

基于药效实验和层次分析法的参芪强心片提取工艺优选

莫平莉¹, 王洛临^{2*}, 卢泳¹, 李洁环², 冯健英², 陈雪婷², 徐文杰², 李智勇²

1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510095

2. 广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095

摘要: **目的** 优化参芪强心片的提取工艺。**方法** 采用药效实验, 以对异丙肾上腺素诱发的大鼠心力衰竭模型心脏病变改善程度为指标, 初步筛选制备工艺; 采用层次分析法结合单因素实验、正交试验, 以固形物质量、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 含量, 优化乙醇回流提取工艺; 以固形物质量和淫羊藿苷含量为指标, 优化煎煮提取工艺, 并对提取工艺进行验证试验。**结果** 药效实验表明工艺 4 更优; 该工艺的最佳提取条件为红参、黄芪等 5 味饮片加 50%乙醇回流提取 3 次, 第 1 次加 11 倍量, 第 2、3 次加 10 倍量, 每次 2.5 h; 淫羊藿等其余 2 味饮片煎煮提取 3 次, 第 1 次加 19 倍量, 第 2、3 次加 16 倍量, 每次 1.5 h。验证试验表明乙醇提取固形物得率平均值为 19.78%、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re 提取率平均值为 77.52%; 水提取固形物得率平均值为 16.58%、淫羊藿苷提取率平均值为 90.98% (RSD<2.0%, n=3)。**结论** 该提取工艺稳定可行。**关键词:** 参芪强心片; 心力衰竭; 提取工艺; 层次分析; 单因素实验; 正交试验; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 淫羊藿苷; 红参; 黄芪; 淫羊藿

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)11-2589-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.013

Optimization of extraction process of Shenqi Qiangxin Tablets based on pharmacodynamic test and analytic hierarchy process

MO Ping-li¹, WANG Luo-lin², LU Yong¹, LI Jie-huan², FENG Jian-ying², CHEN Xue-ting², XU Wen-Jie², LI Zhi-yong²

1. The Fifth Clinical Medicine School Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China

2. Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction technology of Shenqi Qiangxin Tablets (SQT). **Methods** With the improvement of heart lesion of pharmacological model of isoproterenol induced heart failure in rats as the index, pharmacological efficacy test was used to screen extracting conditions of the technology. The extraction technology was optimized by analytic hierarchy process combined with principal component analysis, single factor and orthogonal tests using each content of solid matter, ginsenosides Rg₁, Re as indexes. And the verification test was carried out by using solid mass and icariin content as indexes. **Results** Pharmacological efficacy test showed that technology 4 was superior. The optimal extraction condition of technology 4 was as follow: five medicinal materials including red ginseng and astragalus were reflux extracted three times with 50% ethanol, 11 fold for the first time, 10 fold for the second and three times, 2.5 h for each extraction; Epimedium and the other two medicinal materials were decocted three times with water, 19 fold for the first time, 16 fold for the second and third times, 1.5 h for each decction. The verification test showed that the average yield of ethanol extracted solids was 19.78%, and the average extraction rate of ginsenoside Rg₁ and Re was 77.52%; The average value of water extracted solids was 16.58%, and the average extraction rate of epimedium was 90.98% (RSD < 2.0%, n = 3). **Conclusion** The optimized extraction technology was stable and feasible.

Key words: Shenqi Qiangxin Tablets; heart failure; extraction technology; analytic hierarchy process; single factor test; orthogonal test; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; icariin; red ginseng; *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; *Epimedium brevicornu* Maxim.

收稿日期: 2018-12-28

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A070701017); 广东省科技计划项目 (2013B040200040)

作者简介: 莫平莉 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。Tel: (020)83501292 E-mail: M_Pingli@163.com

*通信作者 王洛临 (1958—), 男, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药新药研发。Tel: (020)83501292 E-mail: luolin_w@163.com

心力衰竭 (heart failure, HF) 简称心衰, 是各种心脏病的终末阶段, 具有预后差、死亡率高的特点^[1]。中医将心衰归属为“心悸”“喘证”“水肿”等范畴, 多采用补气、活血、通络、化瘀等治疗方法^[2-3]。参芪强心片 (Shenqi Qiangxin tablets, SQT) 是由红参、黄芪、淫羊藿等 7 味药组成, 具有益气温阳、活血通络、利水平喘的功效, 临床上主要用于治疗气阳亏虚携痰瘀型心力衰竭, 现将其开发成中成药。为保证该制剂的质量和临床疗效, 本研究通过各提取物制备工艺样品对异丙肾上腺素诱发的大鼠心肌梗大型心力衰竭模型^[4-5]心脏病变的改善程度, 初步筛选提取物制备工艺, 再对所选的提取物制备工艺进行优化, 优选出参芪强心片的最佳提取工艺。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 HPLC、DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; TLE204 分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; R1005 型旋转蒸发仪, 郑州长城科工贸有限公司; JJ500 型电子天平, 常熟市双杰测试仪器厂; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海安亭科学仪器厂; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试药

