

正交试验-多指标权重分析法优选芪苓益肾颗粒的提取工艺

林帅军¹, 郭丽¹, 荣晓哲¹, 杜跃亮², 王瑞¹, 于晓涛^{1*}

1. 漯河市第一人民医院 药学部 河南省中药制剂与加工中医药重点实验室, 河南 漯河 462005

2. 漯河市第一人民医院 肾内科, 河南 漯河 462005

摘要: 目的 优选芪苓益肾颗粒的提取工艺。方法 以黄芪甲苷得率、总多糖得率、干膏得率的综合评分为评价指标, 采用层次分析法(AHP)确定这3个指标权重系数, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选最佳加水量、提取次数和提取时间, 并进行验证试验。结果 以AHP法确定的权重系数合理有效。筛选的最优提取工艺为加8倍量水, 提取3次, 每次1h。3次验证试验结果显示, 黄芪甲苷、总多糖、干膏得率的平均值分别为0.10%、2.51%、43.09%; 平均综合评分为99.88, RSD值为0.03%。结论 正交试验设计结合AHP确定的多指标权重系数法可较好地优化芪苓益肾颗粒的提取工艺。

关键词: 芪苓益肾颗粒; 层次分析法; 正交试验; 黄芪甲苷; 总多糖; 干膏得率; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)11-2259-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.11.007

Optimization of extraction of Qiling Yishen Granules by orthogonal test and multi-index weighting analysis method

LIN Shuai-jun¹, GUO Li¹, RONG Xiao-zhe¹, DU Yue-liang², WANG Rui¹, YU Xiao-tao¹

1. Key Laboratory of TCM Preparation and Processing of Henan Province, Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Luohe, Luohe 462005, China

2. Department of Nephrology, the First People's Hospital of Luohe, Luohe 462005, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of Qiling Yishen Granules. **Methods** The comprehensive scores of astragaloside IV yield, total polysaccharides yield, and dry extract yield were used as the evaluation index, and the weight coefficient of these indexes was determined by analytic hierarchy process (AHP). $L_9(3^4)$ orthogonal test was designed to screen water volume, extraction times, and extraction time, and validation tests were carried out. **Results** The weight coefficient determined by AHP method was reasonable and effective. The optimized extraction technology was to add 8-fold water, extracting 3 times, and 1 h each time. The results of three validation tests showed that the average yields of astragaloside IV, total polysaccharides, and dry paste were 0.10%, 2.51%, and 43.09%, respectively. Average comprehensive score was 99.88 with RSD value 0.03%. **Conclusion** Orthogonal test and multi-index weighting analysis method could be used to optimized extraction process of Qiling Yishen Granules.

Key words: Qiling Yishen Granules; AHP; orthogonal test; astragaloside IV; total polysaccharides; dry extract yield; extraction

当归补血汤源自金元医著《内外伤辨惑论》, 对于血虚发热症的疗效显著。现代药理学研究证明采用当归补血汤治疗糖尿病肾病安全有效^[1-2]。芪苓益肾方是基于当归补血汤加味茯苓、枸杞子的临床经验方, 具有益气活血、健脾益肾的功效, 临床上用于慢性肾脏病 1~3 期效果良好, 具有培育为名优中成药的潜力和价值。目前芪苓益肾方临床主要以

水煎汤剂, 患者使用携带不便、服用量较大, 而颗粒剂载药量大、服用方便、吸收快。因此, 结合临床疗效和各药味的理化性质, 拟开发芪苓益肾颗粒, 采用水提浓缩, 再经干燥制成颗粒剂。本研究选取君药活性成分黄芪甲苷得率、总多糖得率和干膏得率作为权重指标予以量化, 将这3个指标的综合评分为评价指标, 通过层次分析法(AHP)结合

收稿日期: 2021-08-18

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20191429)

作者简介: 林帅军, 男, 药师, 硕士, 主要从事中药质量评价研究。E-mail: 398289408@qq.com

*通信作者: 于晓涛, 男, 副主任中医师, 本科, 主要从事中药制剂研发与临床应用。E-mail: 346727649@qq.com

正交试验优化芪苓益肾颗粒的提取工艺,为其后续制剂研究和生产扩大化提供参考。

1 仪器和试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪、蒸发光检测器 (ELSD) (美国 Agilent 公司); AUW120D 型十万分之一分析天平 (日本 Shimadzu 公司); Epoch2 酶标仪 (美国 BioTek 公司); MaxiVac Beta 真空离心浓缩仪 (丹麦 Labogene 公司); 5810R 高速离心机 (美国 Eppendorf 公司); Milli-Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

