

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.011

多指标正交试验优选葆肾合剂最佳提取工艺*

冯子芳,袁晓航,陈晓伟,费倩倩,费逸明[△]

(南京中医药大学附属无锡市中医医院,江苏 无锡 214000)

摘要:目的 优选葆肾合剂的最佳提取工艺。方法 选择浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数为影响因素进行正交试验设计,以葆肾合剂有效成分含量和浸膏得率为评价指标,采用多指标综合评分确定最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺为加10倍量水,浸泡30 min,煎煮3次,每次2.0 h。结论 该提取工艺稳定、可行,重复性好,可用于葆肾合剂的生产。

关键词:葆肾合剂;正交试验;多指标综合评分;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0043-04

Orthogonal Experiment with Multi-Index for Optimizing Decoction Process of Baoshen Mixture

FENG Zifang, YUAN Xiaohang, CHEN Xiaowei, FEI Qianqian, FEI Yiming

(Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi, Jiangsu, China 214000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Baoshen Mixture. **Methods** Soaking time, adding water amount, decoction time, and decoction times were chosen to carry out orthogonal experiment. The active ingredient content and extract yield was chosen as Baoshen Mixture's evaluation index, and multi-index comprehensive score was used to determine the best extraction process. **Results** The optimum extraction process was that the added water amount was 10-fold of the herbs, soaking for 30 min, decocting 3 times with 2.0 h for each time. **Conclusion** The extraction process is stable and feasible with good reproducibility, which can be used in the production of Baoshen Mixture.

Key words: Baoshen Mixture; orthogonal experiment; multi-index comprehensive score; extraction process

*基金项目:江苏省无锡市卫计委中医药科研项目[ZYZL201802]。

第一作者:冯子芳,女,硕士研究生,中药师,研究方向为中药检验与质量分析,(电子信箱)798772485@qq.com。

[△]通信作者:费逸明,男,主任药师,研究方向为中药分析及质量评价方法,(电子信箱)13951561199@139.com。

- 蒺藜制剂中莫诺苷、马钱苷、山茱萸新苷、齐墩果酸及熊果酸[J]. 中草药,2017,48(24):5168-5173.
- [10] 曾志辉,王晓莉,叶艳琼,等. 花旗松素对H9C2细胞氧化应激保护作用机制研究[J]. 中国全科医学,2019,22(15):1794-1799.
- [11] 张玉霞,朱海东. 山茱萸总甙对IgA肾病大鼠血清白蛋白细胞素-18、转化生长因子- β_1 水平及肾组织病理变化的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(17):1327-1331.
- [12] 贾欢欢,曾业文,李航,等. 附子与山茱萸配伍对慢性心力衰竭大鼠的影响[J]. 中草药,2019,50(2):159-163.
- [13] YU B, ZHANG G, AN Y, et al. Morroniside on anti-inflammatory activities in rats following acute myocardial infarction[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2018, 22(1):17-21.
- [14] 罗鹏,胡婷,张开菊. 亚砷酸钠对人正常肝细胞L-02活性氧含量和细胞凋亡的影响[J]. 中华地方病学杂志,2017,36(1):42-45.
- [15] KIM MJ, CHOI KJ, YOON MN, et al. Hydrogen peroxide inhibits Ca^{2+} efflux through plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in mouse parotid acinar cells[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2018, 22(2):215-223.
- [16] DONG Z, ZHANG C, CHEN Y, et al. Astragaloside-IV Protects Against Heat-induced Apoptosis by Inhibiting Excessive Activation of Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(2):480-494.
- [17] HUANG QH, XU LQ, LIU YH, et al. Polydatin Protects Rat Liver against Ethanol-Induced Injury: Involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF- κ B p65 Pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:7953850.
- [18] YANG DK, KIM SJ. Cucurbitacin I Protects H9c2 Cardiomyoblasts against H_2O_2 -Induced Oxidative Stress via Protection of Mitochondrial Dysfunction[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:3016382.
- [19] LU Z, MIAO Y, MUHAMMAD I, et al. JNK mediated colistin-induced autophagy and apoptosis via JNK-Bcl2-Bax signaling pathway and JNK-p53-ROS positive feedback loop in PC12 cells[J]. Chem Biol Interact, 2017, 277:62-73.
- [20] LI XJ, LIANG L, SHI HX, et al. Neuroprotective effects of curdione against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2017, 13(2):1733-1740.
- [21] GAO RQ, TANG CL, HUANG SQ, et al. Effects of Electroacupuncture on Apoptosis-related Protein Expression of Gastrocnemius Muscle Cells in Rats with Denervated Sciatic Nerve[J]. Acupuncture Res, 2017, 42(4):302-307.
- [22] JIANG W, CHEN Y, LI B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cytochrome c in rat hippocampus[J]. Mol Bio Syst, 2017, 13(9):1863-1873.

