

正交设计结合药效学实验优选四君子汤颗粒水提及精制工艺

尚芳红^{1,2,3,4}, 阳 勇^{1*}, 宋旭红^{1,2,3,4}, 谭 均^{1,2,3,4}, 王计瑞^{1,2,3,4}, 谭春斌¹

1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065
2. 重庆市中药良种选育与评价工程技术研究中心, 重庆 400065
3. 重庆市中药资源学重点实验室, 重庆 400065
4. 中国中医科学院 中药资源中心 重庆分中心, 重庆 400065

摘要: 目的 优选四君子汤颗粒最佳水提及精制工艺。方法 采取正交试验法, 以人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 及甘草酸、甘草苷的含量及出膏率为指标, 考察浸泡时间、加水量、提取时间、提取次数 4 个因素, 优选四君子汤颗粒最佳水提工艺; 以药液质量浓度、药液含醇量、醇沉时间为考察因素, 优选四君子汤颗粒最佳水提醇沉工艺; 通过干预脾虚证药效学实验对醇沉前后提取物进行比较。**结果** 四君子汤颗粒最佳水提工艺为加 10 倍量的水浸泡 60 min, 煎煮 3 次, 每次 30 min; 最佳水提醇沉工艺为水提滤液浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 0.5 g, 药液含醇量为 80%, 醇沉时间为 12 h。与模型组比较, 四君子汤颗粒水提物组、水提醇沉物组大鼠唾液淀粉酶活性和血清胃泌素含量均显著升高 ($P < 0.05$), 且能提高脾虚大鼠小肠木糖吸收功能 ($P < 0.05$); 与四君子汤颗粒的水提物组比较, 四君子汤颗粒水提醇沉物组 *D*-木糖排泄率有显著性差异 ($P < 0.05$), 但唾液淀粉酶活性和血清胃泌素含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 四君子汤颗粒不宜采用醇沉工艺进行精制, 因此, 选择水提工艺作为四君子汤颗粒的最佳提取工艺。

关键词: 正交设计; 脾虚证; 四君子汤颗粒; 水提工艺; 精制; 人参; 甘草; 多指标综合评分法

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4191-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.012

Optimization of water extracting and refining procession of Sijunzi Decoction Granules by orthogonal design and pharmacodynamics test

SHANG Fang-hong^{1, 2, 3, 4}, YANG Yong¹, SONG Xu-hong^{1, 2, 3, 4}, TAN Jun^{1, 2, 3, 4}, WANG Ji-rui^{1, 2, 3, 4}, TAN Chun-bin¹

1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
2. Chongqing Engineering Research Center for Fine Variety Breeding Techniques of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China
3. Chongqing Key Laboratory of Chinese Medicine Resources, Chongqing 400065, China
4. Chongqing Sub-center of National Resources Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To optimize the water extracting and refining procession of Sijunzi Decoction Granules (SDG). **Methods** The orthogonal test method was used to study the four factors including the soak time, amount of water added, extraction time and frequency by taking the dry extract yield of the medicinal materials and contents of ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁, glycyrrhizic acid, and liquiritin as indicators to optimize the water extracting process of SDG. To optimize the alcohol precipitation process of SDG, the factors including the concentration of the medicinal materials, alcohol content, and time of alcohol precipitation were investigated. The extracts before and after alcohol precipitation were compared by intervening spleen deficiency syndrome pharmacodynamics experiment. **Results** The best water extracting procession of SDG was soaked for 60 min with 10 times of water, decocted three times,

收稿日期: 2020-05-08

基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (cstc2018jcyjAX0669); 重庆市科研机构绩效激励引导专项项目 (基本科研业务费) (cstc2018jxjl-jbky120002)

作者简介: 尚芳红, 女, 讲师, 主要从事中药药理与新药研发。E-mail: shangfh2006@163.com

*通信作者 阳 勇, 男, 副研究员, 主要从事新药开发与代谢组学研究。E-mail: yangychem@126.com

30 min for each time. The optimal water extraction by alcohol sedimentation process was to concentrate the filtrate of water extraction to 1 mL, which was equivalent to 0.5 g of the original medicinal materials, with 80% alcohol content and 12 h alcohol precipitation time. Compared with the model group, the activity of salivary amylase and the content of serum gastrin in the water extracting group and water extracting by alcohol sedimentation group of SDG were significantly increased and could improve the absorption function of xylose in small intestine of rats with spleen deficiency syndrome ($P < 0.05$); Compared with the water extracting group of SDG, there was a significant difference in *D*-xylose excretion rate in the water extracting by alcohol sedimentation group of SDG ($P < 0.05$), but there was no significant difference in activity of salivary amylase and content of serum gastrin ($P > 0.05$). **Conclusion** The alcohol precipitation process is not suitable for refining of SDG. So the water extracting process is finally selected as the best extraction process of SDG.

Key words: orthogonal design; spleen deficiency syndrome; Sijunzi Decoction Granules; water extracting procession; refine; *Ginseng Radix et Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; multi-index evaluation

四君子汤源自宋代《太平惠民和剂局方》，由君药人参、臣药白术、佐药茯苓和使药炙甘草 4 味药组成。方中人参为五加科多年生草本植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 干燥根和根茎，益气固脱、补脾益肺；白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎，健脾益气、燥湿利水；茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核，利水渗湿、健脾宁心；炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎，补脾益气、调和诸药。四药配伍，共奏益气健脾之功，主治脾虚胃弱，言语低微，四肢无力，舌色淡，脉弱细无力，食欲锐减，满腹肠鸣，伴有寒证者^[1-3]。四君子汤在临床上广泛应用，现已开发成膏剂、合剂、丸剂、片剂、胶囊剂、颗粒剂等多种成方制剂，其中四君子丸、四君子颗粒收载于《中国药典》2020 年版。经文献检索，发现目前国内外对于四君子汤制剂提取工艺的研究报道较少。另外，复方制剂的提取工艺多以正交实验为主，偏重指标成分，未能实现与临床疗效相关联。基于此，本研究以人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 及甘草酸、甘草苷的含量及出膏率为考察指标，采用多指标权重分析正交设计结合药效学实验，优选四君子汤颗粒（Si-jun-zi Decoction Granules, SDG）最佳提取工艺，为其更好地发挥药用功效服务临床以及后续制剂的生产提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1263 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；UV 2600 紫外分光光度计，日本岛津公司；Milli-Q Integral 5 型纯水仪，美国 Millipore 公司；BSA 124-S 型电子天平，德国 Sartorius 公司；KQ-250

