

基于药效筛选和正交试验优化健脾益肾丸的制备工艺

陈剑平, 陈秋谷, 胡兆流, 黄诗莹, 王佛长, 郑平, 江霞, 易铁钢, 张尚斌*, 李顺民*

深圳市中医院 深圳市医院 中药制剂研究重点实验室, 广东 深圳 518033

摘要: 目的 通过药效研究筛选健脾益肾丸的制备工艺, 并以正交试验进行优化, 确定健脾益肾丸的最佳提取工艺。方法 采用 5/6 肾切除方法制备大鼠慢性肾衰竭模型, 以大鼠肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 含量降低值为指标, 对拟定的健脾益肾丸 A (打粉入药+水提)、B (打粉入药+提油+水提) 和 C (提油+水提) 3 种工艺路线进行筛选; 继以黄芪甲苷含量和固形物质量为指标, 采用正交试验优化加水量、煎煮时间和煎煮次数的提取工艺。**结果** 药效实验表明, 工艺 A 对慢性肾衰竭大鼠模型具有明显的改善作用, 可作为该方剂成型工艺。该工艺中白术等 5 味药材单独粉碎成细粉, 黄芪等其余药材的最佳提取工艺为药材每次加 8 倍量水, 煎煮 2 次, 每次煎煮 1 h。**结论** 健脾益肾丸能明显改善 5/6 肾切除大鼠模型的 Cr、BUN 含量, 优选的制备工艺稳定、可行, 为健脾益肾丸的后续开发提供依据。

关键词: 健脾益肾丸; 5/6 肾切除; 慢性肾衰竭; 制备工艺; 正交试验; 黄芪甲苷; 肌酐; 尿素氮

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)24-5817-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.013

Optimization of preparation process of Jianpi Yishen Pill based on pharmacodynamic screening and orthogonal test

CHEN Jian-ping, CHEN Qiu-gu, HU Zhao-liu, HUANG Shi-ying, WANG Fo-chang, ZHENG Ping, JIANG Xia, YI Tie-gang, ZHANG Shang-bin, LI Shun-min

Shenzhen Key Laboratory of Hospital Chinese Medicine Preparation, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China

Abstract: Objective To screen the preparation technology of Jianpi Yishen Pill (JYP) by pharmacodynamics screening, and optimize it by orthogonal test to determine the best extraction technology. **Methods** The chronic renal failure model in rats was established by 5/6 nephrectomy. Three technological routes of JYP were selected, including A (powder of medicinal materials and decocting with water), B (powder of medicinal materials, extraction of volatile oil, and decocting with water), and C (extraction of volatile oil and decocting with water), with the content of Cr and BUN in rats as index. The orthogonal test was optimized by using the content of astragaloside and the quality of solid as indexes, with water volum, decoction time, decoction frequency as factors. **Results** The pharmacological efficacy test showed that technology A could obviously improve the rat model of chronic renal failure, and it could be used as the molding technology of this prescription pill. In this technology, five herbs such as *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* were crushed into fine powder alone, and the optimal extraction condition of other medical materials such as *Astragalus Radix* was as follows: 8-fold water per time, decocting 1 h, for two times. **Conclusion** JYP can obviously improve the content of Cr and BUN in rats model of 5/6 nephrectomy. The optimized preparation technology is stable and feasible, which can provide the basis for the follow-up development of JYP.

Key words: Jianpi Yishen Pill; 5/6 nephrectomy; chronic renal failure; preparation technology; orthogonal test; astragaloside; creatinine; urea nitrogen

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81804052); 深圳市科技计划项目 (JSGG20141017103353178); 深圳市科技计划项目 (ZDSYS20160608151545865); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20160428182041577); 广东省自然科学基金项目 (2015A030310247); 广东省自然科学基金项目 (2018A030313305)

