

# 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<sup>Δ</sup>

张雅<sup>1\*</sup>, 王一乔<sup>2</sup>, 马卓雅<sup>1</sup>, 梅之南<sup>3</sup>, 滕红丽<sup>1,4#</sup> (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 Ya<sup>1</sup>, WANG Yiqiao<sup>2</sup>, MA Zhuoya<sup>1</sup>, MEI Zhinan<sup>3</sup>, TENG Hongli<sup>1, 4</sup> (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: 1396500081@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)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the water extraction and ethanol precipitation technology of Zhuang medicine Baijin granules. METHODS: HPLC method was adopted to determine the content of bergenin in Baijin granules extract. The extraction routes of Baijin granules (water decoction, 70% ethanol reflux extraction, water decoction combined with 70% ethanol reflux extraction) was screened primarily with the yield of extract and the experiment of reducing uric acid of mice. The orthogonal test was adopted to optimize water extraction technology of Baijin granules with water multiple, extraction time and extraction times as factors, taking the extraction yield and the bergenin content as index, then the validation test was carried out. The orthogonal test was adopted to optimize the alcohol precipitation process of Baijin granules including the relative density of medicinal materials, alcohol content and the alcohol precipitation time, then the validation test was carried out. By the experiment of reducing uric acid, the effects of medicinal materials extract of Baijin granules extract were compared before and after ethanol precipitation. RESULTS: Established method for content determination of bergenin with linearity range of 0.007 2-0.288 mg/mL, had good precision, reproducibility, stability and accuracy. The initially chosen extraction process of Baijin granules was water decoction extraction. The optimal water extraction technology was soaked for 0.5 h, then decocted for 3 times with 14-fold water (mL/g) and 1.0 h each time. The optimal ethanol precipitation process was to concentrate the water extract to a relative density of 1.0 g/mL with alcohol content of liquid at 60% and precipitated for 12 h. Validation tests showed that RSDs of extract yield and beragenin content were all lower than 2% ( $n=3$ ). The experiment of pharmacodynamics showed that water extract (before ethanol precipitation) and water extract after alcohol precipitation could significantly decrease the level of uric acid in hyperuricemia model mice ( $P<0.01$ ). There was no statistical significance in the reduction of uric acid between 2 groups ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: The optimized water extraction technology can obtain good extract yield and bergenin content, and combined with ethanol precipitation technology for removing excess impurities would not affect the pharmacodynamics. The water extraction and ethanol precipitation technology is feasible, and can be used for extracting the medicinal materials of Baijin granules and its edulcoration.

**KEYWORDS** Zhuang medicine; Baijin granules; Water extraction; Ethanol precipitation; Orthogonal test; Pharmacodynamics; Bergenin; Hyperuricemia

高尿酸血症(Hyperuricemia)是一种以尿酸升高为特征的代谢疾病,在临床上表现为尿酸水平高于正常范围(男性为420  $\mu\text{mol/L}$ ,女性为350  $\mu\text{mol/L}$ )的异常机体状态<sup>[1]</sup>,也是导致高血压、高血脂、冠心病等发生的重要原因之一<sup>[2-4]</sup>,对人类健康的威胁日益加深。柏金方为广西国际壮医医院的临床经验方,由石上柏7.5 g、铁包金5 g、小叶金花草5 g、土茯苓5 g、苏木5 g、广金钱草7.5 g、益母草7.5 g、白茅根15 g、葫芦茶5 g、矮地茶5 g、木贼15 g、甘草2.5 g共12味药材组成,经该院多年临床验证适用于高尿酸血症的治疗,疗效显著。本方以壮医药学理论为指导,通过主药、帮药、带药进行组方,具有多靶点、多环节、整体性调节机体的特点<sup>[5-6]</sup>。方中石上柏、铁包金、小叶金花草等3味为主药,合用可通龙路、调气道、解热毒;土茯苓、苏木、广金钱草、益母草、白茅根、葫芦茶、矮地茶、木贼等8味为帮药,有加强主药清热除湿祛风之功效,通调三道两路;再佐以甘草调和解毒,是为带药<sup>[5-7]</sup>。

