

· 论著 ·

## 基于正交试验和响应曲面法优化复方金钱草颗粒提取工艺

潘鹏超<sup>a</sup>, 陈啸飞<sup>a</sup>, 谌卫<sup>b</sup>, 郭志勇<sup>b</sup>, 柴逸峰<sup>a</sup>(海军军医大学: a. 药学院药物分析教研室, b. 长海医院肾内科, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 采用正交试验和响应面分析法优化复方金钱草颗粒的提取工艺。方法 以复方金钱草颗粒中多个代表性成分的峰面积之和为评价指标, 应用正交试验及 Box-Behnken 响应面分析法对超声提取时间、超声温度以及乙醇比例 3 个提取条件进行 3 因素 3 水平回归分析, 优化最佳提取条件。结果 超声提取时间和乙醇比例是复方金钱草颗粒提取工艺的重要因素, 超声温度对其提取效果作用不明显。复方金钱草颗粒的最佳提取条件为超声提取时间 10 min, 超声温度 55 ℃, 乙醇比例 55%。结论 结合正交试验以及 Box-Behnken 响应面分析法得到的最佳提取工艺参数, 可用于复方金钱草颗粒代表性成分的提取以及后续的药学研究。

**[关键词]** 复方金钱草颗粒; 提取工艺; 正交试验; 响应面分析法

**[中图分类号]** R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)01-0027-08

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.201910001

## Optimization of the compound herba lysimachiae extraction process based on orthogonal experiment and response surface method

PAN Pengchao<sup>a</sup>, CHEN Xiaofei<sup>a</sup>, CHEN Wei<sup>b</sup>, GUO Zhiyong<sup>b</sup>, CHAI Yifeng<sup>a</sup>(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, b. Department of Nephrology, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To optimize the extraction process of the compound herba lysimachiae by orthogonal experiment and response surface method. **Methods** The sum of the peak areas of multiple representative components in the compound herba lysimachiae was used as the evaluation index. The ultrasonic extraction time, ultrasonic temperature and ethanol ratio were analyzed to optimize the extraction process conditions by orthogonal experiment and Box-Behnken response surface analysis method. **Results** Ultrasonic extraction time and ethanol ratio are important factors in the extraction process of the compound herba lysimachiae. The effect of ultrasonic temperature in the extraction process is not significant. The optimal extraction condition for compound herba lysimachiae is 10 min ultrasonic extraction time at 55 ℃ with 55% ethanol. **Conclusion** The optimal extraction process parameters obtained by combining orthogonal experiment and Box-Behnken response surface method can be used for the extraction of representative components from the compound herba lysimachiae and pharmaceutical research in the future.

**[Key words]** compound herba lysimachiae; extraction process; orthogonal experiment; response surface method

### 0 引言

复方金钱草颗粒由广金钱草、车前草、光石韦以及玉米须四味中药组成, 为成方制剂, 收录于《中国药典》(2015 年版), 该药具有清热利湿、通淋排石的作用, 在临床上常用于泌尿系结石、尿路感染证候者<sup>[1-3]</sup>。现代药理学研究也表明复方金钱草颗

粒具有利尿、抑制泌尿系结石形成、抗炎、抗氧化作用, 能有效抑制结晶肾损伤, 其中, 广金钱草作为君药, 发挥主要药理作用, 车前草和光石韦也起到一定辅助作用<sup>[4-7]</sup>。经鉴定, 复方金钱草颗粒中主要成分包含黄酮类、萜类、生物碱类、酚酸类、甾醇类、多糖类、挥发油等<sup>[8-9]</sup>。近年来研究表明, 其主要活性成分为黄酮类、萜类、酚酸类以及多糖类<sup>[10-12]</sup>。因其成分复杂, 极性强弱各异, 目前的中药提取方法主要有煎煮法、加热回流法、半仿生提取法等<sup>[13-15]</sup>。然而, 这些方法对于复方金钱草颗粒中指标性有效成分提取的效率尚无系统研究, 因此, 目前复方金钱草颗粒尚无通用的提取工艺, 有效成分含量未知。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81573396, 81973291, 81573759)

**[作者简介]** 潘鹏超, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析, Email: 18221151880@163.com

**[通讯作者]** 柴逸峰, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物分析, Email: yfchai@smmu.edu.cn; 郭志勇, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 结晶肾损伤的治疗, Email: drguozhiyong@163.com