(收稿日期:2020-03-02)

葆肾合剂是治疗早中期慢性肾脏病的经验方,由芡实、黄芪、石韦、金樱子、覆盆子等组方,补肾兼顾健脾,以补后天而实先天,固摄之时不忘清利,摄而不滞,利而不伤。中药制剂通过多成分、多靶点协同发挥整体药效,因此,多指标综合评分是优化提取工艺的重要方法^[1-2]。芡实益肾固摄^[3-4],黄芪益气固摄,米仁根清利湿热,但相关研究少,故不选择其作为含量测定的成分。黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷为其有效成分,相关检测手段成熟,分离度好^[5-7]。覆盆子中的鞣花酸、石韦中的绿原酸均为药材主要有效成分,理化性质稳定。故选择毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸、绿原酸作为含量测定指标成分。本试验中以有效成分含量和浸膏得率为考察指标,采用多指标综合评分方法^[8]优选最佳提取工艺,明确葆肾合剂的物质基础。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,包括 DAD 二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司);BSA224S-CW 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);KQ-100 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为 100 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为 111920-201606),鞣花酸对照品(批号为 111959-201602),绿原酸对照品(批号为 110753-201817),均购自中国食品药品检定研究院;中药饮片(产品信息见表 1)经无锡市中医医院副主任中药师胡敏敏鉴定为合格品;葆肾合剂(医院制剂,批号分别为 191201,191202,191203);乙

腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

表 1 中药饮片产品信息

药材	厂家	批号	产地
芡实	江苏苏轩堂药业有限公司	190215	广东
黄芪	南京海源中药饮片有限公司	191126	甘肃
米仁根	江苏东方慧医华康中药饮片有限公司	190801	贵州
金樱子	江苏苏轩堂药业有限公司	190415	江西
覆盆子	苏州春晖堂药业有限公司	190401	浙江
炒僵蚕	江苏东方慧医华康中药饮片有限公司	190901	江苏

2 方法与结果

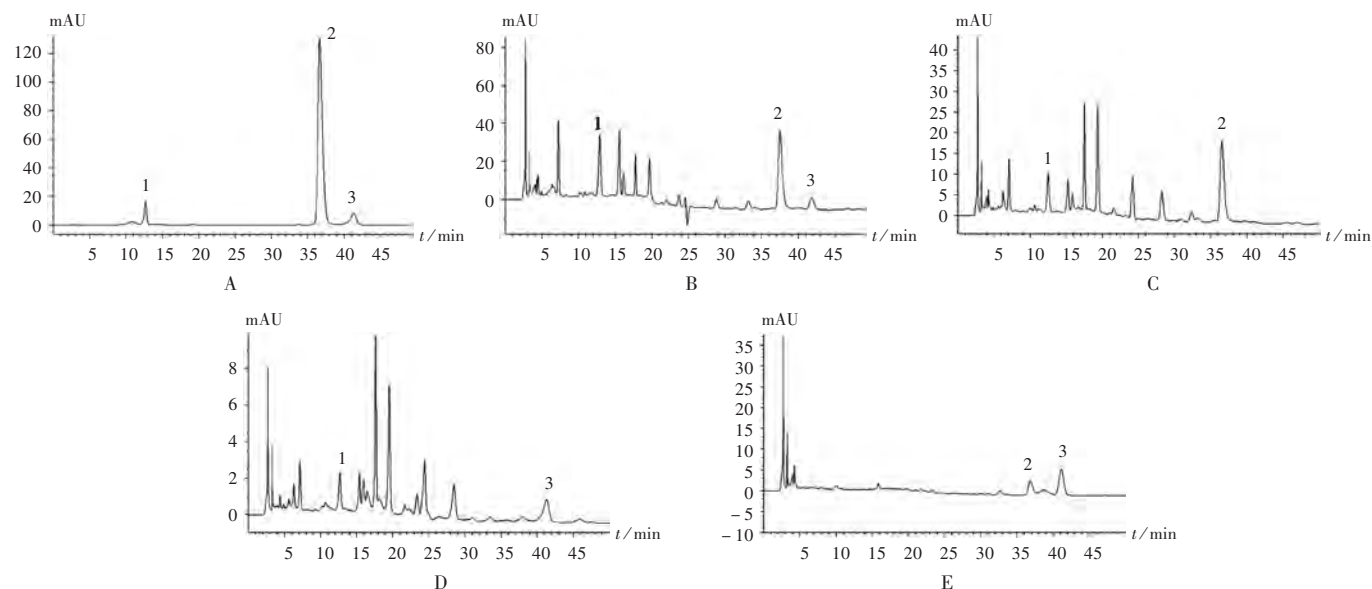
2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters Xbridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:乙腈(A) - 0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱,0 ~ 10 min 时 92% B,10 ~ 12 min 时 92% B → 89% B,12 ~ 50 min 时 89% B;检测波长:326 nm(绿原酸),254 nm(鞣花酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷),采用双波长检测;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL。在此色谱条件下,毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰、鞣花酸峰和绿原酸峰与其他峰达基线分离。色谱图见图 1。

