

藏药四味姜黄汤中10种有效成分含量测定及其煎煮工艺优化[△]

王小艳^{1*}, 向宇楠¹, 高洁¹, 潘琳¹, 毕若红¹, 赖先荣^{1#}, 李啟恩², 李先加²(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 青海大学藏医学院, 西宁 810016)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0913-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.04

摘要 目的:建立同时测定藏药四味姜黄汤中10种有效成分的含量,并对其煎煮工艺进行优化。方法:采用高效液相色谱法测定含量。以浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,10种成分的含量及出膏率的综合得分为响应值,在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken响应面法优化其煎煮工艺。结果:没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素进样量的线性范围分别为0.280 6~1.683 6、0.289 6~1.737 6、0.320 8~1.924 8、0.116 0~0.696 0、0.018 9~0.113 5、0.013 3~0.079 9、0.092 3~0.553 8、0.025 5~0.153 0、0.036 1~0.216 3、0.041 0~0.245 7 μg(*r*均为0.999 9);定量限分别为0.28、14.48、3.21、11.60、1.89、4.44、0.46、0.26、0.36、0.41 ng,检测限分别为0.11、4.14、1.24、3.32、0.58、1.33、0.13、0.09、0.14、0.12 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率为92.56%~103.69%(RSD为0.90%~3.81%,*n*=6)。该方的最优煎煮工艺为浸泡60 min,加入8倍量(mL/g)水,煎煮2次,每次65 min。6次验证试验中,综合得分为3.323 2~3.422 4分,与预测值(3.437 4)相对误差的绝对值均小于2%。结论:所建含量测定方法操作简单,重复性较好,可用于同时测定四味姜黄汤中10种有效成分的含量;优化所得煎煮工艺稳定、可行。

关键词 藏药;四味姜黄汤;煎煮工艺优化;高效液相色谱法;Box-Behnken响应面法;含量测定

Content Determination of 10 Kinds of Active Components in Tibetan Medicine Siwei Jianghuang Prescription and Its Decoction Technology Optimization

WANG Xiaoyan¹, XIANG Yunan¹, GAO Jie¹, PAN Lin¹, BI Ruohong¹, LAI Xianrong¹, LI Qi'en², LI Xianjia²(1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Tibetan Medical College, Qinghai University, Xining 810016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of 10 kinds of active components in Tibetan medicine Siwei jianghuang prescription, and to optimize its decoction technology. METHODS: HPLC method was adopted. Using soaking time, the amount of added water, decoction time and decoction times as factors, comprehensive score of the contents of 10 kinds of components and solid extracts rate as response values, one the basis of single factor test, Box-Behnken response surface method was used to optimize its decoction technology. RESULTS: The linear range of gallic acid, corilagin, magnoflorine, ellagic acid, hydrochloric jatrorrhizine, hydrochloride palmatine, hydrochloride berberine, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin were 0.280 6-1.683 6, 0.289 6-1.737 6, 0.320 8-1.924 8, 0.116 0-0.696 0, 0.018 9-0.113 5, 0.013 3-0.079 9, 0.092 3-0.553 8, 0.025 5-0.153 0, 0.036 1-0.216 3, 0.041 0-0.245 7 μg (all *r* were 0.999 9), respectively. The limits of quantitation were 0.28, 14.48, 3.21, 11.60, 1.89, 4.44, 0.46, 0.26, 0.36, 0.41 ng, respectively. The limits of detection were 0.11, 4.14, 1.24, 3.32, 0.58, 1.33, 0.13, 0.09, 0.14, 0.12 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. The recoveries were 92.56%-103.69% (RSDs were 0.90%-3.81%, *n*=6). The optimal decoction technology included soaking 60 min, adding 8-fold (mL/g) water, decoction for twice, lasting for 65 min each time. In 6 validation tests, comprehensive scores were 3.323 2-3.422 4, and the absolute value of the relative error with the predicted value (3.437 4) was less than 2%. CONCLUSIONS: Established method is simple and repeatable, and can be used for simultaneous determination of 10 kinds of active components in Siwei jianghuang prescription. Optimized decoction technology is stable and feasible.

KEYWORDS Tibetan medicine; Siwei jianghuang prescription; Decoction technology optimization; HPLC; Box-Behnken response surface method; Content determination

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81774007, No.815-60806, No.81473427, No.81173360);国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(No.2017YFC1703900);青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-922Q);四川省教育厅重点项目(No.16ZJA0120)

* 硕士研究生。研究方向:药物新制剂、新剂型、新技术。电话:028-61656141。E-mail:1498271280@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药及民族药创新药物。电话:028-61656141。E-mail:vegff@qq.com

标准汤剂即以中医药理论为指导、临床应用为基础,参考现代提取方法,经标准化工艺制备而成的中药水煎剂,可用于表征中药汤剂的一般状态^[1]。藏药四味姜黄汤为藏医经典,《蓝琉璃》^[2]中记载其由姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜等浓煎,内服,可用于治疗尿频症,是藏医药治疗“京尼萨库病”即糖尿病及其并发症的传统方剂^[3]。藏药四味姜黄汤含有生物碱类、多酚类、姜黄素