正交试验因其具有较高的科学性,较短的操作时间以及简单的实验步骤被广泛应用于中药材提取工艺优化<sup>[6]</sup>。响应曲面法通过直观的等高线图和三维立体图比较各因素的相互作用且能通过回归模型预测最佳提取参数,从而在医药食品等领域广泛应用。本研究通过结合正交试验和响应面分析法两种统计学方法,在选定14个复方金钱草颗粒代表性有效成分的基础上,优化得到有效成分含量最大化提取工艺,为后续该药物的药理药效研究奠定基础。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

200 g 摇摆式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司);BP121S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Heraeus Multifuge X1R 台式离心机(美国 Thermo 公司);Agilent1290 液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Agilent 6538 飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司)。

### 1.2 试药

分析纯无水乙醇(中国医药集团上海化学试剂公司);质谱纯乙腈(Merck,Germany)、甲酸(Merck,Germany);超纯水(Milli-Q A10 超纯水制备系统美国 Millipore 公司);二甲基亚砜(Merck,Germany);芹菜素对照品、木犀草素对照品、大豆皂苷 I 对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司);复方金钱草颗粒(每袋装 10 g)来源于长海医院肾内科。

## 2 试验方法

### 2.1 试验因素水平选择

通过前期的文献调研以及对复方金钱草颗粒提取主要因素的考虑,笔者选取超声提取时间(A)、超声温度(B)、乙醇比例(C)作为试验因素并确定了其因素水平表,具体见表1。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I

表1 试验因素水平表

水平	A因素	B因素	C因素
	超声提取时间(t/min)	温度(t/°C)	乙醇比例(%)
-1	10	40	20
0	20	60	50
1	30	80	80

对照品各 5 mg,加一定量的二甲基亚砜(DMSO)溶解,得到浓度均为 80 mmol/L 的对照品溶液。

### 2.3 复方金钱草颗粒供试品溶液的制备

取复方金钱草颗粒进行初步粉碎,精密称取 2.0 g,置于 50 ml 锥形瓶中,根据试验方案加入不同比例的乙醇提取液 25 ml,称定质量并记录,并按各提取条件进行超声加热回流提取药液,经室温冷却后,再次称定并用提取液补足损失的质量,15 000 r/min 离心 20 min,取上清液并经 0.22 μm 滤膜过滤,得各供试品溶液。

### 2.4 色谱条件

色谱柱: XBridge BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm);流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为 0.1% 甲酸乙腈,梯度洗脱,洗脱条件见表2;进样量为 3 μl,流速为 0.4 ml/min,柱温为 40 °C。

表2 梯度洗脱条件

时间(t/min)	A(%)	B(%)
0	98	2
2	98	2
12	40	60
17	2	98
19	2	98

### 2.5 质谱条件

电喷雾离子源(正离子模式);质量扫描范围: 50~1 500 m/z;干燥气温度: 350 °C;干燥气流速: 11.0 L/min;雾化气压力: 45 psig;毛细管电压: 4 000 V;碎片电压: 120 V。

### 2.6 标准曲线的制备

#### 2.6.1 芹菜素

取芹菜素对照品溶液,用 DMSO 溶液稀释得到质量浓度为 0.676、1.351、2.027、2.702、6.756、13.512 μg/ml 的工作溶液,按“2.4”“2.5”项条件进样测定。以对照品溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制曲线。

#### 2.6.2 木犀草素

取木犀草素对照品溶液,用 DMSO 溶液稀释得到质量浓度为 0.217、0.716、1.073、1.431、3.578、7.156 μg/ml 的工作溶液,按“2.4”“2.5”项条件进样测定。以对照品溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制曲线。

#### 2.6.3 大豆皂苷 I

取大豆皂苷 I 对照品溶液,用 DMSO 溶液稀释得到质量浓度为 1.886、7.545、11.317、15.090、

22.635、45.270 μg/ml的工作溶液,按“2.4”“2.5”项条件进样测定。以对照品溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制曲线。

### 2.7 精密度试验

取浓度为 4.054 μg/ml 的芹菜素、2.147 μg/ml 的木犀草素、18.862 μg/ml 的大豆皂苷 I 混合对照品溶液,按“2.4”“2.5”项条件进样,在 1 d 之内连续进样 6 次,并且连续进样 4 d,测定其芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I 的色谱峰面积并计算其各自的相对标准偏差(RSD),考察其日内精密度和日间精密度。

### 2.8 重复性试验

取复方金钱草颗粒提取液,平行制备 6 份,按“2.4”“2.5”项条件进样,连续进样 6 次,测定其芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I 的色谱峰面积并计算其各自的 RSD 值,考察其重复性。

### 2.9 回收率试验

精密量取一定浓度的芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I 混合对照品溶液和已知含量的复方金钱草颗粒提取液各 0.5 ml 混合,平行制备 6 份,按“2.4”“2.5”项条件进样,连续进样 6 次,测定其芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I 的色谱峰面积并计算其各自的含量和 RSD 值,考察其加样回收率。

