

国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 50-53.

[6] 严 婷, 黄方威, 王金钱, 等. 不同厂家复方丹参片物质组溶出度研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 442-447.

[7] 孟 姝, 都述虎, 林玉莲. HPLC 测定利胆片的溶出度[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 123-126.

[8] 陈 刚, 李晓凤, 苏文俏, 等. HPLC 法测定复方苦木消炎片中穿心莲内酯溶出度[J]. 中国药师, 2013, 16(12): 1799-1802.

[9] 宋 英, 陆静冉, 沈 鸣, 等. HPLC 法测定穿心莲滴丸中脱水穿心莲内酯的溶出度[J]. 中成药, 2012, 34(1): 178-180.

[10] 田书霞, 蒋 晔, 郝 福. RP-HPLC 同时测定龙胆泻肝丸中 3 种有效成分的溶出度[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1578-1581.

[11] 周永全, 顾佳莹, 张 宁. 龙胆泻肝丸溶出特性研究[J]. 中成药, 2012, 34(9): 1674-1679.

[12] 李 凯, 樊 鑫. 不同溶出介质对尼莫地平片剂溶出度的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(3): 351-353.

[13] Zhang Y, Huo M R, Zhou J P, et al. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles [J]. APPS J, 2010, 12(3): 263-271.

芪白平肺颗粒中人参和黄芪提取工艺的优化

靳瑞婷^{1,3}, 陶永华^{2,3,4}, 李雪峰^{2,3,4}, 吴 云^{2,3,4}, 王振中^{2,3,4*}, 萧 伟^{2,3,4}
(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000; 2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222047; 3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222047; 4. 中药提取精致新技术重点研究室, 江苏 连云港 222047)

摘要: **目的** 优化芪白平肺颗粒中人参和黄芪的提取工艺。**方法** 在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法, 以乙醇体积分数、药液比、提取时间为自变量, 并通过信息熵法对人参皂苷 Rg₁ + Re、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷的含有量及干膏率进行客观加权。然后, 以综合指标为因变量, 优化实验结果。**结果** 最佳提取条件为 8 倍量 70% 乙醇, 提取 2 次, 每次 2 h。**结论** Box-Behnken 响应面与信息熵的结合可用于优化芪白平肺颗粒的提取工艺。
关键词: 芪白平肺颗粒; 人参; 黄芪; 提取工艺; Box-Behnken 响应面; 信息熵
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)04-0795-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.016

Optimization of the extraction processes of *Panax ginseng* and *Astragalus membranaceus* in Qibai Pingfei Granules

JIN Rui-ting^{1,3}, TAO Yong-hua^{2,3,4}, LI Xue-feng^{2,3,4}, WU Yun^{2,3,4}, WANG Zhen-zhong^{2,3,4*}, XIAO Wei^{2,3,4}
(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047, China; 3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222047, China; 4. The Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Lianyungang 222047, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the exctraxtion processes of *Panax ginseng* and *Astragalus membranaceus* in Qibai Pingfei Granules. **METHODS** Based on single factor experiment, Box-Behnken response surface method was used with ethanol concentration, solvent ratio and extraction time as independent variables. The contents of ginsenoside Rg₁ + Re, ginsenosides Rb₁ and astragaloside A, together with the ratio of dry extraction were objectively weighted by information entropy. Then the test result was optimized with comprehensive index as dependent

收稿日期: 2015-06-25
作者简介: 靳瑞婷 (1989—), 女, 硕士生, 研究方向为中药学。Tel: 15861230373, E-mail: jinruting1407@126.com
* 通信作者: 王振中 (1968—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药新药的研究与开发。Tel: (0518) 811522367, E-mail: kanionlunwen@126.com

variable. **RESULTS** The optimal extraction conditions were 8 – fold 70% ethanol and extracting twice (two hours each time). **CONCLUSION** The combination of Box-Behnken response surface and information entropy can be used for optimizing the extraction process of Qibai Pingfei Granules.