DB 型数控超声波清洗仪，昆山市超声仪器有限公司；XMTB 数显式电热恒温水浴锅，上海跃进医疗器械有限公司；G2X-9240 MBE 电热鼓风干燥箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；ZDHW 调温电热套，北京中兴伟业仪器有限公司。

1.2 主要试剂

人参皂苷 Rg_1 (Rg_1 , 批号 22427-39-0, 质量分数 98%)、人参皂苷 Rb_1 (Rb_1 , 批号 41753-43-9, 质量分数 98%)、人参皂苷 Re (Re , 批号 52286-59-6, 质量分数 98%)、甘草苷 (批号 551-15-5, 质量分数 98%)、甘草酸 (批号 1405-86-3, 质量分数 98%) 等对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司；西沙必利片 (批号 338520) 购自浙江昂利康制药股份有限公司；*D*-木糖 (批号 141492-19-5) 购自淮南市科迪化工科技有限公司；大鼠胃泌素 (GAS) ELISA 试剂盒 (批号 JL21322-48T) 购自上海江莱生物科技有限公司；甲酸、磷酸、乙腈均为色谱纯，购自阿达马斯公司；无水乙醇、甲酸等皆为分析纯。

1.3 药材

处方中人参 (吉林产，批号 190401)、麸炒白术 (浙江产，批号 181101)、茯苓 (云南产，批号 190301)、炙甘草 (新疆产，181201) 饮片均购自重庆众妙药业有限公司，以上药材经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定，人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎，白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎，茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核，甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。

1.4 动物

SD 雄性大鼠，SPF 级，体质量 (200 ± 20) g，由重庆市中药研究院实验动物研究所提供，生产许

可证号 SCXK(渝)2017-0001, 实验动物质量合格证号 0005053; 饲养于西南大学药学院实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK(渝)2014-0002, 动物房温度 18~22 ℃, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 明暗交替。大鼠的饲养和使用均符合中国《实验动物管理条例》。

2 方法与结果

2.1 R_g₁、R_b₁、Re、甘草苷及甘草酸含量的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.03%甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~15%乙腈; 5~10 min, 15%~19%乙腈; 10~15 min, 19%乙腈; 15~25 min, 19%~24%乙腈; 25~40 min, 24%乙腈; 40~55 min, 24%~36%乙腈; 55~65 min, 36%乙腈; 65~75 min, 36%~60%乙腈; 75~80 min, 60%~5%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; R_g₁、R_b₁、

Re、甘草苷的检测波长为 203 nm, 甘草酸的检测波长为 254 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL, 色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 R_g₁、Re、R_b₁、甘草苷及甘草酸对照品适量, 以甲醇溶解定容, 得到质量浓度分别为 0.638、0.600、0.906、0.597、0.603 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定水提或水提醇沉后的干膏粉末(过 65 目筛) 0.1 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 20 min(功率 200 W, 频率 40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 分别称定缺人参、缺甘草的处方量药材, 按“2.1.3”项下方法制备缺人