### 2.10 稳定性试验

取复方金钱草颗粒提取液,按“2.4”“2.5”项条件分别在 0、6、12、24、48 h 进样,测定其芹菜素、木犀草素、大豆皂苷 I 的色谱峰面积并计算各自的 RSD 值,考察其稳定性。

## 3 结果

### 3.1 标准曲线

#### 3.1.1 芹菜素

如图 1A 所示,回归方程为  $Y=50\,999X+33\,373$ ,  $r=0.999\,9$ ,表明芹菜素在 0.676~13.512 μg/ml 浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

#### 3.1.2 木犀草素

如图 1B 所示,回归方程为  $Y=45\,861X+15\,784$ ,  $r=0.999\,9$ ,表明木犀草素在 0.215~7.156 μg/ml 浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

#### 3.1.3 大豆皂苷 I

如图 1C 所示,回归方程为  $Y=19\,763X+68\,383$ ,  $r=0.999\,9$ ,表明大豆皂苷 I 在 1.886~45.270 μg/ml 浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

### 3.2 精密度试验结果

由表 3 可知,日内精密度试验中,芹菜素的 RSD 为 0.98%,木犀草素的 RSD 为 1.90%,大豆皂苷 I 的 RSD 为 2.18%,说明这 3 个化合物的日内精密度良好。日间精密度试验中,芹菜素的 RSD 为 1.53%,木犀草素的 RSD 为 0.87%,大豆皂苷 I 的 RSD 为 1.40%,说明这 3 个化合物的日间精密度良好。

### 3.3 重复性试验结果

平行制备复方金钱草颗粒提取液,重复进样 6 次,以峰面积计算,结果芹菜素的 RSD 为 3.09%,木犀草素的 RSD 为 2.83%,大豆皂苷 I 的 RSD 为 2.21%。说明复方金钱草颗粒提取液进样测定的重复性良好。

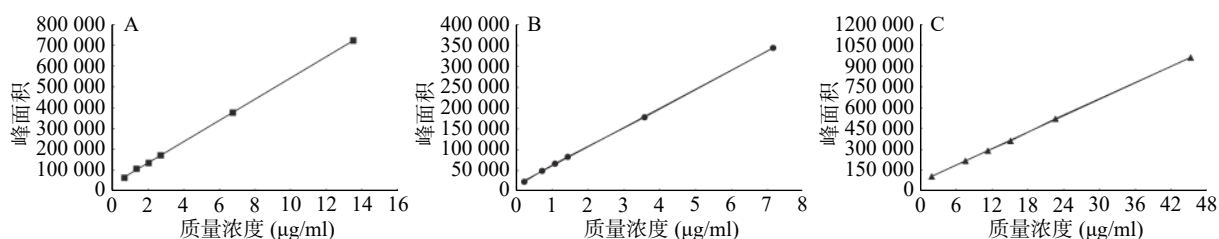


图 1 对照品标准曲线  
A.芹菜素;B.木犀草素;C.大豆皂苷 I

表 3 日内、日间精密度试验结果

化合物	峰面积						RSD(%)					
	日内			日间			日内	日间				
芹菜素	232 990	236 928	234 797	232 197	237 714	237 011	236 928	235 893	230 883	239 504	0.98	1.53
木犀草素	115 411	115 258	117 072	113 539	111 764	111 688	115 258	116 049	116 055	113 919	1.90	0.87
大豆皂苷 I	441 491	431 651	432 629	451 700	431 493	451 081	431 651	444 005	442 165	445 161	2.18	1.40

### 3.4 回收率试验结果

由表4可知,芹菜素、木犀草素的平均回收率为99.58%,其RSD为1.24%;木犀草素的平均回收率为101.07%,

其RSD为1.83%;大豆皂苷I的平均回收率为100.59%,其RSD为1.22%,说明该测定方法准确性良好。

表4 加样回收率试验结果

化合物	原有量(m/μg)	加入量(m/μg)	平均测得量(m/μg)	平均回收率(%)	RSD(%)
芹菜素	1.216	3.378	4.580	99.58	1.24
木犀草素	0.923	2.147	3.093	101.07	1.83
大豆皂苷 I	11.358	16.976	28.434	100.59	1.22

### 3.5 稳定性试验结果

由图2可知,复方金钱草颗粒提取液在0、6、12、24、48 h共进样5次,3个成分的峰面积在48 h内无明显波动,计算得芹菜素、木犀草素、大豆皂苷I的RSD分别0.86%、3.83%、1.44%,说明复方金钱草颗粒提取液在48 h内稳定性良好。

