

HPLC-PDA 联合 Box-Behnken 响应面法优选五苓散低极性部位提取工艺

王慧森¹, 刘 明¹, 李更生¹, 梁瑞峰¹, 葛文静¹, 夏书涛²

1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004

2. 郑州大学医药科学研究院, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 应用 HPLC-PDA 联合响应曲面法, 筛选五苓散低极性部位乙醇提取最佳工艺。**方法** 采用多波长切换定量测定, 以 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、麦角甾醇、茯苓酸、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、肉桂酸、桂皮醛 9 种有效成分为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应曲面法考察提取乙醇体积分数、料液比、提取时间对提取工艺的影响, 确定最佳工艺。**结果** 色谱柱为 Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 40 ℃。流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 37%~60%乙腈; 10~20 min, 60%乙腈; 20~23 min, 60%~95%乙腈; 23~36 min, 95%乙腈; 36~37 min, 95%~37%乙腈; 37~42 min, 37%乙腈。检测波长为 280、247、220、208 nm 多波长切换。最佳提取工艺为 10 倍量 75%乙醇提取 2 次, 每次 1.5 h。**结论** 建立的 HPLC-PDA 法稳定可行, 适合多种成分同时测定。响应曲面法所建模型准确, 可以较好地预测 9 种成分含量综合评分; 优选的提取工艺方法重现性良好, 稳定可行, 为五苓散临床应用、药效物质基础研究和新药开发提供技术参考。

关键词: 五苓散; 提取工艺; HPLC-PDA; 响应曲面法; 多指标综合评价; 23-乙酰泽泻醇 B; 23-乙酰泽泻醇 C; 麦角甾醇; 茯苓酸; 白术内酯 I; 白术内酯 II; 白术内酯 III; 肉桂酸; 桂皮醛

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6741-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.011

Optimization of low polarity components extraction process of Wuling Powder by HPLC-PDA combined with Box-Behnken response surface methodology

WANG Hui-sen¹, LIU Ming¹, LI Geng-sheng¹, LIANG Rui-feng¹, GE Wen-jing¹, XIA Shu-chou²

1. Henan Academy of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China

2. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: **Objective** The optimal ethanol extraction process for the low polarity components of Wuling Powder (五苓散) was established using HPLC-PDA combined response surface method. **Methods** The quantitative analysis method of HPLC-PDA multi-wavelength switching was used to analyze the contents of nine active components including 23-acetate alisol B, 23-acetate alisol C, ergosterol, pachymic acid, atractylenolide I, atractylenolide II, atractylenolide III, cinnamic acid and cinnamaldehyde. Box-Behnken response surface methodology was used to investigate the effects of extraction ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and extraction time on Wuling Powder low polarity components extraction process to determine the optimal extraction process. **Results** The determination was performed on an Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) with a volume flow rate of 0.8 mL/min and a column temperature of 40 ℃. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution: 0—10 min, 37%—60% acetonitrile; 10—20 min, 60% acetonitrile; 20—23 min, 60%—95% acetonitrile; 23—36 min, 95% acetonitrile; 36—37 min, 95%—37% acetonitrile; 37—42 min, 37% acetonitrile. The detection wavelength was multi-wavelength switched for 280, 247, 220, 208 nm. **Conclusion** The established HPLC-PDA method is stable and suitable to analyze multiple components. The model established by response surface method is accurate and can be used to predict the comprehensive score of nine components well. The optimized extraction method had good reproducibility, stability and feasibility, which provided technical reference for clinical application, research of effective substances and development of new medicine of Wuling Powder.

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 河南省中医药科学研究专项重点课题 (2018ZY1021); 河南省中医药科学研究专项重点课题 (2019ZY1041)

作者简介: 王慧森, 女, 副研究员, 主要从事中药药效物质基础及中药新药开发研究。Tel:(0371)66331718 E-mail: whs_zz@126.com

Key words: Wuling Powder; extraction process; HPLC-PDA; response surface methodology; multiple indicators comprehensive evaluation; 23-acetate alisol B; 23-acetate alisol C; ergosterol; pachymic acid; atractylenolide I; atractylenolide II; atractylenolide III; cinnamic acid; cinnamaldehyde

五苓散(Wuling Powder)出自东汉末年名医张仲景的《伤寒论》，由泽泻、猪苓、茯苓、白术、桂枝 5 味药组成，为中药利水渗湿剂代表方；具有利水渗湿、温阳化气的功效^[1]；可用于治疗膀胱蓄水证、水逆证和津亏液燥证^[2]。现代临床应用和药理研究表明，五苓散对改善泌尿系统、神经系统、消化系统、心血管系统^[3]、腹水^[4]、骨质疏松^[5]等疾病的临床症状、相关指标等有明显的优势和应用前景。医家张仲景临床遣方用药多以汤剂为主，但经临床疗效反复实践宜散不宜汤有其科学内涵。有文献报道^[6]，对 41 例五苓方汤剂和散剂治疗水湿内停证患者的随机对照临床研究，结果显示五苓方散剂组的疗效显著优于汤剂组。该作者进一步对五苓方汤剂和散剂的化学成分进行比较研究发现，汤剂的一组非挥发低极性分子仅为其同方散剂 1/450，可见低极性部位成分是该复方不可缺少的重要药效物质^[7]。有关五苓散化学成分的报道目前多集中在各单味药材上，而对复方整体研究则较少。文献报道有检测五苓散复方中桂皮醛含量^[8]，单味药材泽泻中 23-乙酰泽泻醇 B 和 23-乙酰泽泻醇 C 含量^[8-10]，猪苓中麦角甾醇含量^[8]，茯苓中茯苓酸含量^[11-12]，白术中白术内酯 I、II、III 含量^[13-14]，桂枝中桂皮醛、肉桂酸含量测定^[15]等，未见五苓散 HPLC 多个成分同时测定的研究报道。本研究以五苓散中活性代表成分 23-乙酰泽泻醇 B^[16-18]、23-乙酰泽泻醇 C^[17-19]、麦角甾醇^[20]、茯苓酸^[21-22]、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III^[23-24]、桂皮醛^[25]、肉桂酸^[26]等为指标成分，建立稳定可行的多波长切换同时测定方中 9 种成分含量的 HPLC-PDA 方法。采用响应曲面法(response surface methodology)以多指标量化综合评分结合出膏率筛选五苓散乙醇提取最佳方案，为中药新药开发及药效物质基础研究提供技术参考。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪，2996 PDA 检测器，美国 Waters 公司；AUY120 型万分之一电子天平，日本岛津公司；AE240 型十万分之一电子天平，瑞士梅特勒托利多公司；UL UP-IV-10T 超纯水器，四川优普；SB-5200DTD 超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；FW100 型高速万能粉碎