2.1.2 溶液制备

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,配制含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 32 μg/mL、鞣花酸 157.8 μg/mL、绿原酸 53 μg/mL 的混合对照品溶液。精密量取 3 批样品(批号分别为 191201,191202,191203)1.5 mL,置 5 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,超声(功率为 100 W,频率为 40 kHz)10 min,放冷,加甲醇定容,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜



1. 绿原酸 2. 鞣花酸 3. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺黄芪阴性对照品溶液 D. 缺覆盆子阴性对照品溶液 E. 缺石韦阴性对照品溶液

图 1 高效液相色谱图

滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按葆肾合剂制备工艺,分别制备缺黄芪、缺覆盆子、缺石韦的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密移取上述混合对照品溶液适量,加甲醇溶解,稀释成不同质量浓度的混合对照品溶液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,分别精密吸取 10 μL ,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,以各对照品质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线。结果见表 2。

表 2 线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	相关系数(r)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 29.37X - 1.62$	1.60 ~ 19.20	0.999 0
鞣花酸	$Y = 85.02X - 220.94$	7.89 ~ 94.68	0.999 9
绿原酸	$Y = 15.76X - 4.87$	2.65 ~ 31.80	0.999 8

精密度试验:取同一对照品溶液适量,连续进样 6 次,记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸的峰面积。结果的 RSD 分别为 0.44%, 0.27%, 0.33% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 191202)适量,依法平行制备 6 份供试品溶液。精密吸取 10 μL 分别进样测定。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.72%, 2.09%, 1.42% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下同一供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8, 16 h 时按拟订色谱条件进样测定,每次 10 μL 。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.79%, 1.98%, 2.63% ($n = 6$),表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

加样回收试验:精密量取样品(批号为 191202) 0.75 mL,按 1:1(供试品溶液和混合对照品溶液中有效成分质量比)精密加入混合对照品溶液 0.5 mL,依法平行制备 6 份供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸的平均加样回收率分别为 98.15%, 97.08%, 97.82%, RSD 分别为 2.51%, 2.19%, 2.52% ($n = 6$)。

2.2 正交试验设计

试验方案:按处方量称取全方药材,共 72.5 g,分别取 9 份。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸的量为有效成分指标,采用正交设计试验 $L_9(3^4)$,考察煎煮时间(因素 A)、煎煮次数(因素 B)、加水量(因素 C)和浸泡时间(因素 D)对提取效果的影响,因素水平见表 3。按正交试验方案,过滤、合并提取液,滤液浓缩至 200 mL,得 9 个正交试验的样品溶液。

