

多指标综合评分法优化稳心汤提取工艺

陈恒文¹, 田盼盼^{1,2}, 何轩辉¹, 马涛¹, 李军^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**采用多指标综合评分法确定临床经验方稳心汤的最佳提取工艺。**方法:**采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计法对稳心汤进行提取工艺优化,采用多指标综合评分法确定最优提取工艺。对姜黄、肉桂、莪术、细辛考察加水量、浸泡时间、提取时间对挥发油得率的影响;对党参、川芎、全蝎进行乙醇正交试验设计,以党参炔苷和干膏率进行综合评分;对赤芍、大黄、山楂、麦冬、甘草,以及经乙醇提取党参、川芎、全蝎残留的药渣进行水提醇沉工艺正交试验优化,以芍药苷和干膏率的综合评分为考察指标,优选出最佳工艺参数,并进行验证。**结果:**确定了稳心汤的提取工艺,其中姜黄、肉桂、莪术、细辛提取挥发油的最佳提取工艺为加入8倍量水,浸泡6 h,蒸馏5 h,挥发油的得率较高;对党参、川芎、全蝎加入乙醇提取,最佳工艺为加入10倍70%乙醇,提取1.5 h,提取2次;对乙醇提取药材残渣及赤芍、大黄、山楂、麦冬、甘草等进行水提醇沉,水提取工艺为加入8倍水,提取1.0 h,提取2次,醇沉工艺为药液质量浓度 $1.12 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,加入95%乙醇使含醇量达到60%,静止醇沉36 h。**结论:**通过多指标综合评分法优化的稳心汤提取工艺稳定可靠,适合工业化生产,为临床应用和新药的研发提供参考。

[关键词] 稳心汤; 多指标综合评分; 正交试验; 中药复方

[中图分类号] R282.6;R284.1;R289;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0025-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182023

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180730.1541.003.html>

[网络出版时间] 2018-07-31 09:53

Multi-index Integrated Evaluation Method Optimizes Extraction of Wenxin Decoction

CHEN Heng-wen¹, TIAN Pan-pan^{1,2}, HE Xuan-hui¹, MA Tao¹, LI Jun^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the optimum extraction process of a clinical experience prescription, Wenxin decoction (WXT), by using multi-index integrated evaluation method. **Method:** Orthogonal test $L_9(3^4)$ was conducted for the optimization of extraction technology and multi-index grading method was used to determine the optimal one. Curcumae Longae Rhizoma, Cinnamomi Cortex, Curcumae Rhizoma, and Asari Radix et Rhizoma were evaluated from the influence of amount of water, soaking time and extraction time on the yield rate. Orthogonal experiment design was applied in Codonopsis Radix, Chuanxiong Rhizoma and Scorpio with ethanol as solvent while lobetyolin and dry extract yield were used for overall scoring. Orthogonal experiment was used to optimize the water extraction and alcohol precipitation technologies for Paeoniae Radix Rubra, Rhei Radix et Rhizoma, Crataegi Fructus, Ophiopogonis Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and residual dregs of Codonopsis Radix, Chuanxiong Rhizoma and Scorpio extracted by ethanol. Paeoniflorin and dry extract yield were chosen as the index of evaluation to select and verify the optimal process parameters. **Result:** The extraction process of WXT was determined. The optimal extraction process for higher yield of volatile oil from Curcumae Longae Rhizoma,

[收稿日期] 20180425(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503421);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ0808005);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015249);中国科协青年人才托举工程(2017QNRC001)

[第一作者] 陈恒文,博士,助理研究员,从事心血管临床与药物研究,E-mail:chenhengwen@163.com

[通信作者] *李军,博士,主任医师,从事心血管中西医结合临床与基础研究,Tel:010-88001817,E-mail:gamyylj@163.com

Cinnamomi Cortex, Curcumae Rhizoma, and Asari Radix et Rhizoma was to soke these drugs for 6 hours with 8 times of water volume, and then distill those drugs for 5 hours. The optimal ethanol extraction process for Codonopsis Radix, Chuanxiong Rhizoma and Scorpio were as follows: 10 times of 80% ethanol amount, extracting for 2 times and 1.5 hours each time. Water extraction and alcohol precipitation were used in Paeoniae Radix Rubra, Rhei Radix et Rhizoma, Crataegi Fructus, Ophiopogonis Radix, licorice and residual dregs. The water extraction process was 1 hour extraction for twice, with 8 times of water volume. The ethanol-precipitation process was established where the 95% ethanol was added up to 60% and precipitated for 36 hours in 1.12 g·mL⁻¹ liquid density. **Conclusion:** The extraction process of WXT optimized by multi-index integrated evaluation method is stable and reliable, which is suitable for industrial production, and can provide reference for clinical application and development of new drugs.