机，北京科伟永兴仪器有限公司；DZKW-2 型电热恒温水浴锅，北京用光明医疗仪器厂；DHG 型电热恒温鼓风干燥箱，上海精宏实验设备有限公司。

1.2 试剂

对照品麦角甾醇(批号 111845-201604)、23-乙酰泽泻醇 B(批号 111846-201504)、23-乙酰泽泻醇 C(批号 112062-202001)、白术内酯 I(批号 111975-201501)、白术内酯 II(批号 111976-201501)、白术内酯 III(批号 111978-201501)、肉桂酸(批号 110788-201604)、桂皮醛(批号 110710-202022)，质量分数均≥98%，购自中国食品药品检定研究院；对照品茯苓酸，批号 Y15A7511814，质量分数≥98%，购自上海源叶生物科技有限公司；乙腈、甲醇，色谱级，美国 Fisher 公司；磷酸，色谱纯，天津科密欧化学试剂有限公司；乙醇，分析纯，上海永大化学试剂有限公司；水为超纯水。

1.3 药材

泽泻(批号 20090104)、猪苓(批号 20130101)、茯苓(批号 20110102)、白术(批号 20090201)、桂枝(批号 20110201)饮片购自河南省郑州市瑞龙制药股份有限公司，经河南省中医药研究院李更生研究员鉴定，泽泻为泽泻科泽泻属植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎、猪苓为多孔菌科多孔菌属真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的干燥菌核、茯苓为多孔菌科茯苓属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、桂枝为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝经加工制成的饮片。

2 方法与结果

2.1 五苓散提取液中 9 种指标成分定量测定及综合评价指标确定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)，体积流量为 0.8 mL/min，柱温为 40 ℃。流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，37%~60% 乙腈；10~20 min，60% 乙腈；20~23 min，60%~95% 乙腈；23~36 min，95% 乙腈；36~37 min，95%~37% 乙腈；37~42 min，37% 乙腈。检测波长为 280

nm (测定麦角甾醇、白术内酯 I、肉桂酸和桂皮醛)、247 nm (测定 23-乙酰泽泻醇 C)、220 nm (测定白术内酯 II、白术内酯 III)、208 nm (测定 23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸)。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取干燥至恒定质量的 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、麦角甾醇、茯苓酸、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、肉桂酸、桂皮醛对照品适量，加乙腈溶解定容，制成对照品母液。分别吸取对照品母液各 0.5 mL 加入超纯水定容至 10 mL，混匀，制成含 23-乙酰泽泻醇 B 59.4 $\mu\text{g/mL}$ 、23-乙酰泽泻醇 C 23.0 $\mu\text{g/mL}$ 、麦角甾醇 20.3 $\mu\text{g/mL}$ 、茯苓酸 50.2 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 I 10.1 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 II 14.4 $\mu\text{g/mL}$ 、白术内酯 III 20.3 $\mu\text{g/mL}$ 、肉桂酸 20.3 $\mu\text{g/mL}$ 、桂皮醛 513.4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 样品及供试品溶液的制备

(1) 五苓散的制备：取五苓散处方各药味粉碎过 80 目筛，按处方比例 (泽泻 15 g、猪苓 9 g、茯苓 9 g、白术 9 g、桂枝 6 g) 称取各药味细粉适量，均匀混合制成干燥粉末状制剂，备用。

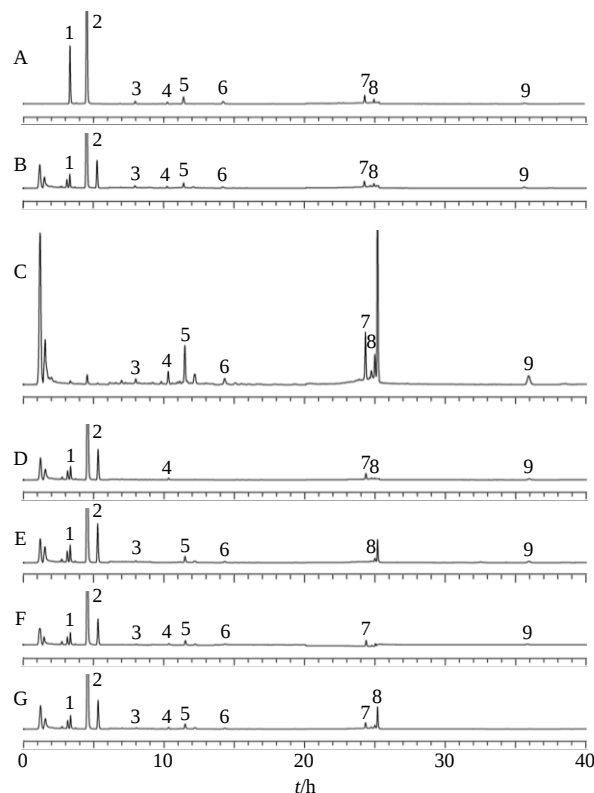
(2) 供试品溶液的制备：根据 Box-Behnken 设计原理，按照 Design-Expert V8.0.6 软件设计 3 因素 3 水平共 17 组试验方案回流提取，每组提取药液冷却至室温，分别混合均匀，滤过，低温 (60 $^{\circ}\text{C}$ 以下) 真空浓缩至适量，作为 1~17 号样品溶液，分别取样品溶液 10 mL，蒸干，残渣用 40% 乙腈溶解，定容至 10 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过，制得供试品溶液，备用。