KEY WORDS: Qibai Pingfei Granules; *Panax ginseng*; *Astragalus membranaceus*; extraction process; Box-Behnken response surface; information entropy

芪白平肺颗粒由黄芪、人参、川芎、地龙、五味子、葶苈子和薤白 7 味药材组成，为治疗慢性阻塞性肺疾病（COPD）的临床经验方^[1]，具有益气温阳，化痰散瘀之功效，主治痰瘀阻肺证。通过前期药效预实验筛选，确定黄芪和人参合并用乙醇提取，而其他药味合并用水提取，由于黄芪和人参为该方的君药，故生产过程中控制两者的提取工艺对保证颗粒质量有重要意义。本制剂所含药味较多，为确保药效，选取人参皂苷 Rg₁ + Re、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷及干膏率为考察指标来进行工艺优选，通常是对多指标进行权重后，以综合指标进行考察。目前，权重方法以主观和客观赋权法为主，其中前者由人为决定，实验者根据经验来决定各成分指标的权重系数，主观影响较大，而后者主要有特征向量法、Fisher 线性判别率、模糊理论或粗糙集、信息熵^[1]等，是经过系统试验数据整理、计算分析后，得到权重系数，结果更加客观可靠。利用信息熵计算各指标的权重，可为中药提取工艺多指标的综合评价提供依据^[2]，李四海等^[3]已经将该方法应用于海棠叶总黄酮的提取工艺。

Box-Behnken 效应面法是多因素 3 水平的试验设计，是在 2 水平析因设计的基础上，加以极值点和中心点构成的，可在试验中进行非线性拟合，具有操作简单、试验次数少、精度高、预测性好^[4-8]等优点。本实验在提取溶剂、提取次数、提取时间的单因素试验基础上，选择连续变量提取溶剂、提取时间、溶剂倍数作为自变量，利用 Box-Behnken 效应面法进行二次多项式拟合，根据回归模型来确定最优工艺。

1 仪器、药材和试药

ELSD 2000 蒸发光检测器；Agilent 1260 液相色谱仪；电热恒温水浴锅；BP211D、XP6 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；Kromsial 100-5 C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）。

人参产自黑龙江，黄芪产自山西，均经连云港康缘大药房吴舟药师鉴定为五加科多年生草本植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 和豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var.

mongholicus (Bge. Hsiao) 的干燥根。

人参皂苷 Rg₁（1107303-201128）、人参皂苷 Re（110754-201324）、人参皂苷 Rb₁（110704-201223）、黄芪甲苷（110781-200613）对照品，均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯；氨水、正丁醇等均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 信息熵原理及计算步骤^[9] 熵是信息论中的一个概念，为信号集的平均信息量^[10]，用来度量系统的不确定性和无序性。在多指标综合评价时，信息熵理论将每个评价指标作为 1 个随机变量，计算指标的信息熵，从而给出各个指标的不同权重。

对于一项评价指标，其取值变异程度越大，指标越有序，信息熵越小，其提供的信息量越多，该指标就越重要；反之，该指标就越不重要。而当一个指标以等概率取同一个值时，信息熵最大，说明该指标与评价结果无关。计算步骤如下。

(1) 建立原始评价指标矩阵 $(X_{ij})_{mn}$

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

其中， x_{ij} 表示第 i 次试验时，第 j 个评价指标的取值。

(2) 将原始数据阵 $(X_{ij})_{mn}$ 转换为概率矩阵 $(p_{ij})_{mn}$

在信息熵公式中， P_i 为某个信息的概率，满足 $0 \leq p_i \leq 1$ ，所以需将原始矩阵进行归一化处理，得到指标的概率矩阵。计算公式为 $P_{ij} = \frac{X_{ij}}{\sum_{j=1}^n X_{ij}}$ 。

其中， P_i 表示第 j 次试验在 i 指标下的概率。

(3) 计算信息熵：

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

(4) 计算各指标的权系数

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

由上式可知,当 H_i 越小, W_i 越大,即 X_{ij} 值相差越大时,该指标传递的信息量越多,作用和权重值就越大。

(5) 综合指标的计算:

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

2.2 提取条件的筛选

2.2.1 乙醇体积分数考察 称取人参 238 g、黄芪 794 g, 30%、50%、70%、90% 乙醇为提取溶剂^[11], 料液比 1:8, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 考察乙醇体积分数对黄芪甲苷、人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 及人参皂苷 Rb_1 的影响。结果见图 1。

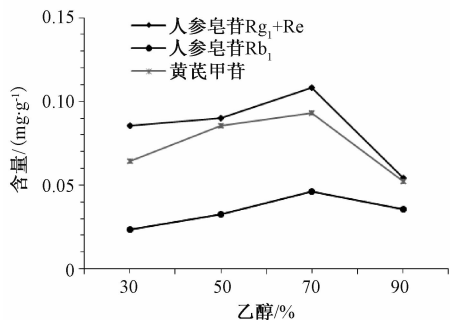


图1 乙醇体积分数对人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的影响

Fig.1 Effects of ethanol content on ginsenoside $Rg_1 + Re$, ginsenosides Rb_1 and astragaloside A

由图可知,随着乙醇体积分数的升高,人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的含有量逐渐增加,当达到 70% 时最高。因此,选择 70% 乙醇作为提取溶剂。

2.2.2 提取次数考察 称取人参 238 g、黄芪 794 g, 70% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1:8, 回流提取 1、2、3、4 次, 每次 2 h, 考察提取次数对黄芪甲苷、人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 及人参皂苷 Rb_1 的影响。结果见图 2。

由图可知,随着提取次数的增加,人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的含有量逐渐增大,但当提取 3 次和 4 次后反而降低。因此,选择提取次数为 2 次。

2.2.3 提取时间考察 称取人参 238 g、黄芪 794 g, 70% 乙醇为提取溶剂, 料液比 1:8, 回流提取 2 次, 每次 1、2、3、4、5 h, 考察提取时间

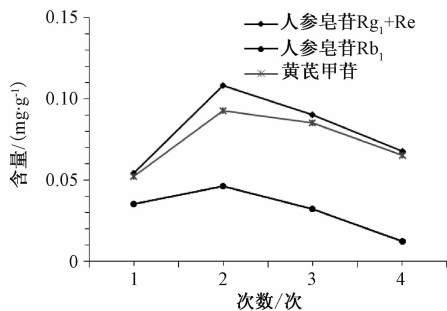


图2 提取次数对人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的影响

Fig.2 Effects of extraction times on ginsenoside $Rg_1 + Re$, ginsenosides Rb_1 and astragaloside A

对人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的影响。结果见图 3。

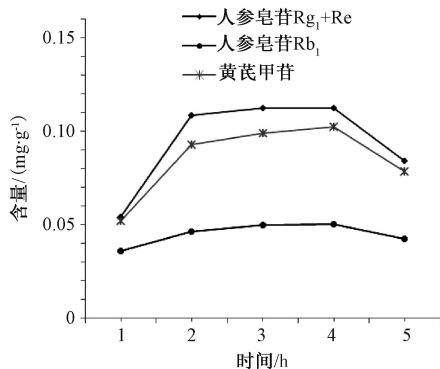


图3 提取时间对人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的影响

Fig.3 Effects of extraction time on ginsenoside $Rg_1 + Re$, ginsenosides Rb_1 and astragaloside A

由图可知,随着提取时间增加,人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的含有量逐渐增大,但当提取 2、3、4 h 后趋于平稳。从节约成本角度考虑,选择 2 h 作为提取时间。

2.2.4 药液比考察 称取人参 238 g、黄芪 794 g, 70% 乙醇为提取溶剂, 药液比为 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14, 回流提取 2 次, 每次 2 h, 考察提取时间对人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的影响。结果见图 4。

由图可知,随着药液比增加,人参皂苷 $Rg_1 + Re$ 、人参皂苷 Rb_1 及黄芪甲苷的含有量逐渐增大,但当达到 10:1 时开始减少。因此,选择药液比为 1:8。

