

引用:杨梅萍,谢瑜,王艾琳,邓钰文,匡创富,刘杨.肾安汤的提取工艺优化及化学成分分析[J].中医导报,2025,31(5):63-70.

中 药

肾安汤的提取工艺优化及化学成分分析*

杨梅萍,谢瑜,王艾琳,邓钰文,匡创富,刘杨
(湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

[摘要] 目的:优化肾安汤的提取工艺,分析其化学成分。方法:以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量及浸膏得率作为综合评分的指标,将提取次数、提取时间、加水量作为考察因素,采用Box-Behnken响应面法,在单因素试验基础上优选肾安汤的提取工艺并开展验证试验;利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术分析肾安汤的化学成分。结果:肾安汤最佳提取工艺为提取次数3次,提取时间60 min,加水量12倍。肾安汤中鉴定出了74种化学成分,主要包括黄酮类、皂苷类和有机酸类等,并对这些化合物的来源进行了归属。结论:优化后的肾安汤提取工艺稳定可行、重现性好,建立的UPLC-Q-TOF-MS分析方法可对肾安汤中的化学成分进行快速识别和鉴定,可为肾安汤药效物质基础和质量控制的研究提供科学依据。

[关键词] 肾安汤;提取工艺;Box-Behnken响应面法;超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱;药效物质
[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)05-0063-08
DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.05.011

Extraction Process Optimization and Chemical Constituents Analysis of Shen'an Decoction (肾安汤)

YANG Meiping, XIE Yu, WANG Ailin, DENG Yuwen, KUANG Chuangfu, LIU Yang
(The Second Hospital Affiliated of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410005, China)

[Abstract] Objective: To optimize the extraction process of Shen'an decoction and analyze its chemical components. Methods: The content of calycosin glucoside, salvianolic acid B and extract yields were taken as the comprehensive scoring indicators, and the extraction frequency, extraction time, and amount of water added were taken as factors. Based on the single factor test, the extraction was optimized by Box-Behnken design-response surface methodology, and validation tests were carried out. To study the chemical constituents in Shen'an decoction by (ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight high resolution-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS). Results: The optimized extraction process of Shen'an decoction included 3 times of extractions, 60 min of extraction and 12 times of water. A total of 74 chemical constituents in Shen'an decoction were identified, including flavonoids, saponins and acids, and the medicinal sources of the compounds were assigned. Conclusion: The extraction process of Shen'an decoction is stable, feasible and reproducible after optimization. The established method of UPLC-Q-TOF-MS can quickly identify the chemical components in Shen'an decoction, and provide scientific basis for the study of the pharmacodynamic substance basis and quality control of Shen'an decoction.

[Keywords] Shen'an decoction; extraction technology; Box-Behnken response surface methodology; UPLC-Q-TOF-MS; pharmacodynamic substances

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)是指各种原因导致的慢性肾脏结构或功能紊乱,对患者的身心健康造成了严重危害。目前西医治疗CKD仅对症支持,尚无特效药物,而中医临床上经方和验方展现出了独特的效果。本院刘新祥主任医师在临床实践中总结出“脾肾双补”法,并自拟经验方肾安汤治疗CKD。该方主要由黄芪、白术、丹参、淫羊藿、

党参、山药、芡实、仙茅、山楂、当归、升麻、甘草12味中药组成。肾安汤对肾病综合征、原发性肾炎、狼疮性肾炎及糖尿病肾脏病具有良好的治疗作用^[1-4],且无不良反应。目前肾安汤提取方法和质量控制方法尚未优化确立,制约其进一步开发成肾安宁颗粒(与肾安汤同方不同剂型)。因此,本研究拟在保持肾安汤配方组成和配比不变的前提下,筛选最优的水提

*基金项目:湖南省卫生健康委卫生科研项目(W20243268);湖南中医药大学校院联合基金项目(2024XYLH052)

通信作者:谢瑜,男,主管药师,研究方向为中医药防治代谢性疾病作用机理与物质基础研究

工艺。Box-Behnken响应面设计法是常用于多因素优化试验的方法之一,该方法具有精密度高、试验数量少、模型预测性能好等特点^[5-6]。中药提取工艺经过Box-Behnken响应面设计优化,不仅能对中药提取工艺中各种影响因素进行系统考察,还能对各种因素之间的相互影响程度进行检验,从而有效地减少主观因素对提取结果产生的偏离影响,使试验结果更加合理和科学^[7-8]。超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术不仅可以迅速而全面地解析中药复方中的复杂化学成分,还可对药物中各成分进行定性定量,近年来已被广泛应用于中药化学成分分析、药效物质基础研究等方面。本研究运用Box-Behnken响应面设计法,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量及浸膏得率3个指标进行综合评价,筛选肾安汤最佳提取工艺,并进一步运用UPLC-Q-TOF-MS技术对其成分进行分析,旨在为肾安宁颗粒的开发及其药效物质基础研究奠定基础。

1 材 料

1.1 主要仪器 WatersXevo G2-XS QTOF超高效液相-高分辨飞行时间质谱联用仪(美国Waters公司);Agilent 1260高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);R300旋转蒸发仪(瑞士步琦有限公司);AL204电子分析天平[梅特勒托利多科技(中国)有限公司];KQ-800B超声波清洗仪(昆山舒美超声仪器有限公司);BZF-50真空干燥箱(上海博迅仪器有限公司)。

1.2 药物与试剂 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号:111920-201606,质量分数97.6%)、丹酚酸B(批号:111562-201917,质量分数96.6%)均购自中国食品药品检定研究院;黄芪(批号:20230701)、白术(批号:20230607)均购自湖南新汇制药有限公司;淫羊藿(批号:202307030076)、党参(批号:202307030045)、仙茅(批号:20230608008)、山药(批号:2306300140)、芡实(批号:202307060089)、丹参(批号:202307190118)、当归(批号:202307190108)、山楂(批号:202307190098)、升麻(批号:202307030063)及甘草(批号:20230606186)均购自湖南三湘中药饮片有限公司。上述中药材经湖南省中医院王青主任药师鉴定,均为正品。甲醇(国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号:20211130,);甲酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯,批号:20171214);乙腈(赛默飞世尔科技公司,色谱纯,批号:230316);甲酸(上海安谱科学仪器有限公司,色谱纯,批号:F2110100)。

