

层次分析-指标相关性赋权系数法赋权的响应面法优化黄芩提取工艺及其抗炎活性研究

黄钰芳^{1,2,3}, 陈亚明¹, 曹 瑞^{2,3}, 郭亚菲², 曹 强², 杨成刚²

(1 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000; 2 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000;

3 西北中藏药省部共建协同创新中心, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 确定指标权重, 优化黄芩中黄酮类成分的超声提取工艺, 并分析其体外抗炎活性。**方法:** 在单因素实验基础上, 选择乙醇浓度(A)、超声时间(B)、超声温度(C)及料液比(D)为考察因素, 以黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素为考察指标, 采用层次分析-指标相关性赋权系数法(AHP-CRITIC)确定各指标权重系数, 结合响应面法拟合多元二项式, 绘制三维图, 选择最佳提取工艺; 同时利用 MTT 法和 Griess 法评估黄芩提取物的体外抗炎活性。**结果:** 黄芩中黄酮类成分的最佳提取条件为: 乙醇浓度 62.73%、超声时间 32.23 min、超声温度 51.15 °C、料液比 1:16.12。3 批验证样品的 AHP-CRITIC 综合评分平均值为 85.28, 与理论预测值的 RSD 为 0.50%。MTT 法结果表明黄芩提取物浓度 >400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞活力显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 黄芩提取物浓度为 50 ~ 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 可显著抑制 RAW264.7 炎性细胞一氧化氮(NO)的释放 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 该方法稳定可靠, 可用于黄芩中黄酮类成分的提取, 其超声提取物具有一定的体外抗炎活性。

[关键词] 黄芩; 黄芩苷; 响应面; 层次分析-指标相关性赋权系数法; 抗炎活性; 工艺优化

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)13-1377-08

Optimization of extraction process of *Scutellaria baicalensis* Georgi by response surface methodology based on AHP-CRITIC weight assignment method and research on its anti-inflammatory activity

HUANG Yu-fang^{1,2,3}, CHEN Ya-ming¹, CAO Rui^{2,3}, GUO Ya-fei², CAO Qiang², YANG Cheng-gang²

(1 Dunhuang Key Laboratory of Medicine, Ministry of Education, Lanzhou 730000, China; 2 College of

Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3 Northwest Collaborative

Innovation Center for Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the index weight coefficient, optimize the ultrasonic extraction process of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgi and analyze its anti-inflammatory activity *in vitro*. **Methods:** On the basis of single factor test, ethanol concentration (A), ultrasonic time (B), ultrasonic temperature (C) and material-to-liquid ratio (D) were selected as the investigation factors. Taking baicalin, wogonin, baicalein and wogonin as the inspection indicators, the AHP-CRITIC mixed weighting method was used to determine the weight coefficients of each index, multivariate binomial was fitted combined with the response surface method, a three-dimensional graph was drawn, and the best extraction process was chosen. At the same time, the MTT method and Griess method were used to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory activity of the ultrasonic extraction of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Results:** The optimal extraction conditions for flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgi were as follows: ethanol concentration of 62.73%, ultrasonic time of 32.23 min, ultrasonic temperature of 51.15 °C, and material-

[基金项目] 甘肃省中医药管理局科研基金项目 (GZK-2019-20); 敦煌医学与转化教育部重点实验室开放课题项目 (DHYX20-13)

[作者简介] 黄钰芳, 女, 博士, 主要从事中药物物质基础及质量控制研究。联系电话: (0931)5161169, E-mail: 1049395950@qq.com。

to-liquid ratio of 1:16.12. The average AHP-CRITIC comprehensive score of three batches of verification samples was 85.28, and the RSD with the theoretical prediction value was 0.50%. The results of MTT method showed that when the concentration of *Scutellaria baicalensis* Georgi extraction was greater than $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the cell viability decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). When the concentration of *Scutellaria baicalensis* Georgi extraction was $50 \sim 350 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the release of NO in RAW264.7 inflammatory cells was significantly inhibited ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The method is stable and reliable and can be used for the extraction of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi, and the ultrasonic extract has strong anti-inflammatory activity *in vitro*.

[Key words] *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalin; response surface; AHP-CRITIC; anti-inflammatory activity; process optimization

黄芩,最早记载于《神农本草经》,为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根^[1],其性寒味苦,临床主要用于肺热咳嗽、血热出血及湿热证等的治疗^[2]。现代药理学研究表明,黄芩具有解热、抗炎、抗病毒、抗氧化及抗肿瘤等药理活性,而其药效物质基础多集中在黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素等黄酮类成分^[3]。

目前,黄芩中黄酮类成分的提取方法已有报道:许继艳等^[4]利用正交实验设计优化了黄芩中总黄酮的提取工艺;李容等^[5]和李欧等^[6]均以黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷及汉黄芩素4种成分的总评“归一化”值作为评价指标,采用星点设计-响应面法优选了黄芩中黄酮类化合物的提取工艺。本研究也以黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷及汉黄芩素4种成分作为评价指标,同样采用响应面法优化黄芩中黄酮类成分的提取工艺,在此基础上将层次分析-指标相关性赋权系数法(AHP-CRITIC)应用于实验设计,以主观分析结合客观运算得到考察指标的综合评分,利用响应曲面法优选出黄芩中黄酮类成分的最佳提取工艺,同时评价了黄芩提取物的体外抗炎活性。

