

多指标综合评分结合响应面法优选金卷升板胶囊的超声提取工艺^Δ

王玲娇^{1*},高先²,刘清池³,杨继章¹,孙国祥⁴,于静^{1#}(1.河北医科大学第一医院药学部,石家庄 050031; 2.河北医科大学第一医院智慧医疗部,石家庄 050031; 3.河北医科大学第一医院血液科,石家庄 050031; 4.沈阳药科大学药学院,沈阳 110016)

中图分类号 R932;R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1781-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.11

摘要 目的:优选金卷升板胶囊的超声提取工艺。方法:以没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚的转移率的综合评分值为考察指标,以乙醇体积分数、超声功率、超声提取时间、液料比为考察因素,在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 响应面法对金卷升板胶囊的超声波提取工艺进行优选,并进行验证试验。结果:最优提取工艺为药材加 50 倍量的 70% 乙醇,在超声功率 300 W 下超声提取 40 min。在验证试验中,3 批样品提取后没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚的平均转移率分别为 85.92%、86.37%、92.76%、90.84%、87.26% (RSD<3.57%, n=3),综合评分平均值为 88.95%,与预测值 88.27% 的相对误差为 1.10%。结论:多指标综合评分结合响应面法可用于金卷升板胶囊提取工艺的优选,所得工艺方法简便、结果稳定。

关键词 金卷升板胶囊;多指标综合评分;响应面法;超声提取;工艺优选

Optimization of the Ultrasound Extraction Technology of Jinjuan Shengban Capsules by Response Surface Methodology Combined with Multi-index Comprehensive Scoring

WANG Lingjiao¹, GAO Xian², LIU Qingchi³, YANG Jizhang¹, SUN Guoxiang⁴, YU Jing¹ (1. Dept. of Pharmacy, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 2. Dept. of Wise Information Technology of 120, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 3. Dept. of Hematology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 4. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology for Jinjuan shengban capsules. METHODS: Using comprehensive score of indexes as transfer rate of gallic acid, chlorogenic acid, baicalin, aloe emodin and emodin methyl ether, with ethanol volume fraction, ultrasonic power, ultrasonic extraction time and liquid-material ratio as factors, the ultrasound extraction technology of Jinjuan shengban capsules was optimized by Box-Behnken response surface methodology based on single factor test. The validation test was conducted. RESULTS: The best extraction technology was 50-fold 70% ethanol, extracting 40 min under 300 W. In validation test, average transfer rates of gallic acid, chlorogenic acid, baicalin, aloe emodin and emodin methyl ether were 85.92%, 86.37%, 92.76%, 90.84% and 87.26% (RSD<3.57%, n=3) in 3 batches of samples; comprehensive score was 88.95%, relative error of which to predicted value of 88.27% was 1.10%. CONCLUSIONS: The response surface method combined with multi-index comprehensive scoring can be used to optimize the extraction technology of Jinjuan shengban capsules which is simple and stable.

KEYWORDS Jinjuan shengban capsules; Multi-index comprehensive scoring; Response surface method; Ultrasonic extraction; Optimization of technology

金卷升板方是依据河北医科大学第一医院血液科刘清池主任多年临床实践的协定处方而组方的,拟将其

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573586);河北省中医药管理局科研计划项目(No.2018117)

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0311-85917354。E-mail:327239256@qq.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0311-85917354。E-mail:38565914@qq.com

开发成院内胶囊制剂,该方主要由金银花、黄芩、地锦草、熟大黄等常见中药材组成,具有解毒散瘀、清热凉血、止血通络之功效,主治原发性免疫性血小板减少症(ITP)^[1-3]。处方中君药金银花性寒味甘,清热解毒、凉血化瘀,具有抗病毒、抗炎、解热止血、调节免疫等功效,主要成分为绿原酸^[4-5];臣药黄芩主治温热病,具有清热解毒、凝血排毒、抗过敏、调节免疫等功效,黄芩苷为其主要活性成分^[6-7];佐药地锦草凉血散瘀、解毒止痢,具有抗

