, et al. Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR-145-5p[J]. *Artificial Cells*, 2019, 47(1): 2875-2881.
- [7] 柳 兰,李 雅,郭志华,等.Box-Behnken响应面法结合G1-熵权法的理气活血复方浸膏喷雾干燥工艺研究[J].*中草药*,2019,50(11): 2560-2566.
- [8] 依孜提·帕力哈提,马建文,刘 怡,等.Box-Behnken响应面法优化健脾祛湿丸水提工艺[J].*中国中医药信息杂志*,2019,26(5):92-97.
- [9] 陈丽津,汤 浩,石 磊,等.基于信息熵理论的正交设计优化消乳增胶囊的提取工艺[J].*中草药*,2019,50(14):3345-3350.
- [10] 皮凤娟,张庆莲,黄 娟,等.运用信息熵理论优化真方白丸胶囊提取工艺[J].*中国现代中药*,2019,21(2):213-217.
- [11] 易丽娟,邹苏兰,柳 兰,等.基于G1-熵权法和响应面设计优化益气活血方醇提工艺[J].*中国中医药信息杂志*,2019,26(7):73-78.
- [12] 杨 凯,马子豪,李 源,等.Box-Behnken响应面法优化白及多糖/聚乙烯醇湿法纺丝工艺及纤维性能评价[J].*中草药*,2020,51(14):3645-3654.
- [13] 吴振起,高 畅,杨 璐,等.基于层次分析法结合Box-Behnken设计-响应面法优选养阴清肺汤加味提取工艺[J].*中草药*,2019,50(12):2862-2867.
- [14] 刘桂花,王云飞,于 宁,等.基于多指标权重分析和正交设计法优选红颗粒复方提取工艺[J].*中国新药杂志*,2019,28(10):1178-1184.

(本文编辑 苏 维)