

· 中药工业 ·

总评归一法结合响应面法优化补肾强筋丸提取工艺[△]崔旭辉¹, 尚佳², 李喜香^{2*}, 陈国华³, 周婷婷¹, 刘永昌¹

1. 甘肃中医药大学 药学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃省中医院 药学部, 甘肃 兰州 730050;

3. 甘肃省疾病预防控制中心, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 目的: 优化补肾强筋丸的提取工艺。方法: 采用高效液相色谱法, 以地黄苷 D、马钱苷、莫诺苷、阿魏酸含量和浸膏得率的总评归一值(OD 值)为评价指标, 以浸泡时间、提取时间、溶剂量为影响因素, 应用星点设计-效应面法选取最佳提取工艺条件。结果: 最佳提取工艺为 12 倍水提取 2 次, 每次浸泡时间为 60 min, 提取时间为 120 min, OD 值为 0.723 3。验证实验结果显示, 实测值与预测值偏差为 3.0%。结论: 该方法稳定可行, 可用于提取补肾强筋丸, 为临床应用和新药的研发提供参考。

[关键词] 补肾强筋丸; 提取工艺; 多指标; 高效液相色谱法; 归一化法

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)05-0868-08

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20210723004

Extraction Process Optimization for Preparation of Bushen Qiangjin Pills by Overall Desirability and Response Surface Methodology

CUI Xu-hui¹, SHANG Jia², LI Xi-xiang^{2*}, CHEN Guo-hua³, ZHOU Ting-ting¹, LIU Yong-chang¹

1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

3. Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730000, China

[Abstract] **Objective:** To optimize the extraction process of Chinese medicinal materials for the preparation of Bushen Qiangjin pills. **Methods:** High performance liquid chromatography was employed to determine the content of active components. The optimal extraction conditions were determined based on the overall desirability (OD) of rehmannioside D, loganin, morroniside, ferulic acid, and extract yield. The optimum soaking time, extraction time, and solvent volume were determined via central composite design-response surface methodology. **Results:** The optimum extraction conditions: 12 volumes of water, extraction for twice, soaking time of 60 min, and extraction time of 120 min, under which the OD was 0.723 3. The results of validation test showed that the deviation between the predicted value and the measured value was 3.0%. **Conclusion:** The optimized extraction conditions are stable and feasible and can be used for the preparation of Bushen Qiangjin pills, which provide reference for clinical application as well as the research and development of new drugs.

[Keywords] Bushen Qiangjin pills; extraction process; multiple indicators; HPLC; overall desirability

补肾强筋丸是清代医家钱寿昌经验方——补肾壮筋汤随症加减而成, 目前临床主要用于治疗骨质疏松型氟骨症^[1-2], 疗效较好。研究表明, 氟骨症已经长时间困扰全球大部分贫困地区的居民^[3], 而中医认为, 此类病症属于“骨痹”和“筋痹”范畴^[4]。故全方由熟地黄、山茱萸、当归等 10 味中药组成, 其

中熟地黄、山茱萸补益肝肾、益精填髓; 杜仲、续断、五加皮强筋健骨、疗伤续折; 当归、白芍、川牛膝补血活血、柔肝止痛; 茯苓、青皮行气健脾, 诸药合用, 共奏补肾强筋功效。

目前, 补肾壮筋方以汤剂入药, 但汤剂作为传统剂型存在煎煮繁琐、携带困难、口感不佳等缺点,

[△] [基金项目] 甘肃省中医药科研课题 (GZKP-2020-27)

* [通信作者] 李喜香, 主任中药师, 研究方向: 中药新制剂; E-mail: lixixiang929@163.com

故本课题组拟将其开发为稳定性高、服药和携带方便的浓缩丸剂。经过前期相关文献调研发现,方中君药熟地黄中的指标成分毛蕊花糖苷已经改为地黄苷D,并且测定地黄苷D成分含量的文献较少,在当前中药复方成分含量测定成为热点的前提下,多指标、多成分的测定已成为共识^[5-7]。故本研究将地黄苷D、马钱苷、莫诺苷、阿魏酸的含量及浸膏得率一同作为考察指标,最后采用多指标总评归一法结合响应面法对补肾强筋丸提取工艺的参数进行优化,得到最佳提取工艺参数,以期为该浓缩丸剂提取工艺的优化提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY ARC型高效液相色谱仪,配置四元溶剂管理器、FTN-R型样品管理器、2998型二极管阵列检测器(美国Waters公司);KQ-300DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);98-1-BN型电热套(天津泰斯特仪器有限公司);HH-6型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);SECURA125-1CN型十万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Elix Essential 5型纯水机(德国默克公司);RE3000B型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);ZXFD-A5140型鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.2 试药