(3) 阴性对照样品溶液的制备：按照供试品溶液的制备方法，分别制备缺桂枝、缺白术、缺泽泻、缺茯苓、缺猪苓的阴性对照样品溶液。

2.1.4 方法学考察

(1) 系统适应性试验和专属性试验：分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及各阴性对照样品溶液各 10 μL ，注入液相色谱仪，测定。结果表明 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、麦角甾醇、茯苓酸、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、肉桂酸、桂皮醛的保留时间依次为 24.364、10.339、36.010、24.986、14.340、11.496、8.035、3.357、4.578 min。样品和对照品对应峰最大吸收波长分别为麦角甾醇、白术内酯 I、肉桂酸、桂皮醛为 280 nm，23-乙酰泽泻醇 C 为 247 nm，白术内酯 II、白术内酯 III 为 220 nm，23-乙酰泽泻醇 B、茯苓酸为 208

nm。各对照品与供试品溶液中其他组分色谱峰分离度良好 ($R>1.5$)。各阴性样品色谱图中未见所缺中药药味对照品。色谱图见图 1。



1-肉桂酸 2-桂皮醛 3-白术内酯 III 4-23-乙酰泽泻醇 C 5-白术内酯 II 6-白术内酯 I 7-23-乙酰泽泻醇 B 8-茯苓酸 9-麦角甾醇
1-cinnamic acid 2-cinnamaldehyde 3-atractylenolide III 4-23-acetate alisol C 5-atractylenolide II 6-atractylenolide I 7-23-acetate alisol B 8-pachymic acid 9-ergosterol

图 1 混合对照品 (A)、五苓散醇提样品 (B) 及缺桂枝 (C)、缺白术 (D)、缺泽泻 (E)、缺茯苓 (F)、缺猪苓 (G) 阴性对照样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), alcohol-extracted sample of Wuling Powder (B), and negative control samples without *Cinnamomi Ramulus* (C), *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (D), *Alismatis Rhizoma* (E), *Poria* (F), *Polyporus* (G)

(2) 线性关系考察：将“2.1.2”项下各对照品配成系列混合对照品溶液，质量浓度分别为 23-乙酰泽泻醇 B 5.94、11.88、17.82、23.76、29.70、35.64 $\mu\text{g/mL}$ ；23-乙酰泽泻醇 C 2.3、4.6、6.9、9.2、11.5、13.8 $\mu\text{g/mL}$ ；麦角甾醇 2.028、4.056、6.084、8.112、10.140、12.168 $\mu\text{g/mL}$ ；茯苓酸 5.02、10.04、15.06、20.08、25.10、30.12 $\mu\text{g/mL}$ ；白术内酯 I 1.008、2.016、3.024、4.032、5.04、6.048 $\mu\text{g/mL}$ ；白术内酯 II 1.438、2.875、4.313、5.750、7.188、8.626 $\mu\text{g/mL}$ ；白术内酯 III 2.034、4.068、6.102、8.136、10.170、12.204

μg/mL; 肉桂酸 2.03、4.06、6.09、8.12、10.15、12.18 μg/mL; 桂皮醛 0.051 3、0.102 6、0.153 9、0.205 2、0.256 5、0.307 8 mg/mL。按“2.1.1”项下色谱条件各进样 10 μL, 测定各指标成分峰面积。将所得峰面积(Y)与各对照品的质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程、相关系数(r)及线性范围分别为 23-乙酰泽泻醇 B $Y=1\ 106\ 808\ X-24\ 587$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 5.94~35.64 μg/mL; 23-乙酰泽泻醇 C $Y=1\ 873\ 745\ X-23\ 870$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 2.3~13.8 μg/mL; 麦角甾醇 $Y=1\ 142\ 505\ X-16\ 276$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 2.028~12.168 μg/mL; 茯苓酸 $Y=1\ 029\ 570\ X-34\ 749$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 5.02~30.12 μg/mL; 白术内酯 I $Y=6\ 268\ 197\ X-11\ 847$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 1.008~6.048 μg/mL; 白术内酯 II $Y=5\ 868\ 314\ X-52\ 321$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 1.432~8.628 μg/mL; 白术内酯 III $Y=3\ 378\ 531\ X-37\ 521$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 2.034~12.204 μg/mL; 肉桂酸 $Y=18\ 026\ 680\ X-194\ 351$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 2.03~12.18 μg/mL; 桂皮醛 $Y=7\ 673\ 681\ X-702\ 666$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 51.34~308.04 μg/mL。

(3) 精密度考察: 取“2.1.2”项下混合对照品溶液及“2.1.3”项下 3 号供试品溶液分别重复进样 6 次, 进行精密度试验, 结果各成分在对照品溶液和供试品溶液中峰面积的 RSD 分别为 23-乙酰泽泻醇 B 为 2.49%及 0.93%、23-乙酰泽泻醇 C 为 2.34%及 3.05%、麦角甾醇为 1.53%及 1.20%、茯苓酸为 1.93%及 0.56%、白术内酯 I 为 0.79%及 3.07%、白术内酯 II 为 1.01%及 3.08%、白术内酯 III 为 0.67%及 3.05%、肉桂酸为 1.85%及 2.74%、桂皮醛为 1.92%及 3.04%, 结果可见精密度良好。

(4) 稳定性考察: 分别于 0、2、4、6、12、24 h 测定同一份供试品溶液(“2.1.3”项下 3 号供试品)稳定性, 测得各成分峰面积, 计算峰面积 RSD 分别为 23-乙酰泽泻醇 B 1.96%、23-乙酰泽泻醇 C 1.65%、麦角甾醇 1.16%、茯苓酸 1.74%、白术内酯 I 1.59%、白术内酯 II 1.69%、白术内酯 III 1.37%、肉桂酸 0.90%、桂皮醛为 1.57%, 结果可见供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