2 方法与结果

2.1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷与丹酚酸B含量检测

2.1.1 色谱条件 采用Waters XBridge C₁₈(4.6 mm×250.0 mm, 5.0 μm)色谱柱,以乙腈-0.4%甲酸水为流动相进行梯度洗脱(见表1),流速为1.0 mL/min,柱温为25℃,检测波长为260 nm,进样量为10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	乙腈/%	0.4%甲酸水/%
0	20	80
12	32	68
19	34	66
25	40	60
30	40	60

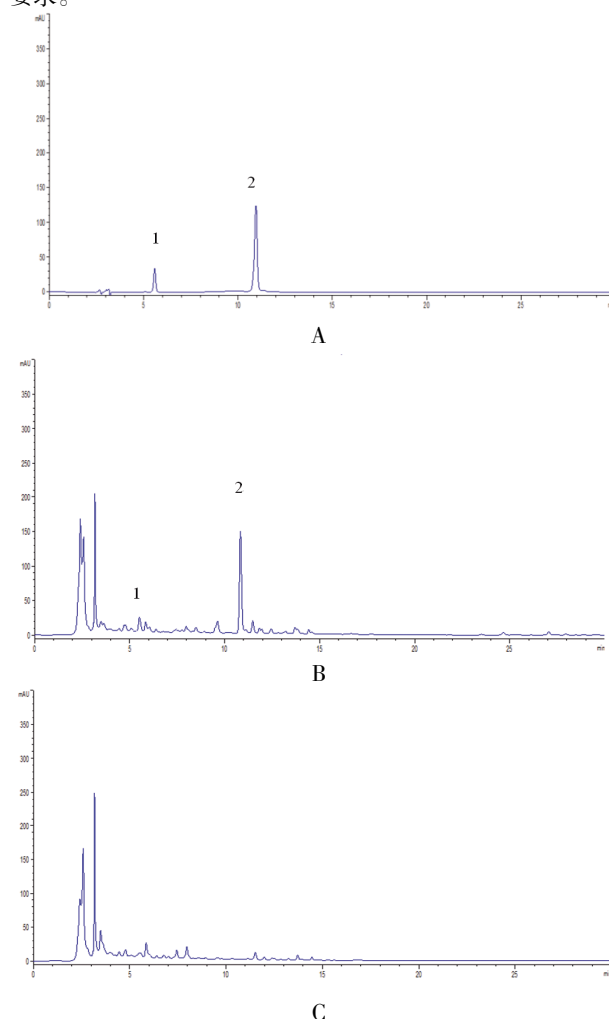
2.1.2 溶液的配制

2.1.2.1 混合对照品溶液的配制 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B对照品置于10 mL容量瓶,用甲醇溶解稀释,得到每1 mL含毛蕊异黄酮葡萄糖苷0.900 mg、丹酚酸B 0.113 mg的混合对照品溶液。

2.1.2.2 供试品溶液的配制 用水煎法对肾安汤进行提取,提取液经减压浓缩、真空干燥制成干浸膏。精密称取0.15 g干浸膏,加入80%甲醇10 mL,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min后,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液即得。

2.1.2.3 阴性对照品溶液的配制 称取肾安汤组方(黄芪、丹参除外)的其他药材,用水煎提取,按照“2.1.2.2”项方法制备缺少黄芪和丹参的阴性对照品溶液。

2.1.3 系统适用性试验 精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录对应的色谱图。(见图1)供试品与对照品色谱图在相应保留时间处有相同的色谱峰,而阴性对照品在相应色谱峰处未受干扰,且毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B的理论塔板数均大于3 000,对应色谱峰的分离度均大于1.5,达到系统适用性要求。



注:1.毛蕊异黄酮葡萄糖苷;2.丹酚酸B。

图 1 混合对照品(A)、供试品(B)、阴性对照品(C)的高效液相色谱图

2.1.4 方法学考察 按照2020年版《中华人民共和国药典》的

方法^[9],根据“2.1.1”项下色谱条件进行方法学考察。结果显示含量测定的各指标均符合要求。(见表2)

表 2 肾安汤中指标成分含量检测结果

指标成分	线性关系	RSD/%			
		精密度	稳定性	重复性	加样回收率
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=18.425X+21.571(r=0.999\ 0)$	0.45	0.81	0.25	1.59
丹酚酸B	$Y=101.400X+41.429(r=0.999\ 5)$	0.28	1.37	0.90	1.95

2.1.5 浸膏得率的测定 精密吸取供试品溶液适量置于蒸发皿中,在水浴锅上将其浓缩到稠膏状,转移到真空干燥至质量恒定,精密称定,计算浸膏得率。

2.1.6 样品含量测定和综合指标计算 对照品和供试品溶液按“2.1.1”项下方法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B含量。依据处方的配方原则和药材物理化学性质以及药理效应,以毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量和浸膏得率作为评估标准进行全面评分,运用单因素分析和Box-Behnken响应面设计对提取工艺进行进一步优化。其中,毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量和浸膏得率的权重被设定为0.4、0.4、0.2,总分为100分。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取次数的考察 在加水量10倍、提取时间为1 h的条件下,进行1、2、3、4次提取试验,分别测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量及浸膏的得率。结果显示,当提取次数增加至3次时,综合评分相应上升,但提取次数为4次时,综合评分并没有持续上升,可能与毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B化学性状不太稳定有关。因此,选择提取次数4、3、2次进行Box-Behnken试验。(见图2)