菌、抗炎、抗过敏、免疫调节、保肝止血等作用,主要成分为没食子酸^[8-9];使药熟大黄泻热通肠、凉血解毒,具有泻火凉血、清热化湿、逐瘀通经的功效,主要成分为蒽醌类衍生物芦荟大黄素、大黄素甲醚^[10-11]。

利用超声波技术提取中药中有效成分具有操作温度低、处理时间短、提取效率高、生产成本低等优点^[12-13]。本研究按照处方中各药材有效成分的理化性质,以绿原酸、黄芩苷、没食子酸、芦荟大黄素和大黄素甲醚的转移率为综合评价指标,采用多指标综合评分结合响应面法^[14-15]对金卷升板胶囊的超声波提取工艺进行优化,为其后续的制剂开发与生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技有限公司);Sartorius BS 110S 分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-500KDE 高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DST-50L 聚能式超声波提取机组(上海矩源机械设备有限公司);JP-800B-8 高速多功能粉碎机(永康市久品工贸有限公司)。

1.2 药品与试剂

金银花(批号:180801CP193)、白术(批号:180201-CP270)、地锦草(批号:180701CP383)、卷柏(批号:180101CP404)、茜草(批号:180601CP608)、山药(批号:180802CP016)、水牛角(批号:180101CP493)均购自河北万修药业有限公司,黄芩(批号:20170302)、(熟)大黄(批号:20170502)均购自河北祁新中药颗粒饮片有限公司,紫草(批号:17041501)购自国药乐仁堂河北药业有限公司,上述所有药材经河北医科大学第一医院张一民主管中药师鉴定均符合 2015 年版《中国药典》(一部)的药用标准;绿原酸(批号:17081021,纯度:≥98%)、没食子酸(批号:17062510,纯度:≥98%)对照品均购自上海士锋生物科技有限公司;黄芩苷(批号:110755-200101,纯度:≥98%)、芦荟大黄素(批号:110796-200802,纯度:≥98%)、大黄素甲醚(批号:110724-200611,纯度:≥98%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,水为市售娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 5个有效成分的含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:0.1% 乙酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱;检测波长:275 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。分别取“2.1.2”和“2.1.3”项下供试品溶液(“2.4.2”项下1号提取液)和混合对照品溶液进样分析。结果,各相邻峰间分离度均大于 1.5,理论板数按黄芩苷峰计大于 4 000。梯度洗脱程序见表 1,各溶液色谱图见图 1。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密吸取提取液 1 mL 至 25

mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释至刻度,振荡摇匀,滤过,取续滤液即得。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0→10	90→60	10→40
10→40	60→30	40→70
40→55	30→0	70→100
55→65	0	100

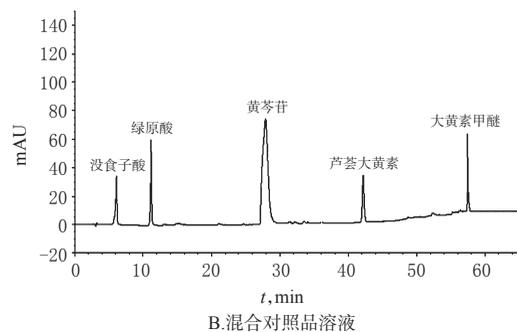
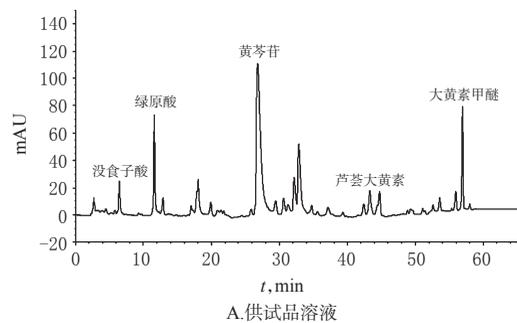


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.3 混合对照品储备液的制备 精密称取没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品 1.34、6.19、6.46、1.81、3.21 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀即得,备用。