对照品人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 批号 110703-201128, 质量分数 93.4%)、人参皂苷 Re (Re, 批号 110754-201525, 质量分数 92.3%)、淫羊藿苷 (批号 110737-200415, 质量分数 >98.0%) 购自中国食品药品检定研究院; 红参 *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*、黄芪 *Astragali Radix*、淫羊藿 *Epimedii Folium* 等饮片购于广州市中芝源中药有限公司, 经广东省中医院工程技术研究院王洛临主任中药师鉴定分别为五加科五加属植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的栽培品经蒸制后的干燥根和根茎、豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedii brevicornu* Maxim. 的干燥叶, 均符合《中国药典》2015 年版一部各药材项下相关要求; 乙醇为药用级, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 192~264 g, 鼠龄 5~6 周, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司

提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2013-0004, 实验动物质量合格证号 43004700026924。

2 方法与结果

2.1 不同制备工艺样品的制备

2.1.1 样品 1 20%红参粉碎, 剩余红参与其余药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (60 ℃), 放冷, 加入乙醇使含醇量达 65%, 静置 24 h, 上清液回收乙醇, 浓缩, 干燥, 粉碎, 与红参细粉混匀制成, 1 g 干浸膏粉相当于 8.866 g 生药。

2.1.2 样品 2 红参加 70%乙醇提取 2 次, 每次加 6 倍量, 第 1 次提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 滤过, 回收乙醇, 干燥, 粉碎; 药渣与其余药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (60 ℃), 放冷, 加入乙醇使含醇量达 65%, 静置 24 h, 上清液回收乙醇, 浓缩, 干燥, 粉碎, 与红参乙醇提取干浸膏粉混匀制成, 1 g 干浸膏粉相当于 7.957 g 生药。

2.1.3 样品 3 红参加 70%乙醇提取 2 次, 每次加 6 倍量, 第 1 次提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 滤过, 回收乙醇, 干燥, 粉碎; 药渣与其余药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩, 干燥, 粉碎, 与红参加乙醇提取干浸膏粉混匀制成, 1 g 干浸膏粉相当于 5.670 g 生药。

2.1.4 样品 4 红参、黄芪等 5 味药材加 70%乙醇提取 2 次, 每次加 6 倍量, 第 1 次提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 滤过, 回收乙醇, 干燥, 粉碎; 淫羊藿等其余 2 味药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (60 ℃), 放冷, 加入乙醇使含醇量达 65%, 静置 24 h, 上清液回收乙醇并浓缩, 干燥, 粉碎, 与 70%乙醇提取所得干浸膏粉混匀制成, 1 g 干浸膏粉相当于 7.827 g 生药。

2.1.5 样品 5 红参加 70%乙醇提取 2 次, 每次加 6 倍量, 第 1 次提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 滤过, 回收乙醇, 干燥, 粉碎; 药渣与黄芪煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩, 干燥, 粉碎; 淫羊藿等其余 5 味药材煎煮 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (60 ℃), 放冷, 加入乙醇使含醇量达 65%, 静置 24 h, 上清液回收乙醇, 浓缩, 干燥, 粉碎。将以上所得 3 种干浸膏粉混匀, 制成 1 g 干浸膏粉相当

于 6.064 g 生药。

2.2 不同制备工艺样品对异丙肾上腺素诱发大鼠心衰模型的影响

选取适应性观察合格的 SD 大鼠 156 只,按性别及体质量随机分为 13 组:阴性对照组,模型组,地高辛组(阳性对照),样品 1、2、3、4、5 低和高剂量组。除阴性对照组外其余各组均 sc 异丙肾上腺素,给药体积均为 5 mL/kg,每天给药 1 次,连续给予 13 d,各组每天给予异丙肾上腺素为第 1 天 20 mg/kg、第 2 天 10 mg/kg、第 3 天 5 mg/kg、第 4~13 天 3 mg/kg,制备心肌梗大型心力衰竭动物模型,而阴性对照组每天 sc 等量 0.9%氯化钠注射液。在造模同时(上午给予受试药、下午给予造模药)地高辛组,样品 1、2、3、4、5 低和高剂量组(约相

当于成人临床日拟用量 2、8 倍)按设定要求给大鼠 ig 给予受试药,阴性对照组、模型组大鼠 ig 给予 0.5% CMC-Na 溶液,给药体积均为 10 mL/kg,每天给药 1 次,连续给药 15 d。各组大鼠末次给药结束,采用麻醉结合腹主动脉抽血处死法处死大鼠,进行大体解剖观察后依次取出主动脉和心脏,称定心脏质量,计算脏器系数,取部分主动脉用于血管平滑肌环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)含量的测定。

采用 Excel 进行统计分析,各实验组首先进行组间方差分析(*F*-test),当组间方差齐同时,组间比较采用 Student-*t* 检验(非配对的 *t* 检验)进行统计分析,组间方差不齐时,采用校正的 Student-*t* 检验进行统计分析。结果见表 1。