[**Key words**] Wenxin decoction; multi-index integrated evaluation method; orthogonal experimental; traditional Chinese medicine prescription

冠心病是世界范围内严重危害人类健康的心血管疾病之一,并且发病年龄呈年轻化趋势发展。据推算我国心血管病现患人数 2.9 亿,患病率及死亡率仍处于上升阶段,其中冠心病患者 1 100 万。心血管病死亡占居民疾病死亡构成 40% 以上,居首位。中国心血管病负担日渐加重,已成为重大的公共卫生问题,防治心血管病刻不容缓^[1-2]。

冠心病属中医的“胸痹”“真心痛”范畴。近年来,越来越多的临床研究证实中医药治疗冠心病有确切疗效。本课题组在近 20 年的临床实践中,系统梳理中医药治疗胸痹心痛的历代文献和中医基础理论,结合临床治疗经验及临床研究发现,阳虚血瘀是冠心病不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)的主要病机,扶阳活血法是治疗 UA 的主要治法,以扶阳治其本,活血治其标,制成治疗 UA 的代表方剂稳心汤^[3-5]。稳心汤由党参 15 g,姜黄 9 g,肉桂 3 g,细辛 3 g,麦冬 12 g,赤芍 15 g,川芎 10 g,莪术 9 g,全蝎 9 g,山楂 15 g,大黄 6 g,甘草 6 g 共 12 味中药组成,前期临床试验表明,稳心汤对 UA 有较好的疗效,可以改善心绞痛症状、降低炎性反应、减少心血管不良事件,尤其可减少非致死性心肌梗死的发生^[6-9],毒理实验证明稳心汤对肝肾功能具有较好的安全性^[10]。

虽然本课题组对稳心汤的临床、药理、毒理已经开展了研究,但提取工艺、物质基础及质量标准并不明确。由于中药复方物质组成复杂多样,通过多成分、多靶点协同发挥整体药效,因此多指标综合评分是优化中药复方提取工艺的重要方法^[11-12]。为更好服务临床,本实验采用 L₉(3⁴) 正交设计法对稳心汤进行提取工艺优化,以出膏率、挥发油、党参炔苷、芍药苷等指标成分含量为考察指标^[13],采用多指标

综合加权评分的方法优化最佳提取工艺,制定合理科学的质量控制标准,明确稳心汤的物质基础,为临床应用和研发提供理论依据。

1 材料

1200 型 HPLC 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BSA124S 型 1/1 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),IKA RV10 型旋转浓缩蒸发仪(德国 IKA 公司),SHB-III 型台式循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司),DTY-CW-300W 小型冷却水循环机(北京德天佑科技发展有限公司),KH-100V 型超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司),DZF-6050AB 型真空干燥箱(上海科晓科学仪器有限公司),GL-20G-II 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);SXXW-500 型智能控温电热套,DZKW-4 型电热数显恒温水浴锅,101-0AB 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司),挥发油玻璃提取装置。

稳心汤所用中药饮片党参(*Codonopsis pilosula*),姜黄(*Curcuma longa*),肉桂(*Cinnamomum cassia*),细辛(*Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum*),麦冬(*Ophiopogon japonicus*),赤芍(*Paeonia lactiflora*),川芎(*Ligusticum chuanxiong*),莪术(*C. phaeocaulis*),全蝎(*Buthus martensii*),山楂(*Crataegus pinnatifida*),大黄(*Rheum palmatum*),甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)均由中国中医科学院广安门医院药房提供(购自北京丰泰金源药业有限公司),经李军主任医师鉴定合格,符合 2015 年版《中国药典》要求。