柏金方原为煎煮汤剂,但汤剂存在煎煮过程繁琐、不便于携带和保存、服用量大等缺点。为了解决这些问题并提高患者用药依从性,本课题组拟对柏金方进行改进和优化,将其研制成颗粒剂。本研究以该方组方药材提取物的浸膏得率和具有明确的抗高尿酸活性的岩白菜素(矮地茶主要活性成分<sup>[8]</sup>)的含量为指标,在单因素试验的基础上,采取正交设计结合药效学实验优选出柏

金颗粒的最佳水提工艺,并采用正交设计优选出最佳醇沉工艺,再考察醇沉法除去杂质的过程对其药效作用的影响,最终确定柏金颗粒的最佳水提醇沉工艺,为后续该颗粒剂的进一步研发提供基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);DGF-4AB型立式电热鼓风干燥箱、98-1-B型电子控温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JA2003N型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司);CP21型电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];1510型全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];TGL-16A型医用离心机(湖南平凡科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

白茅根、矮地茶、木贼等3味药材饮片均购自广西仙茱中药科技有限公司(批号分别为20180801、20171001、20181001);石上柏、铁包金、葫芦茶、小叶金花草、土茯苓、广金钱草、甘草、益母草、苏木等9味药材饮片均购自广西华夏药源药业有限公司(批号分别为190101、190101、190101、190101、180601、190101、181101、190101、190101)。以上药材饮片经中南民族大学药学

院刘新桥教授鉴定,均为真品。其中,葫芦茶符合1977年版《中国药典》(一部)的相关标准<sup>[9]</sup>,石上柏、铁包金符合2011年版《广西壮族自治区壮药质量标准(第2卷)》的相关标准<sup>[9]</sup>,小叶金花草符合2018年版《广西壮族自治区壮药质量标准》(第3卷)的相关标准<sup>[10]</sup>,其余药材均符合2015年版《中国药典》(一部)的相关标准<sup>[7]</sup>。

岩白菜素对照品(批号:Y24A8Y17096,纯度:≥98%)、氧嗪酸钾(批号:R10J8X39379,纯度:>98%)、别嘌醇(阳性对照,批号:Y27O8C46913,纯度:>98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;尿酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20181017);酵母膏(北京奥博星生物技术有限责任公司,批号:20180328);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,化学纯,批号:20140520);0.9%氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司,批号:1807110908,规格:500 mL:4.5 g);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 动物

SPF级ICR小鼠,雄性,体质量18~20 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 柏金颗粒组方药材提取物中岩白菜素的含量测定

参照文献方法<sup>[11]</sup>,采用HPLC法测定柏金颗粒干浸膏中岩白菜素的含量。

2.1.1 柏金颗粒干浸膏的制备 按柏金方处方比例,称取药材饮片共200 g,按照相应工艺提取后,在70℃条件下将提取液减压浓缩至清膏;将上述清膏在80℃的条件下烘干成干浸膏,置于干燥器中冷却1 h,称定质量,研磨,过三号筛,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 取岩白菜素对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,加甲醇制成每1 mL含0.05 mg岩白菜素的对照品溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取“2.1.1”项下所得柏金颗粒干浸膏粉末约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理40 min,放冷,再次称定,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 缺矮地茶阴性样品溶液的制备 根据处方比例称取除矮地茶外的其余药材,按“2.1.1”项下方法制得阴性干浸膏粉末,再按“2.1.3”项下方法制成缺矮地茶阴性样品溶液。

2.1.5 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent Pursuit 5 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水

(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:275 nm;柱温:25℃;进样量:5 μL。取“2.1.2”~“2.1.4”项下对照品溶液、供试品溶液、缺矮地茶阴性样品溶液进样分析,记录色谱图,详见图1。结果,各色谱峰分离良好,理论板数按岩白菜素峰计算不低于1 500,阴性样品不干扰测定,表明方法适用性良好。