2.3 Box-Behnken 效应面法优化

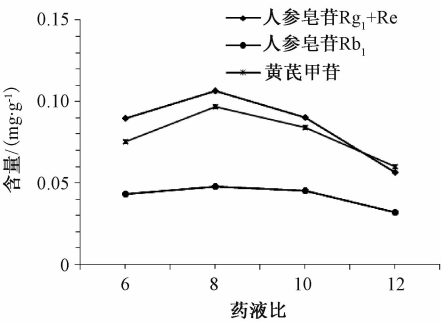


图 4 药液比对人参皂苷 R_{g1} + Re、人参皂苷 R_{b1} 及黄芪甲苷的影响

Fig. 4 Effects of solvent ratio on ginsenoside R_{g1} + Re, ginsenosides R_{b1} and astragaloside A

2.3.1 Box-Behnken 设计 根据单因素试验结果，选取影响人参皂苷 R_{g1} + Re、人参皂苷 R_{b1} 及黄芪

甲苷提取效果显著的因素，即乙醇体积分数、溶剂倍数、提取时间，采用 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面试验设计，共有 17 个试验点，其中析因点 12 个，中心点 5 个。根据信息熵步骤，对所得数据进行计算，得到人参皂苷 R_{g1} + Re、人参皂苷 R_{b1} 及黄芪甲苷的权系数分别为 0.222、0.354、0.383、0.040。因素和水平见表 1，结果见表 2。

表 1 因素和水平
Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	提取时间/h (A)	乙醇体积分数/% (B)	药液比 (C)
-1	1	60	6
0	2	70	8
1	3	80	10

表 2 设计结果
Tab. 2 Design results

编号	提取时间/h	乙醇体积分数/%	药液比	人参皂苷 R _{g1} + Re/(mg·g ⁻¹)	人参皂苷 R _{b1} /(mg·g ⁻¹)	黄芪甲苷/(mg·g ⁻¹)	干膏率/%	综合评分
1	0	-1	-1	0.112 4	0.042 4	0.081 8	25.41	0.060 9
2	0	1	-1	0.101 6	0.042 6	0.082 3	25.52	0.059 9
3	0	0	0	0.129 8	0.049 2	0.095 4	22.80	0.070 1
4	0	-1	1	0.110 2	0.041 4	0.079 7	25.11	0.059 5
5	0	0	0	0.118 1	0.047 9	0.092 8	22.83	0.067 3
6	0	0	0	0.121 2	0.048 3	0.093 6	23.01	0.068 1
7	1	0	1	0.103 1	0.033 7	0.064 3	23.12	0.050 0
8	1	0	-1	0.113 8	0.031 8	0.060 6	26.29	0.049 5
9	-1	0	1	0.104 4	0.032 3	0.061 5	26.49	0.049 0
10	1	-1	0	0.135 6	0.032 6	0.062 1	26.03	0.052 8
11	0	0	0	0.123 7	0.046 6	0.090 2	23.21	0.066 6
12	0	1	1	0.076 5	0.036 2	0.069 4	24.21	0.049 9
13	-1	1	0	0.111 8	0.040 0	0.077 1	25.19	0.058 2
14	-1	-1	0	0.132 2	0.042 3	0.081 6	25.31	0.063 1
15	-1	0	-1	0.115 0	0.041 8	0.080 5	24.11	0.060 4
16	0	0	0	0.123 4	0.046 1	0.089 3	23.10	0.066 0
17	1	1	0	0.113 7	0.031 1	0.059 3	24.41	0.048 6

2.3.2 方差分析 应用 Design-Expert 8.0 软件，对表 2 的数据进行二次多元回归拟合，得回归方程 $Y = 0.068 - 0.003 7A - 0.000 25B - 0.002 8C + 0.000 15AB + 0.003 0AC - 0.002 2BC - 0.008 7A^2 - 0.003 3B^2 - 0.006 8C^2$ ， $R^2 = 0.974 4$ ，说明模型拟合效果较好。同时，方差分析结果显示， $F = 29.68$ ， $P < 0.000 1$ ，表明该模型非常显著；失拟项 $P = 0.297 6$ ，表明不显著，见表 3。

