

## 基于药效筛选和正交试验优化五子衍宗加减方的提取工艺

徐波<sup>1</sup>, 金方<sup>1</sup>, 陈坚波<sup>2\*</sup>

1. 金华市妇幼保健院 中医科, 浙江 金华 321000

2. 金华市职业技术学院医学院, 浙江 金华 321000

**摘要:** **目的** 通过长期毒性与药效实验筛选五子衍宗加减方(WYR)的提取工艺, 并以正交试验进行优化, 确定 WYR 的最佳提取工艺。 **方法** 对不同工艺 WYR 样品进行长期毒性实验, 并以肾阳虚大鼠阴茎勃起潜伏期和性激素水平为药效指标, 综合长期毒性与药效实验的结果, 筛选出最佳工艺方案; 以多个指标成分含量和出膏率为指标, 采用正交试验筛选不同提取工艺的最优水平, 并进行验证。 **结果** 长期毒性实验结果显示所有小鼠均健康存活, 未见明显毒性反应。药效实验结果表明, 巴戟天、杜仲、桑寄生、续断、炙甘草以 70%乙醇回流提取, 其余药材用 70%乙醇作为溶剂进行渗漉提取为 WYR 最佳提取方式; 得到的最优提取工艺为巴戟天、杜仲、桑寄生、续断、炙甘草以 10 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 2.0 h; 其余药材以 10 倍量 70%乙醇 1.5 mL/min 渗漉提取, 渗漉前药材先浸泡 16 h。 **结论** WYR 能明显改善肾阳虚大鼠阴茎勃起潜伏期和性激素水平, 优选的工艺条件合理可行, 为 WYR 的后续开发提供依据。

**关键词:** 五子衍宗加减方; 肾阳虚; 长期毒性; 药效实验; 正交试验; 巴戟天; 杜仲; 桑寄生; 续断; 炙甘草

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)06-1354-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.014

## Optimization of extraction process of Wuzi Yanzong plus and minus Recipe based on pharmacodynamic screening and orthogonal experiment

XU Bo<sup>1</sup>, JIN Fang<sup>1</sup>, CHEN Jian-bo<sup>2</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Jinhua Women and Children's Health Hospital, Jinhua 321000, China

2. School of Medical, Jinhua Vocational and Technical College, Jinhua 321000, China

**Abstract: Objective** To screen the extraction process of Wuzi Yanzong plus and minus Recipe (WYR) by pharmacodynamics and long-term toxicity test, and optimize it by orthogonal experiment to determine the best extraction process of WYR. **Methods** Long-term toxicity experiments were carried out on different processed WYR samples. The penile erection latency and sex hormone levels in rats with kidney-yang deficiency were used as pharmacodynamic indicators. The results of long-term toxicity and efficacy experiments were combined to screen out the optimal process plan. Using the content of ingredients and the rate of ointment as indicators, the orthogonal test was used to screen the optimal level of different extraction processes and verified. **Results** Long-term toxicity test results showed that all mice survived healthily and no obvious toxicity was observed. The results of pharmacodynamic experiments showed that the extracts of *Morindae Officinalis Radix*, *Eucommiae Cortex*, *Taxilli Herba*, *Dipsaci Radix*, and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* were refluxed with 70% ethanol, and the remaining medicinal materials were extracted with 70% ethanol as the solvent to obtain the best extraction method of WYR. The suitable extraction process was as follows: *Morindae Officinalis Radix*, *Eucommiae Cortex*, *Taxilli Herba*, *Dipsaci Radix*, and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* were extracted three times with 10 times 70% ethanol for 2.0 h each time; The remaining medicinal materials were percolated with 10 times 70% ethanol at 1.5 mL/min. The medicinal herbs were firstly soaked for 16 h before percolation. **Conclusion** WYR can significantly improve the penile erection latency and sex hormone levels in rats with kidney yang deficiency. The optimal process conditions are reasonable and feasible, which provides a basis for the follow-up development of WYR.