表 1 不同制备工艺样品对异丙肾上腺素诱发大鼠心衰模型的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of different preparation techniques on isoproterenol induced heart failure in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	<i>n</i>	心脏质量/g	心脏指数	cGMP/(nmol·L ⁻¹)	cAMP/(nmol·L ⁻¹)
阴性对照	—	12	0.879±0.124	0.296±0.023	2.256±0.284	8.089±0.552
模型	—	9	1.334±0.203**	0.446±0.034**	2.210±0.196	8.622±0.572*
地高辛	0.27	8	1.307±0.234**	0.446±0.022**	2.029±0.289	8.953±0.652**
样品 1	640	8	1.356±0.314**	0.444±0.011**	1.824±0.271*#	8.047±0.600
	2 560	8	1.347±0.087**	0.439±0.025**	2.250±0.361	8.636±0.606*
样品 2	712	8	1.342±0.232**	0.440±0.035**	2.152±0.253	8.395±1.092
	2 848	8	1.276±0.185**	0.428±0.057**	2.309±0.152	7.585±0.329##
样品 3	1 000	8	1.303±0.189**	0.425±0.033**	2.062±0.315	9.575±1.200**
	4 000	8	1.305±0.185**	0.429±0.026**	1.988±0.166*#	10.083±0.754***
样品 4	724	10	1.324±0.191**	0.438±0.037**	2.186±0.229	7.756±0.500##
	2 896	8	1.358±0.184**	0.434±0.041**	1.732±0.251***	7.538±0.646##
样品 5	936	8	1.192±0.130**	0.421±0.021**	2.044±0.071	7.647±1.337
	3 744	8	1.334±0.170**	0.447±0.036**	2.136±0.422	7.403±0.682***

与阴性对照组比较: **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 negative control group; #*P*<0.05 ##*P*<0.01 vs model group

结果显示,与阴性对照组相比,模型动物心脏质量和心脏指数明显增加(*P*<0.01)。与模型组相比,各样品组动物心脏质量和指数未见明显改善。cAMP 测定结果显示,与阴性对照组相比,模型组 cAMP 含量明显升高(*P*<0.05)。与模型组相比,阳性药地高辛组对 cAMP 含量未见明显改善;样品 2 高剂量组,样品 4 低、高剂量组,样品 5 高剂量组血管平滑肌 cAMP 含量均明显下降(*P*<0.01)。cGMP 测定结果显示,与阴性对照组相比,模型组 cGMP 未见明显改变(*P*<0.05)。与模型组相比,样品 1 低剂量组、样品 3 高剂量组、样品 4 高剂量

组血管平滑肌 cGMP 含量均明显下降(*P*<0.05、0.01)。

综上,造模后模型动物的心脏指数明显增加,cAMP 含量显著上升,即心肌梗大型心力衰竭模型复制成功。根据心脏指数及 cAMP、cGMP 含量结果判断,使用样品 4 进行深入研究。

2.3 固形物质量的测定

精密量取各供试品溶液 25 mL,置于已恒定质量的蒸发皿(*W*₁)中,先置于水浴锅上蒸干,再于 105 ℃下干燥 8 h,取出,放置室温后精密称定(*W*₂),按照公式计算固形物质量(*V*为定容体积)。

固形物质量 = $(W_2 - W_1) / 25$

2.4 R_gI、Re 和淫羊藿苷含量测定

2.4.1 R_gI、Re 色谱条件 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 乙腈-水 (20.5 : 79.5), 体积流量 1.1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 进样量 8 μL。理论塔板数按 R_gI 峰计算不低于 6 000。

2.4.2 淫羊藿苷色谱条件 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 乙腈-水 (29 : 71), 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 270 nm, 进样量 5 μL, 理论塔板数按淫羊藿苷峰计算不低于 1 500。

2.4.3 对照品溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成含 R_gI 950.8 μg/mL、Re 609.18 μg/mL 的混合对照品溶液, 以及含淫羊藿苷 58.4 μg/mL 的对照品溶液。

2.4.4 SQT 供试品溶液的制备 精密量取样品 (样品 4) 5 mL, 用水饱和正丁醇振摇提取 5 次, 每次 30 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去氨液, 再用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 30 mL, 弃去水层, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇溶解, 并转移至 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为 R_gI、Re 供试品溶液。另取样品 1 mL 于 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 30 min, 放冷, 定容, 摇匀, 作为淫羊藿供试品溶液。

2.4.5 阴性供试品溶液的制备 称取缺红参阴性处方、缺淫羊藿阴性处方 2 份。缺红参阴性处方采用 70%乙醇回流提取 2 次, 每次加 6 倍量, 第 1 次提取 1.5 h, 第 2 次提取 1 h, 滤过, 回收乙醇并定容至 200 mL; 缺淫羊藿阴性处方煎煮提取 2 次, 每次加 10 倍量水, 第 1 次煎煮 1.5 h, 第 2 次煎煮 1 h, 滤过, 浓缩并定容至 200 mL。按“2.4.4”项下方法制备得缺红参阴性供试品溶液和缺淫羊藿阴性供试品溶液。