2.2.2 提取时间的考察 在加水量10倍、提取次数为1次的条件下,考察30、60、90、120 min提取时间,并分别测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B含量以及浸膏得率。结果显示综合评分在120 min时最低,60 min时最高。原因可能为长期处于高

温提取环境导致毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B的化学结构稳定性降低。因此,本研究选择90 min、60 min和30 min来进行Box-Behnken试验。(见图2)

2.2.3 加水倍量的考察 按处方比例称取药材,在提取时间为1 h、提取次数为1次的条件下,考察加入肾安汤处方量饮片8、10、12、14倍水,分别测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B含量和浸膏得率。结果显示综合评分在加水量为12倍时最高,加水量为8倍时最低,故本研究选择加水10、12、14倍进行Box-Behnken试验。(见图2)

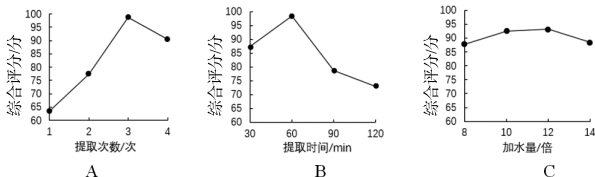


图 2 提取次数(A)、提取时间(B)及加水量(C)对综合评分的影响

2.3 Box-Behnken响应面设计试验考察

2.3.1 方案设计 基于单因素试验数据,影响因素选择提取次数(A)、提取时间(B)和加水量(C),综合评分指标选择毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B含量和浸膏得率,并按照“2.1.6”项下方法综合评分。通过对Box-Behnken响应面数据的分析和评估,从而对肾安汤的工艺条件进行优化。设计因素和水平见表3,Box-Behnken结果见表4。

表 3 响应面分析试验设计因素及水平

水平	因素		
	提取次数/次	提取时间/min	加水量/倍
-1	2	30	10
0	3	60	12
1	4	90	14

2.3.2 模型拟合及分析 各因素水平采用Design-Expert 13

表 4 Box-Behnken 设计-响应面法试验结果

试验号	提取次数/次	提取时间/min	加水量/倍	毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量/(mg/g)	丹酚酸B含量/(mg/g)	浸膏得率/%	综合评分/分
1	2	30	12	9.23	2.77	34.36	75.38
2	2	60	10	10.14	2.40	37.38	75.31
3	4	30	12	10.28	2.86	39.15	81.81
4	3	60	12	13.11	2.81	40.19	90.23
5	3	90	14	11.78	2.27	40.91	80.47
6	4	60	10	13.16	2.33	39.26	84.56
7	2	90	12	9.48	2.62	37.91	76.10
8	3	30	10	9.97	2.78	40.02	80.39
9	2	60	14	11.53	2.24	39.76	78.87
10	3	30	14	10.11	3.20	35.48	83.32
11	3	90	10	9.88	3.19	40.17	84.75
12	3	60	12	13.09	2.82	40.94	90.65
13	3	60	12	13.37	2.88	40.95	92.17
14	3	60	12	11.47	3.34	40.45	91.41
15	3	60	12	11.74	3.56	40.50	94.75
16	4	60	14	11.96	2.14	41.28	79.78
17	4	90	12	11.36	2.11	41.29	77.51

软件进行分析,得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B和浸膏得率的综合评分(Y)的二次多项回归模型方程、响应面回归模型方差分析结果。(见表5)并按照所得模型,绘制提取次数(A)、提取时间(B)、加水量(C)对肾安汤提取工艺影响的3D响应面图和等高线图。(见图3)二次多项回归方程为: $Y=91.79+2.25A-0.26B-0.32C-1.25AB-2.09AC-1.80BC-8.34A^2-5.74B^2-3.81C^2$ 。

该模型拟合统计预测 R^2 值为0.874 3,经调整后 R^2 值为0.945 8,差值低于0.2,说明具有合理一致性;模型的信噪比为15.377 5,通常情况下,当信噪比超过4时是较理想的。因素AC、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 对综合评分有显著影响。本试验模型拟合具有极显著性($P<0.01$),失拟项 $P>0.05$,表明预测值与实测值间不存在失拟现象。该回归模型预测性与可信度良好,建立拟合模型可有效优化分析与预测肾安汤提取工艺。

表 5 响应面回归模型方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	622.41	9	69.16	32.02	<0.000 1
A-提取次数	40.50	1	40.50	18.75	0.003 4
B-提取时间	0.54	1	0.54	0.25	0.633 7
C-加水量	0.83	1	0.83	0.38	0.556 0
AB	6.30	1	6.30	2.92	0.131 4
AC	17.39	1	17.39	8.05	0.025 1
BC	13.00	1	13.00	6.02	0.043 9
A^2	293.16	1	293.16	135.74	<0.000 1
B^2	138.81	1	138.81	64.27	<0.000 1
C^2	61.18	1	61.18	28.33	0.001 1
残差	15.12	7	2.16		
拟失项	3.91	3	1.30	0.465 7	0.721 9
误差	11.20	4	2.80		
总和	637.53	16			