2.1.4 线性关系及定量限考察 分别量取“2.1.3”项下的对照品储备液 8、4、2、1、0.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,按上述色谱条件进样分析,记录色谱图。以色谱峰面积(y)为纵坐标、待测物质量浓度(x, μg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚的回归方程分别为 $y = 3\,322.1x - 2.283\,3$ ($r = 0.999\,3$)、 $y = 1\,755.6x + 91.063$ ($r = 0.999\,5$)、 $y = 10\,393x - 170.92$ ($r = 0.999\,7$)、 $y = 2\,923.8x + 83.299$ ($r = 0.999\,2$)、 $y = 3\,059.5x + 97.55$ ($r = 0.999\,1$)。结果表明,没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚的检测质量浓度线性范围分别为 1.07~17.21、4.92~79.34、5.08~83.69、1.34~23.14、2.58~42.07 μg/mL。按规定方法进行定量限(信噪比 10:1)考察,结果定量限分别为 5.36、4.92、7.11、6.71、3.87 ng/mL。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积。分别计算没食子酸、

绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰面积的RSD,结果分别为1.78%、2.08%、1.30%、2.61%、1.42% ($n=6$)。表明仪器精密度好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取“2.1.2”项下供试品溶液(“2.4.2”项下1号提取液),在室温下放置0、2、4、8、12、24 h后进样测定,记录峰面积。分别计算没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.84%、1.06%、1.35%、1.93%、2.02% ($n=6$)。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液(“2.4.2”项下1号提取液)6份,进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚峰含量的RSD分别为2.13%、1.57%、1.05%、1.78%、1.51% ($n=6$)。表明方法重复性好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液(“2.4.2”项下1号提取液)9份,分别加入没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品溶液适量,按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液并进样分析,计算平均回收率。结果,分别为95.49%、98.51%、98.12%、100.03%、97.19%,RSD分别为2.17%、1.34%、1.67%、1.22%、1.57% ($n=9$)。表明该方法准确度较好。

2.2 提取工艺考察指标的确定

参考前期试验,考虑金卷升板胶囊的药效部位为醇溶性部分,因此对醇提取工艺进行考察。根据预试验结果选择对超声波的醇提效果可能有影响的因素,如乙醇体积分数、液料比、超声功率、超声提取时间等作为考察因素。在单因素试验基础上结合Box-Behnken响应面法进行优化,依次得到各试验提取液。采用层次分析法(AHP)进行分析^[16],依据中药的君臣佐使理念和制剂中各药材的实际配比评价各指标成分在处方配比中的相对重要性进行权重分配:金银花有效成分绿原酸,黄芩有效成分黄芩苷,黄芩为臣药但药材在处方中的实际配比较高,故绿原酸和黄芩苷的权重同等;绿原酸和黄芩苷与地锦草的主要成分没食子酸比较,绿原酸和黄芩苷相对重要,记3分;与熟大黄中有效成分芦荟大黄素、大黄素甲醚比较,绿原酸和黄芩苷相对更重要,记5分;芦荟大黄素、大黄素甲醚重要性相似,均记1分;其余以此类推,具体判断矩阵见表2。

表2 权重记分判断矩阵

Tab 2 Judgment matrix of weight score

成分	没食子酸	绿原酸	黄芩苷	芦荟大黄素	大黄素甲醚
没食子酸	1.00	0.33	0.33	3.00	3.00
绿原酸	3.00	1.00	1.00	5.00	5.00
黄芩苷	3.00	1.00	1.00	5.00	5.00
芦荟大黄素	0.33	0.20	0.20	1.00	1.00
大黄素甲醚	0.33	0.20	0.20	1.00	1.00

根据AHP进行计算,确定没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚的权重系数分别为0.151 83、

0.360 06、0.360 06、0.064 02、0.064 02,按权重对各指标成分转移率[转移率(%)=药液中指标成分总量/药材中指标成分总量×100%]进行综合评价,以综合评分作为提取效果的评判依据。综合评分($Y, %$)=没食子酸转移率×权重系数+绿原酸转移率×权重系数+黄芩苷转移率×权重系数+芦荟大黄素转移率×权重系数+大黄素甲醚转移率×权重系数。

