

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^Δ

胡兆流^{1*}, 陈秋谷¹, 王佛长^{1,2}, 黄诗莹^{1,2}, 郑平¹, 张尚斌^{1,2}, 易铁钢^{1,2}, 李顺民^{1,2}, 陈剑平^{1,2#}(1.深圳市中医院深圳市医院中药制剂研究重点实验室, 广东深圳 518033; 2.广州中医药大学第四临床医学院, 广东深圳 518033)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2656-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.13

摘要 目的: 优选补脾养肾颗粒的水提工艺, 为其后续开发研究提供依据。方法: 分别采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法和高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)法测定补脾养肾颗粒的水提液中黄芪甲苷和丹酚酸B的含量, 以黄芪甲苷、丹酚酸B的含量以及出膏率的综合评分为指标, 采用层次分析(AHP)法、指标重复性相关(CRITIC)法和AHP-CRITIC混合加权法确定各指标权重系数, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验筛选补脾养肾颗粒的水提工艺中煎煮时间、加水倍数和煎煮次数, 并进行验证试验。结果: 以AHP-CRITIC混合加权法确定的权重系数最为合理, 筛选的提取工艺为药材煎煮2次, 每次加12倍量水、煎煮1 h。3次验证试验结果显示, 黄芪甲苷、丹酚酸B的平均含量分别为8.79、609.50 mg(整方121 g药材提取得到的总量), 平均出膏率为31.24%, 平均综合评分为96.59分(RSD=1.01%, $n=3$)。结论: 优选的水提工艺重复性好、稳定可行, 可为补脾养肾颗粒的后续开发和工业化生产提供科学依据。

关键词 补脾养肾颗粒; 水提工艺; 正交试验; 多指标权重分析; 层次分析-指标重复性相关混合加权法

Optimization of Water Extraction Technology for Bupi Yangshen Granules Based on Multi-index Weighting Analysis Method Combined with Orthogonal Test

HU Zhaoliu¹, CHEN Qiugu¹, WANG Fochang^{1,2}, HUANG Shiyang^{1,2}, ZHENG Ping¹, ZHANG Shangbin^{1,2}, YI Tiegang^{1,2}, LI Shunmin^{1,2}, CHEN Jianping^{1,2}(1. Shenzhen Key Laboratory of Hospital TCM Preparation, Shenzhen Hospital of TCM, Guangdong Shenzhen 518033, China; 2. The Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangdong Shenzhen 518033, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of Bupi yangshen granules, and to provide basis for the follow-up research and development of it. METHODS: The contents of astragaloside IV and salvianolic acid B in water extract of Bupi yangshen granules, were determined by HPLC-ELSD and HPLC-DAD. Using the comprehensive score of contents of astragaloside IV and salvianolic acid B and extract yield as index, weight coefficient of indicators were determined by AHP, CRITIC and AHP-CRITIC mixed weighting method. $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to optimize decoction time, water volume and decoction times in water extraction technology of Bupi yangshen granules. Validation test was also performed. RESULTS: The weight coefficient determined by AHP-CRITIC mixed weighting method was the most reasonable. The optimal extraction technology was decocting twice, adding 12-fold water, 1 h each time. The results of 3 times of validation test showed that the average contents of astragaloside IV and salvianolic acid B were 8.79, 609.50 mg (total amount of 121 g medicinal herbs extracted from whole prescription), respectively. The average extract yield was 31.24%. Average comprehensive score was 96.59 (RSD=1.01%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimized water extraction technology is reproducible, stable and feasible. It can provide a scientific basis for the follow-up development and industrial production of Bupi yangshen granules.

KEYWORDS Bupi yangshen granules; Water extraction technology; Orthogonal test; Multi-index weighting analysis method; AHP-CRITIC mixed weighting method

补脾养肾方(曾用名健脾益肾方)由黄芪、丹参、酒苁蓉等八味中药组成, 具有补脾养肾、活血泄浊之功

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81804052); 深圳市科技计划项目(No.JCYJ20160428182041577, No.ZDSYS2016060815-15458)

* 药师。研究方向: 中药新药研究与开发。E-mail: 1277609973@qq.com

通信作者: 副主任中药师, 博士。研究方向: 中药制剂。E-mail: lycjp@126.com

效, 主要用于脾肾阳气虚, 兼有湿浊、水气和瘀毒等症。临床研究和动物实验结果均证实, 该方在治疗慢性肾衰竭上不仅疗效显著, 且安全可靠^[1-5]。目前, 该方以水煎汤剂的形式在临床应用, 患者使用前需先进行煎煮, 具有使用和携带不方便等缺点。而颗粒剂具有载药量大、吸收快、稳定性好、服用和携带方便等优势^[6], 能够弥补水煎汤剂的不足, 故本课题组拟将其开发为颗粒剂——补脾养肾颗粒。而先以水提浓缩后再制成颗粒剂, 符合