党参炔苷(111732-201607,纯度 98.0%),芍药苷(110736-201741,纯度 96.4%)等对照品均购于中国食品药品检定研究院;95% 乙醇(北京鸿志伟

达工贸有限公司), 甲醇、乙腈(美国, Fisher 公司) 为色谱纯, 无水乙醇, KH_2PO_4 等皆为分析纯。

2 方法

2.1 挥发油正交试验设计 稳心汤中姜黄作为君药之一, 其主要有效成分为挥发油, 具有降血脂、抗凝、防止血小板聚集、防动脉硬化、防止心力衰竭和心肌梗死、抗氧化、抗炎等作用^[13-14], 肉桂、莪术、细辛主要有效成分也为挥发油, 可增加冠脉血流量、改善冠脉循环和心肌营养^[13, 15-17]。中药复方传统提取工艺挥发油损失较大, 因此为提高挥发油得率及复方疗效, 将姜黄、肉桂、莪术、细辛 4 味中药按照 2015 年版《中国药典》四部单独设计挥发油提取工艺^[18]。影响挥发油提取的因素主要有药材粉碎程度、加水量、浸泡时间、蒸馏时间等, 由于考虑工业化提取的特点, 药材提取采用中药饮片投料, 不进行粉碎, 因此不考虑粉碎程度。挥发油的提取和含量测定参考 2015 年版《中国药典》四部 2204 挥发油测定法进行。

加水量: 将处方 2 倍量药材 68 g, 分别加入 2, 4, 6, 8, 10, 12 倍水, 浸泡 2 h, 蒸馏 5 h, 挥发油得率在 2~10 倍随加水量的增加而增大, 超过 10 倍水量后挥发油不再增加, 因此选择加水 6, 8, 10 倍进行正交试验。

浸泡时间: 将处方 2 倍量药材 68 g, 加入 8 倍水, 分别浸泡 0, 2, 4, 6, 8 h, 蒸馏 5 h, 挥发油得率在浸泡 0~6 h 随着浸泡时间的延长, 挥发油得率不断增加, 浸泡超过 6 h 后挥发油含量增加不明显, 因此选择浸泡 2, 4, 6 h 进行正交试验。

蒸馏时间: 将处方 2 倍量药材 68 g, 加入 8 倍水, 浸泡 4 h, 分别蒸馏 1, 3, 5, 7, 9 h, 挥发油得率在 1~7 h 与蒸馏时间成正比, 当超过 7 h 后, 挥发油基本不再增加, 因此选择蒸馏 3, 5, 7 h 进行正交试验。

为确定挥发油提取的最佳工艺条件, 在前期预试验的基础上, 拟以正交试验表 $L_9(3^4)$ 进行正交试验。选择加水量分别为 6, 8, 10 倍; 浸泡时间分别为 2, 4, 6 h; 蒸馏时间分别为 3, 5, 7 h。

2.2 挥发油提取验证试验 为了进一步验证所选挥发油最优提取工艺, 取处方药材饮片 20 倍用量, 每批样品 680 g, 共 3 批样品, 按照最优参数进行提取, 测定挥发油得率。

2.3 乙醇提取正交试验设计 稳心汤中党参作为另一味君药, 党参炔苷是其标志性成分, 具有补血、降压、补中益气、增强机体抵抗能力、增加血红蛋白与红细胞、治疗贫血、降低血压等功效^[13, 19]; 川芎是

一味常用的活血行气药, 其有效成分主要为挥发油、酚酸类的阿魏酸、川芎嗪等^[13, 20]; 全蝎具有促进纤溶、抗凝等作用^[13, 21], 根据 2015 年版《中国药典》, 以上 3 味药其有效成分醇溶性较强, 为提高药效, 故采用乙醇提取工艺。

在提取过程中, 由于党参作为君药, 因此以党参炔苷和干膏得率为评价指标, 进行综合评分, 单因素实验结果如下。

乙醇体积分数: 将 2 倍量处方药材 48 g, 分别加入 8 倍量 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 乙醇, 提取 1 h, 提取 2 次, 在 40%~70% 乙醇体积分数, 综合得分与乙醇体积分数成正比, 当超过 70% 后, 综合得分不再增加, 因此选择乙醇体积分数 50%, 60%, 70% 进行正交试验。