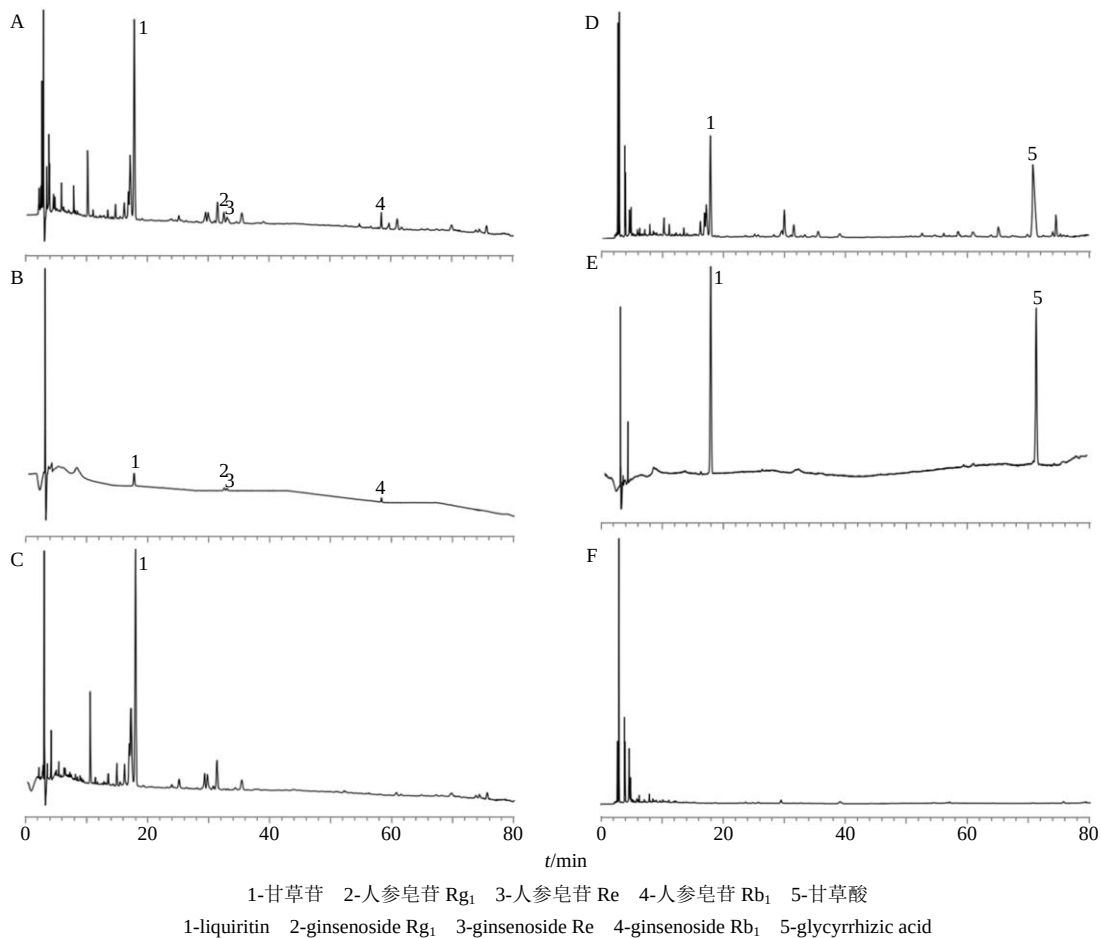


图 1 供试品溶液 (203 nm, A)、混合对照品溶液 (203 nm, B)、人参阴性对照溶液 (203 nm, C)、供试品溶液 (254 nm, D)、混合对照品溶液 (254 nm, E)、甘草阴性对照溶液 (254 nm, F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of samples (203 nm, A), mixed reference substances (203 nm, B), *Ginseng Radix et Rhizoma* negative control samples (203 nm, C), samples (254 nm, D), mixed reference substances (254 nm, E) and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* negative control samples (254 nm, F)

参、缺甘草的2份阴性样品溶液。

2.1.5 系统适应性试验和专属性试验 分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液、阴性对照溶液各20 μL ，进样分析。 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸保留时间分别为32.51、33.52、58.30、18.12、71.81 min，且分离度良好($R>1.5$)，阴性对照品无干扰。色谱图见图1。

2.1.6 线性关系考察 依次精密吸取上述“2.1.2”项下混合对照品溶液适量，用甲醇稀释后，摇匀，制成系列质量浓度的混合标准溶液。精密吸取20 μL 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，以对照品进样质量浓度为横坐标(X)，峰面积值为纵坐标(Y)，进行线性回归，得到各成分的回归方程、相关系数及线性范围分别为 Rg_1 $Y=10\,357\,X-1\,809.5$ ， $r=0.999\,8$ ，70.9~567.2 $\mu\text{g/mL}$ ；Re $Y=9\,483.3\,X+15\,539$ ， $r=0.999\,5$ ，66.7~533.6 $\mu\text{g/mL}$ ； Rb_1 $Y=6\,048.6\,X+2\,070$ ， $r=0.999\,3$ ，100.7~805.6 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草苷 $Y=42\,039\,X-1\,997.5$ ， $r=0.999\,6$ ，132.6~1\,060.8 $\mu\text{g/mL}$ ；甘草酸 $Y=7\,241.4\,X-8\,092.5$ ， $r=0.999\,8$ ，167.5~2\,680 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.7 精密度试验 精密吸取上述“2.1.2”项下混合对照品溶液20 μL ，按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次，以峰面积计算RSD。结果 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸峰面积的RSD分别为0.28%、0.37%、0.43%、0.36%、0.28%，结果表明仪器精密度良好。

2.1.8 重复性试验 平行制备6份水提供试品溶液，照“2.1.1”项下色谱条件进样，记录 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸的峰面积，并分别计算质量分数。结果 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸的平均质量分数分别为1.54、1.12、1.85、3.77、10.41 mg/g，RSD分别为1.20%、1.32%、1.48%、2.29%、2.45%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.9 稳定性试验 取同一供试品溶液，在室温下自然放置，分别于0、2、4、8、12、24 h精密吸取20 μL 进样分析，测定各成分峰面积。结果 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸峰面积的RSD分别为1.52%、2.34%、2.13%、1.81%、1.41%，结果表明供试品溶液中上述5种成分室温放置24 h内稳定。

2.1.10 加样回收率试验 分别精密吸取已测定的供试品溶液6份，每份1 mL，分别精密添加相当于已知含 Rg_1 0.638 mg/mL、Re 0.600 mg/mL、 Rb_1 0.906 mg/mL、甘草苷 0.597 mg/mL、甘草酸 0.603

mg/mL的混合对照品溶液5 mL，依法测定峰面积并计算各成分加样平均回收率。结果 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草苷及甘草酸的加样平均回收率分别为99.21%、98.97%、98.54%、101.25%、99.04%，RSD分别为2.38%、2.50%、2.39%、2.68%、2.44%，表明所建立的含量测定方法准确性良好。

2.1.11 样品测定 精密称取正交试验浸膏样品，按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液，进样测定。每份样品重复测定2次，根据线性回归方程，计算样品中 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草酸及甘草苷含量平均值。

2.2 水提工艺优选

2.2.1 水提干膏得率测定 称取处方药材9份，每份含人参9 g、白术9 g、茯苓9 g、甘草6 g，按正交设计表所列条件，煎煮，药液滤过，合并滤液(体积记为 V_1)。精密量取适量提取液(体积记为 V_2)至干燥恒定质量的蒸发皿中，水浴蒸干，常压105 $^{\circ}\text{C}$ 烘3 h，取出，置干燥器中冷却30 min，精密称定质量，再于100~105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥1 h，冷却，称定质量，至连续2次称定质量的差异不超过5 mg为止，得到供试品干膏(质量记为 M_1)，根据公式计算得膏率。

$$\text{水提干膏得率} = M_1 V_1 / 33 V_2$$

2.2.2 水提取正交试验设计 选定浸泡时间(A)、加水量(B)、煎煮时间(C)、提取次数(D)为考察因素，以 Rg_1 、Re、 Rb_1 、甘草酸及甘草苷的含量及出膏率为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验，优选出最佳的提取工艺，结果见表1。