材 料

1 药材与试剂

黄芩药材购自甘肃复兴厚生物医药科技有限公司,经甘肃中医药大学王明伟副教授鉴定为唇形科植物黄芩的干燥根;黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为: MUST-21041824, MUST-21031225, MUST-21010724, MUST-20122812); RAW264.7 细胞株及专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号: WXAKX9OB0N, XH01112107XP); NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号: 20210731); 脂多糖(LPS, Solarbio 公司,批号: 513E038); MTT(Solarbio

公司,批号:1223G0539,纯度 $\geq 98.0\%$); DMSO(Solarbio 公司,批号:1121E0321,ACS 级); 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2 ~ 7.6, 博士德生物公司,批号: 16113B30)。

2 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); A224S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); SB25-12DTD 超声仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 371 型二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司); HR1500-II A2 型生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司); BCD-478W 型无霜冷藏冷冻箱(博西华家用电器有限公司); IX53 + DP73 型研究级倒置荧光显微镜(Olympus 公司); EPOCH 酶标仪(BioTek Instruments Inc.); Countstar IC-1000 型细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司)。

方法与结果

1 指标成分的含量测定

1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent HC-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液(47:53), 流速: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温箱: 30 °C, 进样量: 10 μL, 检测波长: 280 nm。

1.2 供试品溶液的制备 精密称取黄芩粉末 0.5 g, 根据实验设计超声提取, 滤液用相应浓度乙醇定容至 100 mL, 精密量取 1.5 mL, 用同一浓度乙醇定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素对照品 8.5, 9.0, 7.8 和 9.4 mg, 甲醇定容至 10 mL。精密吸取 4 种对照品溶液各 1.5 mL 至 10 mL 容量瓶, 甲醇定容后得到浓度分别为 0.127 5, 0.135 0, 0.117 0 和 0.141 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

1.4 线性关系考察 分别精密吸取 0.10, 0.50,

1.00, 2.00 及 4.00 mL 混合对照品溶液至 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容摇匀后, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液以“1.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积。以进样量为自变量, 峰面积为应变量绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 指标性成分的回归方程和线性范围

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围/ μg |
|------|------------------------------------|---------|---------------------|
| 黄芩苷 | $Y = 3.0 \times 10^9 X + 6\ 335.7$ | 0.999 2 | 0.001 3 ~ 1.275 0 |
| 汉黄芩苷 | $Y = 3.0 \times 10^9 X - 13\ 372$ | 0.999 8 | 0.001 4 ~ 1.350 0 |
| 黄芩素 | $Y = 7.0 \times 10^9 X + 48\ 240$ | 0.999 3 | 0.001 2 ~ 1.170 0 |
| 汉黄芩素 | $Y = 6.0 \times 10^9 X - 11\ 001$ | 0.999 9 | 0.001 4 ~ 1.410 0 |

1.5 精密度实验 取混合对照溶液, 以“1.1”项色谱条件连续进样 6 次, 测得黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.12%, 0.14%, 0.11% 和 0.14%, 表明仪器精密度良好。

1.6 稳定性实验 取样品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 以“1.1”项色谱条件进样测定, 测得黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.53%, 2.55%, 2.01% 和 0.53%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.7 重复性实验 精密称取黄芩粉末 5 份, 以“1.2”项下条件制备样品溶液, 以“1.1”项色谱条件进样测定, 计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.11%, 0.11%, 0.65% 和 0.56%, 表明该方法重复性良好。

1.8 加样回收实验 精密称取已知含量的黄芩粉末 6 份, 每份约 0.1 g, 加黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素对照品适量, 以“1.2”项下条件制备样品溶液, 以“1.1”项色谱条件进样测定, 计算以上 4 种成分的平均回收率为 96.65%, 98.12%, 98.17% 和

96.76%, RSD 分别为 2.11%, 2.33%, 2.09% 和 3.10%。

2 单因素实验

分别精密称取黄芩粉末 0.5 g ($n = 3$), 考察乙醇浓度 (35%, 45%, 55%, 65%, 75%)、超声时间 (20, 25, 30, 35, 40 min)、超声温度 (40 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 70 $^{\circ}\text{C}$, 80 $^{\circ}\text{C}$) 及料液比 (1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30) 对黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素 4 种成分提取效率的影响, 最终确定各考察因素的水平取值为: 乙醇浓度 45%, 55% 和 65%; 超声时间 25, 30 及 35 min; 超声温度 50 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$ 及 70 $^{\circ}\text{C}$; 料液比为 1:15, 1:20 和 1:25。