(5) 重复性考察: 取同一样品(“2.1.3”项下 3 号样品)平行 6 份, 依法制得供试品溶液。分别精密量取 10 μL, 按前述色谱条件进样, 测定, 分别计算各成分质量分数的 RSD, 结果 23-乙酰泽泻醇

B 的 RSD 为 1.72%, 23-乙酰泽泻醇 C 的 RSD 为 1.53%, 麦角甾醇的 RSD 为 1.12%, 茯苓酸的 RSD 为 1.78%, 白术内酯 I 的 RSD 为 1.13%, 白术内酯 II 的 RSD 为 1.87%、白术内酯 III 的 RSD 为 1.69%、肉桂酸的 RSD 为 1.82%、桂皮醛的 RSD 为 1.88%, 结果可见本测定方法重现性良好。

(6) 加样回收率试验: 精密量取“2.1.3”项下 3 号样品溶液平行 6 份, 按各指标成分含量约 1:1 精密加入对照品, 按“2.1.1”项下色谱条件测定各指标成分的含量。计算回收率和 RSD 值。结果各指标成分回收率和 RSD 值分别为 23-乙酰泽泻醇 B 99.12%、1.81%; 23-乙酰泽泻醇 C 102.05%、1.83%; 麦角甾醇 99.88%、1.68%; 茯苓酸 100.47%、1.65%, 白术内酯 I 100.28%、1.95%, 白术内酯 II 97.34%、1.32%, 白术内酯 III 101.32%、1.18%, 肉桂酸 97.21%、1.89%, 桂皮醛 99.51%、1.84%。

2.1.5 样品测定 精密吸取单因素及响应曲面试验样品溶液, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, “2.1.1”色谱条件进样测定。计算样品中 23-乙酰泽泻醇 B 等 9 种成分含量。

2.1.6 五苓散中 9 种成分综合评分 采用多指标响应曲面法进行综合评价, 依据处方配伍君臣佐使及各药味成分药理活性进行各个指标成分权重分配, 综合评分=23-乙酰泽泻醇 B 得分×25%+23-乙酰泽泻醇 C 得分×25%+麦角甾醇得分×22.5%+茯苓酸得分×22.5%+白术内酯 I 得分×1%+白术内酯 II 得分×1%+白术内酯 III 得分×1%+肉桂酸得分×1%+桂皮醛得分×1%。指标成分得分=该指标含量/该指标组最高含量。本实验单因素和响应曲面实验结果均以综合评分进行分析。

2.2 五苓散乙醇提取液出膏率的测定

精密吸取单因素或响应曲面试验样品溶液 20 mL 置于恒定质量蒸发皿中, 水浴挥干, 置于 105 °C 烘箱干燥至恒定质量, 放至室温迅速称定质量, 计算出膏率。

2.3 影响五苓散醇提工艺的单因素考察试验

2.3.1 提取溶剂乙醇体积分数的考察 按处方比例称取五苓散各药味细粉共计 48 g 混匀, 分别加入 10 倍量不同体积分数乙醇超声处理 30 min, 提取液滤过, 取滤液按“2.1.1”项下色谱条件测定各指标成分的含量, 考察乙醇体积分数对各指标成分影响。结果见表 1。各成分提取量随乙醇体积分数提高而增大, 55%~95%乙醇时 9 种成分均可以提出且综

合评分具有较优值,考虑到提取过程的安全性,大量提取时乙醇体积分数不宜过高,故取 55%、70%、85%乙醇质量分数 3 个点进行响应曲面实验。

2.3.2 提取时间的考察 按处方比例称取五苓散各药味细粉共计 48 g 混匀,取 6 份分别加入 10 倍量 75%乙醇回流提取 20、40、60、80、100、120 min,

提取液放凉滤过,取滤液按“2.1.1”项下色谱条件测定各指标成分的含量,考察提取时间对各指标成分影响。结果见表 2。各成分提取量随提取时间增加而增大,在 40~120 min 时 9 种成分均有较高提取量且综合评分具有较优值,故取 40、80、120 min 3 个点进行响应曲面实验。

表 1 乙醇体积分数对各成分含量及综合评分的影响

Table 1 Effect of ethanol concentration the content of each component and comprehensive score

乙醇/ %	质量分数/(mg·g ⁻¹)								综合 评分
	桂皮醛	白术内酯 III	23-乙酰泽泻醇 C	白术内酯 II	白术内酯 I	23-乙酰泽泻醇 B	茯苓酸	麦角甾醇	
15	0.814	0.027 5	0.047 3	0.017 2	0.010 6	—	—	—	0.151
35	1.830	0.037 2	0.079 4	0.060 6	0.018 1	0.279	0.111	—	0.526
55	2.299	0.044 5	0.087 2	0.083 4	0.023 0	0.397	0.231	0.027	0.763
75	2.452	0.080 8	0.088 6	0.083 1	0.033 9	0.421	0.242	0.203	0.982
95	2.230	0.063 8	0.073 0	0.083 8	0.031 3	0.412	0.246	0.217	0.947

表 2 提取时间对各成分含量及综合评分的影响

Table 2 Effect of extraction time on content of each component and comprehensive score

提取时 间/min	质量分数/(mg·g ⁻¹)								综合 评分
	桂皮醛	白术内酯 III	23-乙酰泽泻醇 C	白术内酯 II	白术内酯 I	23-乙酰泽泻醇 B	茯苓酸	麦角甾醇	
20	1.99	0.115	0.050 9	0.070 3	0.013 1	0.312	0.207	0.255	0.797
40	2.25	0.112	0.055 0	0.071 8	0.013 7	0.337	0.242	0.330	0.883
60	2.27	0.108	0.054 7	0.070 8	0.012 8	0.313	0.279	0.339	0.875
80	2.75	0.110	0.057 2	0.073 1	0.013 4	0.336	0.389	0.388	0.975
100	3.52	0.120	0.057 5	0.073 8	0.014 4	0.329	0.370	0.378	0.980
120	1.94	0.132	0.051 1	0.073 0	0.013 5	0.271	0.367	0.366	0.881