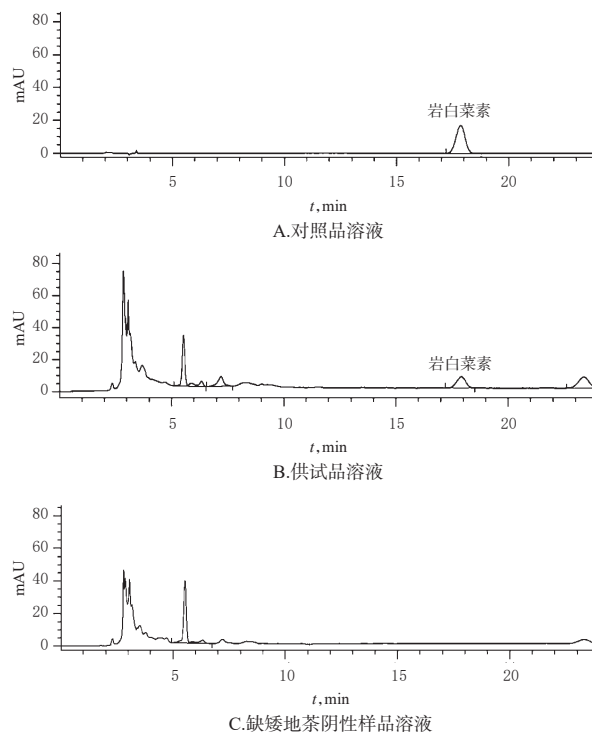


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.6 线性关系考察 精密称取岩白菜素对照品0.018 0 g,置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇制成质量浓度为0.36 mg/mL的对照品贮备液。分别精密吸取该对照品贮备液0.2、1、2、4、6、8 mL,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以岩白菜素质量浓度为横坐标(x)、色谱峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得线性回归方程为 $y=6.966x+3.6858$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,岩白菜素检测质量浓度的线性范围为0.007 2~0.288 mg/mL。

2.1.7 精密密度试验 取“2.1.2”项下对照品溶液适量,按“2.1.5”项下色谱条件进样测定6次,记录色谱图。结果,岩白菜素峰面积的RSD为0.81%( $n=6$ ),表明仪器精密密度良好。

2.1.8 重复性试验 精密称取同一批柏金颗粒干浸膏粉末(编号:180101)约0.4 g,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法计算岩白菜素含量。结果,岩白菜素的平均含量为3.157 mg/g(RSD=1.43%, $n=6$ ),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(编号:180101),分别于室温放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时,按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,岩白菜素峰面积的RSD为1.87%( $n=8$ ),表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

2.1.10 加样回收率试验 称取已知岩白菜素含量的干浸膏粉末(编号:180101)约0.1 g,共6份,精密称定,分别精密加入“2.1.6”项下0.288 mg/mL的岩白菜素对照品溶液1.0 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算加样回收率。结果,岩白菜素的平均加样回收率为98.12%(RSD=2.08%, $n=6$ ),表明该方法准确度良好。

2.1.11 干浸膏样品的含量测定 精密称取铂金颗粒提取干浸膏样品适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法计算岩白菜素含量。每批样品平行测定2次,取平均值作为测定结果。

## 2.2 铂金颗粒提取工艺路线的初步筛选

2.2.1 提取工艺路线的设计 根据文献报道,本方药材提取中主要有水煎煮提取和乙醇回流提取方法<sup>[12-15]</sup>,本研究以此为基础,初步筛选设计了3条工艺路线。(1)工艺 I:方中所有药材混合后,加入14倍量(mL/g,下同)水煎煮提取2次,每次1 h,合并提取液。(2)工艺 II:方中所有药材混合后,加入14倍量70%乙醇回流提取2次,每次1 h,合并提取液。(3)工艺 III:将石上柏、益母草混合后,加入14倍量水煎煮提取2次;其余药材混合后,加入14倍量70%乙醇回流提取2次,每次均为1 h,合并提取液。

2.2.2 不同提取工艺浸膏得率的比较 根据处方比例称取全部药材的混合物200 g,共9份,先用水浸泡0.5 h后,分别按“2.2.1”项下3种工艺路线提取,每种工艺平行3份。所得提取液在70℃下减压浓缩成清膏后,转移至已称定质量的蒸发皿中,在80℃下干燥至恒定质量,再置于干燥器中冷却1 h,称定质量,计算浸膏得率。结果,按平均浸膏得率高低排序依次为:工艺 I > 工艺 III > 工艺 II,即将所有药材混合后加水提取获得的浸膏得率最高,详见表1。