传统汤剂的化学组成和临床疗效。另外,据方中各味药的化学成分与药理作用等相关资料表明^[7-12],君药黄芪的有效活性成分黄芪甲苷具有抗炎、抗间质纤维化及抗氧化应激等药理作用,使药丹参的有效活性成分丹酚酸B具有保肾、抗纤维化等药理作用,以上两个成分对慢性肾衰竭的治疗均有显著效果。因此,本研究选择水提液中黄芪甲苷、丹酚酸B的含量以及出膏率作为评价指标,采用多指标权重分析法结合正交试验优选补脾养肾颗粒的最佳水提工艺,为其后续开发研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

LC-2030 高效液相色谱仪、ELSD-II 蒸发光散射检测器、AUW220D 十万分之一电子分析天平(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪饮片(深圳市正皇庄中药饮片有限公司,批号:180201);丹参饮片(批号:18061101)、山药饮片(批号:18062101)、酒苁蓉饮片(批号:18063001)均购自亳州市永刚饮片厂有限公司;白术饮片(批号:1805002)、大黄饮片(批号:1806001)均购自广州市岭南中药饮片有限公司佛山分公司;豆蔻饮片(广东省药材公司中药饮片厂,批号:D2917916);炙甘草饮片(四川千方中药股份有限公司,批号:18080092);黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110781-201717,纯度:96.9%);丹酚酸B对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq16060405,纯度:≥98%);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 水提液的制备

补脾养肾方由黄芪30 g、山药30 g、白术10 g、酒苁蓉10 g、豆蔻10 g、丹参15 g、大黄10 g和炙甘草6 g组成。取以上八味中药饮片,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表条件进行提取,趁热滤过,合并滤液,浓缩至适量,放冷至室温,加水定容至1 000 mL,备用。

2.2 黄芪甲苷含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:蒸发光散射检测器;流动相:乙腈-水(34:66, V/V);流速:0.8 mL/min;柱温:30 ℃;漂移管温度:55 ℃;载气压力:350 kPa;进样量:5 μL。

2.2.2 黄芪甲苷对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品12.0 mg,用甲醇溶解并定容至10 mL量瓶中,制得质量浓度为1.162 8 mg/mL的黄芪甲苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 量取“2.1”项下水提液500 mL,浓缩,放冷至室温,加水溶解并定容至50 mL,然后

用水饱和正丁醇溶液振摇提取4次(每次40 mL),合并正丁醇液,用氨液洗涤2次(每次40 mL),弃去氨液,将正丁醇液水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,并转移至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 缺黄芪阴性样品溶液的制备 取缺黄芪的其余处方量饮片,按“2.1”项下方法制备水提液(按正交试验1号条件提取)后,量取溶液500 mL,按“2.2.3”项下方法制备缺黄芪阴性样品溶液。

2.2.5 专属性考察 取黄芪甲苷对照品溶液、供试品溶液(按正交试验1号条件提取)和缺黄芪阴性样品溶液(按正交试验1号条件提取),分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,黄芪甲苷与相邻峰间的分离度>1.5,以黄芪甲苷峰计理论板数>5 000。供试品溶液在与黄芪甲苷对照品溶液相同的保留时间处有相同色谱峰,缺黄芪阴性样品溶液在与黄芪甲苷对照品溶液相同保留时间处未见相应色谱峰,表明阴性无干扰、专属性良好。黄芪甲苷含量测定的高效液相色谱图见图1。

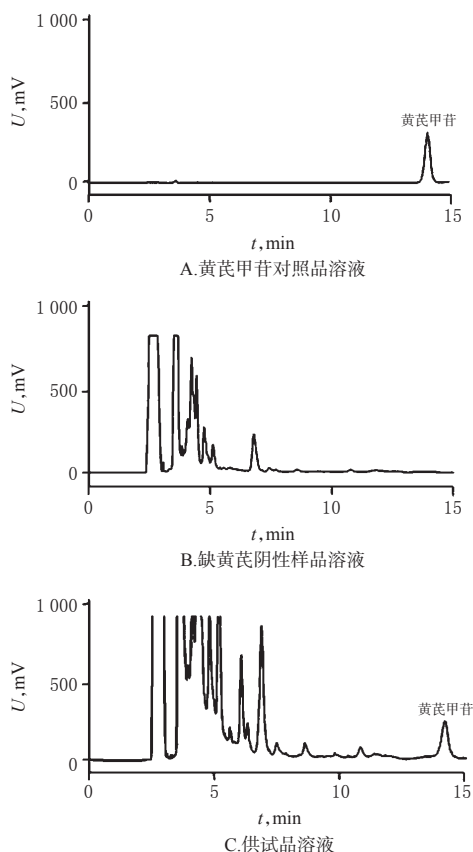


图1 黄芪甲苷含量测定的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of astragaloside IV content determination