类、蒺藜皂苷类等有效成分^[4-5],具有抗氧化、改善血糖等作用^[6-10]。由于藏医经典文献中并未记载其具体的制备方法,为此本研究前期按照《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》^[11]中经典名方物质基准及经典名方制剂的要求,同时参考《医疗机构中药煎药室管理规范》^[12]制备了藏药四味姜黄汤,并以方中生物碱类成分木兰花碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、盐酸小檗碱,多酚类成分没食子酸、柯里拉京、鞣花酸,姜黄素类成分双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素等为指标,建立了测定上述成分含量的高效液相色谱法(HPLC);通过Box-Behnken响应面法对其煎煮工艺进行优化,以得到符合临床用药要求的液体制剂,并为藏药四味姜黄汤的新药研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1311B型四元泵、内置真空脱气机、G1329B型标准自动进样器、G1315D型二极管阵列检测器、G1316A型柱温箱、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);UPH-I-10T型优普纯水制造系统(成都超纯科技有限公司);DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);CPA225D型十万分之一、BSA124S型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];RE-2000A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂

没食子酸对照品(批号:DST180226-008,纯度:≥99%)、柯里拉京对照品(批号:DST170313-012,纯度:≥98%)、鞣花酸对照品(批号:DST170105-004,纯度:≥98%)、双去甲氧基姜黄素对照品(批号:DST171220-21,纯度:≥98%)、去甲氧基姜黄素对照品(批号:DST171220-30,纯度:≥98%)均购自成都德思特生物技术有限公司;姜黄素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-16050404,纯度:≥99.59%);盐酸小檗碱对照品(批号:Y-035-171216,纯度:>98%)、盐酸巴马汀对照品(批号:Y-156170227,纯度:>98%)、木兰花碱对照品(批号:M-026170913,纯度:>98%)、盐酸药根碱对照品(批号:Y-023-171216,纯度:>98%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司;乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为饮用水(煎煮用)或纯化水(色谱分析用)。

姜黄饮片(批号:180601231)、蒺藜饮片(批号:190100791)均购自成都康美药业有限公司;余甘子饮片(批号:20180704)购自成都荷花池药材市场;小檗皮饮片(批号:20190609001)购自青海省西宁市药材市场,均经成都中医药大学药学院赖先荣教授鉴定,分别为姜科植物姜黄(*Curcuma longa* L.)的干燥根茎、蒺藜科植物蒺藜(*Tribulus terrestris* L.)的干燥成熟果实、大戟科植物余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)的干燥果实、小檗科植物刺红珠(*Berberis dicryophylla* Franch.)的干燥内皮。

2 方法与结果

2.1 四味姜黄汤中10种成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Capcell Pak C₁₈-MG II (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 3% A; 8~15 min, 3% A→17% A; 15~20 min, 17% A; 20~33 min, 17% A→19% A; 33~38 min, 19% A→25% A; 38~48 min, 25% A; 48~70 min, 25% A→80% A);流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;柱温:30 ℃;检测波长:270 nm(0~60 min, 没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱)、420 nm(60~70 min, 双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素)^[13]。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素对照品各适量,加甲醇溶解制成含上述各对照品质量浓度分别为1.403、1.448 1、1.604、0.58、0.757、0.666、0.923、0.510、0.721、0.819 mg/mL的单一对照品溶液;取上述各单一对照品溶液适量,加甲醇释释,制成上述各对照品质量浓度分别为140.3、144.8、160.4、58、9.462 5、6.66、46.15、12.75、18.025、20.475 μg/mL的混合对照品溶液,于4 ℃冷藏,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜饮片共60 g,加入8倍量(mL/g)水,浸泡60 min后,煎煮2次,每次65 min,趁热过滤,合并滤液。室温下取滤液1 mL,98~100 ℃水浴挥干,加甲醇溶解并定容至5 mL量瓶中,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液 按藏药四味姜黄汤的处方比例分别称取各单味药材饮片,按“2.1.3”项下方法分别制备缺姜黄、小檗皮、余甘子、蒺藜的阴性对照溶液。

2.1.5 空白对照溶液 以甲醇为空白对照溶液。

2.1.6 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,详见图1。由图1可知,各待测成分基线分离,分离度均大于1.5,其他杂质成分对待测成分无干扰,阴性对照对测定亦无干扰,理论板数以没食子酸峰计不低于5 000。

2.1.7 线性关系考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件分别进样2、4、6、8、10、12 μL,记录峰面积。以各待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