3 评价指标综合权重及综合评分的确定

采用 AHP-CRITIC 法确定各评价指标的综合权重 ($\omega_{\text{综合}}$), 进而得到黄芩苷 (I)、汉黄芩苷 (II)、黄芩素 (III) 及汉黄芩素 (IV) 4 种成分的综合评分。计算过程见式 (1) 和式 (2)。

$$\omega_{\text{综合}} = \omega_{\text{IAHP}} \times \omega_{\text{JCRITIC}} / \sum \omega_{\text{IAHP}} \times \omega_{\text{JCRITIC}} \quad \text{式(1)}$$

$$\text{综合评分} = \left(\frac{\text{I 实测值}}{\text{I 最大值}} \times \omega_{\text{I 综合}} + \frac{\text{II 实测值}}{\text{II 最大值}} \times \omega_{\text{II 综合}} + \frac{\text{III 实测值}}{\text{III 最大值}} \times \omega_{\text{III 综合}} + \frac{\text{IV 实测值}}{\text{IV 最大值}} \times \omega_{\text{IV 综合}} \right) \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式 (1) 中 ω_{IAHP} 和 ω_{JCRITIC} 分别代表层次分析 (AHP) 法及指标相关性赋权系数 (CRITIC) 法中各评价指标的权重系数; 式 (2) 中 I, II, III 及 IV 分别代表黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的含量测定值。

3.1 AHP 法中各评价指标权重系数的确定 根据近年来对黄芩中黄酮类成分及其药理活性的研究^[7-9], 采用 1~9 标度法^[10] 对黄芩中的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素进行两两比较排序, 构建判断矩阵, 依据式 (3) 和式 (4) 分别计算出各评价指标的初始权重系数 (ω_i) 和归一化权重系数 (ω_{IAHP})。判断矩阵及各指标权重计算结果见表 2。

表 2 评价指标成对比较判断矩阵及其权重系数

| 评价指标 | 黄芩苷 | 汉黄芩苷 | 黄芩素 | 汉黄芩素 | ω_i | ω_{IAHP} |
|------|-----|------|-----|------|------------|------------------------|
| 黄芩苷 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2.059 8 | 0.455 0 |
| 汉黄芩苷 | 1/3 | 1 | 1/2 | 1 | 0.638 9 | 0.141 1 |
| 黄芩素 | 1/2 | 2 | 1 | 2 | 1.189 2 | 0.262 7 |
| 汉黄芩素 | 1/3 | 1 | 1/2 | 1 | 0.638 9 | 0.141 1 |

$$\omega_i = \sqrt[m]{a_{i1} a_{i2} \cdots a_{im}} \quad \text{式(3)}$$

$$\omega_{\text{IAHP}} = \frac{\omega_i}{\sum_{n=1}^m \omega_i} \quad \text{式(4)}$$

为了检验判断矩阵是否满足完全一致性, 需要将一致性指标 (CI) 与平均随机一致性指标 (RI) 以式 (5) 进行比较, 若一致性比率 (CR) ≤ 0.10 , 则认

为判断矩阵具有完全一致性。

$$CR = CI/RI \quad \text{式(5)}$$

$$CI = \frac{\lambda_{\max} - m}{m - 1} \quad \text{式(6)}$$

$$\lambda_{\max} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \left(\sum_{j=1}^m a_{ij} \times \omega_{jAHP} / \omega_{iAHP} \right) \quad \text{式(7)}$$

式中 λ_{\max} 为判断矩阵的最大特征值; m 为受检验层次的次目标数。经 MATLAB 7.11 软件计算得表 2 判断矩阵的 λ_{\max} 为 4.010 4, CI 为 0.003 5, CR 为 0.003 9, $CR \leq 0.10$, 表明该判断矩阵满足完全一

致性要求。

3.2 CRITIC 法中各评价指标权重系数的确定

因黄芩中不同黄酮类成分的含量差异较大,故首先对响应面实验中的测定结果(见表 3)进行无量纲化处理,并利用 MATLAB 7.11 软件对处理后的数据进行稳定性预测检验。数据无量纲化处理方法及稳定性预检结果分别见式(8)和图 1。

$$\text{指标成分} = \frac{\text{实测值} - \text{最小值}}{\text{最大值} - \text{最小值}} \quad \text{式(8)}$$