2.2.6 线性关系考察 取“2.2.2”项下黄芪甲苷对照品溶液进行梯度稀释,分别制成不同质量浓度(1.162 8、0.581 4、0.290 7、0.145 4、0.072 7、0.036 3 mg/mL)的系列黄芪甲苷对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测

定,记录峰面积。以峰面积的对数为纵坐标(y)、质量浓度的对数为横坐标(x)绘制标准曲线,得到回归方程为 $y=1.4815x-15.689(r=0.9991)$ 。结果表明,黄芪甲苷在质量浓度为0.0363~1.1628 mg/mL范围内与其峰面积线性关系良好。

2.2.7 精密度的试验 量取“2.2.2”项下黄芪甲苷对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的RSD为1.57%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 量取同一水提液500 mL(按正交试验1号条件提取),按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的RSD为1.41%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.2.9 重复性试验 量取水提液500 mL(按正交试验1号条件提取),平行量取6份,分别按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液后,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算黄芪甲苷含量。结果,所得供试品溶液中黄芪甲苷的含量为0.3740 mg/mL, RSD为1.95%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收试验 量取按正交试验1号条件提取后的水提液500 mL(经“2.2.3”项下方法制备后,测得黄芪甲苷含量为0.3740 mg/mL),平行量取9份,分别按黄芪甲苷含量的50%、100%、150%加入黄芪甲苷对照品,每组3份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液后,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算样品溶液中黄芪甲苷的总含量。结果,黄芪甲苷的平均回收率为96.85%,RSD为1.10%($n=9$),表明该方法准确度良好。黄芪甲苷回收率测定结果见表1。

表1 黄芪甲苷回收率测定结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests for astragaloside IV ($n=9$)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	实测量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
黄芪甲苷	1.870 0	0.935 0	2.787 3	98.11	96.85	1.10
	1.870 0	0.935 0	2.776 6	96.96		
	1.870 0	0.935 0	2.772 8	96.56		
	1.870 0	1.870 0	3.692 6	97.47		
	1.870 0	1.870 0	3.675 9	96.57		
	1.870 0	1.870 0	3.713 5	98.58		
	1.870 0	2.805 0	4.559 8	95.89		
	1.870 0	2.805 0	4.571 1	96.30		
	1.870 0	2.805 0	4.540 7	95.21		

2.3 丹酚酸B含量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Inertsil ODS-SP(150 mm×4.6 mm,5 μm);检测器:光二极管阵列检测器;流动相:乙腈-0.1%磷酸(21:79,V/V);流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:286 nm;进样量:10 μL。

2.3.2 丹酚酸B对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸B对照品10.5 mg,用甲醇溶解并定容至10 mL量瓶中,摇匀,制成质量浓度为1.0290 mg/mL的丹酚酸B对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下水提液适量,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 缺丹参阴性样品溶液的制备 取缺丹参的其余处方量饮片,按正交试验1号条件进行提取,趁热滤过,合并滤液,浓缩至适量,放冷至室温,加水定容至1 000 mL,即得缺丹参阴性样品;再按“2.3.3”项下方法操作,制备缺丹参阴性样品溶液。

2.3.5 专属性与考察 取丹酚酸B对照品溶液、供试品溶液、缺丹参阴性样品溶液,分别按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,丹酚酸B的色谱峰与相邻峰间的分离度>1.5,以丹酚酸B峰计理论板数>5 000。供试品溶液在与丹酚酸B对照品溶液相同的保留时间处有相同色谱峰,缺丹参阴性样品溶液在与丹酚酸B对照品溶液相同保留时间处未见相应色谱峰,表明阴性无干扰、专属性良好。丹酚酸B含量测定的高效液相色谱图见图2。