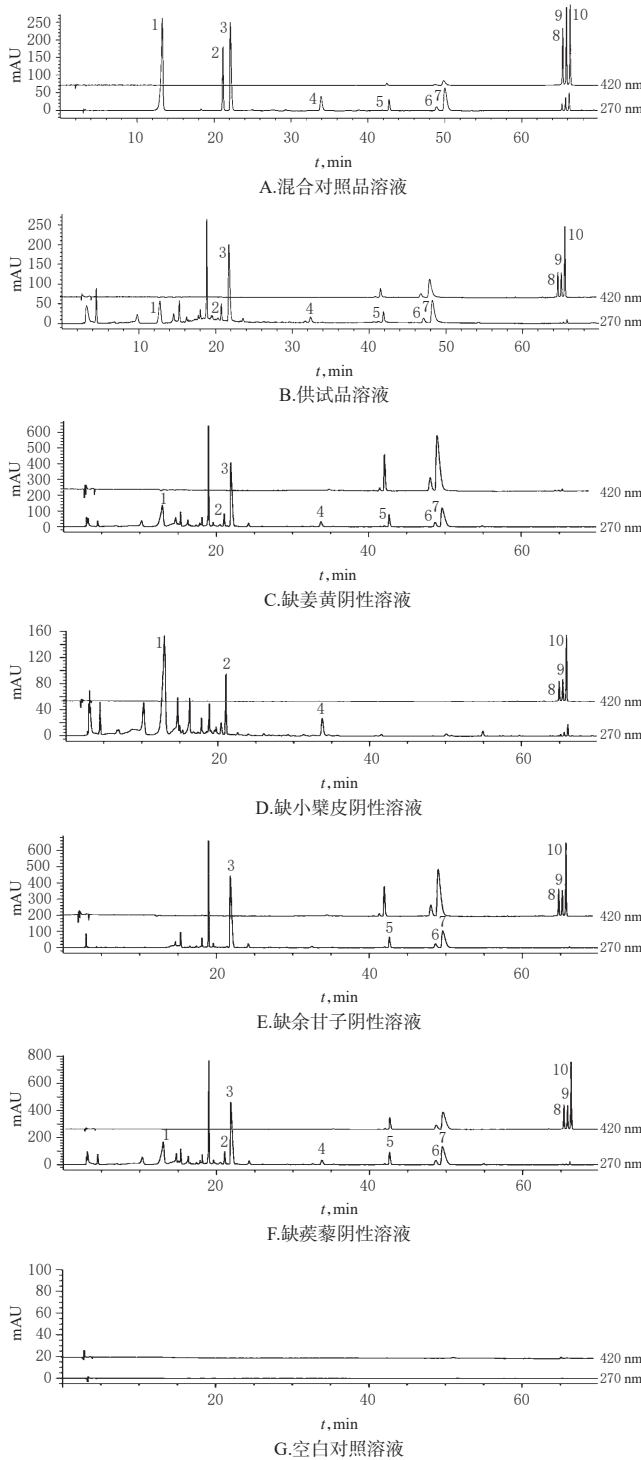
2.1.8 定量限与检测限考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液,以甲醇倍比稀释,按“2.1.1”项下色谱条件进样,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素的定量限分别为0.28、14.48、3.21、11.60、

1.89、4.44、0.46、0.26、0.36、0.41 ng, 检测限分别为0.11、4.14、1.24、3.32、0.58、1.33、0.13、0.09、0.14、0.12 ng。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Linear ranges and regression equations

待测成分	回归方程	线性范围, μg	r
没食子酸	$y=3\ 127x+22.40$	0.280 6~1.683 6	0.999 9
柯里拉京	$y=1\ 543.3x+26.00$	0.289 6~1.737 6	0.999 9
木兰花碱	$y=1\ 856.5x+8.95$	0.320 5~1.924 8	0.999 9
鞣花酸	$y=2\ 520.9x+6.23$	0.116 0~0.696 0	0.999 9
盐酸药根碱	$y=3\ 568.7x+1.12$	0.018 9~0.113 5	0.999 9
盐酸巴马汀	$y=3\ 098.9x+1.81$	0.013 3~0.079 9	0.999 9
盐酸小檗碱	$y=3\ 392.6x+18.09$	0.092 3~0.553 8	0.999 9
双去甲氧基姜黄素	$y=9\ 568.1x-4.47$	0.025 5~0.153 0	0.999 9
去甲氧基姜黄素	$y=8\ 855.6x+1.73$	0.036 1~0.216 3	0.999 9
姜黄素	$y=8\ 116.9x+2.80$	0.041 0~0.245 7	0.999 9



注: 1. 没食子酸; 2. 柯里拉京; 3. 木兰花碱; 4. 鞣花酸; 5. 盐酸药根碱; 6. 盐酸巴马汀; 7. 盐酸小檗碱; 8. 双去甲氧基姜黄素; 9. 去甲氧基姜黄素; 10. 姜黄素

Note: 1. gallic acid; 2. corilagin; 3. magnoflorine; 4. ellagic acid; 5. hydrochloric jatrorrhizine; 6. hydrochloride palmatine; 7. hydrochloride berberine; 8. bisdemethoxycurcumin; 9. demethoxycurcumin; 10. curcumin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.9 精密度的试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素峰面积的RSD分别为1.14%、0.97%、2.10%、1.27%、2.30%、2.97%、2.25%、1.40%、0.95%、0.94% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.10 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液适量,于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素峰面积的RSD分别为1.11%、1.07%、0.38%、1.70%、0.29%、1.44%、0.75%、3.24%、1.27%、0.54% ($n=8$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性较好。

2.1.11 重复性试验 按处方比例精密称取各药材饮片每份约60 g,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量的RSD分别为1.69%、1.87%、1.22%、2.25%、0.92%、1.97%、1.47%、2.97%、1.46%、1.25% ($n=6$),表明方法重复性较好。

2.1.12 加样回收率试验 精密量取已知含量的各药材饮片适量,共6份,加入一定量(加入量按含量的100%计算)的“2.1.2”项下各单一对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素的加样回收率分别为96.24%~101.66% ($RSD=2.33\%$, $n=6$)、92.56%~102.96% ($RSD=3.81\%$, $n=6$)、98.43%~102.81% ($RSD=1.58\%$, $n=6$)、96.61%~101.34% ($RSD=2.71\%$, $n=6$)、98.14%~99.94% ($RSD=0.90\%$, $n=6$)、97.53%~103.44% ($RSD=2.18\%$, $n=6$)、97.64%~103.53% ($RSD=2.48\%$, $n=6$)、99.41%~

103.13% (RSD=1.27% , n=6) 、100.15% ~103.69% (RSD=1.45% , n=6) 、99.57% ~102.84% (RSD=1.44% , n=6) ,表明方法准确度较好。

2.1.13 样品含量测定 按处方比例称取各药材饮片共 60 g ,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,共 3 批,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,平行操作 3 次,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 2 Results of content determination of samples (n=3,mg/g)