对照品地黄苷D(批号:L16J11Y118585,纯度:98%)、马钱苷(批号:P22F10F81444,纯度:98%)、莫诺苷(批号:P11M11F112846,纯度:97%)、阿魏酸(批号:L03A9D57744,纯度:98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈为色谱纯(德国默克公司);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

药材熟地黄(批号:191214)、山萸肉(批号:200803)、当归(批号:190812)、杜仲(批号:190501)、川牛膝(批号:200101)、茯苓(批号:200704)、白芍(批号:191109)、续断(批号:200404)、青皮(批号:191210)、五加皮(批号:20200701)均购自甘肃康乐药业有限责任公司,经甘肃省中医院李喜香主任中药师鉴定为正品,均符合《中华人民共和国药典》2020年版(一部)项下

有关规定。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备

按处方称取药材55 g于圆底烧瓶中,加水550 mL,浸泡30 min,加热回流60 min,提取2次,4层纱布滤过,得水提液,减压浓缩并定容至55 mL,即得。

2.2 莫诺苷、马钱苷、阿魏酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 Waters Sun Fire C₁₈色谱柱(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(0~7 min, 5%~6%A; 7~8 min, 6%~10%A; 8~20 min, 10%~16%A; 20~30 min, 16%~20%A; 30~36 min, 20%~25%A; 36~39 min, 25%~5%A; 39~44 min, 5%A);体积流量:1.0 mL·min⁻¹;进样量:10 μL;柱温:28℃;检测波长:252 nm。

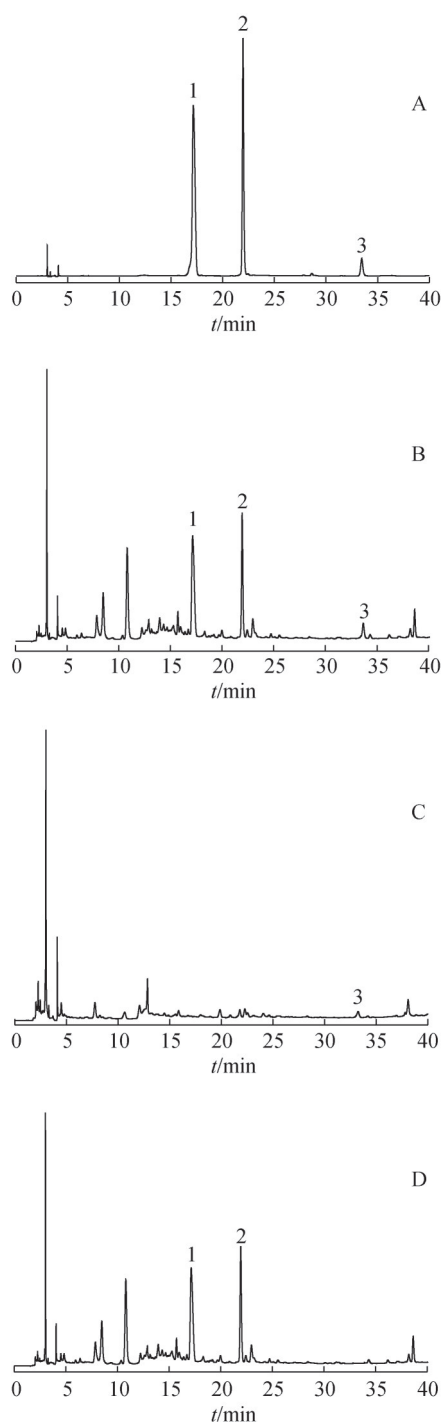
2.2.2 混合对照品溶液制备 精密称取莫诺苷、马钱苷、阿魏酸对照品适量于5 mL量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为1.121、1.042、0.560 mg·mL⁻¹的莫诺苷、马钱苷、阿魏酸对照品储备液,精密吸取适量,置于同一5 mL量瓶中,甲醇定容至刻度,即得莫诺苷、马钱苷、阿魏酸质量浓度分别为0.448、0.416、0.031 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密量取2.1项下提取液5 mL于蒸发皿中,水浴蒸干。加甲醇溶解,定容至25 mL,超声40 min。混匀后用0.2 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.2.4 阴性样品溶液制备 按照处方工艺分别制得缺山茱萸、当归的阴性样品,按2.1及2.2.3项下方法制备,即得。

2.2.5 专属性试验 取混合对照品、供试品、阴性样品溶液适量,按2.2.1项下条件进样测定,结果见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离(分离度>1.5),阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

2.2.6 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL至10 mL量瓶中,甲醇定容,制成质量浓度分别为4.48、8.96、22.40、35.84、44.80 μg·mL⁻¹的莫诺苷对照品溶液,4.16、8.32、20.80、33.28、41.60 μg·mL⁻¹的马钱苷对照品溶液,0.31、0.62、1.54、2.46、