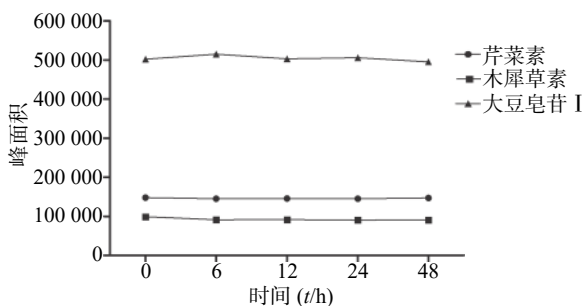


图2 稳定性试验结果

### 3.6 正交试验设计与实验结果

为探讨复方金钱草颗粒最佳提取工艺,笔者采用复方金钱草颗粒中的指标性成分的峰面积之和来代表其提取效果。共选取14种不同的化合物,为代表其合理性,在各味药材中都选取一定数量的化合物,主要为经文献报道的有药理作用的成分以及各味药材中含量相对较高的成分。笔者采用UHPLC-TOF/MS对复方金钱草颗粒提取成分进行鉴定,得到其质谱总离子流图及提取离子流图(图3),其化合物详细信息见表5。

采用 $L_9(3^3)$ 正交试验表划分各个试验的因素水平,其具体的试验方案和结果分析见表6。根据表6的试验结果分析,通过比较K值,得到其提取最优参数水平为A1、B2、C2,通过比较极差R值,可以看到因素A的极差最大,其次为C、B,即超声

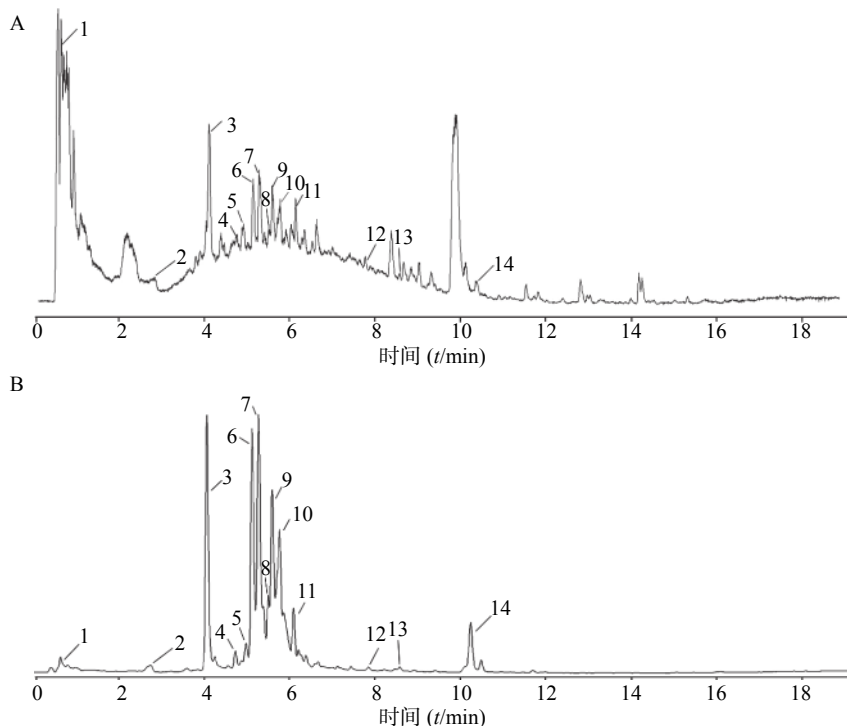


图3 正离子模式下复方金钱草颗粒提取物离子流图

A.总离子流图;B.提取离子流图 1.苹果酸;2.桂皮酸;3.广金钱草内酯;4.绿原酸;5.芦丁;6.芹菜素;7.芒果苷;8.维采宁-2;9.carlinside;10.夏佛塔苷;11.异荜茇苷;12.异牡荆苷;13.木犀草素;14.大豆皂苷 I