乙醇用量: 将 2 倍量处方药材 48 g, 分别加入 4, 6, 8, 10, 12 倍量 60% 乙醇, 提取 1 h, 提取 2 次, 在 4~10 倍乙醇用量范围内, 综合得分随乙醇用量的增加不断增加, 超过 10 倍用量后, 综合得分基本稳定, 故选择加入 6, 8, 10 倍乙醇用量进行下一步的正交试验。

提取时间: 将 2 倍量处方药材 48 g, 加入 8 倍量 60% 乙醇, 分别提取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h, 提取 2 次, 在提取 0.5~1.5 h, 综合得分不断增加, 超过 1.5 h 后, 综合得分基本不再增加, 故选择 0.5, 1, 1.5 h 提取时间进行正交试验。

根据工业化生产的特点和前期单因素试验的结果, 以中药饮片不粉碎, 提取 2 次的前提下, 选取乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 以党参炔苷和干膏得率为评价指标, 用 $L_9(3^4)$ 设计正交试验。

党参炔苷含量测定: 安捷伦 TC C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 267 nm, 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 进样量 10 μL , 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 进行梯度洗脱 (0~20 min, 17%~27% A), 标准曲线 $Y = 6\,543X + 26.158$, $r = 0.999\,8$, 其中 Y 为峰面积, X 为质量浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 线性范围 2.54~254 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 乙醇提取验证试验 为了进一步验证乙醇最优提取工艺参数, 取处方 20 倍药材饮片用量, 每批样品 480 g, 共 3 批样品, 按照最优参数进行提取, 定容, 计算综合得分。

2.5 水提取正交试验设计 稳心汤方剂中赤芍有效成分芍药总苷^[13, 22]; 大黄有效成分为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚^[13, 23]; 山楂

有效成分为有机酸和总黄酮^[13,24];麦冬有效成分为麦冬总皂苷^[13,25];甘草有效成分为甘草苷和甘草酸^[13,26];这些有效成分具有较强的水溶性,因此赤芍、大黄、山楂、麦冬、甘草,以及经乙醇提取党参、川芎、全蝎残留的药渣采取水提醇沉的工艺进行提取纯化。水提取主要考虑的因素为加水量、提取时间、提取次数等,提取过程中,由于芍药苷响应好,不受干扰,因此以芍药苷含量和干膏率为评价指标,进行综合评分,单因素试验如下。

加水量:取处方 2 倍量药材 108 g,分别加入 4, 6, 8, 10, 12 倍量水,提取 1 h,提取 2 次,综合评分在 4~10 倍加水量,随水量的增加不断增加,超过 10 倍用水量后,综合得分基本稳定,故选择加入 6, 8, 10 倍水进行下一步的正交试验。

提取时间:将处方 2 倍量药材 108 g,加入 8 倍量水,分别提取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h,提取 2 次,综合评分在提取 0.5~1.5 h,不断增加,超过 1.5 h 后,综合得分基本不再增加,故选择 0.5, 1, 1.5 h 提取时间进行正交试验。

提取次数:参照试验室和工业化生产的实际情况,选择提取 1, 2, 3 次进行正交试验。

在前期预试验的基础上,拟以正交试验表 $L_9(3^4)$ 设计正交试验,以芍药苷含量及干膏率为考察指标计算综合得分,确定最佳工艺。

芍药苷含量测定:采用安捷伦 HC C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m);检测波长 230 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 10 μ L;流速 1.0 mL·min⁻¹;流动相甲醇-0.025 mol·L⁻¹磷酸二氢钾 (46:54),标准曲线 $Y = 12\ 962X + 49.026$, $r = 0.999\ 5$,其中 Y 为峰面积, X 为质量浓度 ($g \cdot L^{-1}$),线性范围 10.60 ~ 530 $mg \cdot L^{-1}$ 。

2.6 水提取验证试验 按照处方 20 倍药材量进行水提取工艺,每批样品 1 080 g,共 3 批样品,按照最优工艺进行提取,定容,测定芍药苷含量及干膏率,计算综合得分。