黄芪饮片 (批号 C235201102) 购自河南南街村医药有限公司; 茯苓饮片 (批号 20201101) 购自安徽首源医药有限公司; 枸杞子 (批号 191201)、当归 (批号 191101) 饮片均购自河南鸿博药业有限公司。经漯河市第一人民医院制剂科于晓涛副主任中药师鉴定各饮片均为正品。黄芪甲苷 (批号 110781-201616, 质量分数 97.40%)、D-无水葡萄糖 (批号 110833-201707, 质量分数 99.90%) 对照品均购自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 吸水率的测定

称取处方量黄芪、当归、枸杞、茯苓饮片 (M_1), 置 1 000 mL 烧杯中, 加入 500 mL 水, 测定饮片全部润透时的吸水率。结果在 2 h 时已浸泡至透心, 称定饮片质量 (M_2), 根据吸水率 = $(M_2 - M_1) / M_1$ 计算得到吸水率为 164.30%。

2.2 提取浓缩液的制备

按照处方量称取饮片 9 份, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验表条件进行提取, 滤过, 合并滤液, 浓缩至适量, 定容至 200 mL 量瓶中, 即得 9 批浓缩液, 备用, 依次记为 S1~S9。

2.3 黄芪甲苷的 HPLC-ELSD 法测定

2.3.1 色谱条件^[3] Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μ m), ELSD 检测器; 蒸发器温度 50 $^{\circ}$ C, 喷雾温度 50 $^{\circ}$ C, 数据采集速率 40 Hz, 光强度 100%, 雾化载气体积流量 1.59 L/min, 流动相为乙腈 - 水 (32 : 68), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定黄芪甲苷对照品 5.02 mg 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇制成对照品储备液, 质量浓度为 1.01 mg/mL。

2.3.3 供试品溶液的制备^[4] 分别精密吸取浓缩液

(S1~S9) 10 mL, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入含 5% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液 40 mL, 摇匀, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷后再称定质量, 用含 5% 浓氨试液的甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 蒸干, 残渣用 80% 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 缺黄芪阴性样品溶液的制备 称取缺黄芪的阴性样品, 按 2.2 项下 (正交试验 1 号条件提取) 制备浓缩液, 按 2.3.3 项下方法制备缺黄芪的阴性样品溶液。

2.3.5 专属性考察 取黄芪甲苷对照品溶液、供试品溶液 (S1) 和缺黄芪的阴性样品溶液各 10 μ L, 进样, 色谱图见图 1。结果供试品溶液中黄芪甲苷与对照品具有相同的保留时间, 阴性样品溶液在相同保留时间处对黄芪甲苷的测定无干扰。

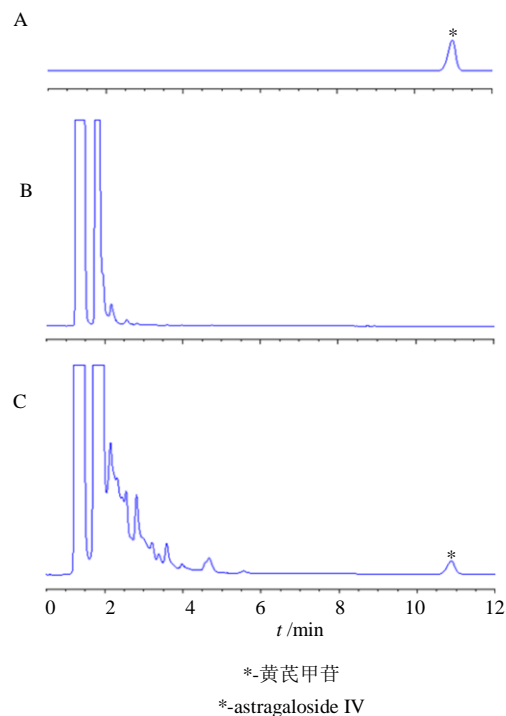


图 1 黄芪甲苷对照品 (A)、缺黄芪甲苷阴性样品 (B)、供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of astragaloside IV reference substance (A), negative sample (B), and sample (C)