2.3.3 影响因素分析及响应面预测 由表 3 可知，

A、B、C、A²、B²、C² 的 P 值均 < 0.01，表明其对提取工艺的影响非常显著，依次为提取时间 (A) > 药液比 (C) > 乙醇体积分数 (B)；AC、BC 交互项的 P 值均小于 0.05，对提取工艺有显著影响；AB 交互项的 P 值大于 0.05，影响不显著，可以忽略不计。AC、BC 交互响应面曲线见图 5。

通过 Design Expert 8.0.6 软件，计算分析出各因素的最优条件为提取时间 1.74 h，乙醇体积分数 70.5%，药液比 1 : 7.46，综合评分 0.068。结合

单因素结构及生产可行性，将提取时间修正为 2 h，乙醇体积分数为 70%，药液比为 1：8。

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance					
系数项	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.000 885 7	9	0.000 098 4	29.68	<0.000 1
A	0.000 110 0	1	0.000 110 0	33.17	0.000 7
B	0.000 048 3	1	0.000 048 3	14.56	0.006 6
C	0.000 062 2	1	0.000 062 2	18.75	0.003 4
AB	0.000 000 1	1	0.000 000 1	0.03	0.873 2
AC	0.000 035 7	1	0.000 035 7	10.77	0.013 5
BC	0.000 018 9	1	0.000 018 9	5.70	0.048 4
A ²	0.000 315 2	1	0.000 315 2	95.05	<0.000 1
B ²	0.000 046 5	1	0.000 046 5	14.03	0.007 2
C ²	0.000 193 8	1	0.000 193 8	58.43	0.000 1
残差	0.000 023 2	7	0.000 003 3		
失拟误差	0.000 013 1	3	0.000 004 4	1.74	0.297 6
纯误差	0.000 010 1	4	0.000 002 5		
总和	0.000 908 9	16			

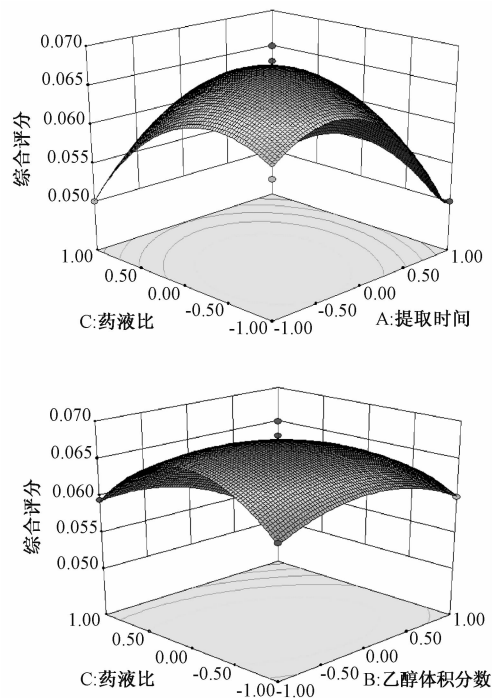


图 5 响应面曲线图
Fig. 5 Response surface curves

2.3.4 工艺验证 按照优选出的最佳工艺，进行 3 次验证试验。取人参 238 g、黄芪 794 g，各 3 份，加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次，每次 2 h，测定各提取液中人参皂苷 R_{g1} + Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷及干膏率，进行加权。结果，平均综合评分为 0.069，与预测值 0.062 相差不大，RSD 为 0.35%，表明在信息熵加权的前提下，该工艺稳定