2.3.3 提取溶媒液料比的选择 药材质地不同蓬松度和吸水率不同,很大程度影响药材提取时液料比的选择。经实验药粉加入定量 75%乙醇浸泡 1 h,考察吸水率约为 220%。药材粉碎后蓬松度降低且考虑到大量提取后期浓缩,故响应面实验时选择液料比范围在 6~12 倍量,同时第 1 次提取时考虑吸水率多加入 2 倍量提取溶媒。

2.3.4 提取次数考察 按处方比例称取五苓散各药味共计 48 g 粉碎混匀,加入 75%乙醇回流提取 5 次,第 1 次 10 倍量,其余 8 倍量,每次提取 90 min。平行操作 3 份。每次提取液分别滤过,取滤液 20 mL 置于恒定质量蒸发皿中,水浴挥干乙醇,置于 105 ℃烘箱干燥至恒定质量,放至室温迅速称定质量,考察不同提取次数干膏量,计算出膏率。结果提取液平均出膏率第 1~5 次分别为 12.33%、2.06%、1.15%、0.50%、0.27%,可见提取液总出膏率 16.31%,前 2 次提取液总出膏率 14.39%占 5 次

总提取量的近 90%,故选择确定提取次数为 2 次。

2.4 响应曲面实验

2.4.1 响应面法试验设计与实验结果 结合上述单因素实验结果,以提取时间(X_1)、乙醇体积分数(X_2)、液料比(X_3)为 3 个考察因素,以 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、麦角甾醇、茯苓酸、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、肉桂酸、桂皮醛 9 种成分质量分数的综合评分和出膏率为响应值,按处方比例称取五苓散各药味共计 48 g 粉碎混匀,平行制成 17 份试验样品,设计 3 因素 3 水平试验设计方案,根据 Box-Behnken 中心组合设计,经 Design-Expert V8.0.6 软件分析处理,设计 3 因素 3 水平 17 组试验,试验方案及结果见表 3。

2.4.2 实验结果分析 应用 Design-Expert.V8.0.6 软件对五苓散乙醇提取工艺实验数据进行分析,结果如下:9 种成分提出量的综合得分对 X_1 、 X_2 、 X_3 的 2 次多元回归模型方程为综合评分=0.93+0.017

$X_1+0.050 X_2+0.049 X_3+6.200\times 10^{-3} X_1X_2-0.013 X_1X_3-1.550\times 10^{-3} X_2X_3-0.064 X_1^2-0.076 X_2^2-0.220 X_3^2$, 回归模型方差分析结果见表 4。五苓散乙醇提取工艺的回归模型 $F=40.66$, $P=0.001<0.05$, 结果表明 2 次多元回归模型显著, 模型系数 $R^2=0.981 2$, $R_{adj}^2=0.957 1$, 变异系数 (CV) = 3.78%, 结果表明模型拟合良好; $F_{失拟}=2.05$, $P=0.249 2>0.05$, 模型失拟度不显著, 结果表明模型

表 3 五苓散乙醇提取响应曲面实验设计与结果

Table 3 Design and results of response surface test of Wuling Powder extracted by ethanol

序号	X_1/min	$X_2/\%$	$X_3/\text{倍}$	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)									综合 出膏率/	
				肉桂酸	桂皮醛	白术内酯 III	23-乙酰泽泻醇 C	白术内酯 II	白术内酯 I	23-乙酰泽泻醇 B	茯苓酸	麦角甾醇	评分	%
1	80	70	9	0.04	2.25	0.05	0.07	0.10	0.04	0.51	1.61	0.26	0.899 4	15.91
2	120	70	6	0.03	1.47	0.04	0.05	0.06	0.02	0.36	1.13	0.18	0.640 0	15.30
3	80	70	9	0.04	2.15	0.07	0.07	0.10	0.04	0.55	1.86	0.26	0.947 5	15.98
4	120	85	9	0.04	1.84	0.05	0.06	0.08	0.03	0.50	1.65	0.23	0.842 9	15.79
5	120	55	9	0.04	2.13	0.03	0.07	0.07	0.03	0.47	1.59	0.10	0.730 6	15.45
6	120	70	12	0.03	1.73	0.04	0.05	0.09	0.03	0.42	1.35	0.21	0.726 9	15.73
7	80	70	9	0.04	2.12	0.07	0.07	0.09	0.04	0.54	1.76	0.25	0.919 4	15.87
8	80	55	6	0.03	1.46	0.04	0.06	0.06	0.02	0.39	1.07	0.04	0.542 2	15.55
9	40	85	9	0.04	2.09	0.07	0.06	0.10	0.04	0.56	1.47	0.21	0.836 6	14.81
10	40	70	6	0.03	1.43	0.08	0.05	0.12	0.05	0.21	0.85	0.18	0.542 3	14.38
11	80	55	12	0.03	1.62	0.03	0.05	0.05	0.01	0.41	1.36	0.11	0.627 8	15.27
12	80	70	9	0.04	2.15	0.08	0.07	0.09	0.04	0.53	1.80	0.25	0.923 4	15.75
13	80	85	6	0.03	1.47	0.05	0.05	0.06	0.03	0.38	1.14	0.18	0.646 3	15.44
14	80	70	9	0.04	2.12	0.06	0.08	0.09	0.03	0.55	1.73	0.27	0.959 7	15.92
15	80	85	12	0.03	1.69	0.03	0.06	0.05	0.02	0.39	1.43	0.21	0.725 7	15.77
16	40	55	9	0.04	2.08	0.05	0.07	0.09	0.04	0.51	1.62	0.08	0.749 1	14.55
17	40	70	12	0.03	1.75	0.06	0.05	0.07	0.03	0.40	1.51	0.15	0.680 3	14.67

表 4 五苓散乙醇提取工艺回归模型方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis of regression model of Wuling Powder extracted by ethanol