收稿日期: 2018-11-19

作者简介: 徐波(1975—), 女, 本科, 副主任中药师, 研究方向为中药饮片的鉴别及质量控制。

Tel: 13486932500 E-mail: fbyxb7181@126.com

\*通信作者 陈坚波(1976—), 男, 本科, 副主任中药师, 研究方向为药用植物学和天然药物成分提取与分析。

Tel: 13868981835 E-mail: cjb62911@126.com

**Key words:** Wuzi Yanzong plus and minus Recipe; kidney yang deficiency; long-term toxicity; pharmacodynamic experiments; orthogonal test; *Morindae Officinalis Radix*; *Eucommiae Cortex*; *Taxilli Herba*; *Dipsaci Radix*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*

五子衍宗加减方(Wuzi Yanzong plus and minus recipe, WYR)是治疗男子弱精症的经典方,由经典名方五子衍宗方演化而来,由淫羊藿 15 g、茺蔚肉 10 g、覆盆子 10 g、枸杞子 10 g、桑椹子 10 g、金樱子 20 g、巴戟天 10 g、地肤子 15 g、杜仲 15 g、桑寄生 15 g、续断 15 g、炙甘草 3 g、车前子(盐制) 15 g 等多味中药组成。该方具有补肾益精作用,用于肾虚精亏所致的阳痿不育、遗精早泄、腰痛、尿后余沥,临床上用于治疗不育症、肾虚腰痛、肾精亏虚、阳痿、男性不育症、肾虚性功能障碍等<sup>[1-3]</sup>。

目前,复方制剂的提取工艺多以测定指标成分含量进行筛选,而容易忽略最根本的指标药效<sup>[4-10]</sup>。本课题组拟设计 4 个针对 WYR 的提取工艺方案,对各工艺样品进行长期毒性实验和药效实验,确定出最佳提取方案<sup>[11-13]</sup>,再采用正交试验,以出膏率和指标成分含量为指标进行综合加权评分,优化 WYR 的提取工艺,为 WYR 的提取工艺提供合理的依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,配 UV 检测器、DAD 检测器,美国 Agilent 公司;Mettler AE50 电子天平,万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司;Sartorius BT25S 电子天平,十万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;SB-3200 DTN 超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 药材、试剂与样品

淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. (批号 20170511)、吴茺蔚 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. (批号 17110804)、覆盆子 *Rubus idaeus* L. (批号 17101525)、枸杞子 *Lycium barbarum* L. (批号 H17100908)、桑 *Morus alba* L. (批号 H17120511)、金樱子 *Rosa laevigata* Michx. (批号 H17120506)、巴戟天 *Morinda officinalis* How (批号 W17100602)、地肤 *Kochia scoparia* (L.) Schrad. (批号 G17080704)、杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver (批号 G17120507)、桑寄生 *Taxillus sutchuenensis* (Lecomte) Danser (批号 W17110909)、续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry (批号 W17101502)、甘草

*Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (批号 W17090703)、车前子 *Plantago asiatica* L. (盐制,批号 W17120804) 购自亳州市三成药材销售有限责任公司,以上所有药材经浙江大学现代中药研究所吴永江教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版一部相关规定;对照品耐斯糖(批号 110703-200726)、川续断皂苷 VI (批号 111685-200802)、淫羊藿苷(批号 110737-200312)均购自中国食品药品检定研究院;对照品地肤子皂苷 Ic (批号 100478-201503),上海纯优生物科技有限公司;以上对照品质量分数均大于 98%;提取用乙醇为工业乙醇,提取用水为蒸馏水,其余所有试剂均为色谱纯或分析纯。

### 1.3 动物

健康 SPF 级 SD 大鼠(体质量 180~220 g)、健康 SPF 级昆明种小鼠(体质量 18~22 g),购自浙江省实验动物中心,动物许可证号 SCXK(浙)2017-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品制备

按照设计的 4 个提取工艺方案(工艺 1 为全方水提。工艺 2 为全方用 70%乙醇作为溶剂进行渗漉。工艺 3 为巴戟天、杜仲、桑寄生、续断、炙甘草 70%乙醇回流提取,得滤液;其余药材用 70%乙醇作为溶剂进行渗漉,收集渗漉液;加入醇提滤液。工艺 4 为全方用 70%乙醇回流提取)提取药材,浓缩、真空干燥、粉碎成干粉备用,样品批号分别为 S18051901、S18051902、S18051903、S18051904。