2.7 水提醇沉正交试验设计 选择适合工业化生产的加乙醇使大分子杂质沉淀的方法进行纯化有效成分及减少病人服用量。分别考察 3 个醇沉因素,药液质量分数分别为 1.06, 1.12, 1.18 $g \cdot L^{-1}$;加入乙醇后体积分数分别为 50%, 60%, 70%;醇沉时间分别为 12, 24, 36 h。

参照本课题组中药提取工艺的方法进行^[11],设计乙醇沉淀正交试验,缓缓加入 95% 乙醇,使含醇量分别达到 50%, 60%, 70%,按正交试验设计分别

放置不同时间,离心过滤,定容,测定芍药苷含量及干膏率,并计算综合得分。

2.8 水提醇沉验证试验 为了进一步验证所选醇沉最优工艺参数,分别取质量分数为 1.12 $g \cdot L^{-1}$ 的浓缩液 300 mL,缓慢加入 95% 乙醇至体积分数为 60%,醇沉 36 h,共 3 个样品,抽滤,对醇沉液进行定容,测定芍药苷含量及干膏率。

3 结果与分析

3.1 挥发油得率 挥发油提取结果见表 1。由分析结果可以看出,影响因素 $C > B > A$,蒸馏时间对挥发油提取影响最大,见表 2。进一步方差分析结果,蒸馏时间对挥发油提取影响显著 ($P < 0.05$),加水量和浸泡时间对挥发油的提取无显著影响。综合考虑工业化生产要求,在姜黄、肉桂、莪术、细辛挥发油提取工艺中,蒸馏 5 h (挥发油 3.653%) 与 7 h 结果相当 (挥发油 3.737%),因此调整最佳提取条件为 $A_2B_3C_2$,即加水量为药材饮片 8 倍,浸泡 6 h,蒸馏 5 h,挥发油的得率较高。见表 3。

表 1 $L_9(3^4)$ 挥发油提取正交试验设计与结果分析

Table 1 $L_9(3^4)$ results and statistics of orthogonal test in volatile oil extraction

No.	A 加水量 / 倍	B 浸泡时间 / h	C 蒸馏时间 / h	挥发油得率 / %
1	6	2	3	2.62
2	6	6	7	3.46
3	6	4	5	3.89
4	8	2	5	3.56
5	8	4	7	3.68
6	8	6	3	3.30
7	10	2	7	3.64
8	10	4	3	3.21
9	10	6	5	3.94

表 2 挥发油提取工艺参数均值响应

Table 2 Response mean of orthogonal test in volatile oil extraction

水平	A 加水量	B 浸泡时间	C 蒸馏时间	D 误差
1	3.323	3.273	3.043	3.413
2	3.513	3.450	3.653	3.467
3	3.597	3.710	3.737	3.553
Delta	0.273	0.437	0.693	0.140
排序	3	2	1	4

表 3 挥发油提取工艺参数方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal test in volatile oil extraction

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A(加水量)	2	0.12	0.12	0.06	3.93	0.203
B(浸泡时间)	2	0.29	0.29	0.14	9.66	0.094
C(蒸馏时间)	2	0.86	0.86	0.43	28.70	0.034
误差	2	0.03	0.03	0.01		
合计	8	1.30				

为验证该工艺的稳定性,按筛选的最佳工艺条件,进行了重复验证试验。即称取 20 倍药材饮片用量,加入 8 倍量水,浸泡 6 h,蒸馏 5 h,重复验证 3 批样品,分别计算挥发油得率,为 4.01%,3.95%,4.10%,平均提取率为 4.02%,RSD 1.9%,所选工艺参数合理,结果稳定可靠。

3.2 乙醇提取结果 对稳心汤中党参、川芎、全蝎进行乙醇提取,参考本课题组前期多指标综合评分法优化提取中药复方工艺的方法^[12],赋予提取指标比重为干膏率 50%,党参炔苷质量分数 50%,计算综合得分。结果分析见表 4~6。

表 4 $L_9(3^4)$ 乙醇提取正交试验设计与结果分析

Table 4 $L_9(3^4)$ results and statistics of orthogonal test in ethanol extraction

No.	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	干膏率/%	党参炔苷/%	综合得分
1	50	6	0.5	36.32	3.51	73.36
2	50	10	1.5	38.69	3.86	79.34
3	50	8	1	39.41	4.21	83.56
4	60	6	1	42.36	4.35	88.09
5	60	8	1.5	45.86	4.97	97.94
6	60	10	0.5	42.89	4.74	92.50
7	70	6	1.5	46.87	4.98	99.11
8	70	8	0.5	44.75	4.36	90.74
9	70	10	1	46.10	5.07	99.18

