

芍药甘草汤药渣中资源性成分的再利用

陈彭月^{1,2}, 刘艳^{2*}, 陈莎², 刘安², 李海鹰^{1*}

(1. 河北大学药学院, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北保定 071002;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 针对经典名方芍药甘草汤药渣, 开展小分子资源性成分提取及定性、定量研究, 明确该药渣中残留小分子化学成分情况, 探讨其可资源化利用途径。方法: 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)定性分析芍药甘草汤药渣中残留的小分子化学物质, 使用Agilent C₁₈色谱柱(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm), 流速0.4 mL·min⁻¹, 进样量5 μL, 流动相0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min, 14%~17.5%B; 1~3 min, 17.5%~19%B; 3~4 min, 19%~20%B; 4~5 min, 20%B; 5~6 min, 20%~21%B; 6~9 min, 21%B; 9~22 min, 21%~36%B; 22~23 min, 36%B; 23~32 min, 36%~43%B), 电喷雾离子源(ESI), 负离子模式扫描, 扫描范围m/z 50~1 200; 对其主要成分建立高效液相色谱法(HPLC)定量分析方法, 使用Agilent C₁₈反相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 检测波长235 nm, 流速0.8 mL·min⁻¹, 流动相0.05%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min, 14%~19%B; 1~4 min, 19%B; 4~18 min, 19%~50%B); 比较有机溶剂提取、酶法提取2种不同技术处理前后芍药甘草汤药渣中主要成分含量变化。结果: 定性分析了芍药甘草汤药渣中16个化学成分, 定量分析发现药渣中化学成分残留较多, 其中芍药苷、甘草苷等6个指标成分残留量达到原饮片中的70%以上; 药渣经纤维素酶酶解后, 甘草苷可转化为甘草素; 酶法提取药渣中粗多糖含量是空白组的6倍, 质量分数高达12%。结论: 芍药甘草汤药渣仍存在较多的小分子资源成分, 有较大开发潜力, 可利用有机溶剂对药渣中目标成分进行再提取, 亦可采用生物酶解技术将甘草苷转化为甘草素, 还可通过酶法提取药渣中粗多糖后开发动物饲料。该研究可为芍药甘草汤制剂及配方颗粒等生产带来的药渣提供资源再利用参考依据和途径, 以实现芍药甘草汤药渣的高值化利用。

[关键词] 芍药甘草汤; 药渣; 资源性成分; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS); 粗多糖; 高效液相色谱法(HPLC); 酶解法

[中图分类号] R22;R94;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)24-0171-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211553

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210421.1743.005.html>

[网络出版日期] 2021-04-22 9:11

Reuse of Resource Components in Residue of Shaoyao Gancaotang

CHEN Peng-yue^{1,2}, LIU Yan^{2*}, CHEN Sha², LIU An², LI Hai-ying^{1*}

(1. Hebei Key Laboratory of Pharmaceutical Quality Analysis and Control,

College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** Aiming at the residue of Shaoyao Gancaotang, the extraction, qualitative and quantitative study of the small molecule resource components were carried out to clarify the residual small molecule chemical components in the residue and explore the ways of its resource utilization. **Method:** The ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS) was used to qualitatively identify the residual small molecule substances in the dregs of Shaoyao

[收稿日期] 20210308(016)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1906601); 国家“重大新药创制”科技重大项目(2019ZX09201005-002)

[第一作者] 陈彭月, 在读硕士, 从事药物分析及制剂研究, E-mail: Chenpengyue7@163.com

[通信作者] * 刘艳, 副研究员, 从事中药质量控制技术和经典名方开发研究, E-mail: yliu1980@icmm.ac.cn;