2.2.3 不同提取工艺提取物的降尿酸作用比较 采用酵母膏灌胃联合氧嗪酸钾腹腔注射法建立高尿酸小鼠模型<sup>[16-18]</sup>。选取小鼠48只,随机分为阴性对照组、模型组、阳性对照组和工艺 I、II、III提取物组(分别选用180101、180201、180301批样品给药),每组8只。各组小鼠均按体质量灌胃或注射给药。阴性对照组小鼠每天上午9点、下午3点(以下同)各灌胃1次相应体积的

表1 不同提取工艺制备浸膏的得率

Tab 1 Extraction yield of the extracts of different extraction technologies

提取工艺	编号	称样量,g	浸膏量,g	浸膏得率,%	平均浸膏量,g	平均浸膏得率,%
工艺 I	180101	200.08	34.20	17.10	34.73	17.35
	180102	200.14	36.12	18.05		
	180103	200.50	33.87	16.89		
工艺 II	180201	200.12	32.85	16.42	31.35	15.67
	180202	200.07	29.73	14.86		
	180203	200.13	31.47	15.72		
工艺 III	180301	200.01	33.75	16.87	31.42	15.70
	180302	200.15	30.46	15.22		
	180303	200.11	30.05	15.02		

水;模型组和各给药组小鼠每天上午均灌胃酵母膏水溶液(10 g/kg),灌胃体积为20 mL/(kg·d);模型组和阳性对照组小鼠每天下午灌胃水10 mL/(kg·d);工艺 I、II、III提取物组小鼠每天下午灌胃“2.2.2”项下3种不同工艺提取物水溶液[其中,180101批样品剂量为3.762 g/kg(人日服生药量为1.21 g/kg,以临床2倍剂量换算成小鼠的灌胃生药量为22 g/kg<sup>[19]</sup>),再以浸膏得率计算,即得,下同);180201批样品剂量为3.612 g/kg;180301批样品剂量为3.711 g/kg],灌胃体积均为10 mL/(kg·d)。各组小鼠连续灌胃7 d。于第8天时,小鼠提前禁食不禁水12 h,称定体质量后,阴性对照组小鼠腹腔注射0.8% CMC-Na溶液15 mL/kg,模型组和各给药组小鼠腹腔注射氧嗪酸钾溶液(600 mg/kg,以0.8% CMC-Na溶液为溶剂)15 mL/kg。腹腔注射1 h后,阳性对照组小鼠一次性灌胃别嘌醇混悬液(0.005 g/kg<sup>[20]</sup>),以0.8% CMC-Na溶液为溶剂,工艺 I、II、III提取物组小鼠则分别最后一次灌胃3种不同工艺提取物水溶液,灌胃体积均为10 mL/(kg·d)。末次给药结束后1 h时,于小鼠眼眶静脉丛采血,静置1 h,以4 000 r/min离心10 min,取上清液,按尿酸试剂盒说明书操作,并采用酶标仪测定血清中尿酸水平。采用SPSS 19.0统计学软件处理所得数据,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,结果见表2。

表2 不同工艺提取物对高尿酸模型小鼠血清尿酸水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 2 Effects of extracts by different technologies on serum uric acid levels in hyperuricemia model mice( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	小鼠血清尿酸水平,μmol/L	组别	小鼠血清尿酸水平,μmol/L
阴性对照组	150.962 ± 49.038	工艺 I 提取物组	165.385 ± 40.384 <sup>##</sup>
模型组	259.855 ± 89.159 <sup>**</sup>	工艺 II 提取物组	175.000 ± 30.767 <sup>##</sup>
阳性对照组	42.309 ± 24.300 <sup>##</sup>	工艺 III 提取物组	172.597 ± 24.519 <sup>##</sup>

注:与阴性对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. negative control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$

由表2结果可知,与阴性对照组相比,模型组小鼠血清尿酸水平显著升高( $P<0.01$ ),表明高尿酸模型复制成功;与模型组比较,各给药组小鼠血清尿酸水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),即3种工艺提取物对高尿酸模型小鼠均有显著的降尿酸效果。

2.2.4 提取工艺初步筛选分析结果 结合“2.2.2”“2.2.3”项下浸膏得率和小鼠药效学实验结果可知,工艺I浸膏得率最高,3种工艺提取物对高尿酸模型小鼠均具有显著的降尿酸效果。本课题组考虑到乙醇作为提取溶剂虽然没有毒性,但是提取物中叶绿素含量较高,且后续纯化工作复杂<sup>[13]</sup>,再结合生产实际,因此选择工艺I作为本研究的提取工艺,即所有药材混合后以水进行煎煮提取。