注：A. 混合对照品溶液；B. 供试品溶液；C. 缺山茱萸阴性样品溶液；D. 缺当归阴性样品溶液；1. 莫诺昔；2. 马钱苷；3. 阿魏酸。

图1 补肾强筋丸中莫诺昔、马钱苷、阿魏酸的HPLC图

3. $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿魏酸对照品溶液，分别精密吸取 $10 \mu\text{L}$ ，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。以各成分质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 1。

2.2.7 精密度试验 取混合对照品溶液适量，按

表1 补肾强筋丸中莫诺昔、马钱苷、阿魏酸线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
莫诺昔	$Y=10\,844X-17\,471$	0.999 9	4.48~44.8
马钱苷	$Y=8\,535.1X-11\,783$	0.999 7	4.16~41.6
阿魏酸	$Y=12\,386X-713.69$	0.999 7	0.31~3.10

2.2.1 项下色谱条件进样测定 6 次，测得莫诺昔、马钱苷、阿魏酸峰面积 RSD 分别为 2.12%、2.65%、1.37%，表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于 2、4、6、8、12、24 h 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，测得莫诺昔、马钱苷、阿魏酸峰面积 RSD 分别为 2.01%、2.85%、1.92%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取同一提取液，按 2.2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进样测定，测得莫诺昔、马钱苷、阿魏酸含量 RSD 分别为 1.91%、2.44%、1.37%，表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取 3 个成分含量已知的供试品溶液 1.0 mL ，共 9 份，每 3 份为一组，分别按低 (80%)、中 (100%)、高 (120%) 3 个水平精密加入 2.2.2 项下混合对照品溶液适量，按 2.2.3 项下方法制成供试品溶液，按 2.2.1 项下色谱条件进行测定，计算回收率，结果见表 2。

2.3 地黄苷 D 含量测定

2.3.1 色谱条件 Waters Sun Fire C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)；流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (5:95)；体积流量： $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；进样量： $10 \mu\text{L}$ ；柱温： 28°C ；检测波长： 203 nm 。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取地黄苷 D 对照品适量于 5 mL 量瓶中，加甲醇制成质量浓度为 $0.925 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的地黄苷 D 对照品储备液，精密吸取适量，置于同一 5 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，即得质量浓度为 $0.183 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的地黄苷 D 对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液制备 精密量取 2.1 项下提取液 5 mL 于蒸发皿中，水浴蒸干。加甲醇溶解，定容至 25 mL ，超声 40 min 。混匀后用 $0.2 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