* 李海鹰, 博士, 副教授, 药物分析及制剂研究方向, E-mail: lihailiy@163.com

Gancaotang. Agilent C_{18} reversed-phase chromatographic column (3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) was used at the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, the injection volume was 5 μL , and the mobile phase was gradient eluted with 0.05% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) (0-1 min, 14%-17.5%B; 1-3 min, 17.5%-19%B; 3-4 min, 19%-20%B; 4-5 min, 20%B; 5-6 min, 20%-21%B; 6-9 min, 21%B; 9-22 min, 21%-36%B; 22-23 min, 36%B; 23-32 min, 36%-43%B), electrospray ionization (ESI) was employed with negative ion mode scanning and scanning range of m/z 50-1 200. A high performance liquid chromatography (HPLC) was established for the quantitative analysis of its main components with Agilent C_{18} reversed-phase chromatographic column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), the detection wavelength was set at 235 nm, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the injection volume was 5 μL . Mobile phase was 0.05% phosphoric acid (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-1 min, 14%-19%B; 1-4 min, 19%B; 4-18 min, 19%-50%B). The content changes of main components in the residue of Shaoyao Gancaotang were compared before and after two different techniques of organic solvent extraction and enzymatic extraction. **Result:** A total of 16 chemical components in the residue of Shaoyao Gancaotang were qualitatively analyzed, and quantitative analysis found that there were many chemical components in the residue, among which the residues of 6 index components such as paeoniflorin and liquiritin reached more than 70% in the original decoction piece. After enzymolysis by cellulase, liquiritin in the residue could be converted into liquiritigenin. The content of crude polysaccharide in enzymatic extract of the residue was 6 times higher than that in the blank group, and the content was up to 12%. **Conclusion:** There are still many small molecule resource components in the residue of Shaoyao Gancaotang, which has great development potential. Organic solvents can be used to re-extract the target components in the residue, and liquiritin can be converted into liquiritigenin by biological fermentation technology, and the crude polysaccharide from the residue can be extracted by enzymatic method to develop animal feed. This study can provide reference basis and approach for reusing the residues of Shaoyao Gancaotang preparations and dispensing granules, so as to realize the high-value utilization of Shaoyao Gancaotang.

[**Keywords**] Shaoyao Gancaotang; residue; resource components; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS); crude polysaccharide; high performance liquid chromatography (HPLC); enzymatic hydrolysis

中药资源是我国重要的战略资源,目前,中药行业每年要消耗的植物类药材约有70万吨(1吨=1 000 kg,下同),每年产生的植物类药渣和废水高达数百万吨^[1-3],中药药渣排放和妥善处理是社会和相关企业面临的棘手问题,给环境保护带来了一定压力^[4-5]。中药固废药渣中含水量较大,极易腐烂,当前的处理仍以堆放、焚烧与填埋为主,这些粗放低值化处理方式投入了大量资金,同时也造成了生物质资源的浪费和一定的环境污染。当前中药固废科学研究中,以单味药渣为研究对象的相关报道较多^[6-8],而对于处方复杂的成方制剂或中成药药渣处理研究相对较少,多用于堆肥或加工动物饲料^[9-11],适用面较窄。随着我国中医药事业的蓬勃发展,中药资源产业化过程产生的中药废弃物日益增多,对中药废渣进行充分利用,使其发挥应有价值是亟待加强的。提高资源利用效率,不仅能有效节约资源,延伸资源经济产业链,为人类生产、生活

提供丰富资源性产品,还可节能减排,减少对生态环境的污染。因此,对中药药渣进行资源化再利用研究,明确其利用价值,具有重大的社会效益和经济效益^[12-14]。

芍药甘草汤出自汉代张仲景所著《伤寒论》,已被收载于《古代经典名方目录(第一批)》^[15],该方剂由白芍和炙甘草2味药材组成,具有调和肝脾、缓急止痛之功效^[16],其整方及加减方在国内外应用广泛。近年国家加大对经典名方注册和配方颗粒生产的政策扶持^[17-18],预计芍药甘草汤制剂和配方颗粒将大批量投入生产,随之而来将产生大量药渣。据报道,芍药甘草汤物质基准(标准汤剂)的平均出膏率约20%^[19],推算会产生约80%的固废,即每生产1吨芍药甘草汤浸膏,将带来4吨左右药渣。目前芍药甘草汤制剂和配方颗粒的制备工艺皆采用水煎煮方式,残留了大量的脂溶性或低极性可利用物质。基于此,本实验选择芍药甘草汤药渣为研究