### 2.2 最佳提取工艺筛选

**2.2.1 不同提取工艺 WYR 样品的小鼠长期毒性实验** 小鼠 90 只,雌雄各半,体质量 18~22 g,随机分 9 组,每组 10 只。禁食不禁水 12 h,对照组 ig 给予生理盐水,其余 8 组分别给予最大容积的 4 种工艺样品溶液,每种样品设高、低剂量组,高剂量组以最大质量浓度 2.0 g/mL,最大给药体积 20 mL/kg 给予实验药物生药 40 g/kg (临床等效用量的 100 倍<sup>[14]</sup>)ig 给药;低剂量组以实验药物生药 20 g/kg ig 给药;连续给药 8 周。观察小鼠的一般情况,包括进食、行为、皮毛、分泌物、排泄物、中毒及死亡等情况,每周称体质量 1 次,并根据体质量变化

调整投药量。

## 2.2.2 不同提取工艺 WYR 样品的大鼠补肾壮阳作用实验<sup>[15]</sup>

(1) 模型制备: 70 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后行去势手术, ip 3.5% 水合氯醛 1 mL/kg 麻醉, 消毒阴囊皮肤, 除对照组外, 各组动物摘除双侧睾丸, 术后 im 青霉素以防感染。

(2) 分组与给药: 造模 1 周后, 待大鼠手术切口完全愈合, 所有存活大鼠随机分为 10 组: 对照组即假手术组 (只切开而不做摘除双侧睾丸手术); 模型组; 4 种工艺 WYR 高、低剂量组。WYR 低剂量组按生药 2.52 g/kg (相当于人临床剂量<sup>[16]</sup>) ig 给药, 高剂量组按生药 5.04 g/kg (相当于人临床 2 倍剂量) ig 给药。假手术组与模型组 ig 给予相应体积的重蒸水。1 次/d, 连续给药 4 周。

(3) 阴茎勃起潜伏期测定: 末次给药后 1 h, 大鼠麻醉后, 用棉签蘸生理盐水湿润阴茎根部, 以增强其导电性。将 BT87-2 型电刺激血栓形成仪的刺激电极放置于大鼠阴茎根部, 给予局部电刺激 (电流强度为 4 mA), 以秒表记录从刺激开始至阴茎勃起时间 (勃起潜伏期)。

(4) 血清制备与指标检测: 各组大鼠 ip 3.5% 水合氯醛 1 mL/kg 麻醉, 腹主动脉取血, 待血液凝固后 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, -70 °C 低温保存备用。用放射免疫法检测血清睾酮 (T)、黄体生成素 (LH)、卵泡刺激素 (FSH) 水平。

(5) 数据处理: 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比

较采用  $t$  检验。

## 2.2.3 WYR 提取工艺筛选结果

(1) 长期毒性实验: 各组小鼠在观察期内外观均正常, 行为活泼, 饮食及大小便正常, 所有小鼠均存活。处死小鼠, 解剖并仔细观察其主要脏器变化, 未发现脏器肿大、萎缩、坏死等异常现象。表明实验给药剂量安全。

(2) 药效实验结果: 由表 1 显示, 模型组大鼠与假手术组比较勃起潜伏期明显延长 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, WYR 各工艺高剂量组均能够明显提高去势大鼠阴茎对外部刺激的兴奋性, 明显缩短勃起潜伏期 ( $P < 0.01$ ); 其中工艺 3 组效果最明显。

由表 1 可见, 模型组血清 T 水平与对照组比较明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, WYR 各工艺高剂量组血清 T 水平有所升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示 WYR 各工艺高剂量均有促进 T 分泌作用; 各组血清 LH 无明显变化; 模型组血清 FSH 水平与对照组比较明显升高 ( $P < 0.05$ ), WYR 各工艺高剂量组 FSH 比模型组有所降低, 但仅有工艺 3 组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 可能是睾丸中支持细胞分泌的抑制素 B 的增加对 FSH 形成了负反馈抑制。