可行。结果见表 4。

表 4 工艺验证结果

Tab. 4 Process validation results					
编号	人参皂苷 R _{g1} + Re/(mg·g ⁻¹)	人参皂苷 R _{b1} / (mg·g ⁻¹)	黄芪甲苷/ (mg·g ⁻¹)	干膏率/ %	综合 评分
1	0.127 9	0.049 0	0.095 4	23.21	0.069 8
2	0.127 9	0.048 9	0.094 9	22.89	0.069 6
3	0.128 6	0.049 3	0.095 6	22.91	0.070 1

3 讨论

Box-Behnken 中心组合设计是响应面优化方法之一，在受多因素影响的试验中，其通过合理的设计方法进行试验，建立数学模型，从而得到最优组合。此方法较正交试验及均匀设计更全面，充分考虑到各因素之间的相互影响，结果以等高线图和 3D 图呈现，更为可观，二期便于分析。由于其为了提高精密度，在中心点进行重复试验，并在最后能拟合出理想的具体数值，故显示出较大的优势^[12-14]。本实验通过该方法，优选出的最佳提取工艺为 70% 乙醇提取 2 次，每次 2 h。

中药复方制剂的有效成分比较多样，药味之间相互配伍，使得治疗疾病时的作用机制复杂，主要药效物质不明确，故在提取工艺设计时，应保留尽量多的有效成分，选取多指标来优化工艺，评价指标的选择及各指标间的赋权是中药提取工艺研究过程中的两个重要问题。在利用熵权法对中药各指标成分进行权重时，数据具有客观性，清晰反映了指标成分的变化规律。在优化过程中，避免了各指标数据间大数吃小数的问题，绕开了人为主观的影响，但有时会出现主要成分权重较低，优化出的结果不符合药理要求，所以该方法在以后应用过程中应该结合实际，并与主观权重相互结合。

本实验选取了中试小规模来进行模拟实验，对优选出的提取条件进行验证时，人参皂苷 R_{g1} + Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷及干膏率的综合评分均比较稳定。由此说明，信息熵及响应面的结合可用于研究芪白平肺颗粒的提取工艺。

参考文献:

- [1] Li Q, Wei W, Xiao F C, et al. Evaluation of disintegrating time of rapidly disintegrating tablets by a paddle method[J]. Pharm Dev Technol, 2006, 11(3): 295-301.
- [2] 李四海, 高建德, 陈建国, 等. 熵权法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 23(18): 56-58.
- [3] 张少艳. 信息熵在教学质量分析中的应用[J]. 红河学院学报, 2007, 5(2): 77-79.

[4]

周绍春, 王志萍, 邓家刚, 等. 星点设计-效应面法优选解酒泡腾片的提取工艺[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 1819-1821.

[5]

黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 28-31.

[6]

吕惠卿, 温成平, 谢志军, 等. 二次回归正交旋转组合设计优化绵萆薢多糖提取工艺[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2918-2921.

[7]

薛彦朝, 常美玲, 粘立军, 等. 正交试验优选参芪颗粒干法制粒工艺[J]. 中国药房, 2012, 23(31): 2915-2917.

[8]

周 欣, 陈华国, 黄志金, 等. 响应面法优选虎耳草抗前列腺癌活性部位提取工艺[J]. 中草药, 2013, 44(13): 1768-1773.

[9]

吴 璐, 杨华生. 基于信息熵理论的中药提取工艺优选

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 29-31.

[10]

张 东, 张 宁. 物理学中的熵理论及其应用研究[J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2007, 21(1): 4-8.

[11]

王耀文, 孟宪生, 包永睿, 等. 人参提取工艺的优化及有效成分与药效学相关性分析[J]. 中成药, 2012, 11(34): 2240-2242.

[12]

葛 庆, 范茜茜, 彭翠香, 等. 星点设计-响应面法优化续断总皂苷提取工艺[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(11): 2395-2399.

[13]

蒋剑平, 许海顺, 卢烨琳, 等. 响应面分析法优化白花蛇舌草水溶性多糖的提取工艺[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(2): 187-191.

[14]

王 博, 任晓文, 李洪起, 等. 星点设计-效应面法优化银杏酮酯包合物的制备工艺[J]. 中草药, 2011, 42(2): 262-265.