待测成分	供试品 1	供试品 2	供试品 3	平均含量
没食子酸	4.65	4.64	4.70	4.66
柯里拉京	2.01	2.01	2.00	2.00
木兰花碱	15.37	15.25	15.10	15.24
鞣花酸	0.70	0.72	0.70	0.71
盐酸药根碱	1.13	1.13	1.13	1.13
盐酸巴马汀	0.77	0.77	0.77	0.77
盐酸小檗碱	5.50	5.46	5.48	5.48
双去甲氧基姜黄素	0.11	0.10	0.10	0.10
去甲氧基姜黄素	0.11	0.11	0.11	0.11
姜黄素	0.35	0.34	0.34	0.34

2.2 出膏率测定

精密吸取“2.1.3”项下供试品溶液 10 mL,置于干燥至恒定质量的蒸发皿中蒸干,浸膏于 105 ℃干燥 3 h 后移至干燥器中冷却 30 min,迅速称定质量,计算出膏率。出膏率(%)=浸膏量(g)/原药材质量(g)×100%。

2.3 单因素试验

2.3.1 综合评分 由于综合评分法要求对选定的指标进行加权,经验性加权法主要根据选定指标的重要程度来确定权重系数,具有主观性和片面性^[14-15],因此本研究参考相关文献^[16-17],同时结合含量测定结果,采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行主成分分析和降维-因子分析。结果显示,没食子酸、柯里拉京、木兰花碱、鞣花酸、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素、姜黄素含量及出膏率等 11 个指标的权重系数分别为 0.111 28、0.111 17、0.111 53、0.110 91、0.109 59、0.109 55、0.111 42、0.110 99、0.111 03、0.112 33、-0.109 80,综合得分(Y)=X₁×0.111 28+X₂×0.111 17+X₃×0.111 53+X₄×0.110 91+X₅×0.109 59+X₆×0.109 55+X₇×0.111 42+X₈×0.110 99+X₉×0.111 03+X₁₀×0.112 33-X₁₁×0.109 80(X表示对应的指标)。

2.3.2 单因素考察 ①浸泡时间:按处方比例称取各药材饮片共 60 g,考察不同浸泡时间(30、60、90、120 min)对综合得分的影响;结果,浸泡 90 min 时综合得分最高,为 3.294 0 分,详见图 2A。②加水量:按处方比例称取各药材饮片共 60 g,考察不同加水量(6、8、10、12、14、16 倍)对综合得分的影响,平行测定 3 次;结果,虽然加入 14 倍量水时的综合得分最高,为 3.604 4 分,但与 10 倍(3.579 6 分)时相当,详见图 2B。③煎煮次数:按处方比例称取各药材饮片共 60 g,考察不同煎煮次数(1、2、3、4

次)对综合得分的影响,平行测定 3 次;结果,虽然煎煮 4 次时综合得分最高,为 3.569 9 分,但与煎煮 2 次(3.507 3 分)相当,详见图 2C。④煎煮时间:按处方比例称取各药材饮片共 60 g,考察不同煎煮时间(30、60、90、120、150 min)对综合得分的影响,平行测定 3 次;结果,煎煮 90 min 时综合得分最高,为 3.432 1 分,详见图 2D。考虑到操作的简便及成本的控制,故后续选择浸泡时间 30、60、90 min,加水量 6、8、10 倍,煎煮次数 1、2、3 次,煎煮时间 30、60、90 min 进行后续试验。

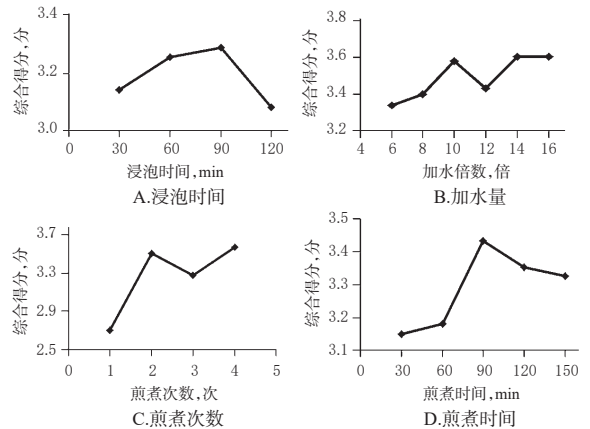


图 2 单因素试验结果

Fig 2 Results of single factor tests

2.4 Box-Behnken 响应面法优化煎煮工艺

2.4.1 Box-Behnken 响应面法试验设计与结果 在单因素试验的基础上,以浸泡时间(A, min)、加水量(B, mL/g)、煎煮时间(C, min)、煎煮次数(D, 次)为考察因素,采用 Design-Expert 8.0.6 软件,按 Box-Behnken 响应面法设计原理^[18-19],以 11 个指标的综合得分为响应值,进行 4 因素 3 水平试验设计。因素与水平见表 3,试验设计方案与结果见表 4(成分 1~10 分别为按前文顺序排列的 10 个待测成分,单位为 mg/g,下同)。

表 3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素			
	A, min	B, 倍	C, min	D, 次
-1	30	6	30	1
0	60	8	60	2
1	90	10	90	3

2.4.2 模型分析与预测 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 4 的试验数据进行二次多项式回归拟合,得综合得分(Y)=3.370-1.435×10⁻³A+0.047 B+0.051C+0.300D+0.012AB+0.014AC+0.051AD-0.020BC-0.085BD-8.684×10⁻⁴CD-0.110A²-0.180B²-0.160C²-0.400D²。方差分析结果见表 5。