浸膏得率测定:精密量取样品溶液 25 mL,置干燥

表 3 正交试验因素水平表

水平	因素 A(h)	因素 B(次)	因素 C(倍)	因素 D(min)
1	1.0	1	8	30
2	1.5	2	10	45
3	2.0	3	12	60

表 4 水提工艺正交试验结果

序号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	I(%)	II(mg/g)	III(mg/g)	IV(mg/g)	V(分)
1	1	1	1	1	11.31	0.19	0.28	0.34	39.81
2	1	2	2	2	14.58	0.55	0.62	0.53	72.64
3	1	3	3	3	16.50	0.53	0.78	0.76	82.76
4	2	1	2	3	12.31	0.21	0.39	0.33	44.68
5	2	2	3	1	16.72	0.59	0.80	1.06	91.70
6	2	3	1	2	17.35	0.60	0.59	1.06	87.96
7	3	1	3	2	13.06	0.22	0.37	0.40	47.28
8	3	2	1	3	16.53	0.49	0.67	0.94	81.82
9	3	3	2	1	18.38	0.67	0.76	1.19	98.94
K_1	65.07	43.92	69.86	76.82					
K_2	74.78	82.05	72.09	69.29					
K_3	76.01	89.89	73.91	69.75					
R	10.94	45.96	4.05	7.52					

注: I 为浸膏得率, II 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, III 为鞣花酸, IV 为绿原酸, V 为综合评分。表 6 同。

至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重。结果见表 4。

有效成分含量测定:依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,分别测定 9 份正交试验供试品溶液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸含量,各成分的质量分数以各单味药材投料量计,如鞣花酸质量分数 = 鞣花酸提出量(mg)/覆盆子投料量(g)。结果见表 4。

综合评价及结果分析:以有效成分的质量分数和浸膏得率进行综合评分,评分时以各指标的试验最大值为参照,将数据进行归一化,再给以不同权重^[9],参考君臣佐使分配权重,综合评分 = (样品浸膏得率/样品中最大浸膏得率) $\times 30\% \times 100$ + (样品毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数/样品中最高毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量分数) $\times 30\% \times 100$ + (样品鞣花酸质量分数/样品中最高鞣花酸质量分数) $\times 20\% \times 100$ + (样品绿原酸质量分数/样品中最高绿原酸质量分数) $\times 20\% \times 100$,综合评分越高,表明提取效果越好。以综合评分对试验结果进行直观分析和方差分析^[10],结果见表 4 和表 5。由表 4 可见,各因素影响顺序为煎煮次数 > 煎煮时间 > 浸泡时间 > 加水量; $A_3 > A_2 > A_1$, $B_3 > B_2 > B_1$, $C_3 > C_2 > C_1$, $D_1 > D_3 > D_2$,优选水平组合为 $A_3B_3C_3D_1$ 。由表 5 可见,煎煮次数对提取影响显著($P < 0.05$),而加水量、煎煮时间和浸泡时间均无显著影响。故确定最佳工艺为加 10 倍量水,浸泡 30 min,提取 3 次,每次 2.0 h。

表5 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	P
A	215.56	2	8.73	19.00	>0.05
B	3 627.89	2	146.99	19.00	<0.05
C	24.68	2	1.00	19.00	>0.05
D	106.70	2	4.32	19.00	>0.05
误差	24.68	2			

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$, $F_{0.01}(2,2) = 99.00$ 。

2.3 验证试验

为验证工艺的合理性和稳定性,需进行验证试验^[11]。按处方比例称取3份药材72.5 g,加10倍量水浸泡30 min,回流提取3次,每次2.0 h,合并滤液,浓缩至200 mL。测得浸膏得率和毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸、绿原酸含量见表6。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、鞣花酸和绿原酸含量的RSD分别为1.66%,0.79%,2.10% ($n=3$),表明工艺稳定可行、重复性好。

表6 最佳工艺验证试验结果($n=3$)

序号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷(mg/g)	鞣花酸(mg/g)	绿原酸(mg/g)	浸膏得率(%)
1	1.06	1.18	2.45	21.09
2	1.06	1.17	2.35	21.20
3	1.04	1.17	2.40	20.61
$\bar{x}$	1.05	1.17	2.40	20.97