2.3.4 阴性样品溶液制备 按处方工艺，制得缺熟地黄的阴性样品，按 2.1 及 2.3.3 项下方法制备，即得。

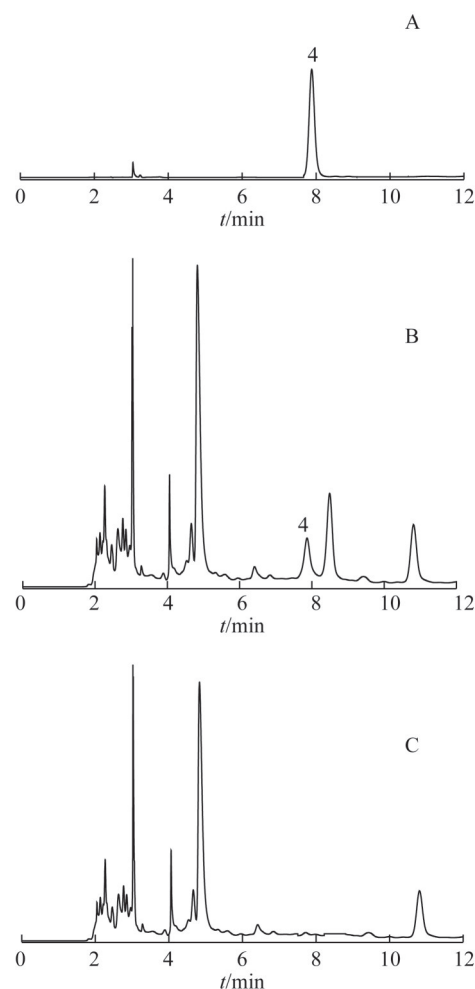
表2 补肾强筋丸中莫诺昔、马钱苷、阿魏酸
加样回收率试验结果

成分	样品中 含量/mg	对照品加 入量/mg	测得 量/mg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
莫诺昔	0.205 0	0.162	0.365	98.77	99.75	1.92
	0.211 0	0.162	0.372	99.38		
	0.209 0	0.162	0.368	98.15		
	0.209 0	0.203	0.413	100.49		
	0.201 0	0.203	0.407	101.48		
	0.199 0	0.203	0.406	101.97		
	0.202 0	0.245	0.438	96.33		
	0.207 0	0.245	0.450	99.18		
	0.205 0	0.245	0.455	102.04		
马钱苷	0.188 0	0.146	0.329	96.58	99.28	1.69
	0.172 0	0.146	0.317	99.32		
	0.179 0	0.146	0.327	101.37		
	0.191 0	0.183	0.371	98.36		
	0.185 0	0.183	0.363	97.27		
	0.187 0	0.183	0.372	101.09		
	0.195 0	0.219	0.416	100.91		
	0.188 0	0.219	0.405	99.09		
	0.188 0	0.219	0.406	99.54		
阿魏酸	0.021 5	0.018	0.039	97.22	99.33	2.27
	0.022 1	0.018	0.040	99.44		
	0.022 2	0.018	0.040	98.89		
	0.021 9	0.022	0.044	100.45		
	0.022 0	0.022	0.045	104.55		
	0.022 1	0.022	0.044	99.55		
	0.021 8	0.026	0.047	96.92		
	0.022 5	0.026	0.048	98.08		
	0.022 3	0.026	0.048	98.85		

2.3.5 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定,结果见图2。由图2可知,各成分均能达到基线分离(分离度>1.5),表明该方法专属性良好。

2.3.6 线性关系考察 精密量取地黄苷D对照品溶液0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mL至10 mL量瓶中,甲醇定容,制成质量浓度分别为1.83、3.66、9.15、14.46、18.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的地黄苷D对照品溶液,精密吸取10 μL ,按2.3.1项下色谱条件进样测定。以各成分质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归, $Y=10\,191X-3\,277.5$ ($r=0.999\,7$),在1.83~18.30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.3.7 精密度试验 取对照品溶液适量,按2.3.1项下色谱条件进样测定6次,测得地黄苷D峰面积RSD为2.51%,表明仪器精密度良好。



注: A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性样品溶液; 4. 地黄苷D。

图2 补肾强筋丸中地黄苷D的HPLC图

2.3.8 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于2、4、6、8、12、24 h按2.3.1项下色谱条件进样测定,测得地黄苷D峰面积RSD为2.29%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.9 重复性试验 取同一份提取液,按2.3.3项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,测得地黄苷D含量RSD为2.66%,表明该方法重复性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密吸取地黄苷D含量已知的供试品溶液1.0 mL,共9份,每3份为一组,分别按低(80%)、中(100%)、高(120%)3个水平精密加入2.3.2项下对照品溶液适量,按2.3.3项下方法制成供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进行测定,测得地黄苷D平均加样回收率为100.21%,RSD为1.86%。

2.4 浸膏得率的测定

准确吸取2.1项下提取液5 mL, 置已干燥至质量恒定的蒸发皿中, 水浴蒸干后, 烘箱中105℃干燥3 h, 移至干燥器中冷却至室温, 迅速精密称定质量, 按公式(1)计算干浸膏提取率^[8]。

干浸膏提取率=(浸膏质量/移取供试液体积×供试液体积)/药材总质量×100% (1)

2.5 工艺优化

2.5.1 单因素试验 通过前期查阅相关文献可知, 对于大多数苷类成分来说, 水提比醇提效果更好^[9], 结合本剂型通常不采用醇提^[10], 故本研究采用水提。筛选提取次数、浸泡时间、提取时间、溶剂量, 按2.1项下方法制备提取液, 进行考察, 结果见图3。由图3可知, 提取数为1~2次时4个成分提取量增长较为急剧, 而2~3次时较缓, 甚至下降, 并且提取次数为非连续变量, 无法进行回归处理, 故将其固定为2次; 浸泡时间为45 min时4个成分提取量最高, 故选择30~60 min进行考察; 提取时间为30~60 min时4个成分提取量增加较缓, 60~90 min时增加较快, 随后又逐渐下降减缓, 故选择60~120 min进行考察; 溶剂量为10倍时4个成分提取量达到最高并逐渐变缓, 故选择8~12倍水进行考察。

2.5.2 中心组合设计-响应面法 在单因素试验结果基础上, 将浸泡时间(A)、提取时间(B)、溶剂量(C)作为考察因素^[11-12], 以地黄苷D、马钱苷、莫诺苷、阿魏酸含量和浸膏得率的总评归一值(OD值)作为响应值进行综合评分, 通过Hassan法^[13]对各指标进行归一化处理, 由于本研究要求各指标成分含量越大越好, 故选择公式(2)计算各指标OD值。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (2)$$

其中, d_i 为各指标的OD值, Y_i 为指标测定值, $Y_{\max}$ 、 $Y_{\min}$ 分别为各指标在20次实验中的最大值、最小值; $OD = (d_1 d_2 \cdots d_n)^{1/n}$, 其中 n 为所选取的指标数。设计三因素五水平试验, 因素水平见表3。