表 5 乙醇提取工艺参数均值响应

Table 5 Response mean of orthogonal test in ethanol extraction

水平	A 乙醇体积分数	B 乙醇用量	C 提取时间	D 误差
1	78.10	86.85	85.53	90.16
2	92.84	89.34	88.87	90.32
3	96.34	91.09	92.88	86.81
Delta	18.25	4.24	7.34	3.51
排序	1	3	2	4

表 6 乙醇提取工艺参数方差分析

Table 6 Variance analysis of orthogonal test in ethanol extraction

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A 乙醇体积分数	2	562.58	562.58	281.29	23.87	0.040
B 乙醇用量	2	27.19	27.19	13.60	1.15	0.464
C 提取时间	2	81.11	81.11	40.56	3.44	0.225
误差	2	23.57	23.57	11.78		
合计	8	694.45				

由试验结果可以看出,以综合指标进行方差分析所得的最佳条件均是 $A_3B_3C_3$,影响乙醇提取的显著因素是乙醇浓度($P < 0.05$),提取时间、乙醇用量影响不显著,因此乙醇提取最佳工艺为,加入 10 倍 70% 乙醇,提取 1.5 h,提取 2 次。

为验证工艺的稳定性,将党参、川芎、全蝎进行了重复验证试验,即称取 20 倍药材饮片用量,按最优条件重复提取 3 批样品,分别计算干膏率和党参炔苷的含量,并计算综合得分为 99.03,99.64,99.21,平均得分为 99.43,RSD 0.3%,所选工艺参数合理稳定。

3.3 水提取工艺结果 参考本课题组前期多指标综合评分法优化提取中药复方工艺的方法^[11],干膏率 50%,芍药苷质量分数 50%,计算综合得分。结果分析见表 7~9。

表 7 $L_9(3^4)$ 水提取正交试验设计与结果分析

Table 7 $L_9(3^4)$ results and statistics of orthogonal test in water extraction

No.	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取次数	芍药苷/%	干膏率/%	综合得分
1	6	0.5	1	1.96	18.72	63.54
2	6	1.5	3	2.38	30.21	89.53
3	6	1	2	2.48	23.46	80.02
4	8	0.5	2	2.76	25.16	87.49
5	8	1	3	3.01	29.13	98.21
6	8	1.5	1	2.25	21.46	72.89
7	10	0.5	3	2.88	28.56	95.11
8	10	1	1	2.14	24.15	75.52
9	10	1.5	2	2.79	29.57	95.29

由试验结果可以看出,以综合指标进行方差分析所得的最佳条件均是 $A_2B_2C_3$,影响水提取的因素由大到小分别是提取次数、加水量、提取时间,但影响都不显著,且提取 2 次与 3 次结果相当,因此确定最佳工艺为 $A_2B_2C_2$,即加水量为药材的 8 倍,提取

表 8 水提取工艺参数均值响应

Table 8 Response mean of orthogonal test in water extraction

水平	A 加水量	B 提取时间	C 提取次数	D 误差
1	77.70	82.05	70.65	85.68
2	86.20	87.75	90.77	85.84
3	88.64	82.73	91.11	81.01
Delta	10.94	5.71	20.46	4.83
排序	2	3	1	4

表 9 水提取工艺参数方差分析

Table 9 Variance analysis of orthogonal test in water extraction

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A 加水量	2	197.98	197.98	98.99	4.38	0.186
B 提取时间	2	58.24	58.24	29.12	1.29	0.437
C 提取次数	2	823.68	823.68	411.84	18.22	0.052
误差	2	45.20	45.20	22.60		
合计	8	1125.09				

时间为 1.0 h, 提取 2 次。

为了进一步验证所选最优工艺为 $A_2B_2C_2$, 按照处方 20 倍药量进行水提取工艺, 重复 3 次, 分别计算干膏率和芍药苷的含量, 并计算综合得分, 为 98.51, 99.03, 99.68, 平均得分为 99.07, RSD 0.6%, 3 批药材提取验证无明显差异, 所选工艺参数合理稳定。