对象,分析其经水提后药渣中的残留有效成分,并考察2种芍药甘草汤药渣的前处理方法,以期药渣资源再利用提供参考,建立一种“生产-利用-回收-资源化”的中药循环经济理念^[20],促进我国中医药事业的可持续发展。

1 材料

1290型超高效液相色谱-6540型飞行时间串联四极杆质谱仪[配备电喷雾离子源(ESI)]和1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),1647型微电脑电陶炉(广东艾诗凯奇智能科技有限公司),T6型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),FW80型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),HYG-C型多功能组合摇床(苏州培英实验设备有限公司)。

甘草苷、甘草酸铵、芍药内酯苷、芍药苷、五没食子酰葡萄糖、芹糖甘草苷、甘草素对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为PS012028, PS010519, PS011455, PS0220-0025, PS2017-0025, PS011457, PS010083, 纯度均 $\geq 98\%$),无水葡萄糖对照品(成都瑞芬思生物科技股份有限公司,批号P-012-170222, 纯度 $\geq 98\%$),纤维素酶(美国Sigma公司,批号22178-25G),实验用水为屈臣氏蒸馏水或娃哈哈纯净水,磷酸、乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;炙甘草饮片(批号180803-4-B,产地安徽涡阳),白芍饮片(批号180801-4-B,产地甘肃瓜州),以上饮片均由厦门中药厂有限公司提供,经中国中医科学院中药研究所孙伟副研究员鉴定,炙甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎的炮制加工品,白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 芍药甘草汤及药渣的制备 采用砂锅煎煮,称取白芍55.2 g,炙甘草55.2 g,加水600 mL,煎煮至300 mL,过200目药筛,即得芍药甘草汤物质基准^[19]。将药渣置于55℃烘箱中烘干至恒重,即得芍药甘草汤药渣。

2.2 芍药甘草汤药渣的定性分析

2.2.1 供试品溶液的制备 精密量取芍药甘草汤物质基准1 mL,加70%乙醇定容至10 mL,摇匀,过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得芍药甘草汤物质基准的供试品溶液。分别取芍药甘草汤组方饮片(炙甘草和白芍按处方比例混合在一起)及药渣,粉碎(过四号筛,下同),称取0.4 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入70%乙醇50 mL,摇匀,称定质量,

超声处理(功率240 W,频率45 kHz,下同)30 min,放冷,用70%乙醇补足减失的质量,过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得芍药甘草汤饮片及药渣的供试品溶液。

2.2.2 检测条件 色谱条件为Agilent C₁₈反相色谱柱(3.0 mm \times 100 mm, 2.7 μm),流动相选择0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~1 min, 14%~17.5%B; 1~3 min, 17.5%~19%B; 3~4 min, 19%~20%B; 4~5 min, 20%B; 5~6 min, 20%~21%B; 6~9 min, 21%B; 9~22 min, 21%~36%B; 22~23 min, 36%B; 23~32 min, 36%~43%B),柱温25℃,流速0.4 mL \cdot min⁻¹,进样量5 μL 。质谱条件为ESI,在负离子模式下扫描;干燥气温度350℃,干燥气流量设定9 L \cdot min⁻¹,离子源温度设定320℃,雾化器电压40 psi(1 psi \approx 6.895 kPa),毛细管电压2.5 kV,质量扫描范围 m/z 50~1 200。