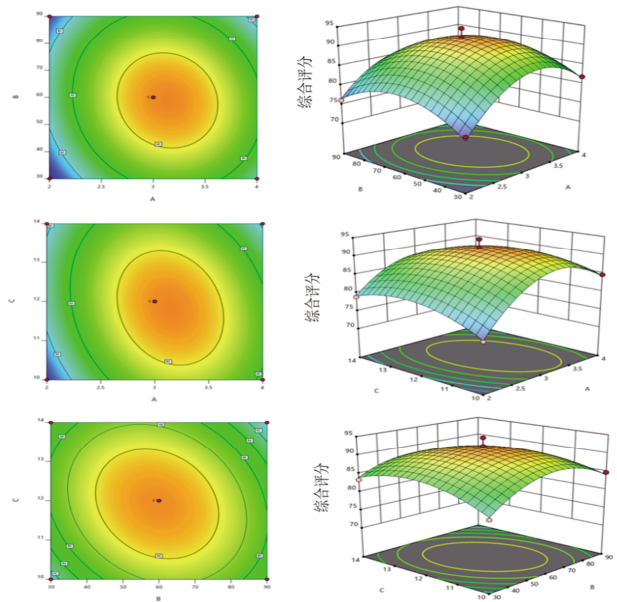


图 3 三因素交互作用对综合评分的响应面图和等高线图

2.3.3 最佳条件预测 通过Design-Expert 13软件中Box-Behnken设计-响应面法,对肾安汤提取工艺最佳条件进行优

化预测。根据拟合方程、各因素间等高线图和3D响应面图,预测当综合评分达91.966分时,对应最佳提取工艺为提取次数3.147次,提取时间59.186 min,加水量11.848倍。考虑到实际生产操作,对最佳提取工艺调整为:提取次数为3次,提取时间为60 min,加水量为12倍。

2.3.4 验证试验 根据Box-Behnken设计-响应面法预测的肾安汤最佳提取工艺,进行3次平行试验,采用“2.1.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件和“2.1.5”项下方法测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B的含量及浸膏得率。结果见表6。优化后的提取工艺稳定性好、重复性较高,表明该模型具有合理性和可行性。

表 6 验证实验结果

试验号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/(mg/g)	丹酚酸B/(mg/g)	浸膏得率/%	综合评分/分	平均值/分	RSD/%
1	12.13	3.25	40.74	92.44		
2	12.33	3.32	40.65	93.82	92.54	1.33
3	12.03	3.21	40.02	91.37		

2.4 肾安汤的化学成分分析

2.4.1 色谱条件 选择Acquity UPLC® HSST3(100.0 mm×2.1 mm,1.8 μm)色谱柱;流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈溶液(B)进行梯度洗脱(见表7),流速为0.3 mL/min,柱温为45℃,进样量为5 μL。

表 7 梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0.0	90	10
7.0	80	20
14.0	65	35
21.0	60	40
30.0	50	50
38.0	20	80
45.0	10	90
47.1	90	10
50.0	90	10

2.4.2 质谱条件 以电喷雾为离子源,正负离子为工作模式;离子源的温度设定为100℃;脱溶剂的温度为550℃;脱溶剂的气流速度为600 L/h;锥孔中的气流速度为50 L/h;毛细管的电压定为2 kV;锥形孔的电压为40 eV;工作方式MSE模式;扫描方式为灵敏度模式;扫描的范围为 m/z 50~1 200;扫描时间1.0 s;碰撞能量为低碰撞能量为off;高碰撞能量区间为20~40 eV。

2.4.3 供试品溶液的制备 根据肾安汤处方配比称取药材,采用水煎法提取3次,每次加水量为12倍,提取时间为60 min,合并3次提取液,经减压浓缩和真空干燥制成干浸膏。精密称取干浸膏适量至锥形瓶内,加入甲醇10 mL并称重,超声(功率250 W,频率40 kHz)提取30 min,放冷后加甲醇补减失质量,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4.4 UPLC-Q-TOF-MS分析结果 按“2.4.2”项下质谱条件,利用UPLC-Q-TOF-MS技术,对肾安汤供试品进行化学成分分析,获得其正、负离子模式下的总离子流图。(见图4)进一

步参考自建数据库,并结合化学成分的裂解规律和相关文献资料,共鉴定出74个化合物,并对并其来源进行归属。(见表8)