表 3 Box-Behnken 实验设计及结果

| 实验 编号 | 乙醇浓度 /% | 超声时间 /min | 超声温度 /℃ | 料液比 | 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ | | | | 综合评分 |
|----------|------------|--------------|------------|-----|-------------------------------------|-------|------|------|----------|
| | | | | | 黄芩苷 | 汉黄芩苷 | 黄芩素 | 汉黄芩素 | |
| 1 | 65 | 30 | 60 | 25 | 158.57 | 32.45 | 6.61 | 2.15 | 82.091 7 |
| 2 | 55 | 30 | 70 | 15 | 159.82 | 33.26 | 6.92 | 2.59 | 85.486 7 |
| 3 | 65 | 30 | 50 | 20 | 163.81 | 35.01 | 7.10 | 2.34 | 86.604 4 |
| 4 | 55 | 25 | 50 | 20 | 164.95 | 34.41 | 4.75 | 2.41 | 79.421 1 |
| 5 | 55 | 30 | 60 | 20 | 171.94 | 35.71 | 6.64 | 2.72 | 89.068 7 |
| 6 | 55 | 35 | 60 | 15 | 152.22 | 31.59 | 6.51 | 2.18 | 79.945 1 |
| 7 | 45 | 30 | 50 | 20 | 168.41 | 36.06 | 7.85 | 3.06 | 93.550 1 |
| 8 | 55 | 30 | 60 | 20 | 170.48 | 35.79 | 5.63 | 2.91 | 86.219 4 |
| 9 | 45 | 30 | 60 | 15 | 154.03 | 32.14 | 4.66 | 2.25 | 74.890 2 |
| 10 | 55 | 30 | 50 | 25 | 163.01 | 34.86 | 6.00 | 2.58 | 83.781 7 |
| 11 | 55 | 35 | 50 | 20 | 164.33 | 35.24 | 5.71 | 2.33 | 82.269 4 |
| 12 | 55 | 25 | 60 | 25 | 157.24 | 34.16 | 5.72 | 2.22 | 79.637 0 |
| 13 | 65 | 30 | 70 | 20 | 178.05 | 37.44 | 6.90 | 2.60 | 91.546 1 |
| 14 | 65 | 25 | 60 | 20 | 167.19 | 33.86 | 7.65 | 2.39 | 89.166 0 |
| 15 | 55 | 25 | 70 | 20 | 162.15 | 33.05 | 6.68 | 2.29 | 84.029 6 |
| 16 | 55 | 30 | 60 | 20 | 172.00 | 35.71 | 6.62 | 2.72 | 89.020 0 |
| 17 | 55 | 30 | 70 | 25 | 156.64 | 33.39 | 3.51 | 2.21 | 72.060 4 |
| 18 | 55 | 30 | 60 | 20 | 177.13 | 32.17 | 6.63 | 2.11 | 86.878 9 |
| 19 | 45 | 25 | 60 | 20 | 158.84 | 32.69 | 4.89 | 2.17 | 76.748 9 |
| 20 | 65 | 35 | 60 | 20 | 165.12 | 34.68 | 4.59 | 2.25 | 78.363 1 |
| 21 | 45 | 35 | 60 | 20 | 162.02 | 34.71 | 6.31 | 2.37 | 83.606 3 |
| 22 | 45 | 30 | 60 | 25 | 167.01 | 34.24 | 6.14 | 2.30 | 83.966 6 |
| 23 | 45 | 30 | 70 | 20 | 158.73 | 33.39 | 4.48 | 2.13 | 75.427 9 |
| 24 | 55 | 35 | 70 | 20 | 161.18 | 33.21 | 3.40 | 2.49 | 74.028 8 |
| 25 | 55 | 30 | 50 | 15 | 166.94 | 35.47 | 5.27 | 2.33 | 81.610 1 |
| 26 | 55 | 35 | 60 | 25 | 165.17 | 34.31 | 5.12 | 2.15 | 79.571 0 |
| 27 | 55 | 25 | 60 | 15 | 173.00 | 36.16 | 5.71 | 2.28 | 84.647 8 |
| 28 | 55 | 30 | 60 | 20 | 175.02 | 35.49 | 5.66 | 2.43 | 85.455 9 |
| 29 | 65 | 30 | 60 | 15 | 171.07 | 38.33 | 8.69 | 3.18 | 98.131 3 |