2.3 单因素试验

2.3.1 乙醇体积分数考察 按处方比例2倍量称取药材150 g,分别加入不同体积分数的乙醇,在超声功率300 W(频率:40 kHz,下同)、液料比50:1的条件下,超声40 min,考察乙醇体积分数(10%、30%、50%、70%、95%)对综合评分的影响。结果显示,在10%~50%乙醇范围内,综合评分一直呈上升趋势,70%乙醇后综合评分下降,结合生产实际操作确定取70%乙醇为响应面设计试验设计的考察水平,结果见图2A。

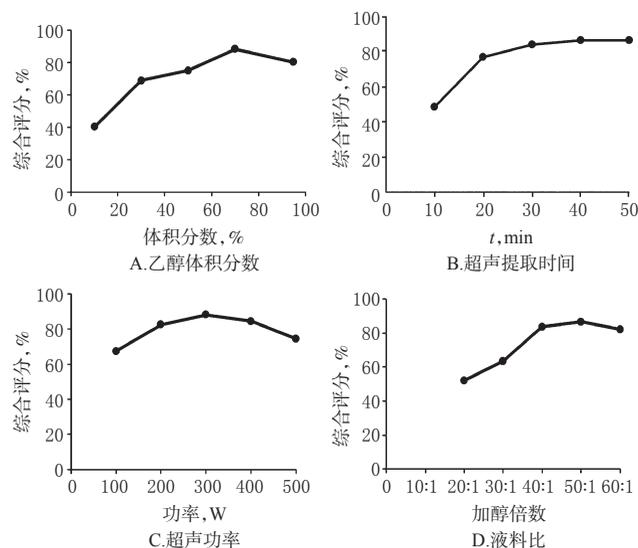


图2 单因素试验考察结果

Fig 2 Results of single factor tests

2.3.2 超声提取时间考察 按处方比例2倍量称取药材150 g,在70%乙醇、液料比50:1、功率300 W的情况下,分别考察超声提取不同时间(10、20、30、40、50 min)对综合评分的影响。结果显示,超声提取前30 min,综合评分呈迅速上升趋势,但40 min后增速缓慢,50 min时的综合评分结果与40 min较为接近,结合生产实际操作确定超声提取40 min为响应面设计试验设计的考察水平,结果见图2B。

2.3.3 超声功率考察 按处方比例2倍量称取药材150 g,加入70%乙醇,在液料比50:1、超声40 min条件下,分别考察超声功率(100、200、300、400、500 W)对综合评分的影响。结果显示,超声功率增大至300 W时综合评分值最大,之后随着超声功率的增大综合评分反而下降。考虑生产实际操作,选择超声功率300 W为响应面设计试验设计考察水平,结果见图2C。

2.3.4 液料比考察 按处方比例2倍量称取药材150 g,分别加入70%乙醇,在超声功率300 W、超声40 min条件下,考察液料比(20:1、30:1、40:1、50:1、60:1)对综合评分的影响。结果显示,在液料比20:1~40:1范围内综合评分呈上升趋势,60:1较40:1出现稍许下降。结合生产实际操作,取50:1为响应面试验设计的考察水平,结果见图2D。

2.4 响应面法优化提取条件

2.4.1 试验设计 根据Box-Behnken响应面试验设计原理,结合单因素试验结果,选择乙醇体积分数(A)、超声提取时间(B)、超声功率(C)、液料比(D)为考察因素,按处方量精密称取饮片,采用4因素3水平响应面分析法进行试验设计,因素与水平见表3。

表3 因素与水平

Tab 3 Factors and levels

水平	因素			
	A(乙醇体积分数),%	B(超声提取时间),min	C(超声功率),W	D(液料比)
-1	60	30	250	40:1
0	70	40	300	50:1
1	80	50	350	60:1

2.4.2 试验结果与方差分析 以没食子酸、绿原酸、黄芩苷、芦荟大黄素、大黄素甲醚转移率为考察指标,按照AHP得到的权重系数进行计算得到综合评分,试验设计与结果见表4。

采用Design-expert 8.0.6软件对试验结果进行分析,得到综合评分(Y)对各因素的回归方程为 $Y=88.27+2.78A+1.29B+1.52C+1.92D-2.69AB+0.09AC+0.17AD+0.24BC+1.37BD+0.75CD-5.11A^2-3.63B^2-6.47C^2-4.91D^2$, $R^2=0.9848$ 。方差分析结果见表5。