2.3.6 线性关系考察 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 2、5、8、12 μ L, 进样测定峰面积。以峰面积的对数值为纵坐标, 进样量的对数值为横坐标, 进行线性回归, 得方程 $Y = 1.8862X - 1.6894$, $r = 0.9999$, 表明黄芪甲苷在 139.30~982.77 μ g/mL

线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积，结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 值为 0.82%。

2.3.8 重复性试验 取浓缩液 (S1) 平行制备供试品溶液 6 份，分别进样，记录峰面积并计算黄芪甲苷质量浓度。结果黄芪甲苷平均质量浓度为 342.14 $\mu\text{g/mL}$ ，RSD 值为 2.24%。

2.3.9 稳定性试验 取浓缩液 (S1) 制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后进样，记录峰面积，结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 值为 1.87%，表明供试品溶液放置 24 h 稳定。

2.3.10 回收率试验 精密吸取含黄芪甲苷 0.342 1 mg 的浓缩液 (S1) 9 份，分别加入黄芪甲苷对照品 0.171 1、0.342 1、0.513 2 mg，每 3 份为 1 个水平，制备供试品溶液，进样分析，计算回收率，结果黄芪甲苷平均回收率为 98.54%，RSD 值为 1.12%。

2.3.11 样品中黄芪甲苷的测定 精密吸取浓缩液 (S1~S9) 10 mL，制备供试品溶液，进样分析，将峰面积值带入回归方程，计算所测样品中黄芪甲苷的质量浓度。

2.4 苯酚-硫酸法测定总多糖^[5]

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称定干燥至恒定质量的 D-无水葡萄糖对照品 20.02 mg，置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，即得 200.20 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖对照品溶液。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取 200.20 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置于 10 mL 具塞刻度试管中，加水定容至 1.0 mL，精密加入 5% 苯酚溶液 2 mL，快速混匀，再迅速加入 5 mL 硫酸，静置 30 min，取出混匀并放至室温。以 0 mL 溶液为空白，于 490 nm 处在酶标仪上测定吸光度值。以质量浓度为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程 $A = 0.00634C + 0.00629$ ， $r = 0.9997$ ，结果表明葡萄糖在 20.02~200.20 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密移取浓缩液 (S1) 0.5 mL，加水补足至 1.0 mL，连续测定 6 次吸光度值，计算多糖质量浓度。结果多糖的平均质量浓度为 95.43 $\mu\text{g/mL}$ ，RSD 值为 1.06%。

2.4.4 重复性试验 精密移取浓缩液 (S1) 6 份，每份 0.5 mL，加水补足至 1.0 mL，测定吸光度值，计算多糖质量浓度。结果多糖的平均质量浓度为

95.44 $\mu\text{g/mL}$ ，RSD 值为 1.12%。

2.4.5 稳定性试验 精密移取浓缩液 (S1) 0.5 mL，加水补足至 1.0 mL，在 30、60、90、120、150、180 min 测定吸光度值，计算多糖质量浓度。结果多糖的平均质量浓度为 95.42 $\mu\text{g/mL}$ ，RSD 值为 1.37%，表明浓缩液中总多糖显色后在 180 min 内稳定。

2.4.6 回收率试验 精密移取含总多糖 5.41 $\mu\text{g/mL}$ 的浓缩液 (S1) 0.34 mL，平行 6 份，分别加入 200.20 $\mu\text{g/mL}$ 葡萄糖对照品溶液 0.16 mL，加水补足至 1.0 mL，于 490 nm 波长下测定吸光度值并计算回收率，结果平均回收率为 101.38%，RSD 值为 1.49%。

2.4.7 样品总多糖的测定 精密吸取浓缩液 (S1~S9) 50 mL，加入无水乙醇使其含醇量达到 80%，放置过夜，弃上清液，挥至无醇味，加入蒸馏水溶解并转移至 250 mL 量瓶中，得供试品溶液。精密移取各供试品溶液 1.0 mL 于 10 mL 具塞刻度试管中，测定，计算所测样品中多糖。