### 2.3 正交设计优选柏金颗粒的水提工艺

2.3.1 正交设计与试验 在前期单因素考察的基础上,以浸膏得率、岩白菜素含量为评价指标<sup>[21-22]</sup>,以加水倍量(A, mL/g)、提取时间(B, h)、提取次数(C, 次)为因素,按处方比例称取9份药材混合物,每份200 g,采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验设计。水提工艺因素与水平见表3,正交试验设计与结果见表4,方差分析结果见表5。

表3 水提工艺因素与水平

Tab 3 Factors and levels of water extraction technology

水平	因素			
	A, mL/g	B, h	C, 次	D(空白)
1	12	1.0	1	1
2	14	1.5	2	2
3	16	2.0	3	3

表4 水提工艺正交试验设计与结果

Tab 4 Orthogonal experiment design and results of water extraction technology

试验号	因素				测定结果	
	A, mL/g	B, h	C, 次	D(空白)	浸膏得率, %	岩白菜素含量, mg/g
1	1	1	1	1	11.84	3.203
2	1	2	2	2	16.54	2.985
3	1	3	3	3	20.23	2.963
4	2	1	2	3	18.56	3.116
5	2	2	3	1	19.95	3.195
6	2	3	1	2	15.91	3.122
7	3	1	3	2	20.35	3.149
8	3	2	1	3	15.19	3.172
9	3	3	2	1	19.80	3.033
浸膏得率	$\bar{x}_1$	16.20	16.92	14.31	17.20	
	$\bar{x}_2$	18.14	17.22	18.30	17.60	
	$\bar{x}_3$	18.44	18.64	20.17	17.99	
	R	2.245	1.728	5.861	0.795	
岩白菜素含量	$\bar{x}_1$	3.050	3.156	3.166	3.144	
	$\bar{x}_2$	3.144	3.117	3.045	3.085	
	$\bar{x}_3$	3.118	3.039	3.102	3.084	
	R	0.094	0.117	0.121	0.060	

由表4、表5可见,以浸膏得率为考察指标,各因素影响作用大小排序为 $C>A>B$ ,其中因素C对浸膏得率

表5 水提工艺正交试验方差分析结果

Tab 5 Variance analysis results of orthogonal test of water extraction technology

指标	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
浸膏得率	A	8.891	2	4.446	9.378	$>0.05$
	B	5.106	2	2.553	5.386	$>0.05$
	C	53.768	2	26.884	56.711	$<0.05$
	D(误差)	0.948	2	0.474	1.000	$>0.05$
岩白菜素含量	A	0.014	2	0.007	2.014	$>0.05$
	B	0.021	2	0.011	3.025	$>0.05$
	C	0.022	2	0.011	3.137	$>0.05$
	D(误差)	0.007	2	0.004	1.000	$>0.05$

的影响有统计学意义( $P<0.05$ ),因素A、B的影响则无统计学意义( $P>0.05$ );以岩白菜素含量为考察指标,各因素影响作用大小排序为 $C>B>A$ ,但这3个因素对岩白菜素含量的影响均无统计学意义( $P>0.05$ )。综合考虑后,优选出最佳工艺为 $A_2B_1C_3$ ,即加入14倍量的水,煎煮提取3次,每次1.0 h。

2.3.2 水提工艺验证 按照处方比例,称取药材混合物100 g,按照“2.3.1”项下优选的最佳水提工艺加水浸泡0.5 h后,煎煮提取,合并提取液,旋转减压蒸发浓缩至清膏后转入已称定质量的蒸发皿中,在80℃下烘干成干浸膏,置于干燥器中冷却1 h,称定质量,计算浸膏得率,并按“2.1.11”项下方法评定岩白菜素含量。平行操作3次。结果,平均浸膏得率为20.48% ( $RSD=1.53%$ ,  $n=3$ ),平均岩白菜素含量为3.144 mg/g ( $RSD=1.26%$ ,  $n=3$ ),表明优选的水提取工艺稳定、可行。