由表5可知,模型 $F=12.51$, $P<0.0001$,提示回归模型极其显著,失拟项 $F=3.67$, $P=0.1110>0.05$,提示模型失拟度不显著,可以用于分析试验。由表中F值可知,模型的一次项影响顺序是 $A>D>B>C$,交互项AB显著,其余交互均不显著,二次项 A^2 、 C^2 、 D^2 均极显著($P<0.0001$), B^2 比较显著($P<0.001$)。

2.4.3 响应面法与工艺优化结果 采用Design-expert 8.0.6软件对试验数据进行回归拟合,得到响应面见图3。

由响应面图的陡峭程度可知,A和D对综合评分影响较大,交互项AB对综合评分有显著影响,其余交互项相对综合评分无显著影响,以综合评分的回归模型的极值分析得到最优条件为:乙醇体积分数70.03%,超声提取时间40.21 min,超声功率300.44 W,液料比为50.34:1;根据生产实际操作将最优提取条件调整为乙醇体积分数70%,超声提取时间40 min,超声功率300 W,液料比50:1,在此条件下综合评分的预测值为88.27%。

2.4.4 验证试验 称取10倍处方量750 g,药材3份,粗粉碎后应用超声波提取机组按上述最优条件进行验证

试验,计算综合评分,结果见表6。

表4 试验设计与结果

Tab 4 Test design and results

试验号	因素				指标(转移率,%)					综合评分, %
	A	B	C	D	没食子酸	绿原酸	黄芩苷	芦荟大黄素	大黄素甲醚	
1	1	0	-1	0	75.52	81.73	85.83	70.30	62.11	80.27
2	1	0	0	-1	74.11	77.36	85.61	64.01	52.02	77.36
3	0	0	0	0	79.72	83.36	92.43	95.18	74.65	86.79
4	1	0	1	0	78.78	78.11	88.35	46.31	66.39	79.11
5	0	0	0	0	77.79	84.21	96.36	95.57	82.17	88.21
6	-1	0	0	-1	76.09	71.97	83.46	46.86	46.49	73.49
7	0	1	-1	0	92.22	80.92	77.68	51.84	36.67	76.77
8	-1	1	0	0	67.36	80.29	88.04	69.74	52.41	79.17
9	1	-1	0	0	79.67	84.24	90.36	79.15	60.10	83.88
10	0	-1	0	-1	85.66	71.90	86.71	75.40	55.92	78.52
11	-1	-1	0	0	81.23	68.54	76.17	63.59	42.78	71.25
12	0	0	1	1	56.99	89.69	90.94	66.31	42.71	80.67
13	0	-1	0	1	95.28	74.84	79.61	78.00	58.09	78.79
14	0	-1	1	0	62.65	79.11	94.61	59.72	60.01	79.72
15	-1	0	1	0	66.56	65.92	94.12	54.76	38.31	73.69
16	-1	0	0	1	75.76	72.88	87.85	95.65	61.04	79.41
17	-1	0	-1	0	75.76	65.12	80.11	88.74	89.65	75.22
18	0	0	-1	1	69.58	71.08	83.18	75.45	47.15	73.95
19	1	0	0	1	79.01	84.70	90.76	81.11	55.97	83.95
20	0	0	0	0	90.61	89.60	92.69	85.57	56.36	88.48
21	0	0	0	0	69.58	85.61	95.92	91.91	95.00	87.89
22	0	0	-1	-1	55.90	66.11	87.80	80.07	65.52	73.23
23	1	1	0	0	75.24	72.73	93.42	79.96	72.87	81.03
24	0	1	1	0	59.54	84.78	91.47	88.66	67.16	82.48
25	0	-1	-1	0	79.01	73.17	81.10	66.87	48.81	74.95
26	0	1	0	-1	71.56	75.12	85.78	90.34	63.87	78.67
27	0	0	1	-1	80.48	66.82	85.14	69.31	86.77	76.93
28	0	1	0	1	72.46	82.44	94.20	81.35	72.14	84.43
29	0	0	0	0	84.77	85.46	97.30	91.91	84.62	89.98