由表 5 可见,回归方程中,一次项 D、二次项 B²、C²、D² 显著(P<0.05),交互项 AB、AC、AD、BC、BD、CD 均不显著(P>0.05);模型的 P<0.05,提示该模型可用于 11 种指标综合得分的分析和预测,且各影响因素对综合

表4 试验设计方案与结果

Tab 4 Test design plans and results

序号	A	B	C	D	成分1	成分2	成分3	成分4	成分5	成分6	成分7	成分8	成分9	成分10	出膏率, %	综合得分, 分
1	-1	-1	0	0	4.851 8	2.157 3	13.385 9	0.877 7	1.165 5	0.877 6	5.152 4	0.090 7	0.096 5	0.306 5	35.88	3.183 8
2	1	-1	0	0	4.530 4	2.087 0	13.131 2	0.772 5	1.122 2	0.843 1	4.985 2	0.096 6	0.102 2	0.324 6	37.00	3.075 1
3	-1	1	0	0	4.357 5	2.661 3	12.286 6	0.711 6	1.232 1	0.906 2	5.554 5	0.138 9	0.141 1	0.426 3	36.16	3.122 5
4	1	1	0	0	4.448 7	2.418 9	11.849 8	0.739 7	1.244 6	0.929 5	5.618 3	0.129 2	0.130 5	0.396 1	37.94	3.063 5
5	0	0	-1	-1	2.556 8	1.427 2	11.188 5	0.586 3	0.910 5	0.702 9	3.910 1	0.078 6	0.082 2	0.262 6	30.85	2.382 0
6	0	0	1	-1	3.741 3	1.496 0	10.792 1	0.599 9	0.892 1	0.659 8	3.757 5	0.060 3	0.064 4	0.205 4	31.23	2.444 2
7	0	0	-1	1	4.186 4	2.860 0	12.197 6	0.947 6	1.322 4	1.020 2	6.242 4	0.164 6	0.168 1	0.511 2	38.35	3.253 8
8	0	0	1	1	5.905 6	2.709 1	11.845 0	0.792 5	1.281 8	0.961 3	5.963 1	0.140 1	0.141 8	0.432 6	40.92	3.312 5
9	-1	0	0	-1	3.538 6	1.220 8	12.528 9	0.843 2	1.071 7	0.809 0	4.746 6	0.106 3	0.112 3	0.362 0	30.74	2.786 5
10	1	0	0	-1	3.537 2	1.188 1	12.756 5	0.736 7	1.033 1	0.768 1	4.397 0	0.085 5	0.092 8	0.305 4	33.05	2.735 2
11	-1	0	0	1	4.772 0	2.590 9	11.459 8	0.598 2	1.241 8	0.930 8	5.739 3	0.154 3	0.155 1	0.464 4	39.48	3.084 2
12	1	0	0	1	5.150 4	2.847 3	12.014 8	0.700 1	1.261 0	0.943 7	5.827 7	0.138 7	0.142 6	0.438 0	39.14	3.235 7
13	0	-1	-1	0	3.626 7	2.228 1	12.627 1	0.694 9	1.082 5	0.809 3	4.724 7	0.097 7	0.103 4	0.329 8	35.22	2.891 1
14	0	1	-1	0	3.818 4	2.584 1	13.237 2	0.787 7	1.271 8	0.963 1	5.875 3	0.144 9	0.150 7	0.467 4	37.80	3.219 2
15	0	-1	1	0	5.398 1	2.500 3	12.544 3	0.640 2	1.031 3	0.772 6	4.569 8	0.077 0	0.080 2	0.244 7	35.23	3.061 8
16	0	1	1	0	5.534 1	2.668 9	12.929 5	0.611 2	1.226 9	0.907 0	5.605 3	0.119 2	0.125 9	0.392 8	39.32	3.308 9
17	-1	0	-1	0	3.688 1	2.176 9	12.633 2	0.538 1	1.126 0	0.840 8	5.084 2	0.120 3	0.125 3	0.389 8	36.43	2.934 1
18	1	0	-1	0	3.845 2	2.313 3	12.423 4	0.577 5	1.119 2	0.837 7	5.005 6	0.106 2	0.113 0	0.355 8	36.05	2.931 6
19	-1	0	1	0	5.080 4	2.472 0	11.737 5	0.720 6	1.121 9	0.833 1	5.059 3	0.103 1	0.106 3	0.329 0	38.93	3.024 6
20	1	0	1	0	5.184 5	2.474 5	12.028 2	0.848 5	1.102 8	0.830 7	5.041 8	0.096 8	0.102 0	0.318 9	38.05	3.077 4
21	0	-1	0	-1	3.207 2	1.233 8	10.775 6	0.543 9	0.852 7	0.637 4	3.474 8	0.057 0	0.064 0	0.216 8	31.74	2.309 6
22	0	1	0	-1	3.253 3	1.835 1	11.133 5	0.572 4	0.918 1	0.693 4	4.006 3	0.085 2	0.090 3	0.285 9	31.72	2.511 0
23	0	-1	0	1	5.269 9	2.426 5	11.669 4	0.598 3	1.146 8	0.817 1	5.020 3	0.108 2	0.113 9	0.353 0	39.26	3.019 8
24	0	1	0	1	4.774 4	2.329 7	9.773 7	0.735 9	1.248 3	0.906 8	5.692 5	0.162 9	0.164 4	0.488 2	40.32	2.879 3
25	0	0	0	0	5.104 4	2.919 8	13.770 7	0.745 1	1.309 2	0.920 7	5.429 1	0.101 4	0.107 3	0.338 5	36.90	3.381 0
26	0	0	0	0	5.111 6	3.050 1	14.141 9	0.835 2	1.276 3	0.900 1	5.384 9	0.105 7	0.111 6	0.350 3	37.34	3.438 7
27	0	0	0	0	5.147 4	3.087 7	14.003 1	0.725 4	1.258 2	0.909 9	6.111 0	0.103 0	0.108 5	0.339 2	37.04	3.497 7
28	0	0	0	0	5.044 1	2.923 5	13.590 5	0.746 3	1.250 8	0.888 9	5.305 9	0.117 7	0.122 7	0.384 8	38.13	3.338 5
29	0	0	0	0	4.779 0	2.873 2	13.003 2	0.765 1	1.241 4	0.865 5	5.182 3	0.111 2	0.111 6	0.351 7	37.33	3.217 9