表5 复方金钱草指标性有效成分列表

峰号	$t_R$ /min	化合物	分子式	分子量 $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	误差(ppm)	来源
1	0.776	苹果酸	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	135.028 3	-4.86	玉米须
2	2.378	桂皮酸	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	149.059 9	0.04	车前草
3	4.120	广金钱草内酯	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	172.097 7	2.32	广金钱草
4	4.778	绿原酸	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	355.102 6	1.30	广金钱草、车前草、光石韦、玉米须
5	5.008	芦丁	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611.160 6	0.68	广金钱草
6	5.049	芹菜素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.059 9	-0.62	广金钱草
7	5.148	芒果苷	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	423.093 7	-0.14	光石韦
8	5.304	维采宁-2	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.167 4	0.51	广金钱草
9	5.345	carlinside	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	581.151 4	0.61	广金钱草
10	5.608	夏佛塔苷	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	565.157 1	1.30	广金钱草
11	5.641	异荭草苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.108 3	0.88	广金钱草
12	6.093	异牡荆苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.114 3	0.21	广金钱草
13	7.802	木犀草素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.055 7	0.48	广金钱草、车前草、玉米须
14	10.365	大豆皂苷 I	C <sub>48</sub> H <sub>78</sub> O <sub>18</sub>	943.525 6	0.88	广金钱草

表6 正交试验结果与分析

编号	A超声提取时间(t/min)	B温度(t/°C)	C乙醇比例(%)	峰面积之和
1	-1	-1	-1	75 366 773
2	-1	0	0	77 378 233
3	-1	1	1	68 003 293
4	0	-1	0	70 701 815
5	0	0	1	66 623 731
6	0	1	-1	64 767 084
7	1	-1	1	67 083 883
8	1	0	-1	70 310 818
9	1	1	0	70 357 457
K <sub>1</sub>	73 582 766	71 050 823	70 148 225	-
K <sub>2</sub>	67 364 210	71 437 594	72 812 501	-
K <sub>3</sub>	69 250 719	67 709 278	67 236 969	-
R	6 218 556	3 728 316	5 575 532	-
最优水平	A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	-
主次因素		A>C>B		
最优工艺		A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>		

注：“-”表示无数值

提取时间对复方金钱草颗粒的提取效果影响最大,其次是乙醇比例,最后是超声温度。结果表明,适宜超声提取时间和温度能促进化合物的溶出,但当超声提取时间过长、温度过高时,可能会破坏物质的结构,使得溶出的化合物含量反而降低;适宜的乙醇比例可以使复方金钱草颗粒中的水溶性和脂溶性成分都能最大限度的溶出。

进一步采用 IBM SPSS Statistics 19 软件对正交试验结果进行方差分析,各因素对复方金钱草颗粒的提取效果由  $F$  值和  $P$  值进行检验,具体结果见表 7。

对表 7 结果进行分析,影响复方金钱草颗粒提取效果的因素中,  $A>C>B$ ,这与上述根据表 6 的极差得到的结果一致。显著性分析发现,因素 A 和因

表7 方差分析表

变异来源	III型平方和	自由度	均方	F值	P值
A	6.100×10 <sup>13</sup>	2	3.050×10 <sup>13</sup>	26.298	0.037*
B	2.522×10 <sup>13</sup>	2	1.261×10 <sup>13</sup>	10.872	0.084
C	4.666×10 <sup>13</sup>	2	2.333×10 <sup>13</sup>	20.117	0.047*
误差	2.319×10 <sup>12</sup>	2	1.160×10 <sup>12</sup>	-	-
校正的总计	1.352×10 <sup>14</sup>	8	-	-	-

注：“-”表示无数值；\*P<0.05,与同一因素不同水平间的比较

素C的P值<0.05,差异显著,而因素B>0.05,其差异无统计学意义。

### 3.7 响应曲面试验设计与实验结果

采用软件 Design-Expert 10,以超声提取时间、超声温度、乙醇比例为自变量,指标性化合物峰面积之和为响应值设计试验。共设17组试验点,其中,分析点12个,零点5个,零点代表重复实验,常用于估算试验误差。本试验方案及结果见表8。

将表8的试验结果输入 Design-Expert 10 软件进行综合分析,可以得到复方金钱草颗粒指标性成分峰面积之和与各因素变量的回归方程模型:

$$Y=7.659 \times 10^7 - 1.284 \times 10^6 A - 8.503 \times 10^5 B + 1.585 \times 10^6 C + 6.659 \times 10^5 AB - 27702.25 AC + 7.504 \times 10^5 BC - 5.730 \times 10^5 A^2 - 3.015 \times 10^6 B^2 - 4.833 \times 10^6 C^2$$

通过对表9的数据进行方差分析,可以看到该

表8 响应曲面试验方案及结果

编号	A超声提取时间 (t/min)	B超声温度 (t/°C)	C乙醇比例 (%)	峰面积之和
1	-1	1	0	73 380 679
2	1	0	1	71 275 671
3	1	-1	0	71 293 990
4	-1	-1	0	76 980 711
5	0	-1	1	71 217 813
6	0	0	0	76 591 184
7	0	0	0	76 591 050
8	1	0	-1	70 310 818
9	0	0	0	76 591 109
10	-1	0	-1	71 038 420
11	0	1	1	71 585 813
12	0	-1	-1	67 400 527
13	1	1	0	70 357 457
14	0	1	-1	64 767 084
15	0	0	0	76 591 095
16	-1	0	1	72 114 082
17	0	0	0	76 591 123