综合长期毒性、阴茎勃起功能和性激素水平 (表 1) 比较发现, 在安全性相同的情况下, 工艺 3 的样品效果更好, 故以下实验对工艺 3 进行考察。

## 2.3 巴戟天、杜仲、桑寄生、续断、炙甘草回流提取工艺考察

### 2.3.1 耐斯糖定量测定<sup>[17]</sup> 按《中国药典》2015 年

表 1 假手术组、模型组与 WYR 各工艺高剂量给药组的肾虚大鼠阴茎勃起潜伏期和性激素水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 1 Comparison of penile erection latency and sex hormone levels among sham-operation group, model group and each high-dose group in rats with kidney yang deficiency ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | 阴茎勃起潜伏期/s                  | T/(ng·mL <sup>-1</sup> )  | LH/(mU·mL <sup>-1</sup> ) | FSH/(mU·mL <sup>-1</sup> ) |
|--------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 假手术组   | —                        | 25.33 ± 3.31               | 7.18 ± 4.23               | 14.59 ± 2.43              | 5.39 ± 0.40                |
| 模型组    | —                        | 48.89 ± 6.79 <sup>▲▲</sup> | 0.34 ± 0.06 <sup>▲▲</sup> | 13.55 ± 4.51              | 6.30 ± 0.51 <sup>▲</sup>   |
| 工艺 1 组 | 2.52                     | 27.85 ± 3.14 <sup>△△</sup> | 0.44 ± 0.05 <sup>△</sup>  | 14.33 ± 2.74              | 5.90 ± 0.89                |
|        | 5.04                     | 25.01 ± 2.76 <sup>△△</sup> | 0.46 ± 0.04 <sup>△</sup>  | 14.68 ± 3.09              | 5.71 ± 0.67                |
| 工艺 2 组 | 2.52                     | 23.02 ± 3.90 <sup>△△</sup> | 0.48 ± 0.09 <sup>△△</sup> | 13.19 ± 3.98              | 5.66 ± 0.77                |
|        | 5.04                     | 19.62 ± 4.65 <sup>△△</sup> | 0.50 ± 0.08 <sup>△△</sup> | 13.75 ± 4.54              | 5.98 ± 0.65                |
| 工艺 3 组 | 2.52                     | 19.06 ± 3.44 <sup>△△</sup> | 0.58 ± 0.08 <sup>△△</sup> | 14.45 ± 1.66              | 5.50 ± 0.84                |
|        | 5.04                     | 16.67 ± 2.88 <sup>△△</sup> | 0.61 ± 0.05 <sup>△△</sup> | 15.04 ± 1.24              | 5.12 ± 0.71 <sup>△</sup>   |
| 工艺 4 组 | 2.52                     | 23.56 ± 2.95 <sup>△△</sup> | 0.50 ± 0.06 <sup>△△</sup> | 15.29 ± 2.43              | 5.68 ± 0.80                |
|        | 5.04                     | 21.74 ± 2.69 <sup>△△</sup> | 0.53 ± 0.09 <sup>△△</sup> | 15.81 ± 1.90              | 5.85 ± 0.69                |

与假手术组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs sham-operation group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group

版方法进行。Agilent 1260 色谱仪(蒸发光散射检测器);色谱柱为 Diamonsil Plus  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为甲醇-水(3:97);体积流量 1 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数按耐斯糖峰计算不低于 2 000。

**2.3.2 川续断皂苷 VI 的定量测定<sup>[17]</sup>** 按《中国药典》2015 年版方法进行。Agilent 1260 色谱仪(UV 检测器);色谱柱为 Diamonsil Plus  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈-水(30:70);体积流量 1 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长 212 nm;进样量 10  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数按川续断皂苷 VI 峰计算不低于 3 000。

**2.3.3 正交试验优选回流提取工艺** 在预实验的基础上,选取提取溶剂倍数(A)、乙醇体积分数(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,每个因素选取 3 个水平,因素与水平见表 2。按日处方量称取巴戟天 10 g、杜仲 15 g、桑寄生 15 g、续断 15 g 和炙甘草 3 g 药材共 9 份,照 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计表

安排进行回流提取,滤过,合并滤液,得供试液。精密吸取一定量供试液于 25 mL 量瓶中,加乙醇至刻度,摇匀,以 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过,取续滤液得 9 批供试品溶液。

综合考虑原药材中各指标成分的含量及相应药材在处方中的用量,本实验以出膏率、耐斯糖质量分数( $\psi_1$ )和川续断皂苷 VI 质量分数( $\psi_2$ )为评价指标,采用综合评分法进行数据处理,权重系数出膏率为 0.4,耐斯糖和川续断皂苷 VI 均为 0.3。

出膏率=干膏质量/药材质量

指标成分含量=指标成分质量/指标成分来源药材质量

综合评分=(出膏率/出膏率最大值)×0.4+( $\psi_1/\psi_{1\text{max}}$ )×0.3+( $\psi_2/\psi_{2\text{max}}$ )×0.3

实验设计与结果见表 2,方差分析结果见表 3。由表 2、3 可知各因素对综合评分的影响大小顺序为 C>D>A>B,其中 C 对提取结果有显著性影响( $P<0.05$ )。