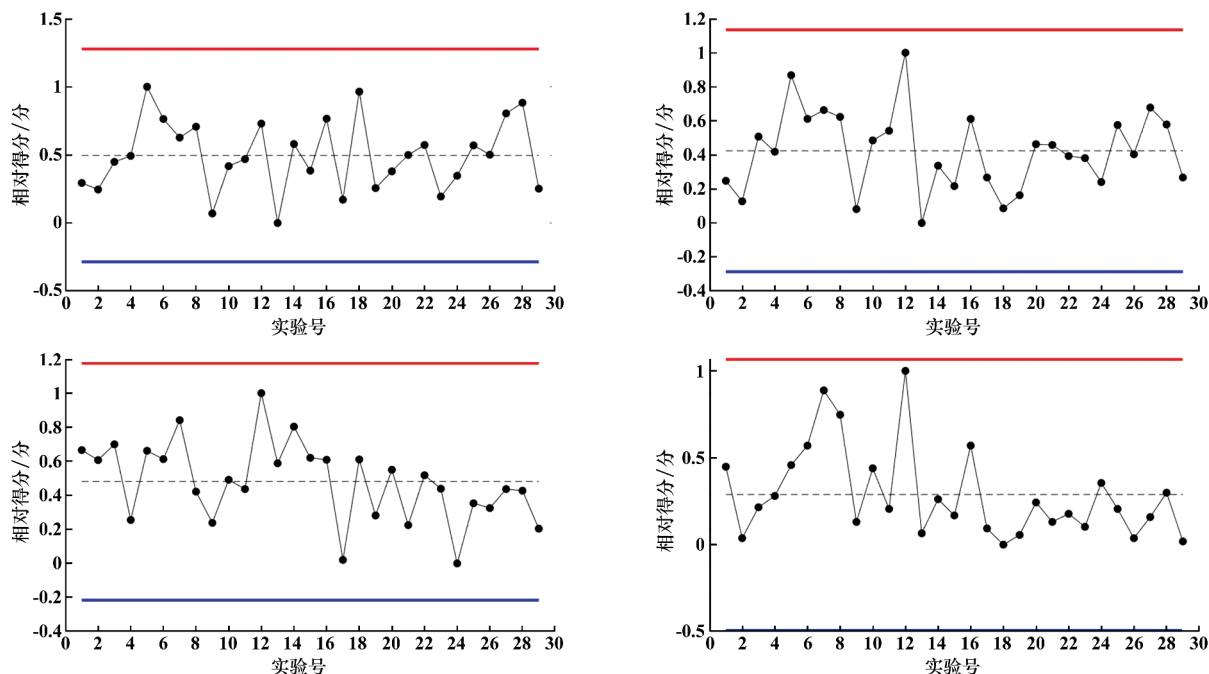


图1 无量纲化数据稳定性预检结果

由图1可知,所有数据均分布在 $\pm 3\bar{x}$ 范围内,呈正态分布趋势,说明实验方法合理,实验条件稳定,得到的所有实验数据稳定可靠,可进行后续运算处理。

利用 MATLAB 7.11 软件将无量纲化数据进行评价指标间的标准差(σ_j)及相关系数(r_{ij})的运算,利用式(9)~式(11)得到各指标的初始权重系数(C_j)和归一化权重系数($\omega_{j\text{CRITIC}}$)。相关数据见表4。

$$C_j = \sigma_j \times R_j \quad \text{式(9)}$$

$$R_j = \sum_{i=1}^n (1 - r_{ij}) \quad \text{式(10)}$$

$$\omega_{j\text{CRITIC}} = C_j / \sum_{j=1}^n C_j \quad (n \text{ 为所有指标的数量}) \quad \text{式(11)}$$

表4 CRITIC法中指标权重的相关数据

| 评价指标 | σ_j | C_j | $\omega_{j\text{CRITIC}}$ |
|------|------------|---------|---------------------------|
| 黄芩苷 | 0.260 4 | 0.386 4 | 0.273 3 |
| 汉黄芩苷 | 0.236 8 | 0.288 1 | 0.203 8 |
| 黄芩素 | 0.232 1 | 0.394 9 | 0.279 3 |
| 汉黄芩素 | 0.259 8 | 0.344 5 | 0.243 6 |

将 AHP 和 CRITIC 法中分别得到的各指标权重系数(ω_{AHP} 和 $\omega_{j\text{CRITIC}}$)代入式(1),得到黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的综合权重系数分别为:0.476 7,0.110 2,0.281 3及0.131 8,将其代入式(2),计算评价指标的综合评分。

4 响应面法优化黄芩中黄酮类成分的提取工艺

4.1 响应面实验设计及其结果 以单因素实验结果为基础,选择乙醇浓度(A)、超声时间(B)、超声温度(C)及料液比(D)为考察因素,利用 Design-Expert 12.0 软件中 Box-Behnken 响应面法考察各因素间的交互作用对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素提取效率的影响,并进行加权计算,最终得到评价指标的综合得分,结果见表3。

4.2 回归模型显著性检验及方差分析 通过 Design-Expert 12.0 软件对表3中的实验结果进行回归模型的拟合,得到综合评分对考察因素自变量 A, B, C, D 的回归方程:综合评分 = 87.33 + 3.14A - 1.32B - 2.05C - 1.97D - 4.42AB + 5.77AC - 6.28AD - 3.21BC + 1.16BD - 3.90CD + 0.573 1A² - 4.76B² - 2.46C² - 2.96D²,说明各因素对综合评分响应值的影响并不是简单的线性关系。二次回归模型的显著性检验及方差分析结果见表5。由表5可知,回归模型 $F = 11.10, P < 0.000 1$,说明该模型显著性良好;失拟项 $F = 2.68, P > 0.05$,表明此模型拟合度较高,能准确反映考察因素与响应值的关系,故可在实验设计范围内对实验结果进行预测;依据 P 值大小可知,4种考察因素对黄芩中黄酮类成分提取效率的影响大小依次为: $A > C > D > B$ 。通过 Design-Expert 12.0 软件得到响应曲面图,用于反映考察因素间交互作用的强弱,进而确定最佳提取工