### 2.4 柏金颗粒的醇沉工艺优化

2.4.1 醇沉提取物的制备 按处方比例称取各药材饮片,按照“2.3”项下优选的最佳水提工艺进行提取,浓缩至一定密度,再根据一定工艺进行醇沉,抽滤,将滤液减压浓缩至清膏后转入已称定质量的蒸发皿中,在80℃下烘干成干浸膏,置于干燥器中冷却1 h,称定质量,计算浸膏得率,研磨,过三号筛,备用。

2.4.2 正交试验优化醇沉工艺 在前期单因素考察的基础上,以浸膏得率、岩白菜素含量为评价指标,选定药液相对密度[A, g/mL(以生药量计)]、含醇量(B, %)、醇沉时间(C, h)为考察因素<sup>[21-22]</sup>,采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交试验。醇沉工艺因素与水平见表6,正交试验设计与结果见表7,方差分析结果见表8。

表6 醇沉工艺因素与水平

Tab 6 Factors and levels of ethanol precipitation technology

水平	因素			
	A, g/mL	B, %	C, h	D(空白)
1	0.5	60	12	1
2	1.0	70	24	2
3	1.5	80	36	3

表7 醇沉工艺正交试验设计与结果

Tab 7 Orthogonal experiment design and results of ethanol precipitation technology

试验号	因素				测定结果	
	A, g/mL	B, %	C, h	D(空白)	浸膏得率, %	岩白菜素含量, mg/g
1	1	1	1	1	12.72	3.594
2	1	2	2	2	12.26	3.238
3	1	3	3	3	10.65	2.972
4	2	1	2	3	11.64	3.584
5	2	2	3	1	10.88	3.104
6	2	3	1	2	11.03	3.641
7	3	1	3	2	11.21	3.261
8	3	2	1	3	11.19	3.541
9	3	3	2	1	10.67	3.699
浸膏得率	$\bar{x}_1$	11.88	11.86	11.65	11.42	
	$\bar{x}_2$	11.18	11.44	10.52	11.50	
	$\bar{x}_3$	11.02	10.78	10.91	11.16	
	R	0.854	1.074	0.734	0.340	
岩白菜素含量	$\bar{x}_1$	3.268	3.480	3.692	3.466	
	$\bar{x}_2$	3.443	3.294	3.507	3.380	
	$\bar{x}_3$	3.500	3.437	3.112	3.366	
	R	0.094	0.117	0.121	0.060	

表8 醇沉工艺正交试验方差分析结果

Tab 8 Variance analysis results of orthogonal test of ethanol precipitation technology

项目	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
浸膏得率	A	1.234	2	0.617	6.469	>0.05
	B	1.758	2	0.879	9.215	>0.05
	C	0.925	2	0.463	4.848	>0.05
	D(误差)	0.191	2	0.095	1.000	>0.05
岩白菜素含量	A	0.088	2	0.044	5.010	>0.05
	B	0.057	2	0.028	3.226	>0.05
	C	0.393	2	0.197	22.404	<0.05
	D(误差)	0.007	2	0.004	1.000	>0.05

由表7、表8可见,以浸膏得率为考察指标,各因素影响作用大小排序为B>A>C,但这3个因素对醇沉效果的影响均无统计学意义( $P>0.05$ );以岩白菜素含量为考察指标,各因素影响作用大小排序为C>A>B,其中因素C对醇沉效果的影响有统计学意义( $P<0.05$ ),而因素A、B的影响则无统计学意义( $P>0.05$ )。综合考虑,优选出最佳醇沉工艺为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>,即水提液浓缩至相对密度为1.0 g/mL,药液含醇量为60%,醇沉时间为12 h。

2.4.3 醇沉工艺验证 按照处方比例,称取药材混合物100 g,按“2.3”项下优选的最佳水提工艺进行提取后,再按“2.4.2”项下优选的最佳醇沉工艺进行醇沉处理后,抽滤,将滤液旋转减压蒸发浓缩至清膏后转入已称定质量的蒸发皿中,在80℃下烘干成干浸膏,置于干燥器中冷却1 h,称定质量,计算浸膏得率并按“2.1.11”项下方法测定岩白菜素含量。平行操作3次。结果,平均浸膏得率为11.01% (RSD=1.77%,  $n=3$ ),平均岩白菜素含量为3.634 mg/g (RSD=1.60%,  $n=3$ ),表明优选的醇沉工艺