综合直观分析与方差分析结果,得到最优回流

表 2 回流提取工艺 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test of reflux extraction process

| 试验号            | A/倍    | B/%    | C/h     | D      | 出膏率/% | $\psi_1$ /% | $\psi_2$ /% | 综合评分/% |
|----------------|--------|--------|---------|--------|-------|-------------|-------------|--------|
| 1              | 8 (1)  | 60 (1) | 1.0 (1) | 1 (1)  | 25.15 | 1.36        | 1.83        | 68.79  |
| 2              | 8 (1)  | 70 (2) | 1.5 (2) | 2 (2)  | 33.82 | 1.75        | 2.27        | 88.99  |
| 3              | 8 (1)  | 80 (3) | 2.0 (3) | 3 (3)  | 35.71 | 1.84        | 2.51        | 95.19  |
| 4              | 10 (2) | 60 (1) | 1.5 (2) | 3 (3)  | 33.47 | 1.92        | 2.29        | 91.52  |
| 5              | 10 (2) | 70 (2) | 2.0 (3) | 1 (1)  | 39.20 | 1.51        | 2.44        | 92.76  |
| 6              | 10 (2) | 80 (3) | 1.0 (1) | 2 (2)  | 27.63 | 1.42        | 2.24        | 77.15  |
| 7              | 12 (3) | 60 (1) | 2.0 (3) | 2 (2)  | 37.96 | 1.76        | 2.32        | 93.96  |
| 8              | 12 (3) | 70 (2) | 1.0 (1) | 3 (3)  | 28.03 | 1.62        | 2.14        | 79.49  |
| 9              | 12 (3) | 80 (3) | 1.5 (2) | 1 (1)  | 36.58 | 1.67        | 2.08        | 88.28  |
| K <sub>1</sub> | 252.97 | 254.27 | 225.43  | 249.83 |       |             |             |        |
| K <sub>2</sub> | 261.43 | 261.24 | 268.79  | 260.10 |       |             |             |        |
| K <sub>3</sub> | 261.73 | 260.62 | 281.91  | 266.20 |       |             |             |        |
| R              | 8.76   | 6.97   | 56.48   | 16.37  |       |             |             |        |

表 3 回流提取工艺方差分析

Table 3 Results of variance analysis

| 因素 | 偏差平方和     | 自由度 | F 值      | 显著性      |
|----|-----------|-----|----------|----------|
| A  | 16.488 8  | 2   | 1.662 0  |          |
| B  | 9.920 9   | 2   | 1.000 0  |          |
| C  | 582.468 3 | 2   | 58.711 4 | $P<0.05$ |
| D  | 45.628 9  | 2   | 4.599 3  |          |

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

提取工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,结合因素影响大小和实际生产成本考虑,得到最适回流提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即巴戟天、杜仲、桑寄生、续断、炙甘草以 10 倍量 70%乙醇回流提取 3 次,每次 2.0 h。

**2.3.4 验证实验** 为确保该工艺的稳定性,根据“2.3.3”项优选结果提取 3 批样品进行验证实验,结果见表 4。所有指标的均值与正交试验结果的较高数据接近,且各指标的 RSD 均小于 3%,表明优选

表 4 验证实验结果  
Table 4 Results of verification

| 试验号 | 出膏率/% | $\psi_1$ /% | $\psi_2$ /% |
|-----|-------|-------------|-------------|
| 1   | 39.02 | 1.83        | 2.43        |
| 2   | 38.76 | 1.97        | 2.56        |
| 3   | 39.44 | 1.89        | 2.37        |

的工艺条件稳定、可行。

## 2.4 其余药材渗漉提取工艺考察

**2.4.1 淫羊藿苷的定量测定<sup>[17]</sup>** 按《中国药典》2015 年版方法进行。Agilent 1260 色谱仪 (UV 检测器); 色谱柱为 Diamonsil Plus  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈-水 (30:70); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 检测波长 270 nm。理论塔板数按淫羊藿苷峰计算不低于 1 500。

**2.4.2 地肤子皂苷 Ic 的定量测定<sup>[17]</sup>** 按《中国药典》2015 年版方法进行。Agilent 1260 色谱仪 (蒸

发光散射检测器); 色谱柱为 Diamonsil Plus  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (85:15:0.2); 体积流量 1 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数按地肤子皂苷 Ic 峰计算不低于 3 000。