艺条件。从图 2 可直观看出,乙醇浓度分别与超声时间、超声温度及料液比的交互作用三维图(AB, AC 和 AD),超声时间与超声温度的三维图(BC)以

及超声温度与料液比的三维图(CD)坡度更陡,说明以上 5 种交互效应显著($P < 0.05$)。

表 5 回归模型显著性检验及方差分析

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|----------|-----|--------|---------|----------|-----|
| 模型 | 926.02 | 14 | 66.14 | 11.10 | <0.000 1 | b |
| A-乙醇浓度 | 118.52 | 1 | 118.52 | 19.89 | 0.000 5 | b |
| B-超声时间 | 20.98 | 1 | 20.98 | 3.52 | 0.081 6 | |
| C-超声温度 | 50.67 | 1 | 50.67 | 8.50 | 0.011 3 | a |
| D-液料比 | 46.42 | 1 | 46.42 | 7.79 | 0.014 4 | a |
| AB | 77.97 | 1 | 77.97 | 13.09 | 0.002 8 | b |
| AC | 132.99 | 1 | 132.99 | 22.32 | 0.000 3 | b |
| AD | 157.70 | 1 | 157.70 | 26.47 | 0.000 1 | b |
| BC | 41.27 | 1 | 41.27 | 6.93 | 0.019 7 | a |
| BD | 5.37 | 1 | 5.37 | 0.902 2 | 0.358 3 | |
| CD | 60.82 | 1 | 60.82 | 10.21 | 0.006 5 | b |
| A ² | 2.13 | 1 | 2.13 | 0.357 6 | 0.559 4 | |
| B ² | 146.92 | 1 | 146.92 | 24.66 | 0.000 2 | b |
| C ² | 39.30 | 1 | 39.30 | 6.60 | 0.022 3 | a |
| D ² | 56.87 | 1 | 56.87 | 9.55 | 0.008 0 | b |
| 残差 | 83.40 | 14 | 5.96 | | | |
| 失拟值 | 72.57 | 10 | 7.26 | 2.68 | 0.177 2 | |
| 纯误差 | 10.83 | 4 | 2.71 | | | |
| 总离差 | 1 009.43 | 28 | | | | |

$R^2 = 0.917 4$; a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

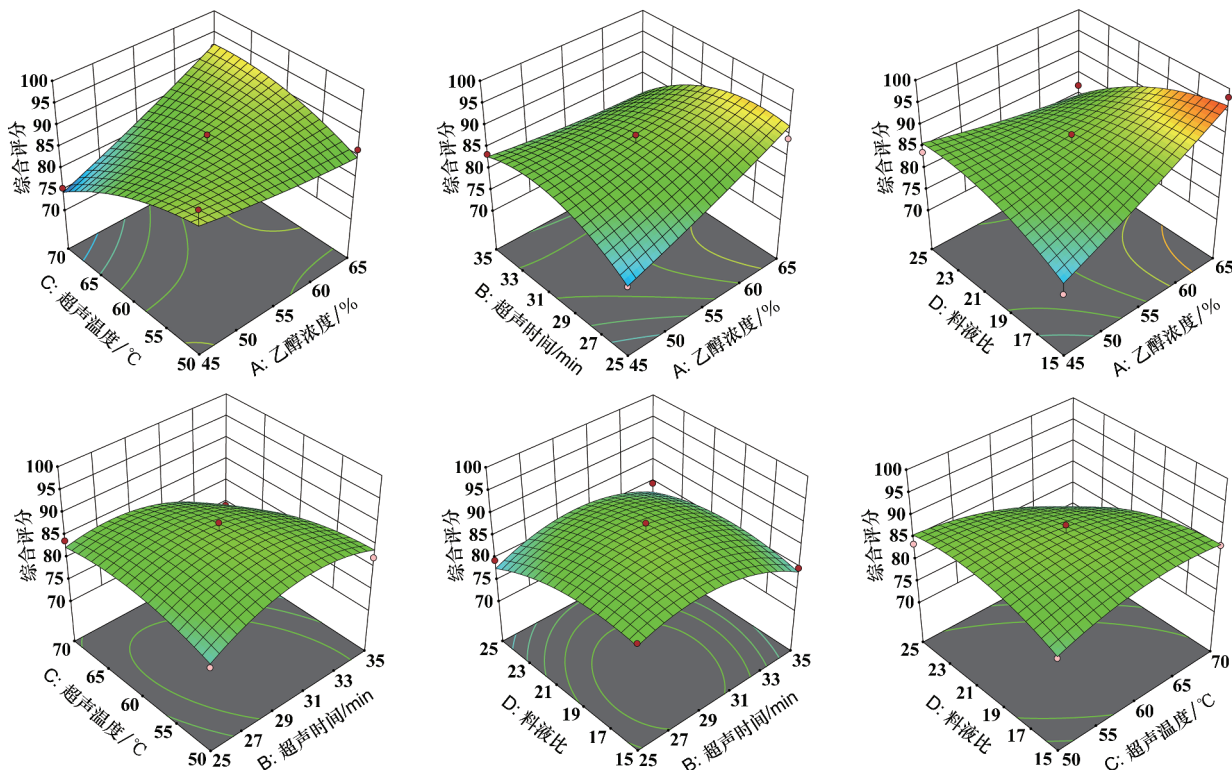


图 2 3D 响应面图

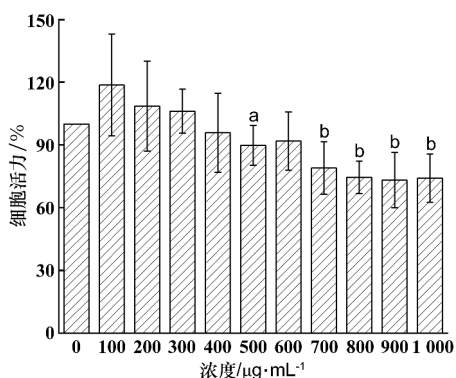
4.3 验证性实验 根据模型拟合结果,预测黄芩中黄酮类成分的最佳提取工艺条件为:乙醇浓度 62.73%、超声时间 32.23 min、超声温度 51.15 °C、料液比 1:16.12,综合得分 84.68。考虑实际操作,将最佳提取条件调整为:乙醇浓度 62%、超声时间 32 min、超声温度 51 °C、料液比 1:16。根据最佳提取条件进行 3 次验证实验,得到综合评分的平均值为 85.28,与理论预测值的 RSD 为 0.50%,表明该模型预测结果良好。