2.4.6 专属性试验考察 分别吸取上述对照品、供试品及阴性供试品溶液进样测定。测试结果表明, 缺红参阴性供试品溶液和缺淫羊藿供试品溶液在 R_gI、Re、淫羊藿苷色谱峰相应的位置上无吸收, 阴性供试品溶液均无干扰。见图 1~2。

2.4.7 线性关系考察 精密量取 R_gI、Re 混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 各置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 再取淫羊藿苷对照品溶液同法操作, 即得 2 个系列对照品溶

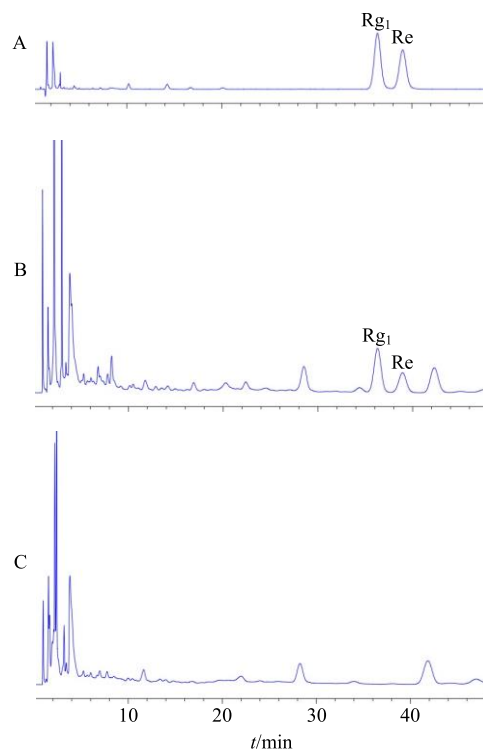


图 1 R_gI 和 Re 混合对照品 (A)、SQT 供试品 (B) 和阴性供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances of R_gI and Re (A), SQT sample (B), negative control (C)

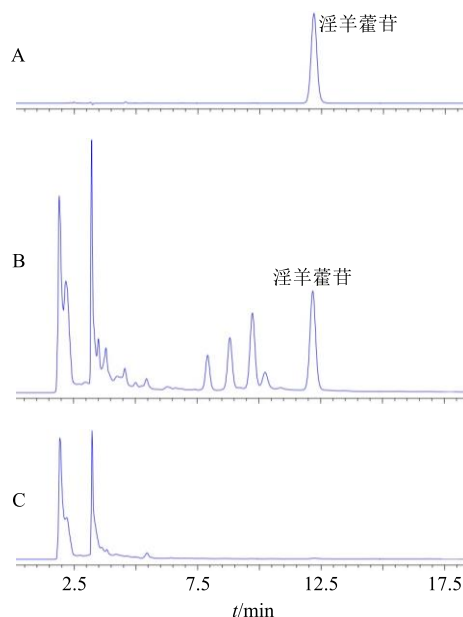


图 2 淫羊藿苷对照品 (A)、SQT 供试品 (B) 和阴性供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of icariin reference substance (A), SQT sample (B), and negative control (C)

液, R_gI、Re 系列对照品溶液进样 10 μL, 淫羊藿苷系列对照品溶液 15 μL, 测得峰面积。以进样量

为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得 R_{g1} 、 Re 和淫羊藿苷的标准曲线分别为 $Y=207.705\ 642\ X-7.687\ 657\ 5$, $r=0.999\ 93$; $Y=264.661\ 553\ X-8.914\ 378$, $r=0.999\ 92$; $Y=2.206\ 013\ 2\ X-1.590\ 343\ 1$, $r=0.999\ 99$, 线性范围分别为 $0.950\ 8\sim 9.508\ 0\ \mu\text{g}$ 、 $0.609\ 2\sim 6.091\ 8\ \mu\text{g}$ 、 $87.6\sim 876.0\ \text{ng}$ 。

2.5 吸水率考察

称取乙醇提取处方 3 份, 加 5 倍量 70%乙醇, 密封浸泡 24 h 后, 称定饮片质量, 计算平均吸醇率为 79.81%; 另取水提取处方各 3 份, 加 10 倍量水, 浸泡 24 h 后, 称定饮片质量, 计算平均吸水率为 323.01%。因此, 考察提取工艺时, 乙醇提取处方第 1 次煎煮应多加 1 倍量溶剂, 水提取处方第 1 次煎煮应该多加 3 倍量水。

2.6 层次分析法确定乙醇提取各指标权重系数^[6-7]