得分的顺序依次为D(煎煮次数)>C(煎煮时间)>B(加水倍数)>A(浸泡时间)。

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

差异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	2.47×10^{-5}	1	2.47×10^{-5}	8.43×10^{-4}	0.977 2
B	0.03	1	0.03	0.90	0.358 2
C	0.03	1	0.03	1.09	0.315 2
D	1.09	1	1.09	37.23	<0.000 1
AB	6.20×10^{-4}	1	6.20×10^{-4}	0.02	0.886 4
AC	7.67×10^{-4}	1	7.67×10^{-4}	0.03	0.873 7
AD	0.01	1	0.01	0.35	0.563 1
BC	1.64×10^{-3}	1	1.64×10^{-3}	0.06	0.816 1
BD	0.03	1	0.03	1.00	0.334 7
CD	3.02×10^{-6}	1	3.02×10^{-6}	1.03×10^{-4}	0.992 0
A ²	0.08	1	0.08	2.56	0.131 7
B ²	0.22	1	0.22	7.47	0.016 2
C ²	0.16	1	0.16	5.62	0.032 7
D ²	1.01	1	1.01	34.59	<0.000 1
模型	2.31	14	0.17	5.65	0.001 3
残差	0.41	14	0.03		
缺失	0.37	10	0.04	3.23	0.134 9
纯误差	0.05	4	0.01		
总离差	2.72	28			

2.4.3 各因素交互作用分析 采用Design-Expert 8.0.6软件绘制各影响因素的响应面图,详见图3。由图3可

知,因素BD、因素AD交互作用较强,因素AB、因素CD交互作用较弱,其交互强弱顺序依次为BD>AD>BC>AC>AB>CD。

2.4.4 最优煎煮工艺的确定 采用Design-Expert 8.0.6软件预测的最优煎煮工艺为浸泡时间62.86 min、加水量8.06倍、煎煮时间64.86 min、煎煮次数2.38次。考虑到实际操作,确定最优煎煮工艺为浸泡时间60 min、加水8倍、煎煮时间65 min、煎煮次数2次。

2.4.5 验证试验 按处方比例称取各药材饮片共60 g,按“2.4.4”项下最优煎煮工艺条件进行试验验证,平行操作3次(结果见表6序号1~3);同时,根据《医疗机构中药煎药室管理规范》^[12]与《中药饮片标准汤剂》(第1卷)^[20]对药液规格和浓缩体积(0.2 g/mL)的规定,按最优煎煮工艺进行验证(结果见表6序号4~6)。结果显示,与模型预测值(预测综合得分3.437 4分)比较,相对误差的绝对值均小于2%,提示优化后的煎煮工艺稳定、可行。

3 讨论

本研究采用HPLC法测定了四味姜黄汤中10种成分的含量,结果显示,方中没食子酸、木兰花碱、盐酸小檗碱含量较高,姜黄素类成分含量偏低,其原因可能与各成分在水溶液中的溶解度有关。在供试品溶液的制备中,笔者分别比较了酚酸类、生物碱类以及姜黄素类

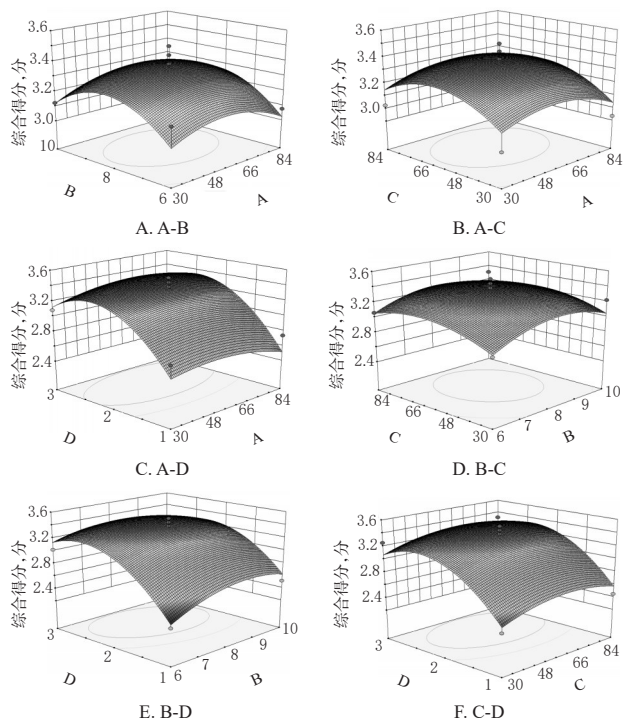


图3 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图

Fig 3 Response surface plots of interaction effects of each factor on comprehensive score