5 黄芩提取物的体外抗炎活性

5.1 黄芩提取物对 RAW264.7 细胞活性的影响

收集对数生长期 RAW264.7 细胞,进行细胞计数,加入完全培养基使细胞密度为 $1 \sim 2 \times 10^5$ 个 \cdot mL $^{-1}$,每孔 200 μ L 接种于 96 孔板中。实验分为空白组、正常组、不同浓度黄芩提取物组。空白组:无细胞;正常组:不加黄芩提取物;不同浓度黄芩提取物组:加终浓度梯度为 100,200,300,400,500,600,700,800,900,1 000 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的黄芩提取物。每组处理重复 3 孔,在 37 °C,5% CO $_2$ 培养箱中培养过夜。取细胞上清液,按照 MTT 方法检测细胞活性。

由图 3 可知,当黄芩提取物终浓度 ≤ 400 μ g \cdot mL $^{-1}$ 时,细胞活力均在 100% 以上,且与空白组无明显差异;当终浓度 ≥ 500 μ g \cdot mL $^{-1}$ 时,与空白组相比,细胞活力显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。细胞活力实验结果表明,后续实验中可选取 400 μ g \cdot mL $^{-1}$ 及以下黄芩提取物浓度开展实验。



与空白组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

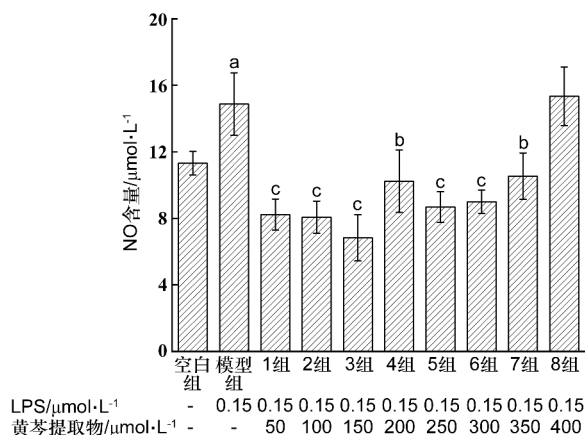
图 3 不同浓度黄芩提取物对 RAW264.7 细胞活性的影响 ($n = 3$)

5.2 黄芩提取物对 RAW264.7 炎性模型 NO 分泌量的影响

收集对数生长期 RAW264.7 细胞,进行细胞计数,加入完全培养基使细胞密度为 $1 \sim 2 \times$

10^5 个 \cdot mL $^{-1}$,每孔 200 μ L 接种于 96 孔板中。实验分为空白组、正常组、模型组及不同浓度黄芩提取物组。空白组:无细胞;正常组:不加 LPS 和黄芩提取物;模型组:加 LPS 至终浓度 0.15 μ g \cdot mL $^{-1}$ 且不加黄芩提取物;不同浓度黄芩提取物组:加 LPS 至终浓度 0.15 μ g \cdot mL $^{-1}$ 和黄芩提取物终浓度梯度为 50,100,150,200,250,300,350,400 μ g \cdot mL $^{-1}$ 。每组处理重复 3 孔。在 37 °C,5% CO $_2$ 培养箱中培养 24 h 后,收集上清液,按照 NO 试剂盒方法检测 NO 分泌量。

由图 4 可知,与空白组相比,模型组 NO 含量显著升高 ($P < 0.05$),说明 RAW264.7 炎性模型建模成功。当黄芩提取物终浓度为 50 ~ 350 μ g \cdot mL $^{-1}$ 时,与模型组相比,NO 释放量显著受到抑制 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明在此浓度范围内,黄芩提取物对 RAW264.7 炎性细胞具有一定的抗炎效果。



与空白组相比, a: $P < 0.05$; 与模型组相比, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$

图 4 不同浓度黄芩提取物对 RAW264.7 炎性模型 NO 分泌量的影响 ($n = 3$)

讨论

响应曲面法能够满足多指标的同步优化,且对工艺参数的预测精密度较高^[11]。本实验选用 Box-Behnken 响应曲面法建立了多元二次回归模型,拟合了乙醇浓度、超声时间、超声温度及料液比等因素与各指标综合评分间的函数关系,预测了黄芩中黄酮类成分的最佳超声工艺参数,验证实验得到了黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素的综合得分为 85.28,其提取率分别为 16.13%,3.38%,0.70% 和 0.26%,与李容等^[12]筛选的回流提取工艺验证结果