采用综合加权评分法对试验结果进行方差分析。按照四君子汤君臣佐使组方原则，人参为君药，设人参中有效成分 Rg_1 、Re及 Rb_1 提取率之和(X_1)权重系数为0.4；使药炙甘草的有效成分甘草酸及甘草苷提取率之和(X_2)和出膏率(X_3)的权重系数均为0.3。在此基础上进行总加权评分，利用综合评分值(Y)对试验结果进行方差分析： M_{ij} 表示第*i*次试验中第*j*个指标的测定值，以各指标的最大值作为参照对同一指标各数据进行标准化处理， D_{ij} 表示第*j*个指标下第*i*个测定值的标准化数据。 $D_{ij} = M_{ij} / (M_j)_{\max}$ ，其中*i*=1, 2, ..., 9；*j*=1, 2, ..., 4。综合评分 $Y = \sum (\text{权重系数} \times D_{ij} \times 100)$ 。 Y 值越大，表示提取工艺越好，以综合评分对试验结果进行直观分析和方差分析，结果见表1、2。

由表1直观分析可知，因素D(煎煮次数)的极差*R*最大，因此是主要影响因素。各因素对四君

表 1 水提工艺正交试验设计与结果

Table 1 Orthogonal experiment design and results of water extraction technology

试验号	A/min	B/倍	C/min	D/次	质量分数/(mg·g ⁻¹)					X ₁	X ₂	X ₃ /%	Y
					Rg ₁	Re	Rb ₁	甘草酸	甘草苷				
1	30 (1)	8 (1)	30 (1)	1 (1)	0.85	1.25	0.32	1.57	2.80	2.42	4.37	19.94	41.13
2	30 (1)	10 (2)	45 (2)	2 (2)	0.46	1.19	0.9	1.24	4.89	2.55	6.13	22.40	46.45
3	30 (1)	12 (3)	60 (3)	3 (3)	1.42	1.25	0.96	14.47	5.46	3.63	19.93	18.96	72.59
4	60 (2)	8 (1)	45 (2)	3 (3)	1.12	0.95	0.93	12.87	4.35	3.00	17.22	11.78	58.28
5	60 (2)	10 (2)	60 (3)	1 (1)	0.22	0.17	1.29	4.95	1.92	1.68	6.87	6.29	28.55
6	60 (2)	12 (3)	30 (1)	2 (2)	1.31	1.58	1.49	14.90	6.61	4.38	21.51	23.68	84.62
7	120 (3)	8 (1)	60 (3)	2 (2)	0.83	0.37	0.59	3.28	6.00	1.79	9.28	17.73	40.97
8	120 (3)	10 (2)	30 (1)	3 (3)	1.55	1.09	1.99	10.41	3.51	4.63	13.92	42.34	89.41
9	120 (3)	12 (3)	45 (2)	1 (1)	1.06	0.94	0.76	7.85	3.22	2.76	11.07	14.48	49.55
K ₁	160.17	140.38	215.16	119.23									
K ₂	171.45	164.41	154.28	172.04									
K ₃	179.93	206.76	142.11	220.28									
R	19.76	66.38	73.05	101.05									

表 2 水提工艺方差分析结果

Table 2 Variance analysis results of water extraction technology

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A (误差)	65.511 8	2	1.000 0	$P>0.05$
B	753.029 8	2	11.494 6	$P>0.05$
C	1 021.198 4	2	15.588 0	$P>0.05$
D	1 703.010 7	2	25.995 5	$P<0.05$

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

子汤水提效果的影响次序依次为 D (煎煮次数) > C (煎煮时间) > B (加水量) > A (浸泡时间), 各因素不同水平程度依次为 $A_3>A_2>A_1$ 、 $B_3>B_2>B_1$ 、 $C_1>C_2>C_3$ 、 $D_3>D_2>D_1$, 结果表明四君子汤最佳水提工艺为 $A_3B_3C_1D_3$ 。表 2 方差分析表明, D 因素对水提效果有显著性影响 ($P<0.05$), 其余 3 个因素均无显著性影响 ($P>0.05$)。考虑大生产合

理、节能降耗的要求, 确定最佳提取工艺为 $A_2B_2C_1D_3$, 即加 10 倍量的水浸泡 60 min, 煎煮 30 min, 煎煮 3 次。

2.2.3 水提取工艺验证试验 为了验证试验结果的准确性及可靠性, 按照处方比例, 精密称取处方量药材 (人参 9 g、白术 9 g、茯苓 9 g、炙甘草 6 g), 加 10 倍量的水浸泡 60 min, 煎煮 30 min, 煎煮 3 次, 合并滤液, 浓缩至相对密度为 1.08~1.10 (60 °C), 真空干燥 (0.08~0.10 MPa, 80 °C) 成干浸膏, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定各项指标。

进行 3 次重复试验, 测得 Rg₁、Re 及 Rb₁ 提取率之和平均值为 4.99 mg/g, RSD 为 2.42%; 甘草酸和甘草苷提取率之和平均值为 20.86 mg/g, RSD 为 3.88%; 得膏率平均值为 43.33%, RSD 为 2.51%, 且组间均无显著性差异, 表明该水提工艺稳定可行, 重复性良好。结果见表 3。

表 3 水提验证工艺结果

Table 3 Comprehensive score results of water extraction verification process

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						X ₃ /%	Y
	Rg ₁	Re	Rb ₁	甘草酸	甘草苷	X ₁	X ₂	
1	1.75	1.72	1.66	14.25	6.10	5.13	20.35	42.18
2	2.11	1.66	1.18	15.71	6.08	4.95	21.79	43.47
3	1.99	1.93	0.98	13.47	6.96	4.90	20.43	44.34
平均值						4.99	20.86	43.33
RSD/%						2.42	3.88	2.51

2.3 醇沉精制工艺优选

2.3.1 醇沉干膏得率的测定 取优选的水提浓缩液, 再按照正交试验安排进行醇沉, 抽滤, 滤液减压浓缩 (50 ℃) 至适量 (体积记为 V_1'), 精密量取适量醇沉溶液 (体积记为 V_2') 至干燥恒定质量的蒸发皿, 真空 (0.08~0.10 MPa, 105 ℃) 干燥至恒定质量, 置干燥器冷却 30 min, 精密称定质量, 再于 100~105 ℃ 下干燥 1 h, 冷却, 称定质量, 至连续 2 次称定质量的差异不超过 5 mg 为止, 得到供