表5 方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	675.06	14	48.22	12.51	<0.0001
A	92.85	1	92.85	24.08	0.0002
B	19.86	1	19.86	5.15	0.0395
C	27.67	1	27.67	7.18	0.0180
D	44.12	1	44.12	11.44	0.0045
AB	29.02	1	29.02	7.53	0.0158
AC	0.03	1	0.03	0.01	0.9282
AD	0.11	1	0.11	0.03	0.8681
BC	0.22	1	0.22	0.06	0.8133
BD	7.55	1	7.55	1.96	0.1834
CD	2.27	1	2.27	0.59	0.4554
A ²	169.45	1	169.45	43.95	<0.0001
B ²	85.68	1	85.68	22.22	0.0003
C ²	271.27	1	271.27	70.37	<0.0001
D ²	156.69	1	156.69	40.64	<0.0001
残差	53.97	14	3.86		
失拟项	48.67	10	4.87	3.67	0.1110
纯误差	5.31	4	1.33		
总误差	729.03	28			

由表6可知,综合评分平均值为88.95%,结果与预测值接近,相对误差为1.10%,提示该数学模型合理,且

3次试验各指标的RSD均小于3.57% ($n=3$),提示优化工艺稳定、可靠。

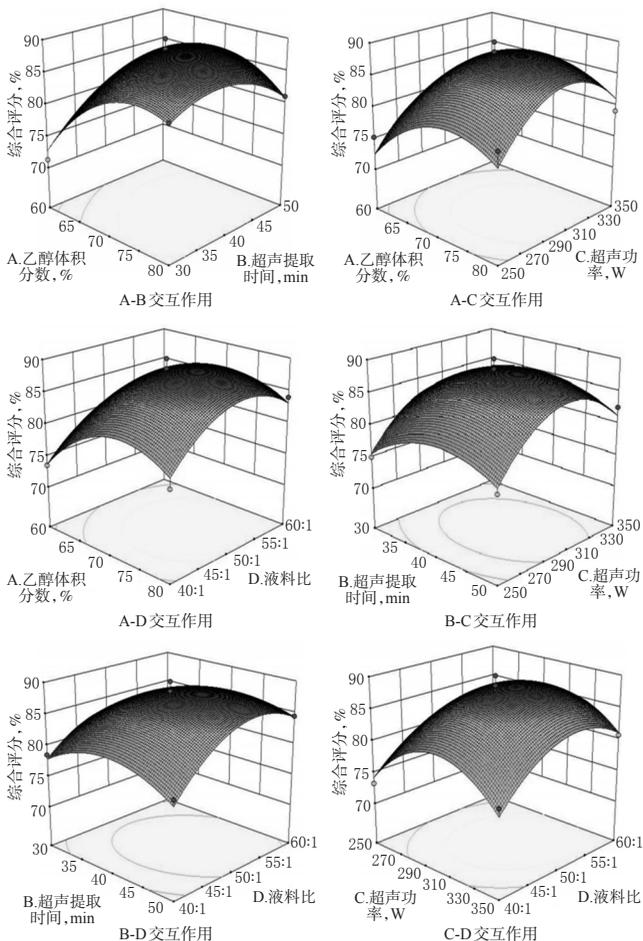


图3 4种因素对综合评分的响应面图

Fig 3 Response surface plot of 4 factors to comprehensive score

表6 验证试验结果

Tab 6 Results of validation tests

试验编号	转移率, %					综合评分, %
	没食子酸	绿原酸	黄芩苷	芦荟大黄素	大黄素甲醚	
1	83.19	87.62	92.26	90.21	85.41	88.64
2	85.32	86.14	91.24	89.74	87.23	88.15
3	89.24	85.36	94.78	92.57	89.15	90.05
平均值	85.92	86.37	92.76	90.84	87.26	88.95
RSD, %	3.57	1.33	1.96	1.67	2.14	1.10

3 讨论

3.1 有效成分的选择

中药制剂的多组分、多靶点特点决定了不能选择单一成分作为检测指标,而剂量的配伍差异可能引起组方的功效发生变化,因此应从中药的整体观出发,选择多个能够发挥目标药效的成分进行控制才能更好地达到中药之间药效整合的目的,从而建立更为临床认可的稳定、可行的方法^[17-18]。