稳定、可行。

## 2.5 药效学实验比较柏金颗粒提取工艺醇沉处理前后的差异

取小鼠40只,随机分为阴性对照组、模型组、阳性对照组、水提物组、水提醇沉物组,每组8只。按照“2.2.3”下方法进行造模和给药。其中,水提物组灌胃剂量为4.52 g/kg,水提醇沉物组大鼠灌胃剂量为2.39 g/kg(均以提取物计算,按不同工艺得率换算后相当于等量生药材),灌胃体积均为10 mL/(kg·d)。同法测定大鼠血清中尿酸水平并进行统计学比较,结果见表9。

表9 醇沉前后所得提取物对高尿酸模型小鼠血清尿酸水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 9 Effects of the extracts on serum uric acid levels in hyperuricemia model mice before and after ethanol precipitation ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	小鼠血清尿酸水平, $\mu\text{mol/L}$	组别	小鼠血清尿酸水平, $\mu\text{mol/L}$
阴性对照组	37.956 ± 37.956	水提物组	45.742 ± 38.929 <sup>##</sup>
模型组	88.008 ± 25.860 <sup>**</sup>	水提醇沉物组	38.790 ± 51.721 <sup>##</sup>
阳性对照组	25.304 ± 18.491 <sup>##</sup>		

注:与阴性对照组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. negative control group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$

0.01

由表9可知,与阴性对照组比较,模型组小鼠血清尿酸水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠血清尿酸水平均显著降低( $P<0.01$ ),且水提物组与水提醇沉物组小鼠尿酸水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),即醇沉处理后提取物药效并未受到影响,因此选择水提醇沉法作为本方的最佳提取工艺。

## 3 讨论

### 3.1 药效学模型的建立

本研究在前期药效学预实验中尝试过不同造模剂诱导的高尿酸血症小鼠模型<sup>[23-24]</sup>:腺嘌呤联合乙胺丁醇、次黄嘌呤联合氧嗪酸钾、酵母膏联合氧嗪酸钾;也比较过诱导7 d和诱导14 d对小鼠尿酸水平的影响。经过对比后发现,酵母膏联合氧嗪酸钾诱导7 d可复制出较为稳定的高尿酸小鼠模型,且对小鼠肾功能影响较小,因此本研究最终选择酵母膏灌胃联合氧嗪酸钾腹腔注射的造模方法。

### 3.2 工艺优化中评价指标的选择

柏金方中含有黄酮类、生物碱类、香豆素类等多种类型化学成分<sup>[25-27]</sup>,但是有关其治疗高尿酸血症的有效成分研究较少。根据文献记载,目前比较明确的是矮地茶中的岩白菜素和土茯苓中的落新妇苷为降尿酸的主要有效成分<sup>[7]</sup>,二者对黄嘌呤氧化酶均有抑制活性,能促进肾脏尿酸排泄、改善肾功能,而黄嘌呤氧化酶是尿酸生成的关键酶<sup>[8, 28]</sup>。然而前期研究发现,本方中含有落

新妇苷、夏佛塔苷、芹菜素、槲皮素等大量黄酮类成分,彼此干扰很大,较难建立专属性强、稳定性好的HPLC分析检测方法。因此,本课题最终选取岩白菜素作为矮地茶药材的含量测定指标。此外,干浸膏是复方制剂中发挥临床作用的物质基础,浸膏得率的高低可在很大程度上反映出制剂工艺的优劣。因此,本研究最终选择浸膏得率和岩白菜素含量作为正交试验的评价指标。

### 3.3 制剂工艺的筛选及优化

本研究在预试验中对预浸泡时间、加水量、提取时间、提取次数进行了单因素考察,发现浸泡时间对浸膏得率并无影响,因此并未将其纳入正交设计的因素筛选范围,而是按照中药材常规提取流程进行预浸泡0.5 h。本研究选取药效学作为评价指标,结合浸膏得率和岩白菜素含量进行提取工艺的初步筛选,确定全方采用水提工艺后,再通过正交试验优选出最佳的水提工艺。由于水提物中含有鞣质、淀粉等大量杂质,为了富集有效成分、降低出膏率,减少患者每日服用量,本课题组考虑在不影响药效的情况下,采取醇沉法除去多余杂质,在借助正交试验优化最佳醇沉工艺的基础上,采用药效学实验比较醇沉前后提取物的降尿酸作用。结果显示,醇沉工艺对其降尿酸药效作用无显著影响。综上,优化的水提醇沉工艺可用于柏金颗粒组方药材的提取、除杂。

### 参考文献

[1] JOHNSON RJ, BAKRIS GL, BORGHI C, et al. Hyperuricemia, acute and chronic kidney disease, hypertension, and cardiovascular disease: report of a scientific workshop organized by the national kidney foundation[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 851-865.