3 讨论

多指标综合评价是优化中药复方提取工艺的重要手段,设计正交试验优化提取工艺时,根据影响因素对提取工艺的贡献大小分配不同的权重系数^[12-13]。黄芪为方中臣药,而毛蕊异黄酮葡萄糖苷为《中国药典》规定的含量测定成分,给予其30%的权重;覆盆子中鞣花酸类化合物具有抗氧化、抗菌等作用^[14],给予20%的权重;石韦中绿原酸有抗菌、降压等作用^[15],给予20%的权重;同时,浸膏得率也是提取工艺考察的重要指标,故将其权重设为30%。这既保证了数据指标的全面性,又根据各指标的影响程度给予了不同的侧重,保证分析结果合理、科学^[16]。

通过查阅文献及多次预试验摸索,本试验中采用双波长切换的方法,实现了同时测定葆肾合剂中3种有效成分。通过对比不同流动相系统对分离效果的影响,选择了乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.2%甲酸溶液等流动相。结果表明,选择乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相,梯度洗脱时,所测成分各峰与其他峰有良好的分离度。利用3种不同品牌的色谱柱 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), YMC-Pack ODS-A C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对3种成分进行了含量测定,分离度较好。经方法学考察证实,该方法可达到有效

成分分离测定的要求,且准确、可靠。

在葆肾合剂提取工艺的试验研究中,充分考虑了君臣佐使的配伍原则、主要成分的化学性质及规模化生产的要求,采用多指标综合评分法,优选最佳提取工艺,并进行了验证,避免了单一因素对中药复方提取影响的局限性和片面性。

参考文献:

- [1] 任伟光,王阶,张翠英,等. 多指标正交试验优选丹参黄连的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(10):814-818.
- [2] 陈恒文,田盼盼,何轩辉,等. 多指标综合评分法优化稳心汤提取工艺[J]. 中国实验方剂学,2018,24(20):25-31.
- [3] 孙广达,蒋瑞智,吴启南,等. 芡实石油醚部位对脑缺血再灌注模型大鼠SOD、CAT和GSH的影响[J]. 时珍国医国药,2019,30(9):2087-2089.
- [4] 孙海林,张雅琼,谢小燕,等. 芡实化学成分研究[J]. 中药材,2014,37(11):2019-2021.
- [5] 刘仁俊. 黄芪化学成分及临床应用研究[J]. 中国中医药,2011,9(16):71.
- [6] WU H, CHEN Y, LI ZG, et al. Untargeted metabolomics profiles delineate metabolic alterations in mouse plasma during lung carcinoma development using UPLCQTOF/MS in MSE mode[J]. R Soc Open Sci,2018,5(9):1-13.
- [7] ZHANG GY, QU RL, LI FY, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters by Astragaliradix decoction and its main bioactive compounds: Implication for clinical drug-drug interactions[J]. J Ethnopharmacol,2016,180:104-113.
- [8] 卞振华,刘顺,朱旭祥. 正交试验优选清热解毒合剂制备工艺研究[J]. 中国药师,2019,22(8):1438-1441.
- [9] 鲍晓东,赵金平,连胜利. 正交试验法分析平帕汤治疗帕金森病的最佳配伍比例[J]. 中医杂志,2013,54(20):1774-1777.
- [10] 李金花,戚进,曹玲,等. 多指标正交试验优化美国洋参胶囊中9种人参皂苷类成分测定的前处理方法[J]. 中南药学,2017,15(12):1757-1760.
- [11] 谢远平,赵颖,吴清,等. 治疗骨质疏松的丹参有效部位提取工艺研究[J]. 中南药学,2019,17(3):389-393.
- [12] 陈洁航,黄松,黄孟秋,等. 多指标综合评分法优选妇科栓剂的提取工艺[J]. 中成药,2010,32(3):508-511.
- [13] 王京霞,陈琳. 多指标综合评分法优选小儿清热栓的提取工艺研[J]. 中华中医药学刊,2014,32(10):2396-2399.
- [14] 郭增军,谭林,徐颖,等. 鞣花酸类化合物在植物界的分布及其生物活性[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(3):519-524.
- [15] 贾富娟,崔露露,张颖颖,等. HPLC测定不同品种石韦中绿原酸、芒果苷、咖啡酸、芦丁含量[J]. 食品与药品,2017,19(3):187-189.
- [16] 周永妍,程秀民,于海英. 桔梗皂苷提取及桔梗质量控制新进展[J]. 中外医疗,2009,41(5):157-159.

(收稿日期:2020-01-19)