作者简介: 陈剑平, 副主任中药师, 从事中药制剂研发。E-mail: lycjp@126.com

***通信作者** 张尚斌, 主任中药师, 从事中药新药开发。E-mail: zsb6383@163.com

李顺民, 主任中医师, 从事中医药防治肾脏病研究。E-mail: zyylishunmin@126.com

慢性肾衰竭 (chronic renal failure, CRF) 是各种慢性肾脏病进行性进展, 引起肾单位受损和肾功能不全, 不能维持基本功能, 出现以代谢产物潴留, 水、电解质、酸碱平衡紊乱以及内分泌失调为特征的临床综合征^[1]。因具有“三高”(发病率高、致残率高、医疗费用高) 特点和平均每年 8% 的增长速度, CRF 成为了危害人类健康和生命的重要疾病^[2]。现代研究表明, 中药在延缓肾衰竭、改善肾功能、增加尿量等^[3-5]方面有良好的治疗效果, 其中使用较多的有黄芪、丹参、大黄、当归、白术、茯苓、附子等^[6-9]。

健脾益肾丸 (Jianpi Yishen Pill, JYP) 是本院经长期临床实践总结并研制的中药复方制剂, 由黄芪、大黄、山药、丹参、白术等 8 味药组成, 具有健脾益肾、通腑泄浊、活血化瘀的功效^[10], 治疗 CRF 疗效确切, 且无明显不良反应。方中重用黄芪益气健脾、升阳固表为君药, 其主要有效成分黄芪甲苷亦可通过下调转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 表达、阻断 MAPK/NF- κ B 通路和抑制氧化应激等途径达到肾间质纤维化和肾损伤的保护作用^[11-13]。通过实验前期的文献调研发现, 目前我国制剂的制备工艺筛选多以正交试验为主, 偏重于指标成分, 未能实现与临床疗效相关联; 而药效学可通过整体动物、离体器官或组织、细胞、分子的不同水平研究中药的作用效果, 阐释中药复方制剂发挥功效的机制及物质基础。基于此, 本研究采用中药药理和中药化学相结合的中药研究模式, 同时根据“丸者缓也”用于慢性病的剂型治疗特点, 设计的丸剂的制备工艺和原方汤剂进行研究。首先通过经典慢性肾衰竭 5/6 肾切除方法制备大鼠模型进行药效实验, 确定最优制备工艺路线, 再采用正交试验, 以黄芪甲苷含量和固形物质量为指标, 优化 JYP 的提取工艺。通过以上研究, 为确保临床用药的有效性奠定了基础, 同时为后续的开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu20A 高效液相色谱仪、ELSD-LT II 蒸发光散射检测器, 日本 Shimadzu 公司; LD5-2A 低速离心机, 北京京立离心机有限公司; 5424 型小型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 500-BS-2 恒温干燥箱, 上海跃进医疗器械厂; J3000 动物电子秤, G&G 公司; BS224S 电子天平, 万分之一, 德国 Sartorius 公司; DD-2 型高频电刀, 北京东方神健医

疗器械有限公司; FC160F 型粉碎机, 泓荃制药机械公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 金坛市富华仪器有限公司; 3K30 离心机, Sigma 公司; -80 °C 超低温冰箱、Varsoskan Flash 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司。

1.2 药材、药品与试剂

黄芪 (批号 150621)、丹参 (批号 150626)、山药 (批号 150615)、酒苁蓉 (批号 150620)、大黄 (批号 150104)、豆蔻 (批号 150617)、白术 (批号 141230)、炙甘草 (批号 150615), 均购自深圳市华辉药业有限公司, 经深圳市中医院药检室检验, 均符合《中国药典》2015 年版一部各味药项下标准; 黄芪甲苷对照品, 批号 110781-201717, 质量分数以 96.9% 计, 中国食品药品检定研究院; 复方 α -酮酸片, 批号 51412036, 北京康而福药业有限责任公司; 培哚普利片, 施维雅 (天津) 制药有限公司; 尿毒清颗粒, 批号 20130628, 康臣药业 (内蒙古) 有限责任公司; 肌酐 (Cr) 测定试剂盒 (批号 20160419)、尿素氮 (BUN) 测定试剂盒 (批号 20160415), 均购自南京建成生物工程研究所; 乙腈、甲醇为色谱纯, 德国 Merck 公司; 水为屈臣氏超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 购自广东省医学实验动物中心, 实验动物质量合格证号: No. 44007200026770, 实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2013-0002。

2 方法与结果

2.1 制备工艺筛选

根据 JYP 中各药味所含已知成分及相关药理作用, 采用 5/6 肾切除方法制备大鼠 CRF 模型进行制备工艺的筛选。

2.1.1 样品制备

(1) 样品 A 的制备 (工艺 A): 白术、豆蔻、大黄、炙甘草、1/3 山药粉碎成细粉, 黄芪等其余味药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 煎煮 2 h, 滤过, 滤液减压浓缩成稠膏, 与上述药材细粉混匀, 真空干燥, 粉碎制成 1 g 细粉相当于 1.41 g 生药。