表6 验证试验结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 6 Results of validation tests($n=3, \text{mg/g}$)

序号	成分1	成分2	成分3	成分4	成分5	成分6	成分7	成分8	成分9	成分10	出膏率, %	综合评分,分	相对误差, %
1	4.894 4	2.879 2	14.159 6	0.838 7	1.262 9	0.915 5	5.493 8	0.121 8	0.124 3	0.377 4	0.367 8	3.417 1	-1.12
2	4.985 7	2.857 4	14.154 1	0.859 0	1.245 8	0.883 8	5.399 3	0.106 3	0.128 1	0.380 1	0.359 0	3.410 6	-0.93
3	4.915 1	2.844 7	14.319 0	0.810 4	1.259 5	0.917 2	5.432 5	0.107 3	0.127 2	0.372 9	0.358 7	3.422 4	-1.27
4	4.942 1	2.729 5	13.531 0	0.807 6	1.448 0	0.939 1	5.318 0	0.109 8	0.108 9	0.366 8	0.286 1	3.340 3	1.16
5	5.011 5	2.817 4	13.377 2	0.834 5	1.448 0	0.931 0	5.136 5	0.107 3	0.109 4	0.376 9	0.287 6	3.323 2	1.68
6	4.931 9	2.753 0	13.448 7	0.862 7	1.443 2	0.919 9	5.298 8	0.111 7	0.109 8	0.372 3	0.266 3	3.337 0	1.26

四味姜黄汤原方为四味姜黄汤散,亦同于煮散,是将中药饮片粉碎后与水共煎,去渣取汁得到的中药液体制剂,兼有汤剂和散剂的共同特点^[26]。本研究以四味姜黄汤标准汤剂的工艺研究为基础,采用Box-Behnken响应面法对其煎煮工艺进行优化,得到最优煎煮工艺为浸泡60 min,加入8倍量水,煎煮2次,每次65 min。经验证,工艺优化后的综合评分与模型预测值的相对误差的绝对值均小于2%,表明该工艺稳定、可行。

综上所述,所建含量测定方法操作简单、重复性较好,可用于同时测定四味姜黄汤中10种有效成分的含量;优化所得煎煮工艺稳定、可行。

参考文献

[1] 陈士林,刘安,李琦,等.中药饮片标准汤剂研究策略[J].中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
 [2] 第司·桑杰嘉措.蓝琉璃[M].毛继祖,卡洛,毛韶玲,译校.上海:上海科学技术出版社,2012:381-382.
 [3] 王艺润,赵存花,汪满江措,等.藏医藏药对糖尿病的认识与治疗[J].中国民族医药杂志,2013,19(10):33-35.
 [4] 周邦华.藏药四味姜黄胶囊制备工艺及质量标准研究[D].

成分在25%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇等中的溶解度,结果显示各成分相互影响溶出,酚酸类成分在50%甲醇中溶解较好,姜黄素类成分和生物碱成分在甲醇中溶解较好,考虑实际操作,选择甲醇为溶剂。由于试验条件欠缺,本研究未对蒺藜药材中的有效成分进行分析,后续本课题组将进一步探索。

中药标准汤剂是在中医药理论指导下,按照临床汤剂煎煮流程的规范化操作而煎得^[21]。临床用汤剂的标准煎药方法十分重要,应避免铜、铁、铝等易与中药成分发生化学反应的器具^[21]。考虑到操作方便,可使用玻璃器皿或不锈钢容器,本研究采用圆底烧瓶进行回流煎煮;而煎煮用溶剂可选择符合标准的饮用水,其成本低廉且方便易得。有研究对中药经典名方的加水量进行了探讨,结果发现根据药材的质地、疏松程度,加水量不同,一般以没过药面2~5 cm为宜^[22-23]。另有研究发现,煎煮2次,每次20~30 min后中药中的有效成分可大部分溶出^[24-25]。而本方中的药材多为质地坚硬的滋补类中药,煎煮时间可比一般药材适当延长。因此,综合考虑选择浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数为指标进行单因素考察。

成都:成都中医药大学,2017.

[5] 程匀,袁丽苹.高效液相色谱法同时测定协日嘎四味汤胶囊中姜黄素、脱甲氧基姜黄素、二脱甲氧基姜黄素的含量[J].中南药学,2011,9(5):335-338.
 [6] 艾小鹏,王小博,王小艳,等.基于代谢组学的小檗皮对STZ诱导糖尿病大鼠肾病的保护机制研究[J].中药药理与临床,2019,35(2):67-73.
 [7] 孙林林,乔利,田振华,等.姜黄化学成分及药理作用研究进展[J].山东中医药大学学报,2019,43(2):207-212.
 [8] 童东,王文倩,罗煜,等.藏药四味姜黄方对STZ诱导糖尿病肾病大鼠模型的剂量配比关系的初步研究[J].中成药,2018,40(3):516-524.
 [9] 刘延泽,李海霞,许利嘉,等.药食兼用余甘子的现代研究概述及应用前景分析[J].中草药,2013,44(12):1700-1706.
 [10] 张素军,冯尚彩.蒺藜皂苷对正常和2型糖尿病大鼠餐后血糖水平的影响[J].实用药物与临床,2012,15(1):1-3.
 [11] 国家药品监督管理局.古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定[N].中国中医药报,2018-06-04(002).
 [12] 国家中医药管理局.关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知[EB/OL].(2009-03-27)[2019-09-15]. http://