来源	9 种成分综合评分					出膏率				
	平方和	自由度	离差平方和	F 值	P 值	平方和	自由度	离差平方和	F 值	P 值
模型	0.300	9	0.034	40.660	$<0.000 1$	4.210	9	0.470	35.490	$<0.000 1$
X_1	2.180×10^{-3}	1	2.180×10^{-3}	2.640	0.148 5	1.860	1	1.860	141.410	$<0.000 1$
X_2	0.020	1	0.020	24.390	0.001 7	0.120	1	0.120	9.300	0.018 6
X_3	0.019	1	0.019	22.970	0.002 0	0.074	1	0.074	5.630	0.049 5
X_1X_2	1.540×10^{-4}	1	1.540×10^{-4}	0.190	0.679 4	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.120	0.737 7
X_1X_3	6.530×10^{-4}	1	6.530×10^{-4}	0.790	0.403 9	4.900×10^{-3}	1	4.900×10^{-3}	0.370	0.561 2
X_2X_3	9.610×10^{-6}	1	9.610×10^{-6}	0.012	0.917 2	0.093	1	0.093	7.060	0.032 6
X_1^2	0.017	1	0.017	20.910	0.002 6	1.580	1	1.580	119.640	$<0.000 1$
X_2^2	0.024	1	0.024	29.380	0.001 0	0.065	1	0.065	4.940	0.061 7
X_3^2	0.200	1	0.200	242.760	$<0.000 1$	0.270	1	0.270	20.670	0.002 6
残差	5.790×10^{-3}	7	8.270×10^{-4}			0.092	7	0.013		
失拟项	3.510×10^{-3}	3	1.170×10^{-3}	2.050	0.249 2	0.063	3	0.021	2.860	0.168 1
纯误差	2.280×10^{-3}	4	5.700×10^{-4}			0.029	4	7.330×10^{-3}		
总和	0.310	16				4.300	16			

选择合适, 可用于五苓散乙醇提取工艺分析。1 次项 X_2 、 X_3 对模型有显著影响, 交互项均未有显著影响, 2 次项均有显著影响。

出膏率对 X_1 、 X_2 、 X_3 的 2 次多元回归模型方程为: 出膏率 = $15.89 + 0.48 X_1 + 0.12 X_2 + 0.096 X_3 + 0.020 X_1 X_2 + 0.035 X_1 X_3 - 0.15 X_2 X_3 - 0.61 X_1^2 - 0.12 X_2^2 - 0.25 X_3^2$, 回归模型方差分析结果见表 4。回归模型 $F = 35.49$, $P = 0.001 < 0.05$, 表明 2 次多元回归模型显著, 模型系数 $R^2 = 0.978 6$, $R_{adj}^2 = 0.951 0$,

$CV = 0.74\%$, 结果表明模型拟合良好; $F_{失拟} = 2.86$, $P = 0.168 1 > 0.05$, 模型失拟度不显著, 结果表明模型选择合适, 可用于五苓散乙醇提取工艺分析。1 次项均对模型有显著影响, 交互项 $X_2 X_3$ 有显著影响, 2 次项 X_1^2 、 X_3^2 对模型有显著影响。

由响应面 3D 和等高线图 (图 2、3) 的倾斜度反应两者对响应值的影响, 倾斜度越高表明两者交互作用越显著。从 3D 和等高线图的颜色变化也可以初步判定, 变化趋势增加, 其颜色也呈加深趋势。