试品干膏 (质量记为 M_1'), 根据公式计算得膏率。

$$\text{醇沉干膏得率} = M_1' V_1' / 33 V_2'$$

2.3.2 醇沉正交试验设计 经前期预试验研究, 影响醇沉效果因素主要有药液质量浓度 (A)、药液含醇量 (B)、醇沉时间 (C), 称等量的处方药材 9 份, 按优选的最佳水提工艺制备药液, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行醇沉试验及方差分析, 优选出最佳醇沉工艺。结果见表 4、5。由表 4 直观分析可知, 因素 B 的极差 R 最大, 因此是主要影响因素。各因素对四君子

表 4 醇沉工艺正交试验设计与结果

Table 4 Orthogonal experiment design and results of alcohol precipitation technology

试验号	A/(g·mL ⁻¹)	B/%	C/h	D (误差)	质量分数/(mg·g ⁻¹)							X ₃ /%	Y
					Rg ₁	Re	Rb ₁	甘草酸	甘草苷	X ₁	X ₂		
1	0.5 (1)	60 (1)	12 (1)	(1)	0.68	0.54	0.40	5.43	2.52	1.62	7.95	18.65	74.82
2	0.5 (1)	70 (2)	24 (2)	(2)	0.66	0.59	0.73	8.05	4.38	1.98	12.43	9.63	75.88
3	0.5 (1)	80 (3)	36 (3)	(3)	0.85	0.71	0.72	7.34	5.76	2.28	13.10	8.17	80.17
4	1.0 (2)	60 (1)	12 (2)	(3)	0.70	0.75	0.49	5.67	4.19	1.94	10.66	7.13	67.50
5	1.0 (2)	70 (2)	24 (3)	(1)	0.54	0.62	0.60	6.16	5.92	1.76	12.08	10.60	72.85
6	1.0 (2)	80 (3)	36 (1)	(2)	0.93	0.59	0.51	8.66	5.88	2.03	14.54	11.65	84.36
7	1.5 (3)	60 (1)	12 (3)	(2)	0.76	0.40	0.59	5.51	3.92	1.75	9.43	11.41	68.52
8	1.5 (3)	70 (2)	24 (1)	(3)	1.02	0.58	0.46	7.89	4.54	2.06	12.43	5.35	70.40
9	1.5 (3)	80 (3)	36 (2)	(1)	0.81	0.55	0.59	6.70	5.86	1.95	11.56	10.03	74.19
K ₁	230.87	210.84	229.58	221.86									
K ₂	224.71	219.13	217.57	228.76									
K ₃	213.11	238.72	221.54	218.07									
R	17.76	27.88	12.01	10.69									

表 5 醇沉工艺方差分析结果

Table 5 Variance analysis results of alcohol precipitation technology

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	54.213 7	2	2.768 4	$P > 0.05$
B	136.643 0	2	6.977 5	$P > 0.05$
C	24.960 3	2	1.274 6	$P > 0.05$
D (误差)	19.583 4	2		

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

汤醇沉效果的影响程度依次是 B (药液含醇量) > A (药液质量浓度) > C (醇沉时间), 各因素不同水平程度依次是 $A_1 > A_2 > A_3$, $B_3 > B_2 > B_1$, $C_1 > C_3 > C_2$ 。再通过表 5 方差分析进一步分析, A (药液质量浓度)、B (药液含醇量)、C (醇沉时间) 对醇沉效果没有显著性影响 ($P > 0.05$)。结果表明四君子汤最佳醇沉工艺为 $A_1B_3C_1$, 即水提滤液浓缩至

1 mL 药液相当于原药材 0.5 g, 药液含醇量为 80%, 醇沉时间为 12 h。

2.3.3 醇沉工艺验证试验 按照处方比例, 精密称取处方量药材 (人参 9 g、白术 9 g、茯苓 9 g、炙甘草 6 g) 3 份, 加 10 倍量的水浸泡 60 min, 煎煮 30 min, 煎煮 3 次, 合并滤液, 浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 0.5 g, 加入乙醇至含醇量为 80%, 静置 12 h, 抽滤, 滤液减压浓缩 (-0.08 MPa, 50 ℃) 至相对密度为 1.20~1.25 (60 ℃), 真空干燥 (80 ℃) 成干浸膏。进行 3 次重复试验, 按照“2.1.1”项下条件测定各项指标。进行 3 次重复试验。测得 Rg_1 、Re 及 Rb_1 提取率之和平均值为 2.36 mg/g, RSD 为 3.46%; 甘草酸和甘草苷提取率之和平均值为 14.16 mg/g, RSD 为 1.13%; 得膏率平均值为 20.06%, RSD 为 1.19%, 且组间均无显著性差异, 表明该醇沉工艺稳定可行, 重复性良好。见表 6。

表 6 醇沉验证工艺综合评分

Table 6 Comprehensive score results of alcohol precipitation verification process

试验号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						X ₃ /%	Y
	R _{g1}	Re	R _{b1}	甘草酸	甘草苷	X ₁	X ₂	
1	1.01	0.68	0.69	8.40	5.72	2.38	14.12	20.18
2	0.95	0.62	0.70	8.03	6.00	2.27	14.03	20.36
3	1.12	0.70	0.61	7.98	6.36	2.43	14.34	19.63
平均值						2.36	14.16	20.06
RSD/%						3.46	1.13	1.90

2.4 药效学实验筛选最佳提取工艺

2.4.1 药物的制备

(1) 四君子汤水提物的制备: 按照处方比例称取全方药材, 按照优化水提工艺提取, 得四君子汤水提物干膏 (1 g 药粉相当于 2.31 g 生药), 备用。

(2) 四君子汤水提醇沉提取物的制备: 按照处方比例称取全方药材, 按优化水提醇沉工艺提取, 得四君子汤水提醇沉提取物干膏 (1 g 药粉相当于原生药 4.98 g), 备用。