2.2.3 定性分析 将制备的芍药甘草汤药渣供试品溶液进样分析,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)总离子流色谱图(TIC)见图1。采用Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00质谱工作站软件处理,将数据导入PCDL数据处理系统,利用其自动筛查、鉴定功能对各样品溶液的化学成分进行自动识别和质谱解析,结合化合物裂解规律对所采集碎片离子的相对保留时间和精确相对分子质量等进行碎片信息推导,并参考在线质谱数据库ChemSpider和相关文献完成各化学成分的人工识别和定性分析。结果推测并鉴定了芍药甘草汤药渣中成分16个化合物,包括7个黄酮类,6个萜类,1个没食子酰糖类,1个有机酸类,1个酚类化合物,见表1。以化合物4为例,其在负离子模式下分子离子峰为 m/z 525.147 1 [M-H]⁻,与文献报道的芍药内酯苷和芍药苷加甲酸峰一致,故初步推测为芍药内酯苷或芍药苷,分子式为C₂₃H₂₈O₁₁。二级碎片离子有 m/z 479.157 7,脱去一分子HCHO得到碎片离子 m/z 449.127 4,或脱去一分子苯甲酸后得碎片离子 m/z 357.109 8,继续脱去一分子HCHO后得到碎片离子 m/z 327.095 3,最后形成苯甲酸碎片离子 m/z 121.030 0,与文献报道芍药苷二级质谱碎片离子相一致^[21-23],故鉴定此化合物为芍药苷。其他化合物采用类似鉴别过程。

2.3 芍药甘草汤药渣中主要成分的高效液相色谱法(HPLC)测定

2.3.1 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密

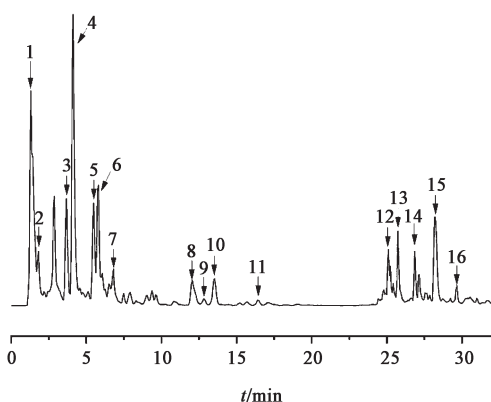


图1 芍药甘草汤药渣 UPLC-QTOF-MS/MS 分析的 TIC

Fig. 1 TIC of Shaoyao Gancaotang residue by UPLC-QTOF-MS/MS

称定,加70%乙醇使溶解,制成含 $85.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药内酯苷, $240.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药苷, $66.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芹糖甘草苷, $112.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草苷, $106.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 五没食子酰葡萄糖, $16.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草素和 $119.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘草酸铵(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.0207)的混合对照品溶液。

2.3.2 色谱条件 Agilent C_{18} 反相色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),检测波长235 nm,流动相0.05%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min, 14%~19%B; 1~4 min, 19%B; 4~18 min, 19%~50%B),柱温14 $^{\circ}\text{C}$,流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量5 μL 。

2.3.3 标准曲线绘制 取上述混合对照品溶液,按

2.3.2项下色谱条件测定,进样量分别为2,4,6,8,10 μL ,以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸铵线性方程分别为 $Y=0.7070X+2.7897$ ($r=0.9999$), $Y=0.7313X+3.3395$ ($r=0.9999$), $Y=0.9071X-0.0177$ ($r=0.9996$), $Y=1.1770X-0.7784$ ($r=0.9999$), $Y=0.6155X-0.4181$ ($r=0.9998$), $Y=2.0098X-0.3868$ ($r=0.9999$), $Y=0.2130X-1.2039$ ($r=0.9992$),线性范围分别为0.1712~0.856,0.4804~2.402,0.1336~0.668,0.2256~1.128,0.2128~1.064,0.0328~0.1640,0.2388~1.194 μg 。

2.3.4 精密度 取同一芍药甘草汤药渣供试品溶液,按**2.3.2**项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,计算芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.7%,0.4%,1.3%,1.7%,0.4%,0.4%和0.9%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性 取同一芍药甘草汤药渣供试品溶液,分别于制备后0,2,4,8,12,24 h按**2.3.2**项下条件测定,计算芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸铵峰面积的RSD分别为1.1%,0.4%,1.1%,1.7%,1.3%,0.4%和1.6%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表1 芍药甘草汤药渣化学成分的UPLC-QTOF-MS/MS分析