(提取率分别为 12.53%、2.77%、0.66% 和 0.25%) 相比,4 种成分的提取率均有所增加,且验证结果与理论预测值的 RSD 为 0.50%,证实了本研究所建模型可信度较高、方法稳定可行,能为黄芩的有效利用提供参考。之前对黄芩药理活性与物质基础的研究多集中在黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素等成分^[13-15],故本实验中也选择了以上 4 种成分作为优选黄芩中黄酮类成分提取工艺的评价指标。但随着黄芩中黄酮类成分结构及生物活性的不断明确,在后续实验中应引入更多的活性成分作为综合评价指标,以提高工艺优选的合理性和可行性。

AHP 法是研究者根据经验进行指标间重要性的比较,构建判断矩阵,建立层次模型,从而计算出不同指标的权重系数的一种主观确定权重的方法^[16]。CRITIC 是以评价指标间的对比强度(以指标间的标准差体现)及冲突性(以指标间的相关性体现)为基础,全部依据数据本身计算出各指标所占权重,是一种客观反映指标权重的方法^[17]。与 AHP 和 CRITIC 单独赋权相比,AHP-CRITIC 混合赋权法更能从主观和客观两方面进行综合评价,所得到的综合评分更能科学合理地反映实际情况。因此,本实验采用了 AHP-CRITIC 法对响应曲面实验结果进行了综合分析,结果显示得到的综合评分与考察因素间的响应关系良好。

体外抗炎活性实验结果显示,当终浓度为 50 ~ 350 mg·mL⁻¹ 时,黄芩提取物能显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)抑制 RAW264.7 炎性模型 NO 的释放,表明在此浓度范围内,黄芩提取物对 RAW264.7 炎性细胞具有抗炎活性。本实验中采用的黄芩提取物是利用了最佳超声工艺条件制备的黄芩提取液,真空浓缩后采用冷冻干燥技术得到了黄芩提取粉末,并用于体外抗炎活性分析。研究显示,不同的提取技术、不同的浓缩工艺以及不同的干燥技术均能影响提取物中活性成分的含量高低,从而影响生物活性的强弱。因此在后续研究中,一方面可将提取技术、浓缩工

艺、干燥技术与药物活性之间的关系进行系统研究;另一方面还可将提取物中的活性成分进行分离和纯化,从而进一步明确黄芩中发挥抗炎活性的成分物质。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:314-315.
- [2] 李化,张明晓,白羽琦,等. 基于黄酮类成分含量构成特征和体外抗病毒活性的不同产地黄芩的质-效评价研究[J]. 中国药房,2020,31(10):1166-1171.
- [3] 姜希红,刘树民. 黄芩药理作用及其化学物质基础研究[J]. 中国药师,2020,23(10):2004-2010.
- [4] 许继艳,李硕. 正交试验优选黄芩中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):69-71.
- [5] 李容,王海蓉,欧小群,等. 星点设计-效应面法优化黄芩中 4 种黄酮类成分的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):35-38.
- [6] 李欧,赵善婷,李亚迪,等. 总评“归一值”优选黄芩中黄酮类成分的提取工艺[J]. 中兽医医药杂志,2021,40(3):17-23.
- [7] 王宇卿,李淑娟. 基于 HPLC-ABTS-DAD-Q-TOF/MS 的黄芩抗氧化活性成分研究[J]. 中草药,2019,50(3):568-572.
- [8] 黄光强,梁洁,林婧,等. 以黄芩为例的中药质量标志物预测分析[J]. 中国新药杂志,2020,29(3):285-292.
- [9] 李杰,尚孟文,李婧楠. 黄芩中 3 种黄酮水热法提取工艺的优化[J]. 中成药,2020,42(9):2427-2430.
- [10] 杨志城,杨羽君,何毅,等. 多属性决策在中药研发及生产中的应用[J]. 中成药,2021,43(4):988-993.
- [11] 杨申明,郭文华,王振吉,等. 响应面法优化地参多糖提取工艺及其抗氧化活性分析[J]. 中国现代应用药学,2021,38(20):2554-2559.
- [12] 李容,王海蓉,欧小群,等. 星点设计-效应面法优化黄芩中 4 种黄酮类成分的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):35-38.
- [13] 陈涛. 中药黄芩及其主要成分抗炎活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2017.
- [14] 黄钰芳,杨志军,邵晶,等. 不同配伍比例下生姜对黄芩中化学成分溶出率的影响[J]. 中国现代应用药学,2020,37(17):2086-2092.
- [15] 崔巍,郝翠,翟立海,等. Box-Behnken 响应面法优化超声波辅助离子液体提取黄芩化学成分方法及抗炎活性评价[J]. 中国新药杂志,2021,30(11):1032-1037.
- [16] 刘莹昕,刘飒,王威尧. 层次分析法的权重计算及其应用[J]. 沈阳大学学报(自然科学版),2014,26(5):372-375.
- [17] 赵亚丽,张斯琪,鲁文茜,等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选如意金黄散复方提取工艺[J]. 中国新药杂志,2021,30(15):1428-1434.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-08-08