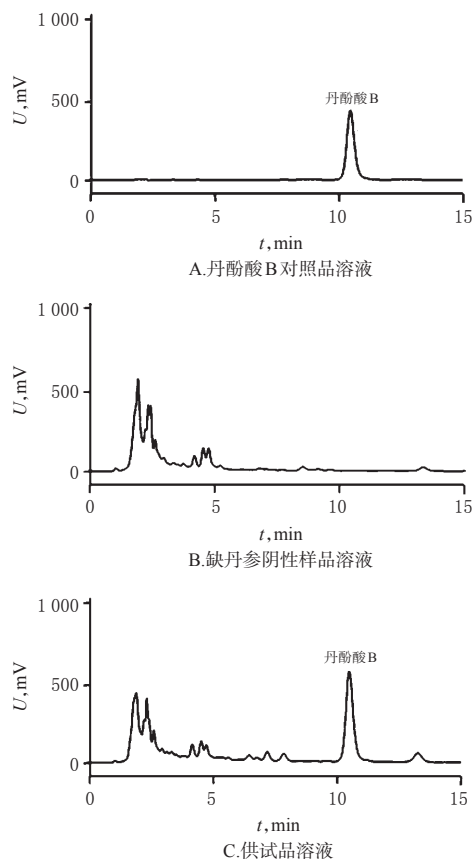


图2 丹酚酸B含量测定的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of salvianolic acid B content determination

2.3.6 线性关系考察 取“2.3.2”项下丹酚酸B对照品

溶液进行梯度稀释,制得不同质量浓度(1.029 0、0.514 5、0.257 3、0.064 3、0.032 2、0.008 0 mg/mL)的系列丹酚酸B对照品溶液,分别按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、丹酚酸B质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得到回归方程为 $y=6\ 422\ 370x-2\ 685.65$ ($r=0.999\ 9$),表明丹酚酸B在质量浓度为0.008 0~1.029 0 mg/mL范围内与其峰面积线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 取“2.3.2”项下丹酚酸B对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD为0.27% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.8 稳定性试验 取水提液1 mL(按正交试验1号条件提取),按“2.3.3”项下方法制备成供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,丹酚酸B峰面积的RSD为1.46% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.3.9 重复性试验 取水提液(按正交试验1号条件提取)6份,每份1 mL,按“2.3.3”项下方法制备成供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录丹酚酸B峰面积并计算其在溶液中的含量。结果,丹酚酸B的含量为0.380 0 mg/mL, RSD为1.05% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.10 加样回收试验 量取已知丹酚酸B含量为0.380 0 mg/mL的水提液1 mL(按正交试验1号条件提取),分别按丹酚酸B含量的50%、100%、150%加入丹酚酸B对照品,每组3份,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录丹酚酸B峰面积并计算其回收率。结果,丹酚酸B的平均回收率为104.05%, RSD为0.94% ($n=9$),表明该方法准确度良好。丹酚酸B回收率测定结果见表2。

表2 丹酚酸B回收率测定结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery tests for salvianolic acid B ($n=9$)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	实测量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
丹酚酸B	0.380 0	0.200 0	0.589 9	104.95	104.05	0.94
	0.380 0	0.200 0	0.590 9	105.45		
	0.380 0	0.200 0	0.588 3	104.15		
	0.380 0	0.400 0	0.795 8	103.95		
	0.380 0	0.400 0	0.800 1	105.03		
	0.380 0	0.400 0	0.789 3	102.33		
	0.380 0	0.600 0	1.002 4	103.73		
	0.380 0	0.600 0	1.001 2	103.53		
	0.380 0	0.600 0	1.000 0	103.33		

2.4 出膏率测定

精密量取水提液50.00 mL,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干,于105 ℃干燥3 h,置于干燥器中冷

却30 min,称定质量,计算出膏率:出膏率(%)=[$(W \times 1\ 000)/(50.00 \times 121)$] $\times 100\%$,其中 W 为50.00 mL浓缩液中固形物的质量,常数121表示该方质量为121 g。

2.5 正交试验优选水提工艺

根据相关文献^[3]及单因素试验结果,以加水倍数(A)、煎煮时间(B)、煎煮次数(C)为考察因素,以一剂方剂中提取得到的黄芪甲苷总量、丹酚酸B总量及出膏率为考察指标设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素与水平见表3,正交试验设计与结果见表4。

表3 因素与水平表

Tab 3 Factors and levels

水平	因素		
	加水倍数(A),倍	煎煮时间(B),h	煎煮次数(C),次
1	8	1	1
2	10	1.5	2
3	12	2	3

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab 4 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