(2) 样品 B 的制备 (工艺 B): 丹参、大黄、1/3 山药粉碎成细粉; 豆蔻、白术加 6 倍量水, 浸泡 1 h, 蒸馏法提取挥发油 5 h, 提取挥发油后的药液另存; 药渣与黄芪等其余味药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 煎煮 2 h, 滤过, 加入提取挥发油后

的药液，滤液减压浓缩成稠膏，与上述药材细粉混匀，真空干燥，粉碎，加入上述挥发油，制成 1 g 细粉相当于 1.815 g 生药。

(3) 样品 C 的制备 (工艺 C): 豆蔻、白术加入 6 倍量水，浸泡 1 h，蒸馏法提取挥发油 5 h，提取挥发油后的药液另存；药渣与黄芪等其余味药材煎煮 2 次，每次加 10 倍量水，煎煮 2 h，滤过，加入提取挥发油后的药液，减压浓缩成稠膏，真空干燥，粉碎，加入上述挥发油，制成 1 g 细粉相当于 1.60 g 生药。

2.1.2 实验方法

(1) 实验分组设置^[14]: 参考相关文献剂量设计方法，本实验设对照组、模型组、复方 α -酮酸片组、培哚普利片组、尿毒清组和 JYP 工艺 A、B、C 组，共 8 组，每组 10 只，雌雄各半。

(2) 实验剂量设置: 参考《中药药理研究方法学》中剂量换算方法“体表面积比”换算动物临床等效剂量，分别以复方 α -酮酸片 0.68 g/kg (临床日用量为 7.56 g)、培哚普利片 6 mg/kg (参考《NKF-KDOQI 慢性肾病诊断、分类与分层指南》^[15])、尿毒清 2.25 g/kg (临床日用量为 25 g)、JYP 工艺 A 组药粉 1.93 g/kg、JYP 工艺 B 组药粉 1.50 g/kg、JYP 工艺 C 组药粉 1.70 g/kg，作为大鼠药效学实验剂量。实验时以蒸馏水按剂量配制成所需浓度。

(3) SD 大鼠 CRF 模型制备: SD 大鼠适应性饲养 7 d，以 10% 水合氯醛溶液 ip 麻醉，常规消毒铺巾，从右背部切口打开腹腔，静脉夹夹住肾蒂后用高频电刀切除 2/3 右肾，止血后复位肾脏 (正常组以相同步骤打开腹腔，暴露肾脏后复位，避免牵拉肾脏)。2 周后于第 2 次手术切除左侧肾脏。造模 4 个月后，以 10 mL/kg 的给药体积连续给药 6 周 (正常组和模型组给予相同体积的生理盐水)，并于实验结束当天采集血液，分离血清，用试剂盒测定 Cr、BUN 含量。

(4) 实验统计方法: 所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，组间均数两两比较，方差齐时采用 SNK 法；方差不齐时采用 Dunnett's T3 法。由 SPSS 22.0 软件完成。测定结果见表 1。与对照组相比，模型组大鼠血清 Cr、BUN 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比，JYP 工艺 A、B、C 3 个组大鼠血清 Cr 含量均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；复方 α -酮酸片组、培哚普利片组、尿毒清组及 JYP 工艺 A、C

表 1 各组大鼠 Cr、BUN 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Content of Cr and BUN in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g kg ⁻¹)	Cr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	61.51 ± 21.83	7.31 ± 2.02
模型	—	158.00 ± 45.11**	16.96 ± 2.77**
复方 α -酮酸片	0.68	109.53 ± 72.47	11.75 ± 3.98 ^{##}
培哚普利片	0.006	110.75 ± 36.29	11.03 ± 3.03 ^{##}
尿毒清	2.25	146.89 ± 49.81	12.00 ± 4.02 ^{##}
JYP 工艺 A	1.93	92.79 ± 44.43 [#]	13.26 ± 1.87 [#]
JYP 工艺 B	1.50	90.75 ± 29.56 [#]	14.55 ± 3.22
JYP 工艺 C	1.70	83.73 ± 34.18 ^{##}	12.07 ± 4.02 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