[2] 郭珺, 罗文浩, 鲜文. 高尿酸水平与高脂血症的相关性研究[J]. *现代医学*, 2019, 47(7): 801-804.

[3] 冯志航, 黄石安. 高尿酸血症与冠状动脉病变的相关性研究进展[J]. *海南医学*, 2019, 30(14): 1865-1868.

[4] 尹非, 李雪晨, 叶菲. 高尿酸血症与代谢综合征研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2017, 44(6): 487-499.

[5] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 第2卷[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011: 79, 234.

[6] 韦松基. 实用壮药学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2017: 16.

[7] 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: 18, 44-45, 63, 86-87, 109, 164, 290-291, 361.

[8] 周宏星, 陈玉胜. 岩白菜素抗尿酸血症的活性及机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(1): 63-67.

[9] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 1977年版. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 570.

[10] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 第3卷[S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2018: 61-62.

[11] 何柯, 张荣, 晁若冰. 熊胆川贝枇杷膏中药材的薄层色谱鉴别和牛磺熊去氧胆酸及岩白菜素的测定[J]. *华西药学杂志*, 2016, 31(6): 650-653.

[12] 罗兰, 张素中, 黄月纯, 等. 广金草总黄酮成分不同提取方法的比较[J]. *中成药*, 2015, 37(11): 2537-2540.

[13] 赵之丽, 赵平, 邓光锐, 等. 多指标正交试验优化复方江南卷柏散提取工艺[J]. *中国药房*, 2016, 27(28): 3996-3998.

[14] 易飞. 木贼总黄酮的提取及活性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.

[15] 闫曼, 安雅婷, 李舰, 等. 益母草提取物对大鼠高尿酸血症的调控作用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(24): 4856-4859.

[16] 迪丽达尔·希力甫, 赵平, 宋丽娟, 等. 酵母膏联合氧嗪酸钾构建高尿酸血症模型大鼠继发的心血管病变[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(11): 1994-1998.

[17] 张娴娴, 孙维峰, 徐伟, 等. 泄浊除痹方对高尿酸血症小鼠尿酸及URAT1的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 144-147.

[18] 王晗, 张敏, 路腾飞, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(4): 253-256.

[19] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.

[20] 黄梦玲. 知黄痛风汤的指纹图谱及对痛风的药效学研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.

[21] 王敏, 杜守颖, 田志浩, 等. 药效学结合正交试验优选参连颗粒的水提工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8): 27-31.

[22] 杜正彩, 齐彪, 张明哲, 等. 正交设计结合药效学实验优选桂梔助眠胶囊提取工艺研究[J]. *中草药*, 2019, 50(3): 618-625.

[23] 何宏明, 冯育林, 张武岗, 等. 不同方法建立高尿酸血症动物模型研究进展[J]. *江西中医药*, 2015(12): 72-75.

[24] 卢忠英, 郁建平, 朱梦琪, 等. 不同组合造模剂诱导大鼠高尿酸血症模型的比较研究[J]. *山地农业生物学报*, 2014, 33(5): 40-42.

[25] 宋蕊, 刘丽芳, 马海燕, 等. 江南卷柏的化学成分[J]. *药学与临床研究*, 2016, 24(4): 318-320.

[26] 钟鸣, 柴玲. 广金钱草化学成分与药理作用研究进展[J]. *广西医学*, 2018, 40(1): 80-82.

[27] 荆英珊, 谢国勇, 顾卫卫, 等. 铁包金的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2017, 36(1): 49-53.

[28] 王建平, 张海燕, 傅旭春. 土茯苓的化学成分和药理作用研究进展[J]. *海峡药学*, 2013, 25(1): 42-44.

(收稿日期: 2019-11-04 修回日期: 2020-03-13)

(编辑: 段思怡)