药效学实验结合正交试验优选壮药柏金颗粒的水提醇沉工艺^Δ

张雅^{1*}, 王一乔², 马卓雅¹, 梅之南³, 滕红丽^{1,4#} (1. 广西中医药大学壮医药学院, 南宁 530001; 2. 湖北民族大学医学院, 湖北恩施 445000; 3. 中南民族大学药学院, 武汉 430074; 4. 广西国际壮医医院科技部, 南宁 530201)

中图分类号 R285.5; R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)08-0919-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.08.05

摘要 目的: 优选壮药柏金颗粒的最佳水提醇沉工艺。方法: 采用高效液相色谱法测定柏金颗粒组方药材中提取物中岩白菜素的含量。以浸膏得率结合小鼠降尿酸实验, 初步筛选柏金颗粒的提取工艺路线(水煎煮、70%乙醇回流提取、水煎煮结合70%乙醇回流提取)。以浸膏得率和岩白菜素含量为指标, 首先采用正交试验考察加水量、提取时间、提取次数等3个因素的影响, 优化柏金颗粒的最佳水提工艺并进行验证试验; 然后采用正交试验考察药液相对密度、含醇量、醇沉时间等3个因素的影响, 优选柏金颗粒的最佳醇沉工艺并进行验证试验。通过小鼠降尿酸实验, 比较醇沉处理前后柏金颗粒组方药材提取物的效果差异。结果: 所建立的岩白菜素含量测定方法的线性范围为0.007 2~0.288 mg/mL, 精密性、重复性、稳定性和准确度均良好。柏金颗粒的提取工艺初步筛选为水煎煮提取; 最佳水提工艺为加入14倍量(mL/g)水, 浸泡0.5 h后, 煎煮提取3次, 每次1.0 h; 最佳醇沉工艺为水提液浓缩至相对密度1.0 g/mL, 药液含醇量60%, 醇沉时间12 h; 验证试验均显示, 所得浸膏得率及其岩白菜素含量的RSD均小于2% ($n=3$)。药效学实验结果显示, 水提物(醇沉前)和水提醇沉物(醇沉后)均能显著降低高尿酸血症模型小鼠的尿酸水平($P<0.01$), 且两者降尿酸效果比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: 采用优化的水提工艺可获得干浸膏得率和岩白菜素含量均较高的提取物, 结合醇沉工艺除杂不影响其药效。该优化水提醇沉工艺可行, 可用于柏金颗粒组方药材的提取、除杂。

关键词 壮药; 柏金颗粒; 水提取; 醇沉; 正交试验; 药效学; 岩白菜素; 高尿酸血症

Optimization of the Water Extraction and Ethanol Precipitation Technology of Zhuang Medicine Baijin Granules by Pharmacodynamics Combined with Orthogonal Test

ZHANG Ya¹, WANG Yiqiao², MA Zhuoya¹, MEI Zhinan³, TENG Hongli^{1, 4} (1. College of Zhuang Medicine, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2. College of Medicine, Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; 4. Dept. of Science, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530201, China)

- yzs.satcm.gov.cn/gongzuodongtai/2018-03-25/6577.html.
- [13] 赵娅, 冯慧, 周珍, 等. HPLC法同时测定四味姜黄汤散中7种成分的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(1): 29-33.
- [14] 张婷婷, 李艺丹, 郑凯旋, 等. 多指标综合加权评分法结合D-最优设计响应面法优选四川芎的炮制工艺[J]. 中草药, 2018, 49(15): 3639-3644.
- [15] 颜惠琴, 牛万红, 韩惠丽. 基于主成分分析构建指标权重的客观赋权法[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2017, 31(6): 519-523.
- [16] 单莉, 魏良兵, 高家荣, 等. 正交试验法优选黄地安消胶囊的醇提和水提工艺研究[J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(8): 1257-1261.
- [17] 熊旺平, 周娴, 杜建强, 等. 因子分析在中医方药量效关系研究中的应用[J]. 中草药, 2014, 45(19): 2820-2823.
- [18] 黄翔, 郭晔红, 贾存勤, 等. 肉苁蓉提取工艺及干燥方式研究[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3622-3630.
- [19] 冯小慧, 秦健峰, 邓家刚, 等. Box-Behnken响应面法优化厚藤中6个成分的提取工艺[J]. 中药材, 2019, 42(5): 1118-1121.
- [20] 陈士林. 中药饮片标准汤剂: 第1卷[M]. 北京: 科学出版社, 2018: 69-70.
- [21] 李艳, 白明, 宋亚刚, 等. 中药标准汤剂的研究与思考[J]. 中草药, 2018, 49(17): 3977-3980.
- [22] 刘秀峰, 谢明. 《伤寒论》中汤剂煎煮加水量问题探讨[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(8): 105-107.
- [23] 王竹兰, 肖相如. 《伤寒论》汤剂加水量与煮取量的研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 885-887.
- [24] 李雅静, 孙博, 朱广伟, 等. 基于传统煎药工艺的茵陈蒿饮片标准汤剂制备及质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1412-1416.
- [25] 吴忠义. 《伤寒论》汤剂煎药时间探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4575-4578.
- [26] 张子龙, 谢月, 梁奇, 等. 煮散与饮片、散剂和中药配方颗粒的比较及其现代化研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(10): 2475-2479.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81960762); 国家“重大新药创制”科技重大专项(No.2017ZX09301060)

* 硕士研究生。研究方向: 民族药资源、质量评价及新药研发。E-mail: 13965000081@163.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药、民族药资源和质量评价。E-mail: THL555@163.com

(收稿日期: 2019-10-16 修回日期: 2020-03-07)
(编辑: 陈宏)