按处方比例称取药材共55 g, 按表3参数加热回流提取2次, 减压浓缩至55 mL, 测定提取液中各指标成分含量及浸膏得率, 计算OD值, 结果见表4。

运用Design Expert 8.0.6软件对表4数据分别进行多元线性、二项式回归拟合分析, 分别得到A、B、

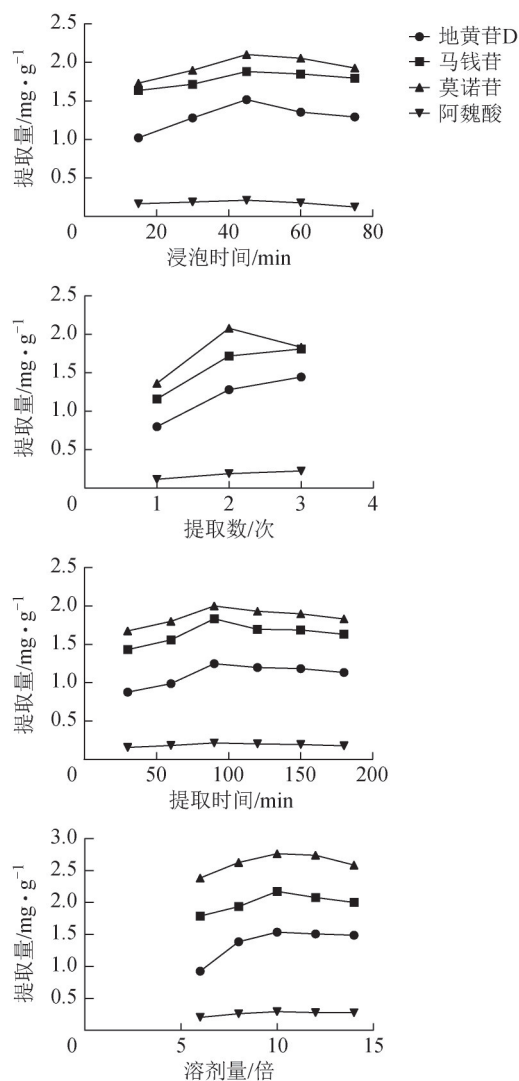


图3 补肾强筋丸提取工艺单因素试验结果

表3 补肾强筋丸提取工艺响应面试验因素水平

水平	A/min	B/min	C/倍
-1.682	19.77	39.55	6.64
-1	30.00	60.00	8.00
0	45.00	90.00	10.00
1	60.00	120.00	12.00
1.682	70.23	140.45	13.36

C与OD值之间的回归模拟方程: $OD = -0.85828 + 0.00602A + 0.00683B + 0.03631C$ ($r=0.5414$)、 $OD = 1.12968 + 0.01698A - 0.01584B - 0.23869C - 0.00007AB - 0.00062AC - 0.00059BC + 0.00002A^2 + 0.00018B^2 + 0.01780C^2$ ($r=0.8527$), 结果表明二项式回归模型拟合度更好, 可用于优化工艺。方差分析见表5。

由表5可知, 模型 $F=6.43$, $P<0.01$, 表明模型

表4 补肾强筋丸提取工艺响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	地黄苷D/mg·g ⁻¹	马钱苷/mg·g ⁻¹	莫诺苷/mg·g ⁻¹	阿魏酸/mg·g ⁻¹	浸膏得率/%	OD值
1	0	0	0	1.261 6	1.852 9	2.020 5	0.216 8	51.23	0.354 9
2	1	-1	-1	1.263 5	1.834 1	2.343 6	0.183 4	45.96	0.302 4
3	0	0	-1.682	1.624 5	1.820 1	1.852 1	0.163 5	47.12	0.312 7
4	-1	-1	1	1.323 7	1.675 3	2.082 4	0.196 2	51.24	0.351 3
5	0	0	0	1.240 1	1.657 7	2.703 5	0.203 8	51.68	0.333 1
6	0	0	0	1.239 5	1.512 8	1.786 1	0.165 9	50.95	0
7	0	0	0	1.283 9	1.859 9	1.974 9	0.213 2	51.52	0.369 3
8	0	0	1.682	1.307 8	1.889 7	2.320 3	0.205 0	51.73	0.464 6
9	0	1.682	0	1.620 1	2.420 5	2.693 6	0.312 3	50.51	0.954 2
10	1	-1	1	1.552 0	1.929 8	2.126 0	0.218 1	45.56	0.460 3
11	0	0	0	1.362 8	1.620 1	1.727 5	0.136 6	50.89	0
12	1	1	-1	1.487 7	2.251 9	2.608 5	0.234 4	47.90	0.680 8
13	1	1	1	1.519 9	2.380 8	2.692 9	0.285 4	48.76	0.816 2
14	0	0	0	1.246 8	1.910 1	1.965 4	0.219 6	52.05	0.336 5
15	-1	1	-1	1.446 9	2.221 3	2.577 9	0.224 2	47.63	0.628 3
16	-1	1	1	1.509 3	2.368 9	2.503 6	0.225 9	49.51	0.719 9
17	-1.682	0	0	1.210 2	1.795 8	1.971 5	0.185 4	48.78	0
18	0	-1.682	0	1.373 7	1.886 2	2.169 6	0.207 2	43.91	0.320 5
19	-1	-1	-1	1.212 6	1.742 4	2.201 7	0.173 2	42.82	0
20	1.682	0	0	1.288 3	1.873 9	2.030 1	0.214 7	52.34	0.400 7