Table 1 UPLC-QTOF-MS/MS analysis of chemical constituents in residue of Shaoyao Gancaotang

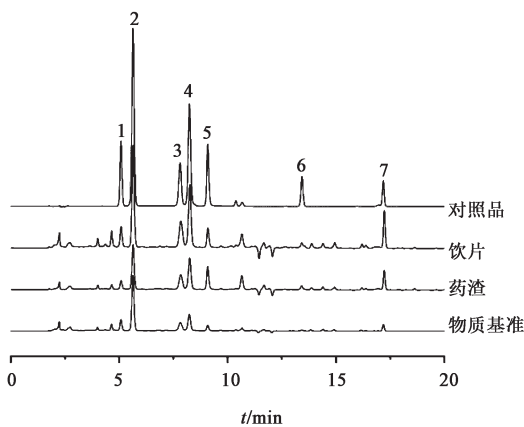
化合物	t_r/min	m/z [M-H] ⁻	碎片离子	分子式	名称
1	1.432	191.023 8	169.014 4	$C_6H_8O_7$	柠檬酸
2	1.807	169.006 7	125.026 0	$C_7H_6O_5$	没食子酸
3	3.681	525.146 8 ¹⁾	479.158 8, 283.266 3, 121.030 5	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药内酯苷
4	4.118	525.147 1 ¹⁾	479.157 7, 449.127 4, 357.109 8, 327.095 3, 121.030 0	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药苷
5	5.492	549.143 8	417.120 7, 255.067 5	$C_{26}H_{30}O_{13}$	芹糖甘草苷
6	5.805	417.116 0	255.067 6, 135.010 5	$C_{21}H_{22}O_9$	甘草苷
7	6.804	939.087 4	769.091 1, 617.079 4, 465.068 8, 447.057 0, 295.043 3, 169.015 6	$C_{41}H_{32}O_{26}$	五没食子酰葡萄糖
8	12.051	549.144 9	417.120 3, 255.066 8	$C_{26}H_{30}O_{13}$	芹糖异甘草苷
9	12.863	283.215 6	268.034 4, 165.990 0	$C_{16}H_{12}O_5$	千层纸素 A
10	13.550	417.106 5	255.066 9, 135.010 4	$C_{21}H_{22}O_9$	异甘草苷
11	16.423	255.038 8	135.010 4	$C_{15}H_{12}O_4$	甘草素
12	25.105	983.431 8	821.398 3, 645.363 5, 469.333 6	$C_{48}H_{72}O_{21}$	甘草皂苷 A ₃ ^[24]
13	25.730	879.386 2	-	$C_{43}H_{60}O_{19}$	22 β -乙酰基甘草素 ^[24]
14	26.854	837.375 9	-	$C_{42}H_{62}O_{17}$	甘草皂苷 G ₂ ^[25]
15	28.166	821.381 1	645.365 7, 469.332 9, 351.058 4	$C_{42}H_{62}O_{16}$	甘草酸
16	29.665	821.380 4	645.367 8, 469.335 1, 351.058 3	$C_{42}H_{62}O_{16}$	甘草皂苷 K ₂ ^[25-26]

注:¹⁾[M+HCOO]⁻。

2.3.6 重复性 平行制备6份芍药甘草汤药渣供试品溶液,按2.3.2项下色谱条件测定,计算芍药甘草汤中芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸平均质量分数分别为0.41%,2.26%,0.68%,0.97%,0.62%,0.02%和2.61%,RSD分别为2.1%,1.9%,1.3%,1.8%,2.0%,1.4%和2.7%,说明该方法的重复性良好。

2.3.7 加样回收率 取已知各成分含量的芍药甘草汤药渣,按1:1的比例添加各对对照品,按2.2.1项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.3.2项下色谱条件测定,计算芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸铵的平均加样回收率分别为99.7%,97.9%,99.9%,100.8%,99.9%,98.4%,99.0%,RSD分别为2.5%,3.0%,2.5%,2.5%,2.2%,2.2%和3.3%,表明该方法的准确度较好。