乙醇提取工艺的考察选择固形物质量和 R_{g1} 、 Re 含量为评价指标, 根据 SQT 处方中君臣佐使配伍及各成分药理作用强弱, 将固形物质量和 R_{g1} 、 Re 含量作为权重指标给予量化, 即将 3 个指标分成 3 个层次, 并确定先后次序: $R_{g1}>Re>$ 固形物质量, 构建成对比较的判断优先矩阵, 赋予各项指标间的相对评分, 指标成对比较的优先矩阵见表 2。

表 2 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 2 Priority matrix for comparison on index pairs

权重指标	R_{g1} 含量	Re 含量	固形物质量
R_{g1} 含量	1	2	5
Re 含量	1/2	1	4
固形物质量	1/5	1/4	1

由表 2 得, 按公式 $w_i'=(a_{i1}a_{i2}a_{i3}\cdots a_{im})^{1/m}$ 计算初始权重系数 (w'), 得 $w_1'=2.154\ 4$, $w_2'=1.259\ 9$, $w_3'=0.368\ 4$; 按照公式 $w_i=w_i'/\sum_{i=1}^m w_i''$ 计算归一化权重系数 (w), 得 $w_1=0.569\ 5$, $w_2=0.333\ 1$, $w_3=0.097\ 4$; 按公式 $CI=(\lambda_{\max}-m)/(m-1)$ 和 $\lambda_{\max}=1/m\sum_{i=1}^m(\sum_{j=1}^m a_{ij}\times w_j/w_i)$ 计算一致性指标 (CI), 得 $CI=0.012\ 3$; 查找相应的平均随机一致性指标 (RI), 见表 3。按公式 $CR=CI/RI$ 计算一致性比例因子, 得 $CR=0.021\ 2<0.1$ 。因此, 3 项指标优先比较矩阵满足一致性要求。求得的权重有效, 即 R_{g1} 、 Re 、固形物质量权重系数确定为 0.569 5、0.333 1、0.097 4。

表 3 平均随机一致性指标 RI 表

Table 3 RI table of mean random consistency index

矩阵阶数	RI	矩阵阶数	RI	矩阵阶数	RI
1	0.00	4	0.90	7	1.32
2	0.00	5	1.12	8	1.41
3	0.58	6	1.24	9	1.45

综合评分值=固形物质量总量/固形物质量最大值 $\times 0.097\ 4+R_{g1}$ 含量/ R_{g1} 含量最大值 $\times 0.569\ 5+Re$ 含量/ Re 含量最大值 $\times 0.333\ 1$ 。

2.7 乙醇提取工艺的单因素实验

考察不同乙醇体积分数、料液比、提取时间及提取次数对乙醇回流提取工艺的影响。

2.7.1 乙醇体积分数 称取乙醇提取处方 5 份, 分别加 10 倍量 40%、50%、60%、70%、80%乙醇, 回流提取 2 h。

2.7.2 料液比 称取乙醇提取处方 5 份, 分别加入 4、6、8、10、12 倍量 70%乙醇, 回流提取 2 h。

2.7.3 提取时间 称取乙醇提取处方 5 份, 分别加入 10 倍 70%乙醇回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h。

2.7.4 提取次数 称取乙醇提取处方 4 份, 分别加入 10 倍量 70%乙醇回流提取 1、2、3、4 次, 每次 1.5 h。

分别将上述各提取液滤过, 浓缩并定容至 200 mL, 测定 R_{g1} 、 Re 含量和固形物质量并计算综合评分值, 结果见表 4~7。由综合评分值结合实际情况确定正交试验各因素水平选取: 乙醇体积分数 50%、60%、70%, 料液比 6、8、10 倍, 煎煮时间 1.5、2.0、2.5 h, 煎煮次数 1、2、3 次。

2.8 乙醇提取工艺的正交试验

称取乙醇提取处方 27 份, 按 $L_9(3^4)$ 正交表结合单因素实验选出的因素与水平进行回流提取, 滤过, 浓缩并定容至 200 mL。正交表因素排满, 通过

表 4 乙醇提取单因素实验乙醇体积分数考察结果

Table 4 Single factor test results of ethanol concentration in ethanol extraction process

乙醇/ %	固形物 质量/g	R_{g1} / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Re / ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	综合评 分值
40	29.100 3	0.978 1	0.356 4	87.99
50	28.646 4	0.998 6	0.528 3	99.85
60	27.014 7	0.953 3	0.321 3	83.67
70	25.539 7	0.938 2	0.315 1	81.92
80	21.882 4	0.845 5	0.353 0	77.80

表 5 乙醇提取单因素实验料液比考察结果

Table 5 Single factor test results of solid-liquid ratio in ethanol extraction process

溶剂用 量/倍	固形物 质量/g	R _{g1} / (mg·mL ⁻¹)	Re/ (mg·mL ⁻¹)	综合评 分值
4	22.901 9	0.792 2	0.253 5	71.19
6	26.291 5	0.887 1	0.347 3	84.53
8	26.815 2	0.908 6	0.445 3	93.03
10	28.996 0	0.963 9	0.459 7	97.95
12	29.219 2	0.998 5	0.420 4	97.15