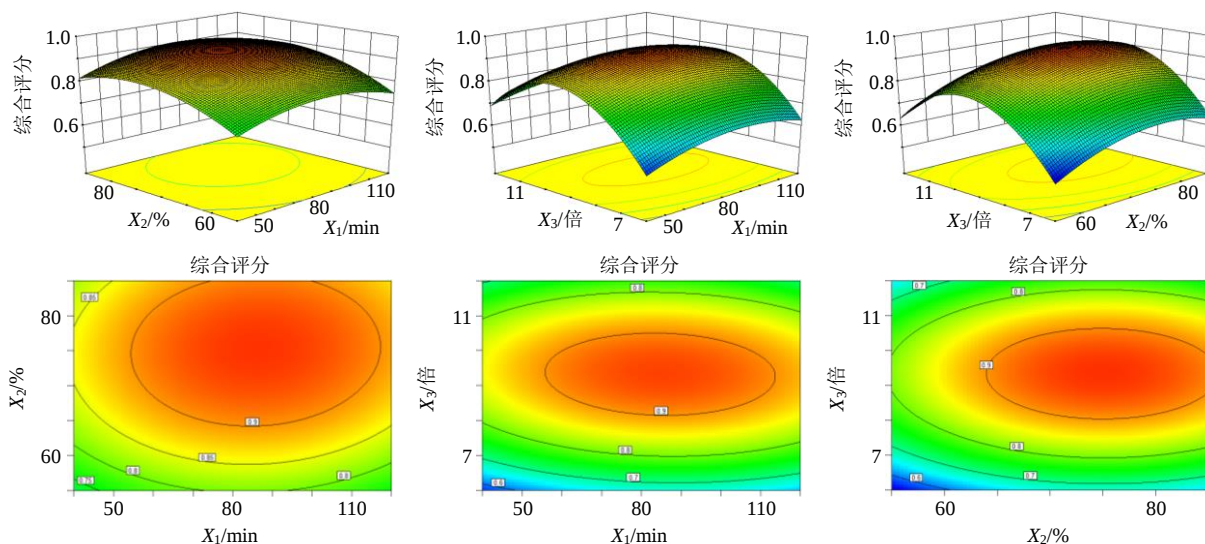


图 2 以综合得分考察 X_1 、 X_2 和 X_3 的交互作用

Fig. 2 Interaction among X_1 , X_2 and X_3 investigated by comprehensive score

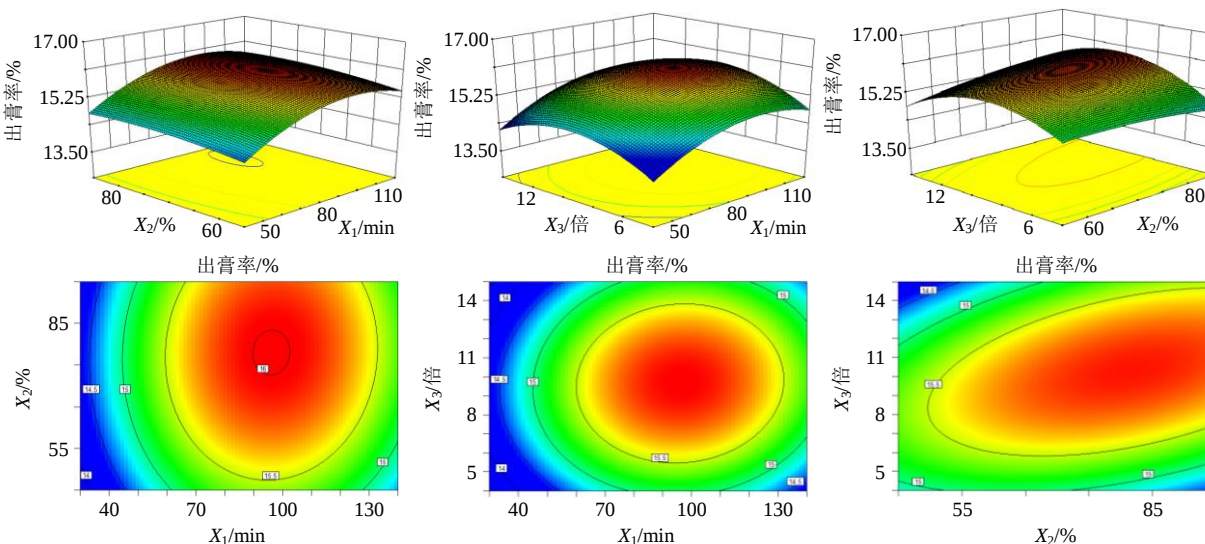


图 3 以出膏率考察 X_1 、 X_2 和 X_3 的交互作用

Fig. 3 Interaction among X_1 , X_2 , and X_3 investigated by extraction amount rates

因此, 以综合得分为指标, 提取时间、乙醇浓度和液料比在响应范围内, 23-乙酰泽泻醇 B 等 9 种成分含量以最大值为响应值, 最后得出五苓散醇

提取工艺为 75.03%乙醇 9.32 倍量提取 2 次, 每次 85.41 min, 23-乙酰泽泻醇 B 等 9 种成分综合得分预测值为 0.941 994; 以出膏率为指标, 使提取时间、

乙醇浓度和液料比在响应范围内, 出膏率最大值为响应值, 最后得出五苓散醇提取工艺条件为 76.59% 乙醇 10.78 倍量提取 2 次, 每次 92.07 min, 出膏率预测值为 16.022 6%。

综上, 结合单因素实验与综合评分和出膏率考察结果, 五苓散乙醇提取工艺条件为以 75%乙醇 10 倍量提取 2 次, 每次 90 min。

2.4.3 验证实验 按处方比例称取五苓散各药味共计 144 g 粉碎混匀, 根据优选出的最佳工艺平行制备五苓散提取液 3 份, 分别按照上述实验条件进行分析检测, 实验结果见表 5。提取工艺验证结果平均综合评分为 0.926 629、出膏率为 15.495 8%与模型预测值 (0.941 994、16.022 6%) 相近, 相对误差为 1.63%、3.29%, 结果表明建立的模型预测性良好,

表 5 工艺验证试验结果

Table 5 Results of process verification test

序号	质量分数/(mg·g ⁻¹)									综合 出膏率/	
	肉桂酸	桂皮醛	白术内酯 III	23-乙酰泽泻醇 C	白术内酯 II	白术内酯 I	23-乙酰泽泻醇 B	茯苓酸	麦角甾醇	评分	%
1	0.064 4	2.84	0.040 7	0.096 8	0.097 6	0.031 1	0.433	2.40	0.346	0.929 5	15.79
2	0.061 0	2.83	0.039 3	0.094 4	0.098 2	0.029 4	0.426	2.42	0.356	0.928 6	15.81
3	0.066 4	2.98	0.046 5	0.097 3	0.099 0	0.029 7	0.449	2.27	0.355	0.931 5	14.90

提取工艺稳定合理。

3 讨论

五苓散被认为是中医的“利尿剂”, 既能祛除体内有形的水分潴留, 也可消除无形之痰饮, 临床应用于水肿、泌尿系统、关节病、眩晕、头痛、心血管系统、消化系统疾病等^[27]。五苓散方中重用泽泻为君, 利水渗湿; 臣以茯苓、猪苓助君药利水渗湿; 佐以白术补气健脾以运化水湿, 又佐以桂枝温阳化气以助利水。中药复方是多种成分的集合体, 按照中医君臣佐使配伍理论相互协调制约, 以多成分调控多靶点, 从而达到临床治疗效果。

《伤寒论》记载方剂共 113 首, 绝大多数以汤剂应用, 仅有五苓散、四逆散等 10 余首方以散剂使用。散剂复方宜散不宜汤是由于汤剂以水为媒介对低极性成分提取能力有限, 导致低极性部位化学成分不能被充分提取。五苓方汤剂和散剂的化学成分比较研究发现, 汤剂非挥发低极性分子仅为其同方散剂 1/450, 可见低极性部位成分是该复方不可缺少的重要药效物质^[7], 故对五苓散低极性部位提取工艺的研究将为进一步新药开发及药效物质研究提供技术支持。

以泽泻中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C, 猪苓中麦角甾醇, 茯苓中茯苓酸, 白术中白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III, 桂枝中肉桂酸、桂皮醛为指标成分, 着重建立了多波长切换同时测定该 9 种有效成分的 HPLC-PDA 方法。实验筛选了多种型号规格层析柱, 最终确定 Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 填料细柱