表5 补肾强筋丸提取工艺响应面方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.190 000	9	0.130 000	6.430	0.003 8
A	0.110 000	1	0.110 000	5.420	0.042 2
B	0.570 000	1	0.570 000	27.830	0.000 4
C	0.072 000	1	0.072 000	3.500	0.090 9
AB	0.008 620	1	0.008 620	0.420	0.532 1
AC	0.002 798	1	0.002 798	0.140	0.720 0
BC	0.009 955	1	0.009 955	0.480	0.502 6
A ²	0.000 307	1	0.000 307	0.015	0.905 2
B ²	0.360 000	1	0.360 000	17.730	0.001 8
C ²	0.073 000	1	0.073 000	3.550	0.089 0
残差	0.210 000	10	0.021 000		
失拟项	0.043 000	5	0.008 612	0.260	0.914 6
纯误差	0.160 000	5	0.033 000		
总差	1.400 000	19			

具有极显著影响； $F_{失拟}=0.26$ ， $P=0.914\ 6>0.05$ ，表明模型失拟项不显著，可以用此模型进行分析和预测；因素B、B²差异有统计学意义（ $P<0.01$ ），因素A差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），而交互项均不显著；各因素的影响程度依次为B>A>C。

利用 Design Expert 8.0.6 软件得到二次回归方程等高线及响应曲面图，从而确定最佳提取工艺参

数，结果见图4~6。由图4~6可知，B的等高线密度均大于A和C，说明提取时间对成分提取量的影响最大，与方差分析结果一致，且指标成分随着3个因素的增加而有增加的趋势；最终确定最佳提取工艺为12倍水，浸泡60 min，提取120 min，提取2次。

再按上述最佳工艺进行3批验证，测得OD值分别为0.723 7、0.702 9、0.743 3，平均为0.723 3，RSD为2.79%，同时与预测值0.745 7相比偏差为3.0%，表明工艺稳定可行、重复性良好。结果见表6。

3 讨论

补肾强筋方原剂型为汤剂，但因携带不便、患者依从性较差，故改为浓缩丸剂。全方以熟地黄、山茱萸为君药，当归、杜仲为臣药，续断、五加皮、白芍、茯苓、青皮为佐药，川牛膝为使药。其中，熟地黄的指标成分为地黄苷D^[5]，现代药理研究表明，其具有提高免疫力、抗骨质疏松、抗炎等药理作用^[14]；山茱萸活性成分为马钱苷和莫诺苷^[5]，具有抑制软骨细胞凋亡、促进细胞生长、延缓骨关节炎等药理作用^[15-16]；当归的活性成分为阿魏酸^[5]，具有抗炎、镇痛、抗成骨细胞凋亡等药理作用^[17]。这4个成分的药理作用与补肾强筋丸发挥补益肝肾、强筋