组血清 BUN 含量明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。由此可见，JYP 工艺 A、C 均能显著降低 5/6 肾切除方法制备 CRF 大鼠 CRF 模型的 BUN、Cr 含量，且工艺 A 和工艺 C 两者之间比较没有显著性差异 ($P > 0.05$)。参考《中国药典》2015 年版一部项下成方制剂的制法和四部项下各类剂型的特点，工艺 C 提取挥发油后，多选择制成颗粒剂和胶囊剂，但这两类剂型溶解、吸收速度较快，且挥发性成分贮存较久时含量易下降，而丸剂药效作用缓和持久，“丸者缓也”，多用作治疗慢性病药剂型^[16]。故根据 CRF 病程长、病情迁延不愈等特点，并结合大黄、白术等药材与本处方功效相关的化学成分性质和制备工艺的稳定性，最终选择工艺 A 作为 JYP 的制备工艺，制成浓缩丸。

2.2 提取工艺考察

2.2.1 药材单独粉碎考察 根据上述的药效筛选结果，对打粉入药的 5 味药进行粉碎考察，以细粉得率为指标，取白术、豆蔻、大黄、炙甘草等药材各 2 000 g，分别采用 FC160F 型粉碎机 (装孔径 0.2 mm 筛片) 粉碎成细粉，取能通过 5 号筛粉末，称定质量，计算细粉得率，结果见表 2。可知，采用万能粉碎机粉碎对白术、豆蔻、大黄、炙甘草、山药 5 味药材进行单独粉碎细粉平均得率大于 98%，工艺可行。

2.2.2 样品的制备 按照处方比例称取黄芪等 5 味药材 9 份，每份 150 g，按正交试验进行提取，滤过，浓缩并定容至 200 mL，分别测定黄芪甲苷含量和固形物质量。

表 2 药材单独粉碎细粉得率考察结果

Table 2 Yield results of separately crushed herbs

药材	质量/g	细粉量/g	细粉得率/%
白术	2 000	1 989	99.45
豆蔻	2 000	1 963	98.15
大黄	2 000	1 995	99.75
炙甘草	2 000	1 914	95.70
山药	2 000	1 953	97.65

2.2.3 固形物质量的测定 精密量取各样品浓缩液 50 mL, 置已恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 烘箱干燥 3 h, 置干燥器中冷却半小时, 迅速称定质量, 照干燥失重测定法(《中国药典》2015 年版四部通则 0831) 测定, 计算固形物质量。

固形物质量 = 50 mL 浓缩液中干浸膏质量 × 浓缩液质量/50

2.2.4 黄芪甲苷的测定方法

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Sapphire C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (32 : 68); 体积流量 1 mL/min; 进样体积 10 μL; 漂移管温度 40 °C; 氮气压力 360 kPa。

(2) 对照品溶液的制备: 取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制成含黄芪甲苷 495.5 μg/mL 对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备: 精密量取浓缩液 50 mL, 用水饱和正丁醇振摇提取 4 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液充分洗涤 2 次, 每次 40 mL, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 残渣用甲醇溶解定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 即得供试品溶液。

(4) 阴性对照溶液的制备: 按处方比例称取除黄芪以外的药材 90 g, 煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至约 200 mL, 按上述供试品溶液的制备方法制备黄芪甲苷阴性对照溶液。

(5) 专属性试验: 分别吸取以上 3 种溶液按拟定的色谱条件进行测定, 结果表明, 阴性对照色谱中, 在与黄芪甲苷、供试品色谱相应的位置上无色谱峰出现, 专属性良好, 结果见图 1。

(6) 标准曲线的制备: 分别量取黄芪甲苷对照品溶液 (质量浓度 495.5 μg/mL) 5、10、15、20、30、40、60 μL, 按上述色谱条件进样, 测得峰面积。以黄芪甲苷进样量的对数为横坐标 (X), 峰面积的对数为纵坐标 (Y), 得标准曲线回归方程为 $Y =$