3 讨 论

在优化提取工艺的过程中,选择合适的评价指标至关重要。评价指标不仅需要考虑药物的物理化学性质,还必须兼

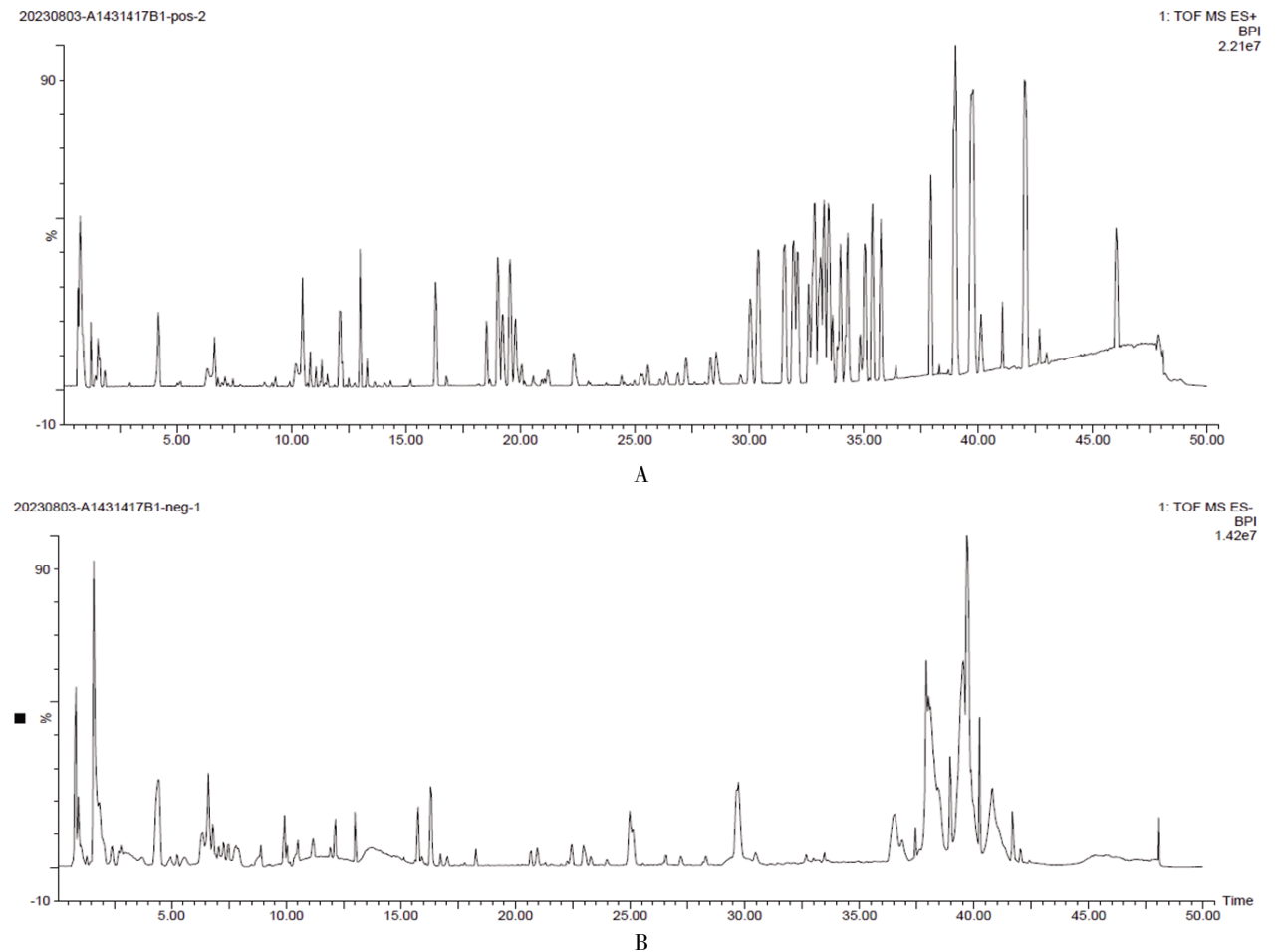


图 4 肾安汤在正离子(A)和负离子(B)模式下的总离子流图

表 8 肾安汤化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定

序号	化合物名称	t_R/min	质荷比(m/z)	加和离子	δ/ppm	分子式	二级质谱(m/z)	来源
1	精氨酸	0.75	175.118 5	+H	-0.5	$C_6H_{14}N_4O_2$	70, 158	甘草、当归、芡实
2	棉子糖	0.80	503.161 1	-H	-0.6	$C_{18}H_{32}O_{16}$	191, 383, 341, 179	党参
3	缬氨酸	0.83	118.085 1	+H	-1.1	$C_5H_{11}NO_2$	100, 84, 69	山药
4	2,4-二羟基苯乙酮	1.55	151.039 9	-H	-0.2	$C_9H_8O_3$	93, 109	当归
5	党参碱	1.62	268.153 6	+H	-0.7	$C_{14}H_{21}NO_4$	88, 161, 84	党参
6	奎尼酸	1.65	191.056 1	-H	0.0	$C_7H_{12}O_6$	85, 93, 109	山楂
7	没食子酸	1.66	169.012 4	-H	-1.8	$C_7H_6O_5$	109, 108, 152, 137	芡实、山楂
8	香草醛	2.39	151.039 8	-H	-0.3	$C_8H_8O_3$	123, 135, 121, 134	当归
9	丹参素	2.40	197.045 2	-H	-0.3	$C_{10}H_{10}O_5$	151, 123, 135, 179	丹参
10	新绿原酸	2.87	353.085 3	-H	-2.5	$C_{16}H_{18}O_9$	191, 111, 115, 135	淫羊藿、党参
11	苹果酸	3.03	133.014 1	-H	-0.2	$C_4H_6O_5$	115, 85, 71, 87	芡实
12	咖啡酸	3.04	179.034 4	-H	-0.6	$C_9H_8O_4$	134, 108, 71, 92	黄芪、党参、当归、芡实、升麻
13	芦丁	3.25	609.145 7	-H	-0.4	$C_{27}H_{30}O_{16}$	489, 267, 399, 369	山楂
14	3-芸香糖鞣皮素	3.26	611.160 2	+H	-0.5	$C_{27}H_{30}O_{16}$	144, 511, 147	山楂
15	绿原酸	3.59	353.086 3	-H	-1.5	$C_{16}H_{18}O_9$	191, 135, 165, 179	山楂、当归
16	柠檬酸	4.89	191.019 2	-H	-0.5	$C_6H_8O_7$	112, 101	山楂、山药、芡实
17	异阿魏酸	4.94	193.050 2	-H	-0.4	$C_{10}H_{10}O_4$	161, 134, 133, 175	升麻
18	阿魏酸	5.58	193.050 3	-H	-0.3	$C_{10}H_{10}O_4$	133, 179, 177	当归、黄芪、党参、山药、芡实、升麻
19	3'-甲氧基-5'-羟基异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷	6.40	447.128 5	+H	-0.1	$C_{22}H_{22}O_{10}$	285, 270, 137, 253	黄芪
20	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -D-葡萄糖苷	6.42	461.144 9	-H	-0.5	$C_{23}H_{26}O_{10}$	161, 256, 133, 179	黄芪

续表8:

序号	化合物名称	t_R/min	质荷比 (m/z)	加和离子	δ/ppm	分子式	二级质谱 (m/z)	来源
21	异甘草呋喃糖苷	6.58	549.161 1	-H	-0.3	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	255, 135, 285, 417	甘草
22	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	6.60	447.128 4	+H	-0.2	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	285, 270, 137, 253	黄芪
23	槲皮素	6.78	303.049 5	+H	-0.5	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	287, 153, 285, 289	山楂
24	金丝桃苷	6.80	463.088 3	-H	0.1	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{12}$	30, 15	山楂
25	2''-O-鼠李糖基牡荆素	7.01	595.166 6	-H	-0.3	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	459, 271, 151, 464	山楂
26	木犀草素	7.22	287.054 1	+H	-0.9	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	271, 153, 135	党参
27	木犀草苷	7.25	447.093 3	-H	0.0	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$	285, 327, 297, 430	党参
28	7-O- α -L-鼠李糖-3-O- β -D-葡萄糖山柰酚	7.45	593.151 0	-H	-0.2	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	261, 579, 471, 309	山楂
29	8,3'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄酮	7.83	359.077 0	+HCOO	-0.2	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	161, 133, 179, 285	黄芪
30	5,7,4'-三羟基黄酮-8-C- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷	8.84	577.155 9	-H	-0.4	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	269, 431, 268, 285	山楂
31	丹酚酸A	9.69	493.113 7	-H	-0.3	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	295, 321, 185, 311	丹参
32	甘草苷	10.39	417.118 8	-H	-0.3	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	353, 255, 351, 252	甘草
33	紫草酸	10.47	539.118 3	+H	-0.1	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	521, 269, 323, 295	丹参
34	山楂苷 I	10.68	489.138 9	+H ₂ O+H	-0.3	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	285, 369, 270, 313	山楂
35	紫草酸单甲酯	11.24	551.118 4	-H	-1.1	$\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	293, 321, 519, 339	丹参
36	山柰酚	11.87	287.054 1	+H	-0.9	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	153, 181, 135, 229	黄芪
37	毛蕊异黄酮	12.13	285.075 3	+H	-0.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	270, 253, 137, 269	黄芪
38	朝藿定C	13.01	823.301 4	+H	-0.5	$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_{19}$	369, 531, 313, , 677	淫羊藿
39	淫羊藿苷	13.31	677.244 0	+H	0.0	$\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{O}_{15}$	369, 313, 531, 439	淫羊藿
40	紫丹参戊素	13.60	357.097 5	+HCOO	-0.4	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$	295, 279, 277, 265	丹参
41	丹酚酸B	13.71	717.145 3	-H	-0.8	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	321, 519, 339, 295	丹参
42	芹菜素	13.81	269.045 4	-H	-0.2	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	251, 117, 161	黄芪、党参、山药
43	山楂苷 I	14.56	501.103 4	+HCOO	-0.5	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$	267, 161, 151, 113	山楂
44	丹酚酸E	14.81	717.145 1	-H	-1.0	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	321, 519, 339, 295	丹参
45	仙茅皂苷 I	15.05	989.531 2	+HCOO	-1.5	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	797, 831, 112, 645	仙茅
46	异甘草内酯	15.22	469.330 2	+H	-1.0	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_4$	451, 439, 433, 350	甘草
47	芒柄黄花素	16.31	269.080 4	+H	-0.4	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	253, 237, 118, 137	黄芪、甘草
48	宝藿苷 II	16.74	499.161 0	-H	0.0	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$	353, 323, 309, 281	淫羊藿
49	黄芪甲苷	18.21	829.458 8	+HCOO	-0.3	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	503, 221, 171, 201	黄芪
50	甘草酸	18.53	823.411 1	+H	0.1	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	453, 471, 647, 435	甘草
51	黄芪皂苷II	20.66	871.469 8	+HCOO	0.1	$\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$	793, 781, 112, 765	黄芪
52	柴胡皂苷C	20.75	943.525 1	+H	-1.0	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$	423, 645, 441, 659	柴胡
53	异黄芪皂苷 II	21.30	825.464 0	-H	-0.2	$\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$	779, 617, 112, 221	黄芪
54	羟基白术内酯	22.04	247.133 6	-H	-0.4	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$	203, 175	白术
55	羟基丹参酮 II A	22.26	355.118 6	+HCOO	-0.1	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$	229, 109	丹参
56	淫羊藿素	22.46	367.118 7	-H	0.0	$\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_6$	309, 297, 351, 323	淫羊藿
57	甘草查耳酮A	23.05	357.168 6	+H ₂ O+H	-1.0	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_4$	123, 165, 307, 205	甘草
58	脱氧升麻烃	23.75	661.393 5	+H	-1.1	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$	283, 339, 583, 437	升麻
59	8-C-Prenylkaempferol	25.03	353.102 9	-H	-0.2	$\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{O}_6$	125, 227, 177, 151	淫羊藿
60	异黄芪皂苷 I	26.56	913.480 3	+HCOO	0.0	$\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{O}_{16}$	112, 183, 313, 825	黄芪
61	兴安升麻苷 I	28.18	677.390 6	-H	-0.1	$\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_{11}$	492, 617, 486, 635	升麻
62	白术内酯 II	28.98	233.152 3	+H	-1.3	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	105, 189, 187, 147	白术
63	新隐丹参酮	29.53	315.158 1	+H	-1.0	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$	297, 268, 279, 254	丹参
64	丹参酮 II B	32.77	297.148 2	+H	-0.3	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$	254, 279, 282, 268	丹参
65	亚麻酸	33.44	279.232 0	+H	0.2	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	107, 93, 91, 81	黄芪
66	乙酰黄芪皂苷 I	33.66	955.491 0	+HCOO	0.2	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{17}$	823, 299, 295	黄芪
67	5,7,4'-三羟基-8,3'-二异戊烯基黄酮	34.47	407.181 3	+H	-4.0	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$	351, 295, 149	淫羊藿
68	西麻苷 I	34.61	667.402 4	+H	-2.8	$\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{11}$	607, 583, 451, 220	升麻
69	升麻素	35.84	307.119 1	+H	1.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_6$	149, 217, 235	升麻
70	丹参酮 II A	36.39	295.132 4	+H	-0.5	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$	265, 252, 280, 220	丹参
71	丹参酮二酚	36.52	297.153 1	-H	3.5	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$	183, 197, 225, 198	丹参
72	Mongholicoside I	38.56	636.422 1	-e	-1.1	$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_9$	283, 591, 109, 206	黄芪
73	鞣酸	40.31	279.232 9	-H	-0.1	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_2$	163, 233, 205	山楂
74	Polycanthisine	41.35	226.179 6	+H ₂ O+H	-0.5	$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$	100, 95, 109, 149	黄芪