2.3.8 样品测定 取2.2.1项下制备的芍药甘草汤饮片、物质基准、药渣的供试品溶液,按2.3.2项下色谱条件测定,见图2和表2。由于物质基准及药渣中甘草素含量极低,故未进行含量测定。结果发现芍药甘草汤经水提后药渣中的有效成分残留较多,药渣中芍药内酯苷和芍药苷含量均约为物质基准中的2倍,芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖和甘草酸的含量均在物质基准的2.8倍以上;上述6个指标成分的残留量分别为72%,74%,72%,72%,85%和79%,均超过了原饮片的70%,表明芍药甘草汤药渣有进一步回收利用的价值。



1. 芍药内酯苷;2. 芍药苷;3. 芹糖甘草苷;4. 甘草苷;5. 五没食子酰葡萄糖;6. 甘草素;7. 甘草酸

图2 芍药甘草汤不同样品的HPLC

Fig. 2 HPLC of different samples of Shaoyao Gancaotang

2.4 酶解对药渣中化学成分的影响

2.4.1 药渣的酶解处理 称取芍药甘草汤药渣粉

表2 芍药甘草汤不同样品中指标成分的质量分数(n=3)

Table 2 Contents of index components in different samples of Shaoyao Gancaotang (n=3) %

样品	芍药内酯苷	芍药苷	芹糖甘草苷	甘草苷	五没食子酰葡萄糖	甘草酸
饮片	0.57	3.06	0.95	1.37	0.72	3.31
物质基准	0.22	1.23	0.24	0.28	0.16	0.76
药渣	0.41	2.27	0.68	0.98	0.61	2.60

末1.0g,精密称定,加入柠檬酸盐缓冲液(pH 4.8)50 mL,121 °C高温灭菌,纤维素酶加酶量20 U·g⁻¹(以药渣质量计算,下同),于50 °C恒温摇床震荡2 d(200 r·min⁻¹),沸水浴灭酶10 min,冷却至室温,减压抽滤,收集滤液。空白组不加纤维素酶,其余操作同上。

2.4.2 供试品溶液的制备 取2.4.1项下样品滤液2 mL,过Agilent C₁₈固相萃取柱(500 mg×6 mL),依次用水、甲醇各3 mL洗脱,收集甲醇洗脱液,氮气吹干,沉淀加70%乙醇2 mL,超声复溶,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.4.3 芍药甘草汤药渣的定性与定量分析 取2.4.2项下供试品溶液,按2.2.2项下条件检测,结果发现与空白组相比,酶解组中甘草素含量显著增高,甘草苷含量却明显降低,见图3;按2.3.2项下色谱条件定量分析,见表3。结果发现药渣酶解组中芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草酸含量与空白组相比变化不大,而甘草苷和甘草素含量则变化明显,药渣经酶解后显著提高了甘草素质量分数,达到了0.43%,是空白组的14.3倍。

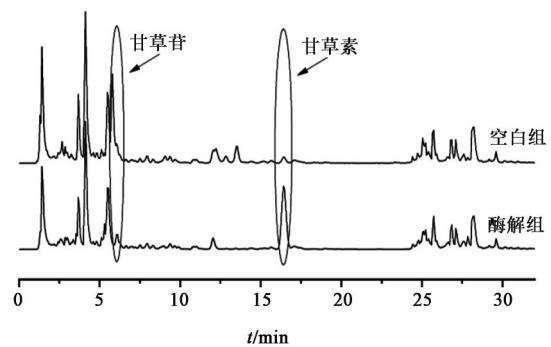


图3 芍药甘草汤药渣酶解前后TIC对比

Fig. 3 Comparison of TIC before and after enzymolysis of Shaoyao Gancaotang residue

2.5 芍药甘草汤药渣中粗多糖的检测

2.5.1 粗多糖的提取 称取芍药甘草汤药渣粉末1.0 g,加入柠檬酸盐缓冲液(pH 4.8)20 mL,纤维素

表3 芍药甘草汤药渣酶解后指标成分的质量分数(n=3)