2.5 干膏得率的测定

精密吸取各样品液 3 份，每份 25 mL，置于恒定质量的蒸发皿中，水浴蒸干，于 105 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h，置于干燥器中冷却至室温，精密称定质量并计算干膏得率。

$$\text{干膏得率} = WV / (25 \times M_{\text{总}})$$

其中 V 表示浓缩液的体积； W 表示体积为 V 浓缩液中所含固形物的质量， $M_{\text{总}}$ 表示处方量的总质量

2.6 AHP 法确定综合评分权重系数

AHP 法是一种根据指标成对比较的优先判断矩阵，将主观判断结果和客观判断结果有效地结合起来的方法^[6-7]。将指标性成分黄芪甲苷得率、总多糖得率和干膏得率作为权重指标赋值，分 3 个层次，建立的指标优先顺序为：黄芪甲苷得率 > 总多糖得率 > 干膏得率。因黄芪甲苷得率相较于总多糖得率而言稍重要，赋予 3 分；黄芪甲苷得率相较于干膏得率而言尤其重要，赋予 5 分；总多糖得率的重要性介于其他 2 个指标之间，赋予 2 分。当反向成对比较时，按其对应的倒数赋值，见表 1。结果经 AHP 层次分析法确定 3 个指标的权重系数分别为 0.648、0.230、0.122，一致性比例因子 (CR) = 0.003 < 0.01，表明该矩阵满足一致性要求，权重系数合理有效^[8]。因此，综合评分 = (黄芪甲苷得率/黄芪甲苷得率最大值 \times 0.648 + 总多糖得率/总多糖得率最大值 \times 0.230 + 干膏得率/干膏得率最大值 \times 0.122) \times 100%。

表 1 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 1 Judgment priority matrix for comparison on index pairs

| 权重指标 | 黄芪甲苷得率 | 总多糖得率 | 干膏得率 | 初始权重系数 (W _i ') | 权重系数 (W _i) | 矩阵最大特征 (λ _{max}) | 一致性检验因子 (CI) |
|------|--------|-------|------|---------------------------|------------------------|----------------------------|--------------|
| 黄芪甲苷 | 1 | 3 | 5 | 2.466 | 0.648 | | |
| 总多糖 | 1/3 | 1 | 2 | 0.874 | 0.230 | 3.003 | 0.003 |
| 干膏得率 | 1/5 | 1/2 | 1 | 0.464 | 0.122 | | |

2.7 水提工艺的确定

2.7.1 因素与水平 经预试验考察,以加水量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素,按照提取工艺处理后得到的黄芪甲苷得率、总多糖得率、干膏得率为考察指标设计 L₉(3⁴)正交试验,因素与水平见表 2。

2.7.2 设计和结果 采用 AHP 法得到的权重系数,对正交试验结果进行综合评分,采用 SPSS 22.0 软件对正交试验结果进行分析,正交试验结果见表 3,

方差分析见表 4。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | |
|----|------------|-------------|-------------|
| | 加水量 (A) /倍 | 提取时间 (B) /h | 提取次数 (C) /次 |
| 1 | 6 | 1.0 | 1 |
| 2 | 8 | 1.5 | 2 |
| 3 | 10 | 2.0 | 3 |

表 3 正交试验设计和结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

| 序号 | A | B | C | D | 黄芪甲苷得率/% | 总多糖得率/% | 出膏率/% | 综合评分 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|-------|-------|
| 1 | 2 | 1 | 3 | 3 | 0.10 | 2.56 | 43.19 | 99.19 |
| 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 0.10 | 2.11 | 43.91 | 93.29 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.05 | 1.61 | 29.88 | 52.51 |
| 4 | 1 | 2 | 2 | 3 | 0.08 | 2.61 | 39.46 | 83.02 |
| 5 | 1 | 3 | 3 | 2 | 0.09 | 2.21 | 40.41 | 87.64 |
| 6 | 3 | 2 | 3 | 1 | 0.09 | 2.63 | 42.63 | 92.93 |
| 7 | 3 | 3 | 1 | 3 | 0.06 | 1.83 | 33.58 | 64.01 |
| 8 | 2 | 3 | 2 | 1 | 0.06 | 1.76 | 34.20 | 62.13 |
| 9 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0.08 | 2.21 | 42.14 | 62.13 |
| K ₁ | 223.17 | 244.99 | 178.65 | 207.57 | | | | |
| K ₂ | 223.45 | 238.08 | 238.44 | 243.06 | | | | |
| K ₃ | 250.23 | 213.78 | 279.76 | 246.22 | | | | |
| R | 9.02 | 10.40 | 33.70 | 12.88 | | | | |