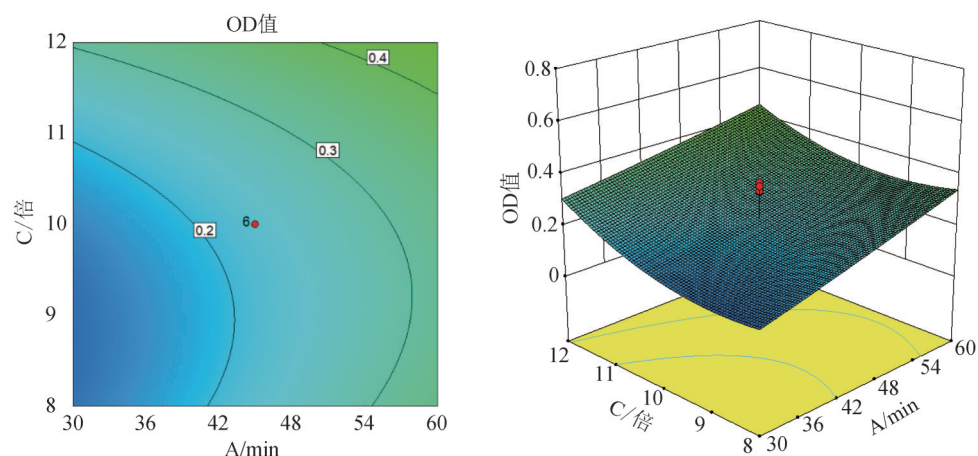


图4 浸泡时间与溶剂量对OD值影响的响应面图

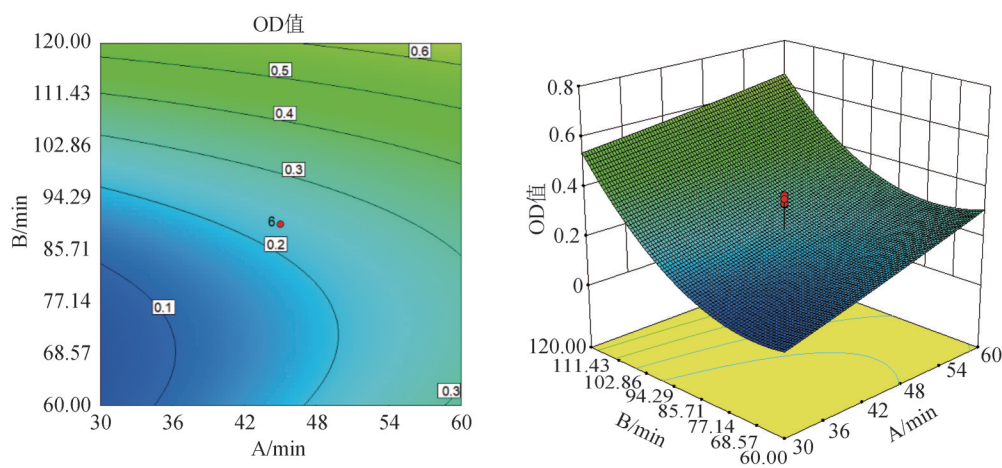


图5 浸泡时间与提取时间对OD值影响的响应面图

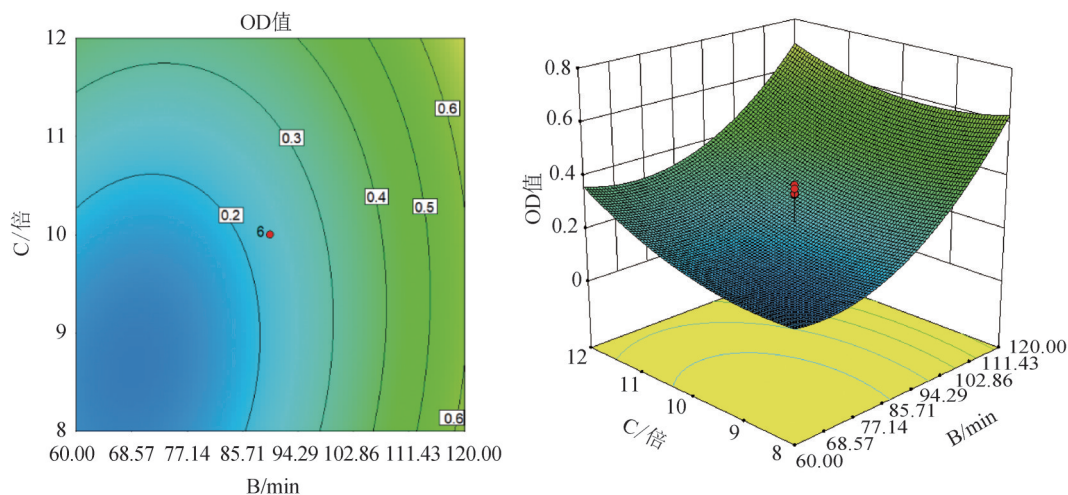


图6 提取时间与溶剂量对OD值影响的响应面图

健骨药效作用有关,同时充分考虑了处方君臣佐使的组方原则、药物各自的化学性质。臣药杜仲中的指标成分松脂醇二葡萄糖苷^[5]在本研究中含量较低,可能与其胶丝有关^[18],为了减小误差,本研究未将

松脂醇二葡萄糖苷作为指标成分。因此,本研究将地黄苷D、马钱苷、莫诺苷、阿魏酸作为指标成分。另外,浸膏得率也常作为中药复方提取工艺的评价指标^[19],故也将其纳入研究。