模型的P<0.01, r=0.960,失拟项显著,说明该模型虽存在试验误差,但模型拟合度较好,能够用来预测复方金钱草提取效果与各因素变量的关系。同时,各因素显著性分析显示,超声提取时间(A)以及乙醇比例(C)的P<0.05,说明它们对复方金钱草颗粒的提取效果作用明显,而超声温度对其提取效果影响不显著,这与前面的正交试验结果相一致。

表9 响应曲面二次回归模型的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.909×10 <sup>14</sup>	9	2.121×10 <sup>13</sup>	9.130	0.004 1
A	1.320×10 <sup>13</sup>	1	1.320×10 <sup>13</sup>	5.680	0.048 6
B	5.783×10 <sup>12</sup>	1	5.783×10 <sup>12</sup>	2.490	0.158 6
C	2.009×10 <sup>13</sup>	1	2.009×10 <sup>13</sup>	8.650	0.021 7
AB	1.774×10 <sup>12</sup>	1	1.774×10 <sup>12</sup>	0.760	0.411 2
AC	3.070×10 <sup>9</sup>	1	3.070×10 <sup>9</sup>	0.001	0.972 0
BC	2.252×10 <sup>12</sup>	1	2.252×10 <sup>12</sup>	0.970	0.357 6
A <sup>2</sup>	1.382×10 <sup>12</sup>	1	1.382×10 <sup>12</sup>	0.600	0.465 7
B <sup>2</sup>	3.827×10 <sup>13</sup>	1	3.827×10 <sup>13</sup>	16.480	0.004 8
C <sup>2</sup>	9.836×10 <sup>13</sup>	1	9.836×10 <sup>13</sup>	42.350	0.000 3
残差	1.626×10 <sup>13</sup>	7	2.323×10 <sup>12</sup>	-	-
失拟项	1.626×10 <sup>13</sup>	3	5.420×10 <sup>12</sup>	2.295×10 <sup>9</sup>	<0.000 1
纯误差	9 446.800	4	2 361.700	-	-
总误差	2.072×10 <sup>14</sup>	16	-	-	-
r	0.960	-	-	-	-

注：“-”表示无数值

### 3.8 响应曲面各因素间的交互分析

利用 Design-Expert 10 软件可以得到其等高线图和3D响应曲面图,如图4所示。其中,等高线的形状反映两者交互作用的强弱,圆形代表交互作用弱,椭圆形代表交互作用强。观察发现,A图显示的超声提取时间和乙醇比例交互作用最强,B图显示的超声提取时间和超声温度交互作用次之,C图显示的超声温度和乙醇比例交互作用最弱。