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 | 均方 | F 值 | P 值 |
|------|-----------|-----|---------|--------|-------|
| 加水量 | 143.953 | 2 | 71.976 | 3.232 | >0.05 |
| 提取时间 | 12.609 | 2 | 6.305 | 0.283 | >0.05 |
| 提取次数 | 1 937.368 | 2 | 968.684 | 43.499 | <0.05 |
| 误差 | 44.538 | 2 | 22.269 | | |

F_{0.05}(2, 2)=19.00 F_{0.01}(1, 2)=99.00

结果显示,各因素对水提工艺影响的主次为: $C>A>B$ 。因素C(提取次数)对实验结果具有显著性影响($P<0.05$),其他两个因素则无显著性影响。故从省时节能、降低成本和对指标综合评分影响大小的综合考虑,确定最佳工艺参数 $A_2B_1C_3$,即加8倍量水,提取3次,每次1h。

2.8 验证试验

按照处方量称取饮片3份,按照正交试验优选的条件进行提取,并测定相关指标。结果黄芪甲苷、总多糖和干膏得率的平均值分别为0.10%、2.51%、43.09%;平均综合评分为99.88,RSD值为0.03%。结果表明该提取工艺稳定可行,可用于芪苓益肾颗粒组方药材的水提工艺。

3 讨论

中药复方制剂是基于中医理论整体论治,多组分、多靶点综合发挥作用,达到调节人体机能的作用。本研究中,以君药黄芪中活性成分黄芪甲苷得率为评价指标,既能反映有效成分的提取情况,又能在一定程度上进行制剂质量的评价;以全方水提醇沉后的总多糖得率为评价指标,在一定程度上可以代表提取物的质量;干膏得率是衡量提取工艺的关键指标之一^[9]。因此,选择黄芪甲苷得率、总多糖得率和干膏得率作为芪苓益肾颗粒处方药材提取工艺的考察指标。

AHP法是一种介于主观和客观权重赋值的分析方法,不仅考虑了主观经验对所选指标的重视程度,又能根据各指标原始数据之间的相互联系进行客观的分析,增强了综合评分的合理有效性^[10-11]。本研究采用AHP法确立黄芪甲苷得率、总多糖得率和干膏得率3个指标的权重系数分别为0.648、0.230、0.122,CR<0.01,权重系数合理有效。所得综合评分结果通过SPSS 22.0软件进行分析,最终

选出优化的提取工艺,即加水量8倍,提取3次,每次1h,为芪苓益肾颗粒的后续研究和生产扩大化提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁 栋,杨洪涛.基于网络药理学的当归补血汤治疗慢性肾脏病作用机制研究[J].时珍国医国药,2020,31(1):242-244.
- [2] 吴 蕊.当归补血汤用于糖尿病肾病的疗效探究[J].航空航天医学杂志,2021,32(3):341-342.
- [3] 胡兆流,陈秋谷,王佛长,等.多指标权重分析法结合正交试验优选补脾养肾颗粒的水提工艺[J].中国药房,2019,30(19):2656-2662.
- [4] 中国药典[S].一部.2020:315.
- [5] 祁晓森,张丽艳,彭邦梅,等.正交试验优选复方太子参颗粒处方药材的提取工艺研究[J].现代药物与临床,2013,28(5):708-711.
- [6] 刘小妹,程中琴,施崇精,等.基于AHP-CRITIC法的正交设计优选参膝口服液提取工艺[J].中草药,2018,49(11):2577-2583.
- [7] 魏 娟,骆 霞,祝 宇,等.多指标层次分析法结合Box-Behnken响应面法优化连翘提取工艺[J].中国医院药学杂志,2021,41(11):1109-1113.
- [8] 郭 丽,陈 皓,贾明璐,等.层次分析法及多指标正交试验优化归芪通脉合剂水提工艺[J].中国现代中药,2021,23(6):1068-1075.
- [9] 马 娟.荷泽颗粒医院制剂的药学研究[D].武汉:湖北中医药大学,2016.
- [10] 祝 宇,余世荣,张晓燕,等.层次分析联合Box-Behnken响应面法优选复方肉苁蓉合剂提取工艺[J].中国现代应用药学,2020,37(23):2852-2858.
- [11] 黄诗淇,武正华,缪文清,等.基于高效液相色谱法结合层次分析和正交设计法优选土茯苓醇提工艺[J].中南药学,2021,19(4):642-648.

[责任编辑 解学星]