顾实际应用、经济和时间成本等方面。黄芪与丹参分别为肾安汤中的君药和臣药。黄芪的化学成分以多糖类、皂苷类、黄酮类、氨基酸及甾醇类为主。黄芪在慢性肾脏病中的主要活性成分可能为黄酮类物质^[10-11]。毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮葡萄糖苷不但可以抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞早期增生,还可缓解晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGES)介导的肾小球内皮细胞的凋亡,表明毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮葡萄糖苷能抑制糖尿病肾脏病的发展进程^[12]。丹参能够减轻肾脏病理损害,具有抗炎、抗氧化、抗凝和免疫调节功能。其水溶性活性成分具有改善肾功能和缓解肾纤维化作用^[13-14]。丹酚酸B为丹参水溶性活性成分中活性最强的一种,具有较强的抗肾纤维化效果^[15-16]。时洁等^[17]研究表明,丹参酚酸B能抑制炎症反应,降低大鼠肾脏组织和外周血中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)水平,清除体内自由基。故本研究以毛蕊异黄酮葡萄糖苷与丹酚酸B作为主要指标评价肾安汤的提取工艺。同时大部分中药的提取物有特殊的药理效果,并且考虑到浸膏提取率对药物剂量的影响,因此本研究将综合评分划分为3个主要指标,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和丹酚酸B含量的权重被设定为40,浸膏得率的权重被设定为20。

本研究以单因素试验为基础,探讨了提取次数、提取时间和加水量因素对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸B含量和浸膏得率的影响,并进一步采用Box-Behnken响应面法对多种因素进行拟合分析,以优选肾安汤提取工艺。方差分析显示,各指标在不同水平上的差异均达到显著水平,说明所选方法具有较高的预测准确性。同时试验结果还显示提取次数对于综合评分有极显著影响,3个因素对肾安汤提取工艺影响大小依次为提取次数>加水量>提取时间。此外,验证试验表明该提取工艺简单,稳定可行,重现性好,可为肾安汤推广应用及肾安宁颗粒研制开发奠定基础。

中药制剂质量评价多采用薄层色谱法和酸碱滴定方法,即使采用高效液相色谱法,指标成分仍然过于单一。这限制了对制剂整体质量的全面反映。在明确了肾安汤的提取工艺之后,本研究采用UPLC-Q-TOF-MS技术分析其化学组成,并鉴定出74种化合物。这些化合物主要包括黄酮、有机酸和皂苷,大部分来源于君药黄芪、臣药丹参和党参,以及佐使药山楂和甘草,且这些物质在各单味药中含量较高,也是治疗CKD的主要药效成分。黄芪甲苷可通过调控Toll/MyD88通路抑制末端通路炎症因子的释放,延缓肾脏纤维化的进程^[18]。木犀草素可通过核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)、信号传导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)途径来抑制炎症小体的活化,从而降低肾脏的纤维化程度,并减缓糖尿病肾脏病的发展^[19-20]。丹参多酚酸盐对细胞增殖有抑制作用,能够减轻肾小球基底膜通透性增加导致的肾小管间质水肿;丹参酮II A磺酸钠能降低糖尿病肾脏病患者肌酐和尿素氮含量,改善肾脏功能^[21]。甘草酸能够通过抑制转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和基质金属蛋

白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)等细胞因子蛋白和mRNA的表达,达到预防早期大鼠肾小球硬化的效果^[22]。槲皮素能够通过刺激海马来抑制肾小球系膜细胞的增生^[23]和TGF- β 1活性,延缓肾小球基底膜的增厚^[24],保持肾脏活性。山柰酚能抑制RhoA/Rho活化^[25],减缓大鼠肾小管细胞上皮向间质转化,改善肾脏的损伤和纤维化情况。金丝桃苷可通过抑制TGF- β 1/smads通路减轻糖尿病肾脏病大鼠肾脏纤维化^[26]。

综上所述,本研究优选了肾安汤提取工艺,并以此为基础分析鉴定其主要化学成分,这为进一步阐明肾安汤的药效物质基础、质量控制、临床应用推广和进一步开发成肾安宁颗粒提供了理论支持。然而,肾安汤中的挥发性有机物难以通过UPLC-Q-TOF-MS技术进行准确检测。因此,下一步研究可使用气相色谱-离子迁移谱(GC-IMS)技术对这些挥发性有机物进行全面系统分析。

参考文献

- [1] 董扬洲,李阳,周珂,等.肾安汤治疗脾肾阳虚证IgA肾病20例临床观察[J].中医药导报,2018,24(14):76-77.
- [2] 梁谋,钟建瑜,张震,等.肾安汤联合激素及免疫抑制剂治疗狼疮性肾炎30例[J].湖南中医杂志,2019,35(8):7-10.
- [3] 简维雄,毛以林,刘新祥,等.肾安汤对原发性肾病综合征肾小管的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2005,6(6):350-351.
- [4] 胡剑卓,陈跃飞,彭素娟.肾安汤加减治疗糖尿病肾病临床观察[J].中国中医药信息杂志,2009,16(6):61-62.
- [5] 赵国栋,洪璐,王倪,等.基于Box-Behnken响应面设计法结合熵权法优选脑络欣通方提取工艺[J].中南药学,2021,19(9):1848-1853.
- [6] 魏永鸽,黄贺梅,齐园圃,等.Box-Behnken设计-效应面法优化吴茱萸碱-羧基乙酸共聚物纳米粒处方及体外释药研究[J].中国医院药学杂志,2021,41(23):2416-2422.
- [7] 王俪桦,应泽茜,孙贝贝,等.基于Box-Behnken设计-响应面法优化蜜麦麸的制备工艺[J].中草药,2021,52(12):3538-3543.
- [8] 杨金枝,赵兴业,周开,等.Box-Behnken设计-效应面法优化根皮素纳米结构脂质载体处方研究[J].中国医院药学杂志,2021,41(20):2076-2081.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
- [10] 张宝霞,陈小飞,陈文佳,等.基于网络药理学探讨黄芪治疗慢性肾脏病的分子机制[J].河南中医,2022,42(11):1683-1688.
- [11] 伦龙威,赵代鑫,蔡小其,等.基于网络药理学的黄芪治疗慢性肾脏病的机制研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(12):1079-1081,后插2.
- [12] DE LEÓN L, LÓPEZ M R, MOUJIR L. Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus* [J]. Microbiol Res, 2010, 165(8):617-626.