金卷升板胶囊的组方为10种常见的中药材,是根据《金匱要略》的泻心汤^[19]和《幼科直言》的银花解毒汤加

减而成^[20],在长期临床实践中其疗效得到了广大患者的认可。本研究根据中药的君臣佐使观点,参考中医治疗ITP的凉血解毒理论,选择该制剂中具有药效物质基础的多组分的代表成分进行研究。处方中君药金银花中的绿原酸,臣药黄芩中的黄芩苷,佐药地锦草中的没食子酸,使药大黄中的芦荟大黄素、大黄素甲醚均为中医凉血止血理论中治疗ITP的有效成分^[4,6,8,11],因此将这5个成分的含量作为考察指标,采用AHP对指标给予不同的权重并计算综合评分来优化工艺参数,不仅体现了方剂的配伍特点,也兼顾了临床的药效基础。

3.2 提取与试验方法的选择

与正交试验法比较,响应面法在寻找最优条件的过程中可以连续分析各水平,兼顾了多个影响因素及各因素之间的交互作用,能够更为准确地获取到与真实试验接近的最优条件^[21]。源于在长期的临床观察中屡有患者采取酒浸后服用得到了很好的治疗效果,结合2015年版《中国药典》(一部)中各单方药材的主要成分的提取方法,本试验选择了醇提法为主要的提取方法。在预试验中,分别考察了乙醇超声提取法、乙醇浸泡法和回流提取法对有效成分的影响,通过高效液相色谱法测定成分含量进行对比,发现水回流提取法和乙醇浸泡法的指标成分含量均低于乙醇超声提取中的含量,且回流温度过高、浸泡时间过长,均会导致有效成分发生分解;而超声提取法不仅可以避免回流法的热破坏和分解,而且比浸泡法的试验步骤也更简单易行,故选择该法进行提取。结合响应面法优选可影响试验结果的各个因素和水平,从而使优化的工艺参数更为稳定、合理。

综上,本文所得提取工艺方法简便、稳定,结果预测性好,可为金卷升板胶囊的制剂生产和药效研究提供参考。

参考文献

- [1] 刘清池,高习华,王淑珍,等.凉血解毒法对免疫性血小板减少症患者T淋巴细胞亚群的调节作用[J].河北中医,2013,35(5):652-658.
- [2] 刘清池,王淑珍,冯寿歧,等.凉血解毒法治疗紫癜病崩漏30例疗效观察[J].河北中医,2014,36(11):1633-1634.
- [3] 刘清池,王淑珍,冯寿歧,等.凉血解毒方药对原发性免疫性血小板减少症患者外周血CD₄⁺CD₂₅⁺调节性T细胞水平的影响[J].河北医药,2015,37(7):977-980.
- [4] 倪付勇,温建辉,李明,等.金银花化学成分研究[J].中草药,2017,48(8):3689-3692.
- [5] CHOI JH, KIM S. Investigation of the anticoagulant and antithrombotic effects of chlorogenic acid[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(3):1-6.
- [6] 杨秀娟,杨志军,张金保,等.甘肃不同产地黄芩的根和茎叶清热燥湿作用比较[J].中国临床药理学杂志,2017,33(8):730-744.
- [7] LEE W, KU SK, BAE JS, et al. Antiplatelet, anticoagu-

桑枝多糖预防性给药对肾缺血再灌注损伤模型小鼠炎症反应的影响及机制研究^Δ

黄 倩^{1*}, 林佩璜¹, 郑丹丹¹, 黄秋虹¹, 王梅爱¹, 陈慧勤¹, 施子禄^{2#}(1.泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室, 福建泉州 362100; 2.福建医科大学附属泉州第一医院肾内科, 福建泉州 362000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1786-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.12