效高, 柱温 40 ℃, 体积流量 0.8 mL/min 时柱压适中稳定, 各成分达到良好分离。

在样品和对照品 HPLC 图谱中相同保留时间点, 23-乙酰泽泻醇 B 和茯苓酸的最大吸收波长为 208 nm, 白术内酯 II 和白术内酯 III 的最大吸收波长为 220 nm, 23-乙酰泽泻醇 C 的最大吸收波长为 247 nm, 麦角甾醇、白术内酯 I、肉桂酸和桂皮醛的最大吸收波长为 280nm。PDA 波长切换程序为: 0~6 min, 280 nm; 6.1~9 min, 220 nm; 9.1~10.5 min, 247 nm; 10.6~13.5 min, 220 nm; 13.6~20 min, 280 nm; 20.1~25.3 min, 208 nm; 25.31~42 min, 280 nm。

在药学提取工艺优化过程中, 常需同时考察多个因素对结果的影响, 并对结果进行优化。常用的均匀设计和正交试验设计方法在试验时精度不够, 筛选的试验取值仅是接近最佳值而非精确的最佳点, 不能考察各因素间的交互作用。响应曲面法 (response surface methodology, RSM)^[28]是一种新型的试验设计方法, 以建立连续变量曲面模型对影响工艺过程的因子及其交互作用进行评价, 可以确定精确的最佳试验点, 具有试验次数少、精度高等特点, 在医药学领域应用比较成熟^[29]。本实验针对乙醇提取工艺的影响因素, 应用响应曲面法展开工艺考察研究。

响应曲面法试验中以各成分来源药味在复方中君臣佐使的配伍关系分配权重系数, 君药泽泻中的成分 23-乙酰泽泻醇 B 和 23-乙酰泽泻醇 C 权重各占 25%, 臣药猪苓中成分麦角甾醇和茯苓中成分茯苓

酸权重各占 22.5%，佐使药白术中 3 种成分共占 3%，桂枝中 2 种成分共占 2%。以该 9 种有效成分含量的综合评分为指标进行考察更好体现评价的合理性，所建立的工艺稳定可行，响应模型拟合度良好，达到工艺优化的目的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李冀. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 253-255.
- [2] 王绵之. 王绵之方剂学讲稿 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 450.
- [3] 杨振芳, 闫伟, 王敏, 等. 五苓散临床研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(3): 206-209.
- [4] Mou Y, Wang X Z, Wang T, et al. Clinical application and pharmacological mechanism of Wuling Powder in the treatment of ascites: A systematic review and network pharmacological analysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112506.
- [5] Zhou H N, Li H Y, Xu W H, et al. Study on the action mechanism of Wuling Powder on treating osteoporosis based on network pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(1): 28-35.
- [6] 金汝真, 余仁欢, 高辉, 等. 五苓散与五苓汤治疗肾病综合征水湿内停证的临床对照研究 [J]. 中医杂志, 2012, 53(7): 572-573.
- [7] 孙彩霞. 五苓散同方汤剂关键缺失成分入血吸收研究及其抗脑水肿活性评价 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 645, 239, 288, 331.
- [9] 曹宁宁, 杨文静, 林映仙, 等. 经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2773-2780.
- [10] 胡诚, 陈龙, 蒋元烨, 等. HPLC 法测定泽泻汤中泽泻醇 A、泽泻醇 B 和 23-乙酰泽泻醇 B 含量 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(5): 73-77.
- [11] 唐丹丹, 陈丹倩, 程显隆, 等. 3 种利尿中药化学成分的内体外分析方法研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 377-382.
- [12] 李蒙, 聂磊, 沈佳瑜, 等. 茯苓、茯神、茯神木及松根中茯苓酸及总萜类成分分析 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(5): 40-43.
- [13] 尹华, 王知青, 王玲, 等. HPLC-DAD 波长切换法同时测定白术中白术内酯 I、II、III 和苍术酮的含量 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 233-236.
- [14] 闫晗, 孙媛媛, 于治国, 等. HPLC 法同时测定白术药材中白术内酯 I 等 4 种有效成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(9): 699-702.
- [15] 于天颖, 周劲松, 马恩耀, 等. 20 批不同产地桂枝质量研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(10): 57-62.
- [16] 张伟云, 刘华欣, 王青, 等. 23-乙酰泽泻醇 B 对 2 型糖尿病小鼠血糖的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 639-643.
- [17] 姜凯元, 叶铨玲, 熊芬, 等. 泽泻水醇提取物改善千里光碱致小鼠急性肝损伤的作用与机制研究 [J]. 药学报, 2021, 56(3): 823-830.
- [18] 张慧娟, 龚苏晓, 许浚, 等. 泽泻药材的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4741-4751.
- [19] 赵志滨, 李李, 陈欣燕, 等. 基于网络药理学的泽泻-白术药对治疗血脂异常作用机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(10): 37-44.
- [20] 陈晓梅, 田丽霞, 郭顺星. 猪苓化学成分及药理活性研究进展 [J]. 菌物学报, 2017, 36(1): 35-47.
- [21] 刘凤, 刘增长. 茯苓酸通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路改善 OX-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(2): 164-168.
- [22] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [23] 邵志愿, 廖延武, 吴德玲, 等. 白术须根和主根的质量差异 [J]. 中成药, 2020, 42(7): 1806-1812.
- [24] 姚兆敏, 陈卫东, 仰忠华, 等. 白术研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4796-4807.
- [25] 黄敬群, 王四旺, 罗晓星, 等. 桂皮醛对裸鼠人胃癌细胞移植瘤生长及凋亡的影响 [J]. 解放军药学报, 2006, 22(5): 343-346.
- [26] 徐宁阳, 王群, 刘悦, 等. 基于整合药理学平台的桂枝汤治疗血脂异常的分子机制 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 1867-1870.
- [27] 倪诚. 王琦教授从化气布津论五苓散制方思想及其运用心法 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(10): 699-701.
- [28] Yasui R, Sekine K, Taniguchi H. Clever experimental designs: Shortcuts for better iPSC differentiation [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3540.
- [29] 王勃, 张晓燕, 吕辰子, 等. 多指标-响应曲面法优选酒炖熟地黄最佳炮制工艺 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2065-2073.

[责任编辑 郑礼胜]