(3) 阳性对照药的制备: 取西沙必利片, 加去离子水配成 8 mg/mL 的混悬液, 置于 4 °C 冰箱冷藏, 备用。

(4) 造模药液的制备: 称取大黄饮片 10 kg, 浸泡 30 min 后加 10 倍量的水, 煎煮 2 次, 每次煎煮 30 min, 合并 2 次滤液, 浓缩至 1 g/mL, 冷却, 置于 4 °C 冰箱冷藏, 备用。

2.4.2 分组及处理 取雄性 SD 大鼠 50 只, 随机分成 5 组, 每组 10 只。分为空白对照组、模型组、西沙比利阳性对照组、四君子汤水提物组、四君子汤水提醇沉物组。空白对照组: 每日上午 9 时 ig 0.01 mL/(g·d) 的蒸馏水, 下午 2 时再次 ig 0.01 mL/(g·d) 的蒸馏水; 模型组: 每日上午 9 时 ig 大黄药液 10 g/(kg·d), 下午 2 时 ig 0.01 mL/(g·d) 的蒸馏水; 西沙比利阳性对照组: 上午 9 时 ig 大黄药液 10 g/(kg·d), 下午 2 时 ig 西沙比利溶液 8 mg/(kg·d) 四君子汤水提物组: 上午 9 时 ig 大黄药液 10 g/(kg·d), 下午 2 时 ig 四君子汤水提物 2.16 g/(kg·d) [按成人 60 kg 体质量折算实验大鼠的给药剂量, 生药量剂量为 5 g/(kg·d)]; 四君子汤水提醇沉物组: 上午 9 时 ig 大黄药液 10 g/(kg·d), 下午 2 时 ig 四君子汤水提醇沉物 1.00 g/(kg·d) [生药量剂量为 5 g/(kg·d)]。连续给药 14 d。

2.4.3 唾液淀粉酶的测定^[8-9] 大鼠末次给药后禁

食 12 h (自由饮水), 用 10% 醋酸浸泡过的滤纸置大鼠舌尖处取唾液, 放入 5 mL 生理盐水中保存, 待测。加 0.5% 可溶性淀粉溶液 5 mL, 37 °C 水浴预热 5 min, 再加入唾液 0.1 mL, 混匀, 37 °C 水浴 30 min, 取出后加入碘滴定液 20 μL 摇匀, 立即在 660 nm 波长处用分光光度计测定, 按如下公式计算淀粉酶量。

淀粉酶量 = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度 × 稀释倍数

2.4.4 尿 D-木糖排泄率的测定^[10] 大鼠末次给药后禁食 12 h (自由饮水), 各组大鼠分别 ig 3% D-木糖溶液 4 mL, 于代谢笼中收集 5 h 尿液, 每只大鼠取 0.5 mL 尿液样本, 加双蒸水稀释 10 倍后, 加入 2% 对溴苯胺溶液 2.5 mL。取质量浓度为 1 mg/mL 的 D-木糖溶液, 依次倍比稀释制作标准曲线。标准管和样品管均置 70 °C 恒温水浴 10 min, 再室温放置 70 min 后, 立即在 520 nm 波长处用分光光度计测定。计算尿 D-木糖排泄率。

D-木糖排泄率 = (标准曲线计算质量浓度) × 尿总量 × 尿液稀释倍数 / ig D-木糖溶液体积

2.4.5 血清胃泌素的测定 待收集完大鼠尿液后眼眶取血 2 mL, 室温静置 2 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, -20 °C 保存备用。实验步骤按照大鼠血清胃泌素 (GAS) 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒说明方法操作。

2.4.6 体质量和脏器指数测定 分别测定给药前和给药 14 d 后各组大鼠的体质量, 计算给药过程中各组大鼠体质量变化。给药结束脱颈处死大鼠后, 打开腹腔和胸腔分别取脾脏和胸腺, 剔除周边多余组织, PBS 缓冲液冲洗后, 用滤纸将水吸干, 立即精密称定质量, 计算脏器指数。

脾脏指数 = 脾脏质量 / 大鼠体质量

胸腺指数 = 胸腺质量 / 大鼠体质量

2.4.7 数据处理 采用 SPSS Statistics 17.0 统计软件, 组间差异比较用 t 检验。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2.4.8 结果与分析

(1) SDG 不同提取工艺对大鼠一般状态的影响: 与空白对照组比较, 模型组大鼠在第 5 日开始出现便溏泄泻现象, 随实验进行, 症状不断加重, 进食饮水减少, 体质量减轻, 毛质粗糙色黯、精神萎靡、聚堆懒动, 这与临床上脾虚证的症状相似。阳性对照组、四君子汤水提物组及四君子汤水提醇沉物组大鼠的上述症状与模型组比较有较明显改善。14 d 后, 治疗组大鼠的精神状态与空白对照组接近。

(2) SDG 不同提取工艺对大鼠体质量和脏器指

数的影响: 在造模的第 14 天, 与空白对照组比较, 模型组大鼠体质量显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 阳性对照组、四君子汤水提物组及四君子汤水提醇沉物组大鼠体质量显著升高 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 模型组大鼠脾脏和胸腺指数均显著性降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 阳性对照组、四君子颗粒水提物组及四君子颗粒水提醇沉物组大鼠脏器指数均显著升高 ($P < 0.05$), 提示四君子颗粒水提物和水提醇沉物可以显著减轻由脾虚所引起的脏器损伤, 可以提高大黄所致的脾虚证模型大鼠的体质量与免疫力。与水提物组比较, 水提醇沉物组大鼠体质量与脏器指数均无显著性差异 ($P > 0.05$), 表明 SDG 不同提取工艺对大鼠的体质量和脏器指数无明显影响。见表 7。

表 7 SDG 不同提取物对大鼠体质量 (第 14 天) 和脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of SDG different extracts on rat body weight (on day 14) and viscera index ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	大鼠体质量/g	脾脏指数/%	胸腺指数/%
空白对照	—	320.40 ± 8.57	0.33 ± 0.06	0.13 ± 0.03
模型	10	258.36 ± 9.30**	0.24 ± 0.06**	0.08 ± 0.02**
阳性对照	0.008	301.39 ± 10.92##	0.29 ± 0.04#	0.11 ± 0.02##
水提物	2.16	290.27 ± 10.27##	0.28 ± 0.02#	0.11 ± 0.03#
水提醇沉物	1.00	287.94 ± 8.95##	0.29 ± 0.03#	0.10 ± 0.02#