3.4 水提醇沉结果 采用多指标成分进行测定及分析, 并根据配方原则赋予各指标成分一定权重, 结果见表 10~12。

表 10 $L_9(3^4)$ 醇沉正交试验结果分析

Table 10 $L_9(3^4)$ results and statistics of orthogonal test in ethanol precipitation

No.	A 药液密度 /g·mL ⁻¹	B 乙醇 体积分数 /%	C 醇沉时间 /h	芍药苷 /%	干膏率 /%	综合 得分
1	1.06	50	12	1.86	15.67	66.25
2	1.06	70	36	2.31	25.59	84.32
3	1.06	60	24	2.45	26.89	90.75
4	1.12	50	24	2.28	22.36	85.11
5	1.12	60	36	2.47	27.10	97.69
6	1.12	70	12	1.99	24.58	77.10
7	1.18	50	36	2.86	28.41	95.24
8	1.18	60	12	2.11	21.38	73.51
9	1.18	70	24	2.94	27.87	92.13

表 11 醇沉工艺参数均值响应

Table 11 Response mean of orthogonal test in ethanol precipitation

水平	A 药液密度	B 乙醇体积分数	C 醇沉时间	D 误差
1	80.44	82.20	72.29	85.36
2	86.63	85.17	87.19	85.55
3	86.96	86.66	94.56	83.12
Delta	6.52	4.46	22.27	2.43
排序	2	3	1	4

表 12 醇沉工艺参数方差分析

Table 12 Variance analysis of orthogonal test in ethanol precipitation

来源	自由度	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A 药液密度	2	80.97	80.97	40.49	7.41	0.119
B 醇沉体积分数	2	30.94	30.94	15.47	2.83	0.261
C 醇沉时间	2	772.48	772.48	386.24	70.67	0.014
D 误差	2	10.93	10.93	5.47		
合计	8	249.41				

由表中试验结果可以看出, 以多指标综合得分进行分析, 所以最佳条件为 $A_3B_3C_3$, 影响综合得分显著的因素是醇沉时间 ($P < 0.05$), 其次是药液密度 A, 乙醇体积分数 B, 但影响并不显著。因此以极差 R 值和离均差平方和 SS 值为指标进行分析, 且从节省能源、有利于工业化生产的角度, 选择参数 $A_2B_2C_3$ 进行下一步的验证试验。

对醇沉最优工艺进行验证, 3 批验证试验综合得分分别为 97.89, 98.03, 97.31, 平均得分为 97.74, RSD 0.4%, 无明显差异, 最后确定水提醇沉的最佳工艺条件为 $A_2B_2C_3$, 即水提取液浓缩至相对密度约为 1.12 g·mL⁻¹ (20 °C 测) 时, 加入 95% 乙醇使沉淀, 使含醇量达到 60%, 醇沉 36 h。

综上所述, 确定了稳心汤的提取工艺, 其中姜黄、肉桂、莪术、细辛提取挥发油的最佳提取工艺为加入 8 倍量水, 浸泡 6 h, 蒸馏 5 h, 挥发油的得率较高; 对党参、川芎、全蝎加入乙醇提取, 最佳工艺为加入 10 倍 70% 乙醇, 提取 1.5 h, 提取 2 次; 对乙醇提取药材残渣及赤芍、大黄、山楂、麦冬、甘草等进行水提醇沉, 水提取工艺为加入 8 倍水, 提取 1.0 h, 提取 2 次, 醇沉工艺为药液质量浓度 1.12 g·mL⁻¹ 时, 加入 95% 乙醇使含醇量达到 60%, 静止醇沉 36 h。

4 讨论

稳心汤经验方以党参、姜黄为君药, 肉桂、细辛、

麦冬为臣药,赤芍、川芎、莪术、全蝎、山楂、大黄为佐药,甘草为使药。其中,党参补益心气,姜黄破血行气、通经止痛,肉桂温阳补肾、散寒通经,细辛散寒止痛、温化痰饮,上药合用,共奏扶阳散寒、益气行血之功,麦冬养阴生津,与党参配伍,益气养阴,阴中求阳,增强扶正固本之力量。川芎、赤芍、山楂,活血化瘀、行气通阳;莪术、全蝎通络散结;瓜蒌清热化痰、利气宽胸;大黄逐瘀通经;上药合用,共奏理气活血、通经止痛、化痰下气之功,为祛邪治标之法;炙甘草补中益气、调和诸药。纵观全方,攻补兼施、标本兼治,具有扶阳活血、化痰通络之功,适用于UA证属阳虚血瘀患者。