表 6 乙醇提取单因素实验提取时间考察结果

Table 6 Single factor test results of extraction time in ethanol extraction process

提取时 间/h	固形物 质量/g	R _{g1} / (mg·mL ⁻¹)	Re/ (mg·mL ⁻¹)	综合评 分值
0.5	18.737 9	0.503 9	0.175 3	48.24
1.0	25.076 8	0.821 9	0.289 5	77.19
1.5	26.599 5	0.803 7	0.335 0	80.48
2.0	27.923 7	0.914 2	0.318 2	85.55
2.5	29.662 9	1.036 9	0.404 2	99.94
3.0	29.833 9	0.930 3	0.339 5	88.81
3.5	29.781 1	0.962 5	0.368 3	92.94

表 7 乙醇提取单因素实验提取次数考察结果

Table 7 Single factor test results of extraction times in ethanol extraction process

提取 次数	固形物 质量/g	R _{g1} / (mg·mL ⁻¹)	Re/ (mg·mL ⁻¹)	综合评 分值
1	27.129 6	0.812 8	0.303 3	65.41
2	37.166 4	1.050 0	0.425 8	87.44
3	38.400 5	1.161 7	0.441 3	93.95
4	38.580 5	1.247 0	0.471 2	100.00

3 次重复试验来统计实验误差。因素与水平见表 8, 正交试验结果见表 9, 方差分析结果见表 10, 方差分析结果由 SPSS 17.0 软件统计得到^[8]。结果表明, 各因素影响大小为 D>B>A>C, 且各因素对乙醇提取结果有显著性影响 ($P<0.05$)。故确定最佳的煎煮工艺为 A₁B₃C₃D₃, 即加 50%乙醇回流提取 3 次, 第 1 次加 11 倍量, 第 2、3 次加 10 倍量, 每次 2.5 h。

2.9 层次分析法确定水提取各指标权重系数

水提取工艺的考察选择固形物质量和淫羊藿苷含量为评价指标, 并给予量化, 即将 2 个指标分成 2 个层次, 确定其先后次序: 淫羊藿苷含量>固形物质量, 构建成对比较的判断优先矩阵, 见表 11。

表 8 因素与水平表

Table 8 Factors and levels

水平	乙醇体积分数 (A)/%	料液比 (B)/倍	提取时间 (C)/h	提取次数 (D)
1	50	第 1 次加 7 倍, 第 2、3 次加 6 倍	1.5	1
2	60	第 1 次加 9 倍, 第 2、3 次加 8 倍	2.0	2
3	70	第 1 次加 11 倍, 第 2、3 次加 10 倍	2.5	3

表 9 乙醇提取工艺正交试验设计表及结果 ($n=9$)Table 9 Orthogonal test design and result of ethanol extraction process ($n=9$)

试验号	A/%	B/倍	C/h	D	固形物质量/g	R _{g1} /(mg·mL ⁻¹)	Re/(mg·mL ⁻¹)	综合评分值
1	1	1	1	1	27.613 2	0.734 1	0.228 1	40.56
2	1	2	2	2	36.427 4	1.035 6	0.459 4	62.62
3	1	3	3	3	42.157 6	1.542 9	0.686 0	90.59
4	2	1	2	3	37.346 8	1.144 4	0.457 9	66.37
5	2	2	3	1	29.900 3	0.798 5	0.332 5	47.75
6	2	3	1	2	35.024 5	1.090 6	0.587 4	69.69
7	3	1	3	2	32.540 0	0.966 1	0.353 3	54.81
8	3	2	1	3	34.960 6	1.055 0	0.431 7	61.72
9	3	3	2	1	26.553 7	0.782 3	0.285 7	44.42
K ₁	193.77	161.74	171.97	132.73				
K ₂	183.81	172.09	173.41	187.12				
K ₃	160.95	204.70	193.15	218.68				
R	32.82	42.96	21.18	85.95				

表 10 方差分析结果

Table 10 Analysis results of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
A	566.064	2	11.690	0.001
B	1 005.197	2	20.758	0.000
C	280.425	2	5.791	0.011
D	3 780.729	2	78.076	0.000
误差	435.816	18		

表 11 指标成对比较的判断优先矩阵

Table 11 Priority matrix for comparison on index pairs

权重指标	淫羊藿苷含量	固形物质量
淫羊藿苷含量	1	3
固形物质量	1/3	1

根据表 11 的评分结果,计算得到淫羊藿苷含量和固形物质量的权重系数分别为 0.634 0、0.366 0,一致性比例因子 $CR=0<0.1$ 。因此,2 项指标优先比较矩阵满足一致性要求。求得的权重有效,即淫羊藿苷含量和固形物质量的权重系数确定为 0.634 0、0.366 0。