**2.4.3 正交试验** 在预实验的基础上, 选取乙醇体积分数 (A)、溶剂倍量 (B)、渗漉体积流量 (C) 和药材浸泡时间 (D) 为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 因素与水平见表 5。按日处方量称取其余药材共 9 份, 按照 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交设计表设计进行渗漉提取, 收集渗漉液, 得供试液。精密吸取一定量供试液于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 以 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过, 取续滤液得 9 批供试品溶液。

综合考虑原药材中各指标成分的含量及相应药材在处方中的用量, 本实验以淫羊藿苷质量分数 ( $\omega_1$ )、地肤子皂苷 Ic 质量分数 ( $\omega_2$ ) 以及出膏率为评价指标, 采用综合评分法进行数据处理, 各指标的权重系数出膏率为 0.4, 淫羊藿苷和地肤子皂苷

表 5 渗漉提取工艺 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计与结果

Table 5 Design and results of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test of percolation extraction process

| 试验号            | A/%    | B/倍    | C/(mL $\cdot$ min <sup>-1</sup> ) | D/h    | 出膏率/% | $\omega_1$ /% | $\omega_2$ /% | 综合评分/% |
|----------------|--------|--------|-----------------------------------|--------|-------|---------------|---------------|--------|
| 1              | 60 (1) | 8 (1)  | 1.0 (1)                           | 8 (1)  | 15.67 | 0.48          | 1.85          | 76.19  |
| 2              | 60 (1) | 10 (2) | 1.5 (2)                           | 16 (2) | 18.56 | 0.54          | 2.48          | 92.38  |
| 3              | 60 (1) | 12 (3) | 2.0 (3)                           | 24 (3) | 17.80 | 0.52          | 2.08          | 85.08  |
| 4              | 70 (2) | 8 (1)  | 1.5 (2)                           | 24 (3) | 18.48 | 0.63          | 2.35          | 94.93  |
| 5              | 70 (2) | 10 (2) | 2.0 (3)                           | 8 (1)  | 20.25 | 0.59          | 2.39          | 97.01  |
| 6              | 70 (2) | 12 (3) | 1.0 (1)                           | 16 (2) | 19.73 | 0.60          | 2.30          | 95.37  |
| 7              | 80 (3) | 8 (1)  | 2.0 (3)                           | 16 (2) | 17.94 | 0.57          | 2.15          | 88.59  |
| 8              | 80 (3) | 10 (2) | 1.0 (1)                           | 24 (3) | 16.38 | 0.51          | 2.10          | 82.04  |
| 9              | 80 (3) | 12 (3) | 1.5 (2)                           | 8 (1)  | 17.55 | 0.49          | 2.05          | 82.80  |
| K <sub>1</sub> | 253.65 | 259.71 | 253.60                            | 256.00 |       |               |               |        |
| K <sub>2</sub> | 287.31 | 271.43 | 270.11                            | 276.34 |       |               |               |        |
| K <sub>3</sub> | 253.43 | 263.25 | 270.68                            | 262.05 |       |               |               |        |
| R              | 33.88  | 11.72  | 17.08                             | 20.34  |       |               |               |        |

Ic 均为 0.3。

综合评分 = (出膏率/出膏率最大值) $\times$ 0.4 + ( $\omega_1/\omega_{1\text{max}}$ ) $\times$ 0.3 + ( $\omega_2/\omega_{2\text{max}}$ ) $\times$ 0.3

实验设计与结果见表 5, 方差分析见表 6。由表 5、6 可知各因素对综合评分的影响大小顺序为 A>D>C>B, 但各因素对提取结果均无显著性影响 ( $P>0.05$ )。综合直观分析表与方差分析表, 得到最优渗漉提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>, 结合因素影响大小和

表 6 渗漉提取工艺方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis of percolation extraction process

| 因素 | 偏差平方和     | 自由度 | F 值      | 显著性 |
|----|-----------|-----|----------|-----|
| A  | 253.433 2 | 2   | 10.520 6 | 无   |
| B  | 24.089 2  | 2   | 1.000 0  |     |
| C  | 62.736 8  | 2   | 2.604 4  | 无   |
| D  | 72.724 7  | 2   | 3.019 0  | 无   |

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

实际生产成本考虑, 优选出最适合渗漉提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, 即以 10 倍量 70%乙醇 1.5 mL/min 渗漉提取, 渗漉前药材先浸泡 16 h。