组号	A	B	C	D(空白)	含量,mg		出膏率,%
					黄芪甲苷	丹酚酸B	
					1	1	
2	1	2	2	2	7.88	479.00	32.52
3	1	3	3	3	6.85	477.12	35.37
4	2	1	2	3	8.22	552.28	32.04
5	2	2	3	1	6.70	533.19	34.63
6	2	3	1	2	4.69	387.26	24.63
7	3	1	3	2	7.94	649.91	34.63
8	3	2	1	3	4.35	399.54	27.32
9	3	3	2	1	8.95	520.88	34.91

2.6 指标权重系数的确定

2.6.1 层次分析(AHP)法确定权重系数 AHP法是基于主观赋值权重的一种方法^[14-15]。根据补脾养肾方的“君臣佐使”配伍规律及各指标成分药理作用的强弱,对黄芪甲苷和丹酚酸B的含量、出膏率作为权重指标予以量化^[16]。将3个指标分为3个层次,确定3项指标的优先顺序为:黄芪甲苷>丹酚酸B>出膏率。因黄芪甲苷含量较丹酚酸B含量而言比较重要,赋值5;黄芪甲苷含量较出膏率而言十分重要,赋值6;丹酚酸B含量较出膏率而言稍微重要,赋值2。构建的指标成对比较的判断优先矩阵见表5。

表5 指标成对比较的判断优先矩阵

Tab 5 Judgment priority matrix for comparison on index pairs

权重指标	黄芪甲苷含量	丹酚酸B含量	出膏率
黄芪甲苷含量	1	5	6
丹酚酸B含量	1/5	1	2
出膏率	1/6	1/2	1

根据表5评分结果,使用yaahp 12.2分析软件进行计算。结果,得到黄芪甲苷含量、丹酚酸B含量及出膏率的权重系数分别为0.725 8、0.172 1、0.102 0;一致性比

例因子(CR)=0.027 9<0.10,即指标成对比较判断优先矩阵具有一致性,权重系数有效。

2.6.2 指标重复性相关法(CRITIC)确定权重系数 主观赋权不能有效全面地体现各指标中成分在提取过程总体提取效果,而CRITIC法以评价指标间的对比强度及冲突性作为基础,通过计算标准差将对比强度体现出来,是一种能客观反映各评价指标权重的计算方法^[17-18],故考察采用CRITIC法确定各指标权重系数。将表4正交试验结果数据作线性插值处理,即[指标成分值=(实测值-最小值)/(最大值-最小值)×100],消除单位量纲后,用SPSS 22.0软件计算指标间的对比强度(s_i)、冲突性(δ_i)、综合权重(c_i)与权重(ω_i),结果见表6。

表6 CRITIC法相关计算数据

Tab 6 Relevant calculation data of CRITIC method

参数	黄芪甲苷含量	丹酚酸B含量	出膏率
s_i	35.870 7	31.306 4	37.813 7
δ_i	0.436 0	0.395 9	0.389 9
c_i	15.639 6	12.394 2	14.743 6
ω_i	0.365 6	0.289 7	0.344 7

由表6结果可知,黄芪甲苷含量、丹酚酸B含量和出膏率的权重系数分别为0.365 6、0.289 7、0.344 7,黄芪甲苷含量与出膏率的权重系数接近。

2.6.3 AHP-CRITIC混合加权法确定权重系数 AHP法依据中药复方“君臣佐使”配伍特点,赋予君药黄芪中黄芪甲苷最大的权重系数,佐药丹参中丹酚酸B权重系数次之,出膏率权重系数最小。CRITIC法计算结果显示,黄芪甲苷与出膏率的权重系数相近,虽然客观真实,但不能反映中药复方的配伍规律。AHP-CRITIC混合加权法兼具两者优点,既能符合“君臣佐使”配伍,又不失客观,能全面体现样本的数据信息,故决定采用AHP-CRITIC混合加权法确定指标权重系数,即($\omega_{综合ij}$)= $\omega_{AHPij}\omega_{CRITICij}/\sum\omega_{AHPij}\omega_{CRITICij}$ (式中, ω_{AHPij} 表示AHP法计算的权重系数, $\omega_{CRITICij}$ 表示CRITIC法计算的权重系数, i 表示第*i*个因素, j 表示第*j*个样本)。根据AHP-CRITIC混合加权法计算得黄芪甲苷含量、丹酚酸B含量和出膏率的权重系数分别为0.757 3、0.142 3、0.100 4。