综合评分值 = 固形物质量总量/固形物质量最大值 $\times$ 0.366 0 + 淫羊藿苷含量/淫羊藿苷含量最大值 $\times$ 0.634 0

2.10 水提取工艺的单因素实验

考察不同料液比、煎煮时间及煎煮次数对煎煮提取工艺的影响。

2.10.1 料液比 称取水提取处方 8 份,分别加入 6、8、10、12、14、16、18、20 倍量水,煎煮 2 h。

2.10.2 煎煮时间 称取水提取处方 5 份,分别加入 14 倍水煎煮 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h。

2.10.3 煎煮次数 称取水提取处方 4 份,分别加入 14 倍水煎煮 1、2、3、4 次,每次 1.5 h。

分别将上述各提取液滤过,浓缩并定容至 200 mL,测定固形物质量和淫羊藿苷含量,并计算综合评分值,结果见表 12~14。由综合评分值结合实际情况确定正交试验各因素水平选取:料液比 14、16、18 倍,煎煮时间 1.0、1.5、2.0 h,煎煮次数 1、2、3 次。

2.11 水提取工艺的正交试验

称取水提取处方 9 份,按 $L_9(3^4)$ 正交表结合单因素实验所选的因素与水平进行煎煮提取,滤过,浓缩并定容至 200 mL。因素与水平设计表见表 15,正交试验结果见表 16,方差分析结果见表 17。方差分析结果由 SPSS 17.0 软件统计得。结果表明,各

表 12 水提取单因素实验料液比考察结果

Table 12 Single factor test results of solid-liquid ratio in water extraction process

料液比	固形物质量/g	淫羊藿苷/(mg·mL ⁻¹)	综合评分值
6	6.315 2	0.381 4	39.89
8	7.731 5	0.395 3	44.62
10	9.108 5	0.746 5	47.86
12	10.430 1	0.749 1	72.88
14	11.079 5	0.871 9	81.90
16	11.606 9	1.078 8	95.51
18	12.911 7	1.072 6	98.76
20	13.228 0	0.796 1	83.39

表 13 水提取单因素实验煎煮时间考察结果

Table 13 Single factor test results of extraction time in water extraction process

煎煮时间/h	固形物质量/g	淫羊藿苷/(mg·mL ⁻¹)	综合评分值
0.5	10.175 7	0.801 7	64.43
1.0	11.182 7	0.863 6	70.05
1.5	11.457 3	0.935 1	73.95
2.0	12.321 6	1.463 5	99.37
2.5	12.538 9	1.160 0	86.85

表 14 水提取单因素实验煎煮次数考察结果

Table 14 Single factor test results of extraction times in water extraction process

煎煮次数	固形物质量/g	淫羊藿苷/(mg·mL ⁻¹)	综合评分值
1	11.860 8	0.978 1	51.52
2	16.943 7	1.882 5	88.33
3	19.880 5	1.848 6	92.71
4	19.736 5	2.088 8	99.73

因素影响大小为 $C>B>A$,且各因素对水煎煮提取结果有显著性影响 ($P<0.01$)。故确定最佳的煎煮提取工艺为 $A_2B_2C_3$,即加水煎煮 3 次,第 1 次加 19 倍量,第 2、3 加 16 倍量,每次 1.5 h。

2.12 提取工艺验证试验

称取乙醇提取药材、水提取药材各 3 份,按正交试验优选的工艺提取。测定固形物质量和指标成分的含量,并按公式计算得乙醇提取固形物得率平均值为 19.78%, R_{g1} 、 R_e 提取率平均值为 77.52%,综合评分平均值为 98.68;水提取固形物得率平均值为 16.58%,淫羊藿苷提取率平均值为 90.98%,综合评分平均值为 98.42。RSD 值均小于 2.0%,表明该提取工艺稳定可行。

表 15 因素与水平设计表

Table 15 Factors and levels

水平	料液比 (A)	煎煮时间 (B)/h	煎煮次数 (C)
1	第 1 次加 17 倍, 第 2、3 次加 14 倍	1.0	1
2	第 1 次加 19 倍, 第 2、3 次加 16 倍	1.5	2
3	第 1 次加 21 倍, 第 2、3 次加 18 倍	2.0	3

表 16 水提取工艺正交试验设计表及结果 ($n=3$)Table 16 Orthogonal test design and result of water extraction process ($n=3$)

试验号	A	B	C	D (空白)	固形物质量/g	淫羊藿苷/(mg·mL ⁻¹)	综合评分值
1	1	1	1	1	10.750 4	1.048 7	56.09
2	1	2	2	2	15.053 9	1.416 0	76.81
3	1	3	3	3	17.947 2	1.579 3	88.00
4	2	1	2	3	15.385 9	1.294 9	73.50
5	2	2	3	1	17.865 6	1.924 8	99.20
6	2	3	1	2	12.567 2	1.219 4	65.35
7	3	1	3	2	16.754 9	1.729 1	90.53
8	3	2	1	3	12.869 9	1.329 5	69.58
9	3	3	2	1	15.968 3	1.307 1	75.07
K_1	220.90	220.12	191.03				
K_2	238.05	245.60	225.38				
K_3	235.18	228.42	277.73				
R	17.15	25.48	86.70				