摘要 目的:研究桑枝多糖(RMP)预防性给药对肾缺血再灌注损伤(RIRI)模型小鼠炎症反应的影响及可能的作用机制。方法:将60只C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀组(阳性对照,15 mg/kg)和RMP低、中、高剂量组(300、600、1 200 mg/kg)。除假手术组外,其余5组小鼠复制RIRI模型。术前24 h灌胃给药,每天给药1次,连续给药1周。再灌24 h后处死各组小鼠,检测其血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平;光镜下观察其肾脏病理组织学变化;采用酶联免疫吸附法测定其血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-10和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;采用Western blot法测定其肾皮质中Toll样受体4(TLR4)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)和磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组小鼠血清中Scr、BUN水平明显升高($P < 0.01$);肾组织出现典型的炎性改变,肾小管上皮细胞大量变性、坏死,并见炎性细胞浸润;血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$);肾皮质中TLR4、p38MAPK和p-p38MAPK蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中Scr、BUN水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肾组织病理损伤均不同程度改善,尤以RMP中、高剂量组改善最为明显;各给药组小鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),阿托伐他汀组和RMP高剂量组小鼠血清中IL-10水平进一步升高($P < 0.01$),阿托伐他汀组和RMP中、高剂量组小鼠血清中TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各给药组小鼠肾皮质中TLR4、p-p38MAPK蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:RMP预防性给药能改善小鼠RIRI,其机制可能与通过抑制TLR4/p38MAPK通路,进而减轻炎症反应有关。

关键词 桑枝多糖;肾缺血再灌注损伤;Toll样受体4;p38丝裂原活化蛋白激酶;白细胞介素6;白细胞介素10;小鼠

lant, and profibrinolytic activities of baicalin[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(5):893-903.

- [8] 卢秀花,陈忠光,王彦丽.地锦草片对免疫性血小板减少症患者T淋巴细胞亚群及细胞因子的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(1):50-54.
- [9] 彭纪铭,路娟,陈哲,等.多波长检测UPLC法测定地锦草中鞣花酸等4种指标性成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(4):589-594.
- [10] 窦志华,许波,施忠,等.大黄蒽醌类成分肝肾毒性和效应物质研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(10):1214-1217.
- [11] 朱慧,刘晓,祝婷婷,等.熟大黄水煎液中化学成分含量测定及其药效学研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(5):470-475.
- [12] 伏东宁,李祥永,王振中,等.正交试验优化天舒胶囊超声波提取工艺[J]. *中国药房*, 2017, 28(34):4853-4856.
- [13] 马东来,社会茹,蒋翠岚,等.补肾温阳化痰颗粒超声提取

工艺研究的Box-Behnken设计-响应面法优化[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(2):352-353.

- [14] 刘庆焕,王宏,张婷,等.多指标正交试验优化复方红景天颗粒的提取工艺[J]. *中国药房*, 2017, 28(13):1830-1833.
- [15] 范孟雪,秦昆明,丁斐,等. Box-Behnken响应面法结合多指标综合加权法优选升麻中酚酸类成分的提取工艺[J]. *中国药房*, 2016, 27(13):1835-1838.
- [16] 陈恒文,田盼盼,何轩辉,等.多指标综合评分法优化稳心汤提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):25-31.
- [17] 朱春胜,林志健,张冰,等.谱效整合一测多评在中药质量评价中的应用进展[J]. *中成药*, 2016, 38(9):2018-2021.
- [18] 杨方良,张晶,孙国祥,等.中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. *色谱*, 2016, 34(7):715-725.
- [19] 张永清. *临床常用方剂歌诀*[M].北京:中国医药科技出版社, 2013:27.
- [20] 彭怀仁. *中医方剂大辞典:第九册*[S].北京:人民卫生出版社, 1996:498-499.
- [21] 王萍,王宇鹤,辛爱洁,等. Box-Behnken响应面法优化粉葛配方颗粒提取工艺[J]. *中成药*, 2017, 39(6):1293-1296.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.31471100);浙江省自然科学基金资助项目(No.LY13H070002);泉州市科技计划项目(No.2018Z179)

* 讲师,博士。研究方向:肾脏生理学。电话:0595-22632100。E-mail:119569406@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:临床肾脏疾病。电话:0595-22650210。E-mail:cthk2010@zju.edu.cn

(收稿日期:2018-12-24 修回日期:2019-02-14)

(编辑:刘 萍)