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs vehicle control group; # $P < 0.05$ vs model group

(3) SDG 不同提取物对大鼠唾液淀粉酶活性的影响: 与空白对照组比较, 模型组大鼠唾液淀粉酶活性显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性对照组、SDG 水提物组及水提醇沉物组大鼠唾液淀粉酶活性显著升高 ($P < 0.01$), 表明 SDG 能改善脾虚大鼠唾液淀粉酶分泌障碍。与水提物组比较, 水提醇沉物组唾液淀粉酶活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 2-A。

(4) SDG 不同提取物对大鼠 D-木糖排泄率的影响: 与空白对照组比较, 模型组大鼠 D-木糖排泄率显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性对照组、SDG 水提物组及水提醇沉物组大鼠 D-木糖排泄率显著升高 ($P < 0.05$), 表明 SDG 能提高脾虚大鼠小肠木糖吸收功能。与 SDG 的水提物组比较, SDG 水提醇沉物组 D-木糖排泄率有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明 SDG 的水提物组提高脾虚大鼠小肠木糖吸收功能优于水提醇沉组。见图 2-B。

(5) SDG 不同提取物对大鼠血清胃泌素含量的影响: 与空白对照组比较, 模型组大鼠血清胃泌素

含量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 阳性对照组、SDG 水提物组及水提醇沉物组大鼠血清胃泌素含量显著升高 ($P < 0.05$), 表明 SDG 能提高脾虚大鼠血清中胃泌素的含量。与 SDG 的水提物组比较, SDG 水提醇沉物组血清胃泌素含量较低, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。见图 2-C。

3 讨论

3.1 评价指标的选择

现代药理研究表明, 四君子汤作为补脾益气的代表方剂, 主要通过调节胃肠功能、增强机体免疫力发挥作用^[11], 而其中发挥主要功效的成分为人参皂苷类及甘草类成分^[12-14]。Rb₁、Re、Rg₁ 以及甘草酸、甘草苷是《中国药典》2020 年版中规定人参与甘草中所必需有的化学成分, 也是四君子汤中的 5 种指标性成分。另外, 本实验水煎煮四君子汤溶液中未检测到茯苓和白术中的相关化合物, 这与同类研究报道一致^[15], 分析原因可能是茯苓中的萜类、有机酸类以及白术中的内酯类均不溶于水, 在其传统的煎煮法中亦未完全释放出来。因此, 本实验采

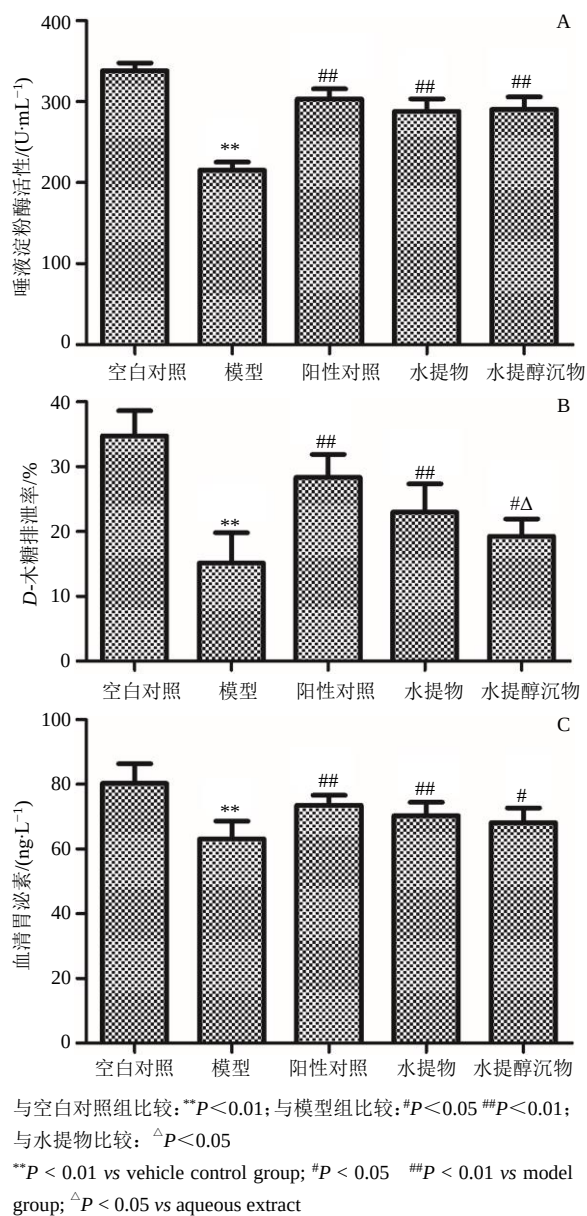


图 2 SDG 不同提取物对大鼠唾液淀粉酶活性、*D*-木糖排泄率及血清胃泌素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 2 Effects of SDG different extracts on rat salivary amylase activity, *D*-xylose excretion rate, and content of serum gastrin ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

用上述 5 种与药效相关联的化学成分和出膏率等多指标进行评价, 优选出最佳工艺, 避免了以单一因素进行评价造成的局限性和不准确性, 使其实验结果更能反映复方制剂的内在质量。

根据《脾胃论》中李东垣“苦寒之药损其脾胃”理论, 选用国内目前常用的苦寒药大黄来复制脾虚证动物模型^[16], 其大鼠表现的一系列症状与中医脾虚证如形体消瘦、神疲乏力、纳差便溏等有很多相似之处。酸刺激后唾液淀粉酶活性比值变化, 是判