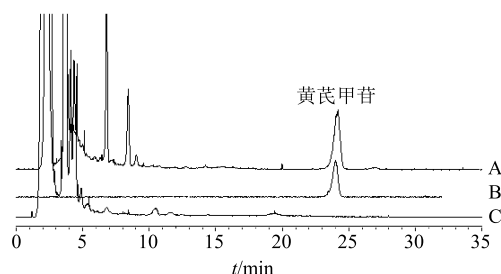


图 1 供试品溶液 (A)、黄芪甲苷对照品溶液 (B) 和阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of test sample (A), astragaloside substance control (B), and negative control (C)

$1.602\ 9\ X + 10.553$, $r = 0.998\ 1$, 表明黄芪甲苷在 $2.477\ 5 \sim 29.73\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

(7) 精密度、重复性、稳定性、准确度试验: 按相关方法进行操作, 结果精密度、重复性、稳定性、准确度试验中黄芪甲苷的 RSD 值分别为 2.10%、2.18%、1.72%、1.04%, 重复性试验的平均含量 $501.2\ \mu\text{g/mL}$, 准确度试验的平均加样回收率为 95.05%, 表明该方法的稳定、可行。

2.2.5 水煎煮提取工艺正交试验 根据上述的药效筛选结果, 对水煎煮提取工艺进行正交试验, 以君药黄芪中黄芪甲苷含量 (Y_1) 和固形物质量 (Y_2) 为评价指标, 并分别赋予权重系数 0.6 和 0.4, 计算综合评分值 [Y , $Y_i = (X_{1i}/X_{1\max} \times 0.6 + X_{2i}/X_{2\max} \times 0.4) \times 100$], 对影响煎煮的加水量 (A)、煎煮时间 (B) 和煎煮次数 (C) 进行优选。因素与水平见表 3。

2.2.6 数据处理及提取工艺优化 按拟定的正交试验方案进行试验, 实验结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

由表 3 分析可知各因素主次影响为 C (煎煮次数) > A (加水量) > B (煎煮时间), 由此得出的最佳工艺组合为 $A_3B_3C_3$ 。表 4 分析结果表明, 因素 C (煎煮次数) 对试验结果有显著性影响 ($P < 0.05$), 因素 A (加水量)、B (煎煮时间) 对试验结果无显著性影响, 由于因素 C (煎煮次数) 中第 2 水平和第 3 水平对试验结果影响的差异较小, 综合考虑到缩短生产周期, 降低生产成本等因素, 故选择提取工艺为黄芪等 5 味药加水 8 倍量水, 煎煮 2 次, 每次煎煮 1 h, 即 $A_1B_1C_2$ 。

2.2.7 验证实验 按照处方比例称取黄芪等 5 味药材 3 份, 每份 150 g, 根据优化的提取工艺条件进行 3 次平行试验, 计算黄芪甲苷含量和固形物质量, 并计算综合评分值, 结果见表 5。结果表明, 黄芪

表 3 正交试验结果
Table 3 Results of orthogonal test

序号	A/倍	B/h	C/次	D (误差)	$Y_1/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Y_2/g	Y
1	8 (1)	1.0 (1)	1 (1)	(1)	62.000 5	24.244 8	28.06
2	8 (1)	1.5 (2)	2 (2)	(2)	294.653 9	35.775 6	64.17
3	8 (1)	2.0 (3)	3 (3)	(3)	407.318 0	44.820 4	84.67
4	10 (2)	1.0 (1)	2 (2)	(3)	422.539 9	40.272 8	82.41
5	10 (2)	1.5 (2)	3 (3)	(1)	382.534 8	41.085 2	78.64
6	10 (2)	2.0 (3)	1 (1)	(2)	97.552 2	25.302 4	32.96
7	12 (3)	1.0 (1)	3 (3)	(2)	408.487 8	45.943 6	85.78
8	12 (3)	1.5 (2)	1 (1)	(3)	115.409 1	36.233 2	44.48
9	12 (3)	2.0 (3)	2 (2)	(1)	535.419 9	40.525 6	95.28
K_1	176.90	196.25	105.50	201.98			
K_2	194.01	187.29	241.86	182.91			
K_3	225.54	212.91	249.09	211.56			
R	48.64	25.62	143.59	28.65			

表 4 方差分析结果
Table 4 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	405.860 3	2	2.862 1	
B	112.691 3	2	0.794 7	
C	4 362.712 3	2	30.765 1	$P<0.05$
D (误差)	141.807 1	2	1.000 0	