表 17 方差分析结果

Table 17 Analysis results of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
A	168.924	2	252.884	0.000
B	338.287	2	506.424	0.000
C	3 812.714	2	5 707.725	0.000
误差	6.680	20		

固形物得率=固形物质量/饮片质量

指标成分提取率=提取液中指标成分的总量/饮片中标成分成分的总量

3 讨论

《中国药典》2015 年版一部红参项下规定含量测定项指标为 Rg_1 、 Re 、人参皂苷 Rb_1 (Rb_1), 但在供试品溶液制备过程中将 Rb_1 除去, 无法检测 Rb_1 , 故选择君药红参中 Rg_1 、 Re 为乙醇提取工艺研究的指标成分^[9]。 Rg_1 、 Re 具有抗动脉粥样硬化、抗心律失常、抗心肌缺血、抑制心室重构等药理作用^[10-17]。水提取工艺研究选择了臣药淫羊藿中淫羊藿苷作为指标成分, 淫羊藿苷具有舒张血管、降低心肌耗氧量、抗心力衰竭等药理作用^[18-19]。后续可

对各种人参皂苷及其他成分做药效分析作进一步研究, 为参芪强心片所选定提取工艺的药效表现及其优化方法提供进一步的药效物质基础依据。

目前确定权重系数的方法众多, 主要可分为主观权重系数法和客观权重系数法, 而本研究采用层次分析法 (AHP) 确定评价指标权重系数, 该法介于主观和客观权重之间, 既考虑了主研究者对各项指标重要性的判断, 又系统地赋予各指标权重值, 避免了片面性, 使得评价结果更为合理^[20]。

本研究是中医临床经验方结合药效试验的指导下, 选择了 Rg_1 、 Re 、淫羊藿苷及能间接反映其他成分溶出情况的固形物质量作为评价指标, 采用层次分析法结合单因素试验、正交试验优化参芪强心片的提取工艺, 避免了单一因素和主观因素对提取工艺片面性和局限性, 有利于后续新药的开发。

参考文献

- [1] 顾东风, 黄广勇, 何江, 等. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率 [J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(1): 3-6.
- [2] 张奕奕, 薛一涛. 中医药治疗心力衰竭研究进展 [J]. 黑龙江中医药, 2014, 43(4): 62-64.

- [3] 邓青秀, 彭 成. 中药治疗心力衰竭的研究现状 [J]. 中药与临床, 2011, 2(1): 57-60.
- [4] 王晓燕, 李七一, 严士海. 异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(8): 31-34.
- [5] 陈向云, 李尧锋, 刘 杨, 等. 苗药理气活血滴丸对慢性心力衰竭模型大鼠的保护作用研究 [J]. 中药与民族药, 2018, 29(16): 2233-2237.
- [6] 任爱农, 卢爱玲, 田耀洲, 等. 层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 372-374.
- [7] 贾成友, 李 微, 张传辉, 等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 917-922.
- [8] 王 政, 魏 莉. 利用 SPSS 软件实现药学实验中正交设计的方差分析 [J]. 数理医药杂志, 2014, 27(1): 99-102.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] Lim K H, Lim D J, Kim J H. Ginsenoside-Re ameliorates. Ischemia and reperfusion injury in the heart: A hemodynamics approach [J]. *J Ginseng Res*, 2013, 37(3): 283-292.
- [11] 孙宪昌, 郭 俊, 姜明春, 等. 人参皂苷 Rg₁ 通过 Akt-Nrf2 信号通路拮抗顺铂诱导的豚鼠耳毒性作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3309-3317.
- [12] 李 渊, 周 玥, 王亚平, 等. 人参皂苷 Rg₁ 基于 SIRT6/NF-κB 信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4497-4501.
- [13] 向 玥, 陈粼波, 姚 辉, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3789-3795.
- [14] 孙莹莹, 刘 玥, 陈可冀. 人参皂苷的心血管药理效应: 进展与思考 [J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(6): 771-778.
- [15] 安 明, 赵国君, 韦新成. 人参皂苷 Rg₁ 保护心血管和中枢神经系统的药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(1): 75-77.
- [16] 黎 阳, 张铁军, 刘素香, 等. 人参化学成分和药理研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 164-附 2.
- [17] 高晨盈, 王俊逸, 罗云梅, 等. 人参皂苷 Re 对球囊损伤大鼠血管内膜增殖及 TGF-β1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 143-148.
- [18] 李 婍, 王学美. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2727-2731.
- [19] 夏国莲, 黄兆铨. 淫羊藿对心血管系统药理作用的研究新进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(8): 1676-1679.
- [20] 胡长明, 黄 露, 许明旺, 等. 基于层次分析权数法的参葛降脂颗粒提取工艺优选 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(24): 2204-2208.