表6 补肾强筋丸提取工艺验证实验结果

试验号	地黄苷D质量分数/mg·g ⁻¹	马钱苷质量分数/mg·g ⁻¹	莫诺苷质量分数/mg·g ⁻¹	阿魏酸质量分数/mg·g ⁻¹	浸膏得率/%	OD值
1	1.477 3	2.368 9	2.503 6	0.225 9	50.51	0.723 7
2	1.518 8	2.306 0	2.518 8	0.213 6	49.88	0.702 9
3	1.520 9	2.373 2	2.578 7	0.215 5	50.58	0.743 3
均值	1.505 7	2.349 4	2.533 7	0.218 3	50.32	0.723 3
RSD/%	1.63	1.60	1.57	3.03	0.77	2.79

本研究采用190~400 nm全波长扫描,经查阅文献,4个成分的吸收波长差异较大^[5],本课题组在多次验证后发现,252 nm时各峰的吸收明显好于237 nm,且分离度良好,故最终确定203、252 nm检测。在流动相方面,本研究考察了甲醇-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水,发现后者峰形更好,各成分分离效果更佳,最后综合考虑将后者作为流动相。

在权重系数的选择上,由于多指标评价采用打分制时存在一定主观性,故本研究对其进行归一化处理,以地黄苷D、马钱苷、莫诺苷、阿魏酸含量和浸膏得率的总评OD值为评价指标,通过星点设计-效应面法来优化补肾强筋丸的提取工艺。结果表明,补肾强筋丸最佳提取工艺为12倍水提取2次,每次浸泡60 min,提取120 min,所得OD值与预测值相当,表明该方法提取效率较高、重复性较好、工艺稳定可行。

参考文献

- [1] 曾明珠,陈国健. 补肾强筋胶囊对去势大鼠主要骨代谢、骨密度影响的研究[J]. 云南中医中药杂志,2020,41(6):70-73.
- [2] 师达. 补肾强筋手法治疗肝肾不足型绝经后骨质疏松症的临床研究[D]. 昆明:云南中医药大学,2019.
- [3] KEBEDE A, RETTA N, ABUYE C, et al. Dietary fluoride intake and associated skeletal and dental fluorosis in school age children in rural Ethiopian rift valley[J]. Int J Environ Res Public Heal,2016,13(8):756.
- [4] 张刘波,周峻,宋继鹏,等. 氟骨症的中医治疗研究进展[J]. 海南医学院学报,2020,26(1):77-80.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:29,130,139.
- [6] 王雪梅,刘校栓,王宝才,等. HPLC-DAD法同时测定益肾健骨丸中5种成分[J]. 中成药,2021,43(1):34-38.
- [7] 张仕瑾,兰杨,王娅俐,等. 基于信息熵理论的黄芪三七复方提取工艺优选[J]. 中国现代中药,2021,23(5):854-860.
- [8] 丘露,曲帅,阚鸿,等. 大叶小檗根提取工艺的优化[J]. 中成药,2021,43(4):1004-1008.
- [9] 罗峰. 星点设计-效应面法优化山茱萸-白芍提取工艺研究[J]. 中医学报,2019,34(7):1492-1496.
- [10] 夏广奥. 脊仙通痹丸组方的制备工艺和质量标准研究[D]. 长春:吉林大学,2019.
- [11] 杨红艳,许建丽. 星点设计-效应面法优化酶法提取黄连中盐酸小檗碱工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2019,26(7):89-93.
- [12] 徐仕娟,徐文芬,郭江涛,等. Box-Behnken 响应面法优化苗药红花龙胆总黄酮的提取工艺及其含量测定研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(2):164-168.
- [13] 黄涵,王宇卿. 瓜蒌薤白半夏胶囊提取工艺的优化[J]. 中成药,2019,41(2):420-423.
- [14] 陈思琦,李佳欣,吴鑫宇,等. 熟地黄的药理学研究进展[J]. 化学工程师,2019,33(11):46-50.
- [15] 李媛,孙锁锋. 山茱萸多糖通过上调Klotho表达和抑制PI3K/Akt通路对肝癌HepG2细胞增殖、凋亡的影响[J]. 现代药物与临床,2019,34(10):2887-2893.
- [16] 周迎春,张廉洁,张燕丽. 山茱萸化学成分及药理作用研究新进展[J]. 中医药信息,2020,37(1):114-120.
- [17] 黄天一,陈婷婷,崔杰,等. 阿魏酸抗成骨细胞凋亡作用及其GPR30相关性研究[J]. 南京中医药大学学报,2020,36(3):346-351.
- [18] 田雨,李喜香,王宝才,等. 基于信息熵理论星点设计-效应面法优化温肾强骨丸的提取工艺[J]. 甘肃中医药大学学报,2020,37(5):49-55.
- [19] 邢增智,张爱军,陈园园,等. 七味蟾参方水提工艺的优化[J]. 中成药,2019,41(3):647-650.

(收稿日期:2021-07-23 编辑:王笑辉)