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

表 5 工艺验证结果
Table 5 Results of verification test

试验号	固形物质量/g	黄芪甲苷/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	综合评分
1	46.061 2	459.017 9	91.54
2	46.420 1	454.025 3	91.29
3	46.953 2	455.754 1	91.95

甲苷的平均含量为 $456.265\ 8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ，固形物平均质量为 $46.478\ 2\ \text{g}$ ，平均综合评分值为 91.59% ，与正交试验综合评分最大值相差不大，说明所筛选的提取工艺条件稳定可行。

3 讨论

根据我国 2012 年的流行病学调查结果，中国慢性肾脏病的发病率高达 10.8% ，据此估计我国 18 岁以上人群中大约有 1.2 亿慢性肾脏病患者，其肾小球滤过率 $<60\ \text{mL}/(\text{min}\cdot 1.73\ \text{m}^2)$ 的患者又占 15% 左右。因此，在中国，慢性肾脏病已成为重要的公共卫生问题。JYP 是我院肾病科以“玉屏风散”、《圣济总录》“四精丸”、《金匱要略》之“大黄芪甘草汤”加减而成，全方具有健脾益肾、通腑泻浊之功，治

疗脾肾两虚型慢性肾功能衰竭均取得很好的临床疗效，且药少价廉，安全性高，可以减少患者的经济负担，具有很高的推广价值^[17]。

本实验通过查阅文献发现，豆蔻、白术的挥发性成分，丹参的脂溶性成分、水溶性酚酸类成分，大黄的蒽醌类化合物及其衍生物，炙甘草的三萜类、黄酮类和多糖类成分，山药的多糖、氨基酸、微量元素等成分，均具有改善肾功能、调节胃肠功能、改善微循环、免疫调节和抗炎作用，因此，根据各味药所含成分的水溶性及相关药理作用，实验设计了 3 种工艺路线，以此筛选 JYP 的最佳制备工艺。

5/6 肾切除大鼠 CRF 模型是近年来国内外研究探讨人类慢性肾衰竭肾病最接近临床实际的经典模型^[18-20]，本研究通过建立此模型，以 Cr、BUN 含量为指标得出，实验拟定的 JYP 工艺 A（打粉入药+水提）和工艺 C [提油（豆蔻、白术）+水提] 均能有效降低 BUN、Cr 含量，且没有显著性差异 ($P>0.05$)。由此猜测，挥发性成分在该方的药效治疗中起一定作用，但非主导地位。为了证实这一猜测，查阅文献发现，除白术、豆蔻中挥发油具有较强的健脾益气、调节肠管功能作用^[21-22]外，白术内酯类成分（难溶于水，性质不稳定^[23]）也有较强的促进脾虚大鼠胃肠道消化吸收功能，为健脾的有效成分^[24]。且预试验中豆蔻、白术两味药提取挥发油时结果发现，由于挥发油含量较低、性质不稳定等因素，以水蒸气蒸馏提取收集的挥发油量较低，每次提取率相差较大。因此，考虑到各类剂型的特点、

对有效成分的保留、制备工艺稳定性程度以及简化工艺流程等因素,实验最终选择工艺 A 为本品的制备工艺,即黄芪等 5 味药水提,其余药味打粉入药,制成浓缩丸。

现代研究表明,黄芪甲苷具有调节免疫、降低血压、抑制肾脏纤维化等作用。课题组前期研究也证实黄芪甲苷在防治肾脏病方面的作用效果^[25-26]。故本实验选取君药黄芪中主要生物活性黄芪甲苷作为水提工艺的指标成分,结合固形物质量,优化提取工艺具有一定的科学性。同时,实验过程中发现毛蕊异黄酮葡萄糖苷与酒苁蓉中松果菊苷极性相似,干扰较大,变换流动相、色谱柱、柱温、体积流量、供试品制备方法均无法达到理想的分离效果,故实验未将毛蕊异黄酮葡萄糖苷纳入正交试验的指标成分,建立多个指标成分评价方法,需在今后的研究中继续完善。