在稳心汤提取工艺实验研究中,充分考虑了中药复方君臣佐使的配伍原则、每味中药材有效成分的化学性质以及工业化生产的要求,运用多指标综合评分的方法确定了稳心汤的提取工艺,并进行了验证,避免了单一因素对中药复方提取的局限性和片面性,更具科学性,有利于后续新药的研发。经最优工艺提取的稳心汤提取物,可经充分的混合进行下一步的制剂及药理学研究。

[参考文献]

[1] Emelia J B, Michael J B, Stephanie E C, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2017, 135(10): e146-e603.

[2] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2017》概要[J]. *中国循环杂志*, 2018, 33(1): 1-8.

[3] 李军,王阶.冠心病心绞痛证候要素与应证组合的5099例文献病例分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(12): 926-927, 930.

[4] 王阶,李军,姚魁武,等.冠心病心绞痛证候要素和冠脉病变的Logistic回归分析[J]. *辽宁中医杂志*, 2007(9): 1209-1211.

[5] 周景想,宋业琳,迟伟峰,等.稳定型心绞痛与不稳定型心绞痛的证候特点及差异性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(6): 1410-1412.

[6] 李军,程广清,李长生.稳心汤对不稳定型心绞痛患者血浆Fib、IL-6、IL-8的影响[J]. *山东中医杂志*, 2005, 24(11): 650-652.

[7] 宋祥和,李军,李长生.稳心汤对不稳定型心绞痛病人高敏C反应蛋白及D-二聚体的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2008, 6(6): 635-637.

[8] 李军,张振鹏,熊兴江,等.稳心汤治疗不稳定性心绞痛的随机对照研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016,

22(4): 154-158.

[9] 高嘉良,李军,王阶.“扶阳活血法”在冠心病不稳定性心绞痛治疗中的运用[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(3): 550-552.

[10] 段练,熊兴江,李军.稳心汤的急性毒理实验研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(7): 1308-1310.

[11] 陈恒文,张翠英,任伟光,等.多指标综合评分法优化宣痹安痛方的水提醇沉工艺[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(1): 70-74.

[12] 任伟光,王阶,张翠英,等.多指标正交试验优选丹参黄连的提取工艺[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(10): 814-818.

[13] 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,2015.

[14] 李伟锋,蒋建兰.姜黄素药理作用的研究现状[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(10): 957-960.

[15] 何珊,姜勇,屠鹏飞.肉桂的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(18): 3598-3602.

[16] 赖艳妮,严一文,徐培平.基于系统药理学探索莪术有效成分的药理作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(14): 177-182.

[17] 伍珊娜,刘振杰,章从恩,等.基于谱效关系的灯盏细辛体外抗血小板聚集活性成分研究[J]. *中草药*, 2017, 48(24): 5179-5185.

[18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:203-204.

[19] 冯亚静,王晓霞,庄鹏宇,等.党参的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(1): 135-139.

[20] 金玉青,洪远林,李建蕊,等.川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中药与临床*, 2013, 4(3): 44-48.

[21] 张盼盼,马明珠,王集会.中药全蝎的研究进展[J]. *药学研究*, 2014, 33(7): 411-414.

[22] 陆小华,马骁,王建,等.赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(4): 595-602.

[23] 刘月红,黄政海,董玲,等.高效液相色谱法同时测定大黄中14种成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(23): 4514-4519.

[24] 章弘扬,张弛,王月荣,等.山楂中黄酮类成分的定性和定量分析[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(5): 601-605.

[25] 吴发明,蔡晓洋,王盼,等.HPLC同时测定麦冬中5个皂苷成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(20): 4022-4025.

[26] 林伟雄,乐智勇,车海燕,等.甘草饮片标准汤剂的研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(5): 830-835.

[责任编辑 顾雪竹]