2.6.4 3种赋权法的综合评分结果比较 分别用3种赋权法得到的权重系数对正交试验数据进行综合评分,结果见表7。

表7结果显示,3种赋权法得到的综合评分结果差异较小。通过SPSS 22.0软件对3种赋权法得到的综合评分进行相关性分析,结果AHP法与CRITIC法得到的综合评分之间的相关系数为0.977,AHP法与AHP-CRITIC混合加权法得到的综合评分之间的相关系数为1.000,CRITIC法与AHP-CRITIC混合加权法得到的综合评分之间的相关系数为0.973,三者间的相关性均显著($P<0.05$),说明这3种赋权法得到的评分结果具有一

表7 3种赋权法的综合评分结果(分)

Tab 7 Comprehensive score of three weighted methods(score)

组号	AHP法	CRITIC法	AHP-CRITIC混合加权法
1	58.80	59.19	58.96
2	85.96	85.24	86.40
3	78.39	84.72	78.45
4	90.52	89.42	90.74
5	78.44	84.89	78.20
6	55.39	60.43	55.16
7	91.59	95.16	91.24
8	53.73	62.20	53.31
9	96.44	93.81	97.05

致性。通过SPSS 22.0软件对AHP法与CRITIC法的权重系数进行相关系数分析,结果两者权重系数的相关系数为0.637,相关性不显著($P>0.05$)。相较之下,AHP-CRITIC混合加权法结合了AHP法与CRITIC法两种方法的优势,能从主、客观两方面体现提取工艺的实际情况。因此,最终采用AHP-CRITIC混合加权法确定权重系数进行综合评分计算,即综合评分=[(黄芪甲苷含量/黄芪甲苷含量最大值)×0.757 3+(丹酚酸B含量/丹酚酸B含量最大值)×0.142 3+(出膏率/出膏率最大值)×0.100 4]×100。

2.7 最佳水提工艺的确定及验证试验

2.7.1 正交试验结果分析 利用SPSS 22.0软件对正交试验结果进行分析,直观分析结果见表8,方差分析结果见表9。

表8 直观分析结果

Tab 8 Results of intuitive analysis

组号	A	B	C	D(空白)	含量,mg		出膏率,%	综合评分
					黄芪甲苷	丹酚酸B		
1	1	1	1	1	5.31	350.20	22.42	58.96
2	1	2	2	2	7.88	479.00	32.52	86.40
3	1	3	3	3	6.85	477.12	35.37	78.45
4	2	1	2	3	8.22	552.28	32.04	90.74
5	2	2	3	1	6.70	533.19	34.63	78.20
6	2	3	1	2	4.69	387.26	24.63	55.16
7	3	1	3	2	7.94	649.91	34.63	91.24
8	3	2	1	3	4.35	399.54	27.32	53.31
9	3	3	2	1	8.95	520.88	34.91	97.05
K_1	223.81	240.94	167.43	234.21				
K_2	224.10	217.91	274.19	232.80				
K_3	241.60	230.66	247.89	222.50				
R	17.79	23.03	106.76	11.71				

表9 方差分析结果

Tab 9 Results of variance analysis

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	69.20	2	34.60	2.54	>0.05
B	88.74	2	44.37	3.26	>0.05
C	2 062.58	2	1 031.29	75.70	<0.05
D(误差)	27.24	2	13.62		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

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

由直观分析结果可知,各因素对补脾养肾颗粒水提工艺作用的主次为C>A>B。方差分析结果表明,煎煮次数(C)对试验结果具有显著影响($P<0.05$)。最终优选的结果为A₃B₁C₂。

2.7.2 比较验证试验 因加水倍数(A)、煎煮时间(B)优选的水平均处在极值,故设计比较验证试验对结果进行进一步验证。称取处方量饮片3份,分别按以下工艺进行提取,进行比较验证试验:(1)煎煮2次,每次加12倍水、煎煮45 min;(2)煎煮2次,每次加12倍水、煎煮60 min;(3)煎煮2次,每次加14倍水、煎煮60 min。结果,优选的最佳工艺参数为煎煮2次,每次加12倍水、煎煮1 h,即与正交试验结果A₃B₁C₂一致,再次说明正交试验结果可信,比较验证试验结果见表10。

表10 比较验证试验结果

Tab 10 Comparative validation test results

提取工艺	含量,mg		出膏率,%	综合评分
	黄芪甲苷	丹酚酸B		
煎煮2次,每次加12倍水,煎煮45 min	7.87	582.15	26.60	86.89
煎煮2次,每次加12倍水,煎煮60 min	8.68	613.17	31.11	95.70
煎煮2次,每次加14倍水,煎煮60 min	8.70	610.62	32.07	96.09