参考文献

- [1] 李 涛,王保和,易春梅.慢性肾衰竭的中医研究概况[J].中国中西医结合肾病杂志,2014,15(4):371-373.
- [2] 赵先锋.中医药治疗慢性肾衰竭研究进展[J].现代中西医结合杂志,2014,23(2):217-220.
- [3] 孙 昕,丛日杰.中医药治疗慢性肾衰竭研究进展[J].中医药导报,2015,21(1):77-78.
- [4] 陈志红,卢春键,易无庸.中医药治疗慢性肾功能衰竭临床进展[J].新中医,2018,50(3):26-29.
- [5] 邢晓宁,王兴华.中医药治疗慢性肾衰竭临床及实验研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(3):239-241.
- [6] 杨 柳,李爱平,张王宁,等.黄芪及含黄芪经方在治疗肾病方面的药理作用及临床应用研究进展[J].中草药,2018,49(14):3419-3424.
- [7] 文玉敏,张并璇,严美花,等.大黄及其制剂在慢性肾衰竭治疗中的概述[J].辽宁中医杂志,2015,42(10):2030-2032.
- [8] 宫仁豪,李海燕,梁幼雅,等.大黄黄芪药对对慢性肾衰竭大鼠的肾保护作用与胃肠激素水平变化的相关性研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(11):2430-2433.
- [9] 王 亚.当归补血汤治疗慢性肾衰竭伴贫血 30 例临床报告[J].中医临床研究,2015,7(11):80-81.
- [10] 陈剑平,郑 平,李中桂,等.HPLC-MS 法同时测定健脾益肾丸中 8 个成分的含量[J].药物分析杂志,2017,37(6):962-967.
- [11] 于芹超,朱同玉,张永康.黄芪甲苷对大鼠肾缺血再灌注损伤的远期防护作用[J].中华医学杂志,2004,84(17):1412-1415.
- [12] Wang L, Chi Y F, Yuan Z T, et al. Astragaloside IV inhibits renal tubulointerstitial fibrosis by blocking TGF- β /Smad signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2014, 239(10): 1310-1324.
- [13] Che X, Wang Q, Xie Y, et al. Astragaloside IV suppresses transforming growth factor- β 1 induced fibrosis of cultured mouse renal fibroblasts via inhibition of the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(4): 1260-1266.
- [14] 钟如帆,唐洪梅,刘 媛,等.健脾通腑颗粒提取工艺优选[J].中药材,2018,41(5):1152-1156.
- [15] Lesley A, Brad C, Chester H, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD [J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 63(5): 713-735.
- [16] 吴 萍,梁晓岚,张志国.同一方剂制成不同剂型的服用天数探讨[J].医药导报,2018,37(12):1505-1508.
- [17] 傅 博,祁爱蓉,熊国良,等.肾衰 1 号方治疗慢性肾功能衰竭 146 例临床观察[J].世界中医药,2017,12(12):2999-3001.
- [18] 孙梅艳.5/6 肾切除大鼠慢性肾功能衰竭经典模型的建立 [A] // 2017 年《中国组织化学与细胞化学杂志》临床研讨会论文集 [C]. 武汉:《中国组织化学与细胞化学杂志》编委会,2017.
- [19] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2014 [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(Suppl 1): S14-S80.
- [20] 陈 奇,陈松海,潘伟祥.丹参注射液对 5/6 肾切除致肾功能炎性损伤模型大鼠的保护作用[J].中国药房,2015,26(25):3518-3521.
- [21] 陈 镇,夏 泉,黄赵刚,等.白术挥发油对小鼠胃肠功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):66-68.
- [22] Piras A, Rosa A, Marongiu B, et al. Extraction and separation of volatile and fixed oils from seeds of *Myristica fragrans* by supercritical CO₂: Chemical composition and cytotoxic activity on Caco-2 cancer cells [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(4): 448-453.
- [23] 梁志远,甘秀海,吴 坤,等.正交试验优选白术中白术内酯 I 和白术内酯 III 提取工艺[J].中成药,2015,37(6):1356-1360.
- [24] 彭 腾,李鸿翔,邓 赟,等.白术内酯类成分及其药理作用研究进展[J].中国药房,2012,23(39):3732-3734.
- [25] 刘新辉,宋高峰,韦 弦,等.黄芪甲苷对 TGF- β 1 诱导下肾小管上皮细胞间充质转分化的保护作用及机制[J].江西中医药,2018,49(2):61-63.
- [26] 孙惠力,韩鹏勋,王文静,等.黄芪甲苷对 2 型糖尿病小鼠肾脏增殖细胞核抗原表达的作用[J].安徽医药,2017,21(12):2152-2157.