- [13] 秦军燕,王琛,杨婧,等.5/6肾切除大鼠残肾组织HIF-1 α 、nNOS蛋白表达及丹参多酚酸盐的作用机制[J].中华肾脏病杂志,2014,30(2):147-148.
- [14] 向清,邓伟,李宝,等.丹参对大鼠肾间质纤维化肾组织TSP-1、VEGF及TGF- β 1表达的影响[J].广西医学,2013,35(12):1582-1584.
- [15] 何立群,黄迪,王云满,等.丹酚酸B改善马兜铃酸肾病作用机制的研究[J].西安交通大学学报(医学版),2010,31(6):766-769.
- [16] 刘建国,杨胜兰,孙勇.丹酚酸B对肾小管上皮细胞转分化的影响及机制[J].中国医院药学杂志,2012,32(11):824-827.
- [17] 时洁,耿晓康.丹参酚酸B对慢性肾炎大鼠的疗效及作用机制研究[J].解放军医药杂志,2017,29(10):5-9.
- [18] 杨茹茜,徐倩,杨旖,等.黄芪甲苷对肾纤维化小鼠Toll/MyD88依赖性通路的作用研究[J].中草药,2017,48(18):3775-3782.
- [19] YU Q, ZHANG M D, QIAN L F, et al. Luteolin attenuates high glucose-induced podocyte injury via suppressing NLRP3 inflammasome pathway[J]. Life Sci, 2019,225:1-7.
- [20] ZHANG M Y, HE L Y, LIU J S, et al. Luteolin attenuates diabetic nephropathy through suppressing inflammatory response and oxidative stress by inhibiting STAT3 pathway[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2021, 129(10):729-739.
- [21] 许强,文豪,李修身,等.丹参酮II A磺酸钠治疗糖尿病肾病的Meta分析[J].中药新药与临床药理,2020,31(1):113-119.
- [22] 于力,张蕾,郝志宏,等.甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的防护作用[J].中草药,2010,41(2):250-255.
- [23] DU L, LI C C, QIAN X, et al. Quercetin inhibited mesangial cell proliferation of early diabetic nephropathy through the Hippo pathway[J]. Pharmacol Res, 2019,146:104320.
- [24] 应巧,张伟,泮瑛瑛,等.二氢槲皮素对糖尿病肾病大鼠的肾脏保护作用及mTORC2/Akt信号通路的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(7):581-584,660.
- [25] SHARMA D, GONDALIYA P, TIWARI V, et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling [J]. Biomed Pharmacother, 2019,109:1610-1619.
- [26] 王苑菲,沈美晓,吴祖荣,等.金丝桃苷对糖尿病肾病大鼠TGF- β 1/smad通路及肾上皮间质转化的影响[J].广西医科大学学报,2021,38(9):1654-1660.

(收稿日期:2024-09-11 编辑:蒋凯彪)

(上接第62页)药出版社,2012.

- [14] 聂晶晶,王骁,唐艳萍.酒精性肝病的中西医结合治疗进展[J].河南中医,2016,36(4):738-740.
- [15] 陈佳慧,马重阳,徐甜,等.从“肝脾相关”与“肝胃不和”探析张仲景肝病证治思想[J].中西医结合肝病杂志,2024,34(3):262-264.
- [16] 高晓阳,赵晓璐,张春艳,等.槲皮素诱导肝星状细胞凋亡:基于调控miR-146影响PI3K/Akt信号通路[J].南方医科大学学报,2023,43(10):1725-1733.
- [17] 崔文超,刘明远,关宝生,等.常春藤皂苷元调控IL-6抑制肝癌细胞增殖的免疫机制[J].中国免疫学杂志,2023,39(9):1864-1871.
- [18] 宋金玥,任锋,张向颖,等.山奈酚干预对D-氨基半乳糖/脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2017,37(5):569-574.
- [19] 章涵,赵玉霞,杨惠然,等.芒柄花黄素联合下调miR-4326对肝癌细胞HCCLM3生长和侵袭的影响[J].中成药,2022,44(5):1636-1640.
- [20] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. Cells, 2019,8(11):1337.
- [21] TIEGS G, HORST A K. TNF in the liver: Targeting a central player in inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2022,44(4):445-459.
- [22] NELSON J E, HANDA P, AOUIZERAT B, et al. Increased parenchymal damage and steatohepatitis in Caucasian non-alcoholic fatty liver disease patients with common IL-1B and IL-6 polymorphisms[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2016,44(11-12):1253-1264.
- [23] DERDAK Z, LANG C H, VILLEGAS K A, et al. Activation of p53 enhances apoptosis and insulin resistance in a rat model of alcoholic liver disease[J]. J Hepatol, 2011,54(1):164-172.
- [24] NEUMAN M G, BRENNER D A, REHERMANN B, et al. Mechanisms of alcoholic liver disease: Cytokines[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2001,25(5 Suppl ISBRA):251S-253S.
- [25] 杨季云,张思仲,郭红,等.肿瘤坏死因子 α 通过激活NF- κ B信号通路加快肝细胞周期进程[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(6):604-610.
- [26] 杨星,王振,李淑娣,等.基于PI3K/Akt信号通路探讨中药活性成分抗肝纤维化的研究现状[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(13):230-240.
- [27] 黄冰,杨光宇,张岩,等.3,3'-二吡啶甲烷通过PI3K/AKT/NF- κ B通路抑制肝星状细胞的活化[J].右江民族医学院学报,2022,44(3):325-329.

(收稿日期:2024-10-11 编辑:罗英姣)