2.7.3 平行验证试验 称取一剂处方量饮片,按正交试验优选的最佳工艺水平A₃B₁C₂进行提取,并按前文建立的方法测定其中总的黄芪甲苷含量、丹酚酸B含量和出膏率,结果见表11。

表11 平行验证试验结果

Tab 11 Parallel validation test results

试验号	含量,mg		出膏率,%	综合评分	平均综合评分	RSD,%
	黄芪甲苷	丹酚酸B				
1	9.02	575.00	30.43	97.55	96.59	1.01
2	8.75	614.70	32.10	96.61		
3	8.60	638.81	31.19	95.61		

由表11结果可知,3次验证试验的平均黄芪甲苷含量为8.79 mg、平均丹酚酸B含量为609.50 mg、平均出膏率为31.24%,平均综合评分为96.59分(RSD=1.01%, $n=3$),表明工艺稳定、重复性好,可作为该方的水提工艺。

3 讨论

在黄芪甲苷的提取中,主要有水饱和正丁醇萃取、氨试液洗涤及大孔吸附树脂柱处理等操作^[19]。本研究分别考察了在水饱和正丁醇萃取后,经氨液洗涤和D101型大孔树脂吸附对提取液中黄芪甲苷含量及其峰形的影响。结果表明,氨液洗涤较D101型大孔树脂吸附可提高黄芪甲苷含量和去除黄芪甲苷特征峰区域的2个杂质峰的干扰。笔者分析这2个杂质峰可能为黄芪皂苷I、II,其在弱碱性环境下可经皂化反应脱去乙酰基生成黄芪甲苷^[20-21]。因此,本研究中黄芪甲苷的提取条件确定为水饱和正丁醇萃取,氨液洗涤。

中药复方中所含成分众多,若以单一指标进行工艺

筛选,不能保证本方的整体质量,故本研究采用多指标成分考察提取工艺。查阅相关文献可知^[22-23],黄芪中有效活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷具有显著的抗氧化活性,能有效清除自由基,可减轻慢性肾病导致的细胞氧化损伤;酒苁蓉中有效活性成分毛蕊花糖苷具有保护肾功能和延缓肾纤维化的作用。但预试验结果表明,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊花糖苷都与其他化学成分互相干扰,经更换色谱柱、流动相及洗脱梯度等色谱条件仍未能达到有效分离,故未能将以上两个有效成分作为评价指标成分,为本研究的不足之处,这将会在后续的研究中改进。

综上,AHP-CRITIC混合加权法确定的多指标权重系数客观、真实;优选的水提工艺稳定且重复性好,可为补脾养肾颗粒的制备提供科学、可靠的依据。

参考文献

- [1] LIU X, CHEN J, LIU X, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula ameliorates chronic kidney disease: involvement of mitochondrial quality control network[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1):340-347.
- [2] LU J, LIU X, LIAO Y, et al. Jian-Pi-Yi-Shen formula regulates inflammatory cytokines production in 5/6 nephrectomized rats via suppression of NF- κ B activation[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018.DOI: 10.1155/2018/7203547.
- [3] WANG D, CHEN J, LIU X, et al. A Chinese herbal formula, Jian-Pi-Yi-Shen decoction, improves muscle atrophy via regulating mitochondrial quality control process in 5/6 nephrectomized rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9253-9262.
- [4] 傅博, 祁爱蓉, 熊国良, 等. 肾衰1号方治疗慢性肾功能衰竭146例临床观察[J]. *世界中医药*, 2017, 12(12):2999-3001, 3005.
- [5] 廖奕娇, 何日明, 杨曙东, 等. 李顺民教授治疗IgA肾病经验[J]. *成都中医药大学学报*, 2018, 41(3):91-94.
- [6] 李江. *中药新药开发学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017:90-91.
- [7] 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. *中医临床研究*, 2015, 7(25):22-25.
- [8] 马丙祥, 董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. *中国药房*, 2014, 25(7):663-665.
- [9] 韩海燕. 黄芪甲苷治疗慢性肾脏疾病研究进展[J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(4):678-680.
- [10] 陈素枝, 檀金川. 黄芪甲苷保护肾脏的分子机制研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(24):5973-5979.
- [11] 孙仁弟, 徐向阳, 宋燕青. 丹酚酸B的药理研究进展[J]. *药物流行病学杂志* 2012, 21(9):458-462.
- [12] 胡大军, 胡蓉, 雷莉, 等. 丹酚酸B对急性肾损伤大鼠血浆FGF-23、KIM-1及肾功能的影响[J]. *中医学报*, 2018, 33(1):91-94.
- [13] 邢增智, 李帅, 张爱军, 等. 基于信息熵赋权法的正交试验