**2.4.4 验证实验** 为确保该工艺的稳定性, 根据优选结果渗漉提取 3 批样品进行实验, 结果见表 7。所有指标的均值与正交试验结果的较高数据接近, 且各指标 RSD 均小于 3%, 表明优选的工艺条件稳定、可行。

表 7 验证实验结果  
Table 7 Results of verification

| 实验号 | 出膏率/% | $\omega_1$ /% | $\omega_2$ /% |
|-----|-------|---------------|---------------|
| 1   | 19.94 | 0.61          | 2.33          |
| 2   | 19.79 | 0.63          | 2.38          |
| 3   | 20.07 | 0.60          | 2.29          |

### 3 讨论

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; 而药效学可在整体动物、离体器官或组织、细胞、分子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。本实验设计的 4 个工艺方案提取的 WYR 样品对小鼠均具有补肾壮阳作用。对比不同溶剂与配伍提取样品的药效实验, 工艺 3 的效果更好, 可能与部分中药不宜高温提取有关。

本研究根据该复方药味多, 传统的单一提取方法难以全面提取各类药材中主要药效成分的情况, 设计回流提取与渗漉提取相结合的组合提取方式, 以期提高该方的临床疗效。在提取研究药效成分指标筛选上, 本实验充分考虑待选指标在原药材中的含量以及该药材在处方中的用量, 药材量太少的如炙甘草中的主要指标成分就不适合作为药效成分指标, 同样药材中含量太低的如茺蔚肉中的柠檬苦素等也不适合作为药效成分指标。

本实验优选工艺条件时综合考虑长期毒性、药效及多个成分含量, 工艺可行、合理、稳定, 为 WYR 的后续开发提供了可靠的实验依据。

### 参考文献

[1] 卢春茜, 赵国红, 徐慧媛. 徐慧媛教授运用五子衍宗丸加减治疗妇科病经验 [J]. 光明中医, 2017, 32(11): 1559-1560.

[2] 戎志斌, 郭文鹏, 赵志英, 等. 五子衍宗方合逍遥散加减对男子弱精症的临床疗效 [J]. 微循环学杂志, 2015, 25(2): 37-40.

[3] 李媛, 杨智. 马居里运用五子衍宗方加减治疗男科疾病 [J]. 河南中医, 2013, 33(3): 401-402.

[4] 徐玉玲, 白婷钰, 付春梅, 等. 三七配伍丹参对丹参中成分提取溶出的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4357-4363.

[5] 殷明阳, 刘毅, 那溪元, 等. 正交试验优化止咳平喘颗粒处方药材的乙醇提取工艺 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1208-1211.

[6] 张周菊, 张悦, 彭翠香, 等. 药效学结合正交试验优选蛇归止痒方的提取工艺 [J]. 中国药房, 2018, 29(19): 2662-2666.

[7] 余姣, 陈娇, 周文杰, 等. 基于抗炎解热药效的小儿温热口服液中心复合设计-效应面法提取工艺优化研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3632-3638.

[8] Li Y, Zhu C P, Zhai X C, et al. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from pomegranate peel by response surface methodology and their antioxidant potential [J]. Chin Herb Med, 2018, 10(4): 416-423.

[9] 崔婷婷, 黄晴雯, 李心雨, 等. 2 次旋转正交设计优化锁阳总糖提取工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4003-4008.

[10] 石浩源, 王春雷, 赵艳敏, 等. 正交试验结合体外抑制肠平滑肌收缩活性研究优化固公果根总三萜提取工艺 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(11): 1581-1586.

[11] 陈剑平, 陈秋谷, 胡兆流, 等. 基于药效筛选和正交试验优化健脾益肾丸的制备工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5817-5822.

[12] 芦彦兆. 基于化学与药效学结合的藏药湿生扁蕾的提取方法及工艺的研究 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.

[13] 庞燕梅, 周福军, 胡跃强, 等. 基于药效筛选和正交试验优化温肺降浊方的提取工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2420-2425.

[14] 徐继建, 丁志勇, 吴依娜, 等. 五子衍宗丸长期毒性实验研究 [J]. 湖南中医药导报, 2001, 7(6): 333-335.

[15] 葛争艳, 金龙, 刘建勋. 五子衍宗丸补肾壮阳作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 173-176.

[16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1982.

[17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.