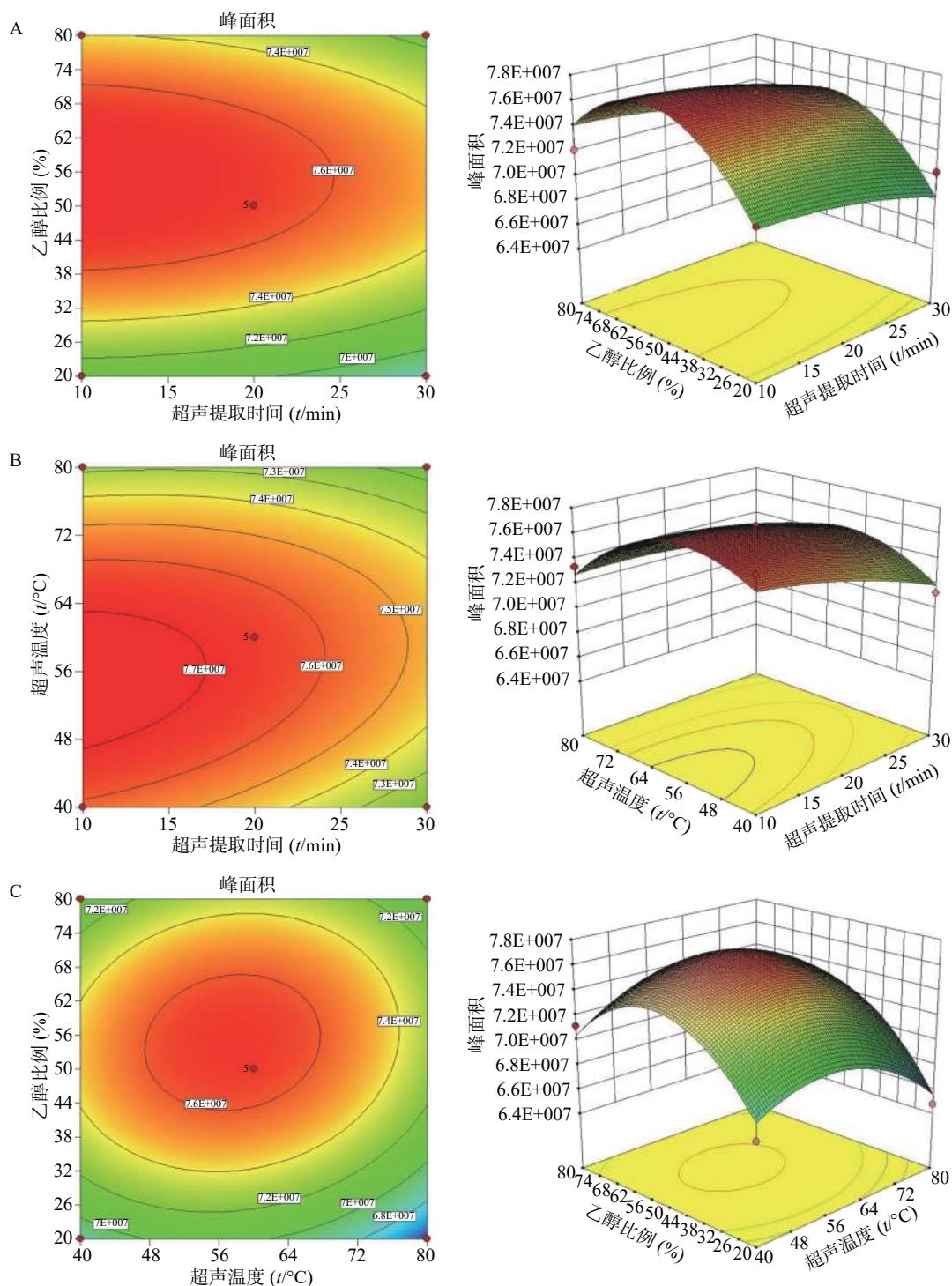


图4 超声提取时间、超声温度及乙醇比例两两交互对峰面积的影响

A. 超声温度为 60 °C 时, 超声提取时间、乙醇比例交互作用对峰面积的影响; B. 乙醇比例为 50% 时, 超声提取时间、超声温度交互作用对峰面积的影响; C. 超声提取时间为 20 min 时, 超声温度、乙醇比例交互作用对峰面积的影响。

### 3.9 复方金钱草颗粒最优提取参数预测及验证

使用回归模型进行最优提取参数预测, 得到当超声提取时间为 10 min, 超声温度为 55.12 °C, 乙醇比例为 54.56% 时, 得到的指标性峰面积之和为 77 471 863.44。结合实际操作, 选用超声提取时间 10 min, 超声温度 55 °C, 乙醇比例 55% 进行验证, 经 3 次平行试验, 得到其平均值为 77 978 123.33,

RSD 为 1.91%, 与模型的预测值基本一致, 表明该预测模型的稳定性强、适用性良好。

## 4 结论

本研究的评价指标为 14 个指标性有效成分的峰面积之和, 以乙醇为提取溶剂, 采用正交试验和响应曲面法进行复方金钱草颗粒提取工艺的优化,

正交试验结果显示,其最佳提取工艺参数为超声提取时间 10 min, 超声温度 60 ℃, 乙醇比例 50%; 响应曲面法则通过回归模型对复方金钱草颗粒提取工艺参数进行预测, 得到其预测的最佳参数为: 超声提取时间 10 min, 超声温度 55 ℃, 乙醇比例 55%, 通过两种试验方法得到的参数基本一致, 且通过响应曲面法预测得到的峰面积之和更大。综上所述, 我们选择工艺参数为: 超声提取时间 10 min, 超声温度 55 ℃, 乙醇比例 55%, 并在此提取条件下进行验证, 其 UHPLC-TOF/MS 图谱中峰面积之和平均值为 77 978 123.33, 说明该模型稳定可靠, 可以用于复方金钱草颗粒的提取。

由于前期采用水提法提取复方金钱草颗粒, 导致水溶性小的成分没有被完全提取出来, 故而改进方法, 采用一定比例的乙醇溶液为提取溶剂, 并且优化了最佳提取时间和温度, 使得其指标性有效成分都能被有效提取, 并为后续复方金钱草的药效和药理研究提供可靠的方法依据。

【参考文献】

[1] 甘星, 许远斌, 马治平, 等. 复方金钱草颗粒治疗急性输尿管结石临床研究[J]. 河南中医, 2015, 35(10): 2539-2541.  
 [2] 朱陈辉, 黄海文, 高绍青, 等. 体外冲击波联合复方金钱草颗粒、哈乐在治疗经皮肾镜碎石术后残石的临床疗效分析[J]. 中国医药科学, 2019, 9(2): 226-230.  
 [3] 周军, 韦桂宁, 吴超伟, 等. 复方金钱草颗粒对肾结石的影响及其利尿、解痉、抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 206-209.