基于数据挖掘的四川南派藏医药主治疾病及用药规律的研究[△]

赵程成^{1*},徐 僮²,田玫瑰³,杜 欢¹,范 刚^{2#},张 艺²(1.成都中医药大学药学院,成都 611137;2.成都中医药大学民族医药学院,成都 611137;3.达州职业技术学院临床医学系,四川 达州 635001)

中图分类号 R931 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)19-2662-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.19.14

摘要 目的:研究四川南派藏医药的学术特色及内涵,为南派藏医药的传承和发展提供相关信息,为其中常用药材的开发利用提供参考。方法:采用中医传承辅助平台中的数据挖掘、统计分析、归纳演绎等方法,系统分析属于四川南派藏医药的藏医院中使用的672个医院制剂的品种特点、药物频次、主治疾病及其用药规律等,并采用熵层次聚类方法演化出基于核心组合药物的新方。结果:四川南派藏医药方剂中共使用了624种药物,其中植物药509种(81.67%)、矿物药61种(9.77%)、动物药54种(8.65%);使用频次>120的药物有16味,排名前3的药物为诃子(57.44%)、红花(43.15%)、木香(42.26%);主治疾病包括13类,排名前3的依次为胃病(28.13%)、肝胆疾病(12.80%)和神经疾病(11.90%)。在治疗胃病方面,主要使用诃子、红花、豆蔻、荜茇、木香、石榴子等,常用药物组合共61个,最常用的药对为荜茇-豆蔻;治疗肝胆疾病主要使用诃子、红花、波棱瓜子、獐牙菜、渣驯等,常用药物组合共64个,最常用药对为红花-诃子;治疗神经疾病主要使用肉豆蔻、诃子、木香、丁香、沉香、广枣等,常用药物组合共73个,最常用药对为诃子-肉豆蔻。采用熵层次聚类方法演化出包括紫草草-紫草-茜草-石榴子在内的5个候选新方。结论:所得四川南派藏医药医院制剂治疗常见疾病的高频药对及基于核心组合演化出的候选新方可用于治疗胃病、肝胆疾病和神经系统疾病的现代藏药新药开发提供参考。

关键词 南派藏医药;主治疾病;用药规律;中医传承辅助平台;数据挖掘

Study on Main Treatment Diseases and Medication Rule in Sichuan Nanpai Tibetan Medicine Based on Data Mining

ZHAO Chengcheng¹, XU Tong², TIAN Meigui³, DU Huan¹, FAN Gang², ZHANG Yi² (1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.School of Ethnic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 3.Dept. of Clinical Medicine, Dazhou Vocational and Technical College, Sichuan Dazhou 635001, China)

- 优化七味蟾参方提取工艺研究[J].中国药房,2019,30(3):376-380.
- [14] 石振武,赵敏.运用层次分析法确定指标的权值[J].科技和产业,2008,8(2):23-25.
- [15] 王晖,陈丽,陈垦,等.多指标综合评价方法及权重系数的选择[J].广东药学院学报,2007,23(5):583-589.
- [16] 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.
- [17] 贺佳,高尔生,楼超华.综合评价中权重系数及标准化方法的研究[J].中国公共卫生,2001,17(11):91-93.
- [18] 郭真,于丽红,兰庆高.村镇银行可持续发展评价指标体系的构建:基于对湖南湘乡市村镇银行的调查[J].金融理论与实践,2011(5):53-56.
- [19] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:133-134,209,249.
- [20] 颜晓航.黄芪及其制剂中黄芪甲苷含量测定方法研究进展[J].安徽医药,2006,12(10):951-953.
- [21] 刘和平,彭招华,张润容,等.黄芪药材中黄芪甲苷UPLC-ELSD含量测定方法的优化[J].中国实验方剂学,2015,21(5):92-94.
- [22] 于玲,王知斌,王秋红,等.黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展[J].中医药信息,2018,35(2):104-108.
- [23] 郑帅,杨敏.毛蕊花糖苷治疗糖尿病肾病的研究进展[J].医学综述,2018,24(16):3232-3241.

[△] 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2017YFC1703900);中国民族医药学会科研项目(No.2017KYXM-M105-48)

* 硕士研究生。研究方向:民族药质量控制。E-mail:782541844@qq.com

通信作者:副研究员,博士。研究方向:民族药数据挖掘及质量控制。E-mail:fangang1111@163.com

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-08-05)
(编辑:林 静)