断脾虚证的一项重要参考客观指标之一, 并且与中医“脾开窍于口”“涎为脾之液”的理论认识较为符合^[10,17]。*D*-木糖是一种戊糖, 口服后经小肠吸收, 在体内不被肝脏代谢, 经肾脏排出, 口服木糖后尿中排出量可以反映小肠相对吸收量, *D*-木糖排泄率降低是临床脾虚证诊断指标之一^[18]。GAS 是由 G-细胞分泌, 分布在胃窦部、胃底、十二指肠和空肠等处的一种胃肠激素, 具有刺激胃酸的分泌、促进胃黏膜和壁细胞的生长以及胃肠道蠕动等多种生理功能, 血清及细胞中 GAS 水平紊乱是脾胃运化功能障碍的重要原因, 故血清 GAS 水平可作为脾虚证诊断及疗效评定的客观指标^[19]。基于上述原因, 本实验选择唾液淀粉酶活性、*D*-木糖排泄率及 GAS 含量作为脾虚证大鼠药效实验的评价指标。

本实验在考察 SDG 中 5 种主要有效成分含量的基础上, 再以 3 种药效学指标的方式优化 SDG 的提取工艺, 可避免大鼠个体差异和药理实验条件差异对其实验结果的影响, 以及采用单一指标中实验的偶然性, 降低误差。另外, 综合化学成分指标与药效评价, 还可避免新工艺有可能对组分协同效应的破坏^[20]。

3.2 提取溶剂的选择

中药制剂提取工艺的科学合理性直接影响到产品的质量与疗效。通过查阅文献发现, 影响中药制剂提取工艺的因素有很多, 包括溶剂的选择、溶剂用量、浸泡时间、提取时间、提取次数等^[21]。中药经典名方作为中药方剂的杰出代表, 是目前我国中药创新药物开发研究的热点之一。《中药注册管理补充规定》第七条明确规定, 经典名方的生产工艺与传统工艺基本一致, 这里的“基本一致”应理解为提取溶剂一致, 即选择水提取, 提取工艺参数在参照古籍记载的同时需深入的考察和优化^[22]。四君子汤是中医“益气健脾”的经典代表名方汤剂。因此, 在不改变水作为提取溶剂的条件下优化四君子汤颗粒制剂的提取工艺。

3.3 提取工艺结果分析

本实验采用中药化学和中药药理相结合的研究模式来优选 SDG 的最佳水提及精制工艺。结果显示, SDG 的水提物对于提高脾虚大鼠小肠木糖吸收功能优于水提醇沉物, 而对于脾虚大鼠唾液淀粉酶活性和血清胃泌素含量的影响均无显著性差异, 提示 SDG 不宜采用醇沉工艺进行精制。推测其原因有两方面, 其一, 本实验工艺评价未考虑多糖成分

的影响,从而导致醇沉后的提取物疗效下降。其二,水提醇沉提取物虽有精制除杂,减少服用量,方便成型等优势,但也可能除去具有协同作用的有效成分,使其药效降低。另外,中药水提物更能够体现中医药特色,能够最大限度地保留水煎汤剂的有效成分^[23]。基于此,为了不影响其临床药效,最终选择水提工艺作为SDG的最佳提取工艺。

参考文献

- [1] 杨佃会, 彭伟. 四君子汤 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.
- [2] Kang A, Guo J R, Zhang Z, et al. Simultaneous quantification of ten active components in traditional Chinese formula Sijunzi Decoction using a UPLC-PDA method [J]. *J Anal Methods Chem*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/570359>.
- [3] Guan Z B, Wang M, Cai Y, et al. Rapid characterization of the chemical constituents of Sijunzi decoction by UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2018, (1086): 11-12.
- [4] 许闪闪, 欧晓阳, 袁强. 正交试验法优选加味四君子汤提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 33-35.
- [5] 张挪威, 万长荣, 赵宏. 四君子汤提取工艺优化研究 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(6): 1-4.
- [6] 申力, 吴瑾瑾, 易会助, 等. 多指标正交试验法优选四君子汤煎膏剂的提取工艺 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(11): 852-854.
- [7] 江华娟, 何瑶, 陈意, 等. BP神经网络结合熵权法多指标优化四物汤水提工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(18): 4313-4319.
- [8] 崔小兵, 孙学, 文红梅, 等. 不同加工方式的中药白术对脾虚大鼠唾液淀粉酶活性和尿中D-木糖排泄率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2576-2580.
- [9] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [11] 高蓓蓓, 彭颖, 李晓波. 四君子汤复方多糖肠道免疫调节作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 462-467.
- [12] 纪云飞, 王瑞君, 李晓波. 复方四君子汤的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 837-843.
- [13] Wang Y Y, He S, Cheng X C, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of traditional Chinese formula Si Jun Zi Tang [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 80(6): 24-33.
- [14] Liu Y, Yang J, Cai Z. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs *Panax ginseng* and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(5): 1642-1647.
- [15] 尚如霞, 徐卫东, 许晓倩, 等. 四君子汤血清药效成分的HPLC-MS分析 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2018, 28(6): 529-533.
- [16] 王晔, 王建伟, 王纪元, 等. 中医脾虚证动物模型研究的探析 [J]. 中医药学报, 2005, 35(33): 67-68.
- [17] 陈贤坤, 马媛媛, 赵慧, 等. 强肌健力方及黄芪多糖对脾虚大鼠胃肠激素水平的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 590-593.
- [18] 徐秋香, 郁红礼, 吴皓, 等. 四君子汤传统煎煮和机器煎煮的药效学差异比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 250-255.
- [19] 郑小伟, 宋红, 包素珍. 实验性脾气虚大鼠胃泌素的基因表达及四君子汤的干预作用 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 264-266.
- [20] 陈岩岩, 吴清, 李辉, 等. 多药效学指标结合HPLC优选晕定方中天麻、葛根提取工艺 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(10): 705-711.
- [21] 陈恒文, 张翠英, 任伟光, 等. 多指标综合评分法优化宣痹安痛方的水提醇沉工艺 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 70-74.
- [22] 陈畅, 程锦堂, 刘安. 经典名方研发策略 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1814-1818.
- [23] 杜正彩, 齐彪, 张明哲, 等. 正交设计结合药效学实验优选桂枝助眠胶囊提取工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 618-625.