[4] 崔建敏, 裴保方. 广金钱草多糖的提取工艺及其体外抗氧化活性研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(12): 986-989.  
 [5] 刘学, 崔健, 陈新. 广金钱草现代研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(4): 84-85.  
 [6] 范文昌, 梅全喜, 赖海标. 广金钱草的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2961-2963.  
 [7] 张雪芹, 曲玮, 梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(11): 1-8.  
 [8] 钟鸣, 柴玲. 广金钱草化学成分及药理作用研究进展[J]. 广西医学, 2018, 40(1): 80-82.  
 [9] 李锐. 广金钱草化学成分及分析方法的研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 86-87.  
 [10] MALINI M M, LENIN M, VARALAKSHMI P. Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal-induced peroxidative changes in experimental urolithiasis[J]. Pharmacol Res, 2000, 41(4): 413-418.  
 [11] ZHOU J F, JIN J, LI X, et al. Total flavonoids of *Desmodium styracifolium* attenuates the formation of hydroxy-L-proline-induced calcium oxalate urolithiasis in rats[J]. Urolithiasis, 2018, 46(3): 231-241.  
 [12] 李惠芝, 庄利民. 广金钱草抑制一水草酸钙结晶生长有效成分的研究[J]. 沈阳药学院学报, 1992, 9(3): 194-195.  
 [13] 杨蓉, 郑虎占. 中药煎煮法的现代研究概况[J]. 中国医药科学, 2012, 2(17): 44-46.  
 [14] 李婷, 陈文学, 田娟娟, 等. 加热回流法提取草果中抗氧化成分的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(8): 23-26.  
 [15] 王秋红, 赵珊, 王鹏程, 等. 半仿生提取法在中药提取中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 187-191.  
 [16] 郭澄, 张纯, 林厚文, 等. 正交试验在中药制剂研究中应用[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 360-362.

【收稿日期】 2019-10-08 【修回日期】 2019-12-05

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 17 页)

[31] 谢新芳, 温燕, 高守红, 等. 丙戊酸钠及其代谢产物的体外肝毒性研究[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(1): 43-47, 53.  
 [32] ZHAO M M, ZHANG T, LI G F, et al. Associations of CYP2C9 and CYP2A6 polymorphisms with the concentrations of valproate and its hepatotoxic metabolites and valproate-induced hepatotoxicity[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 121(2): 138-143.  
 [33] 李新林, 张媿, 周敬凯, 等. CYP2A6基因多态性对丙戊酸肝毒性的影响[C]/第四届全国治疗药物监测学术年会论文集. 长沙, 2014: 44.  
 [34] JAFARIAN I, ESKANDARI M R, MASHAYEKHI V, et al. Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria[J]. Toxicol Mech Methods, 2013, 23(8): 617-623.  
 [35] CHEN Z J, WANG X D, WANG H S, et al. Simultaneous determination of valproic acid and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients

with epilepsy[J]. Seizure, 2012, 21(2): 110-117.

[36] SARUWATARI J, DEGUCHI M, YOSHIMORI Y, et al. Superoxide dismutase 2 Val16Ala polymorphism is a risk factor for the valproic acid-related elevation of serum aminotransferases[J]. Epilepsy Res, 2012, 99(1-2): 183-186.  
 [37] 陈卓佳, 王雪丁, 王红胜, 等. ACSM 2A和CPT 1A基因多态性与丙戊酸所致不良反应的相关性研究[C]. 第十届全国药物和化学异物代谢学术会议暨第三届国际 ISSX/CSSX 联合学术会议论文集, 2012: 232-233.  
 [38] 王化明, 赖萍, 谢娟. 用NONMEM法建立癫痫患者丙戊酸群体药代动力学模型[J]. 今日药学, 2012, 22(1): 1-6.  
 [39] JIANG D C, BAI X R, ZHANG Q X, et al. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genotypes on pharmacokinetic variability of valproic acid in Chinese epileptic patients: nonlinear mixed-effect modeling[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(12): 1187-1193.

【收稿日期】 2019-06-10 【修回日期】 2019-10-11

【本文编辑】 李睿旻