Table 3 Contents of index components in Shaoyao Gancaotang residue after enzymolysis (n=3)

样本	指标成分质量分数/%						
	芍药内酯苷	芍药苷	芹糖甘草苷	甘草苷	五没食子酰葡萄糖	甘草素	甘草酸
空白组	0.51	2.36	0.86	1.09	0.04	0.03	0.84
酶解组	0.45	2.18	0.85	0.05	0.04	0.43	0.91

酶加酶量 $80 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床震荡 80 min (转速 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 沸水浴灭酶 10 min , 冷却至室温, 减压抽滤。收集滤液, 加无水乙醇至含醇量达 80% , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 24 h , 减压抽滤。残渣使用无水乙醇 5 mL 洗涤 3 次, 置于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重, 得粗多糖。空白组不加纤维素酶, 其余操作同上。

2.5.2 葡萄糖标准曲线制备 精密称取无水葡萄糖对照品 2.65 mg , 加水定容至 25 mL , 得 $106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。分别精密吸取该储备液 $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 \text{ mL}$ 置于不同试管中, 加水补至 2 mL , 依次加入新鲜配置的 5% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 5 mL , 摇匀, 于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴锅中反应 30 min , 取出, 冷却至室温, 于 490 nm 处测定吸光度 A , 选择水作为空白对照, 以葡萄糖质量浓度为横坐标, A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=0.0556X+0.0072$ ($r=0.9952$), 线性范围 $10.6\sim63.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.3 粗多糖含量测定 取制备的粗多糖, 加水使溶解并定容至 100 mL , 精密量取 0.1 mL 至试管中, 加水补至 1 mL , 按 2.5.2 项下操作测定 A 。结果发现芍药甘草汤药渣酶解组的粗多糖质量分数 12% , 空白组则为 2% , 说明酶法可提高芍药甘草汤药渣的粗多糖产率。

3 讨论

3.1 定量指标成分的选择 芍药甘草汤由白芍和炙甘草组成, 根据 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)“白芍”和“炙甘草”项下含量测定要求, 选择芍药苷、甘草苷和甘草酸。因本文研究实验对象为芍药甘草汤药渣, 以药渣再利用为出发点, 故将选择的指标成分范围扩大至残留量较多的芍药内酯苷、芹糖甘草苷、五没食子酰葡萄糖 3 个成分。采用 70% 乙醇提取芍药甘草汤饮片、物质基准及药渣中有效成分时, 甘草素含量极少, 但经酶解后含量明显增加。故最终选择了芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草素、甘草酸为指标成分进行定量分析。

3.2 物质基准提取次数的选择 经典名方依据的

是物质基准的质量范围进行大生产, 芍药甘草汤关键质量参数为每日剂量芍药甘草汤物质基准中含芍药苷不得少于 406 mg , 甘草苷不得少于 116 mg , 甘草酸不得少于 115 mg , 出膏率范围 $14\%\sim27\%$ ^[19], 目的是还原“一碗汤”的意义, 因此, 其生产不以最大收率为生产目的, 而本课题组正在进行的芍药甘草汤中试研究亦发现, 1 次提取即能达到物质基准的要求范围, 若 2 次提取将超过物质基准范围。故提取数设定为 1 次, 并基于此对药渣进行资源性化学成分分析。

3.3 药渣处理方式选择 考虑到用药安全性, 芍药甘草汤成方制剂及配方颗粒的制备工艺以水煎煮为主, 药渣中脂溶性成分及部分小极性成分残留较多, 基于此, 采用有机溶剂法提取并分析药渣中可利用物质。选择纤维素酶进行酶解处理, 促使由纤维素和半纤维素构成的细胞壁裂解, 促进药渣中残留有效成分的释放或新物质的产生, 进而定性、定量分析酶解后药渣中化学成分。根茎类饮片中富含纤维素, 依靠纤维素酶水解纤维素, 提高药渣中粗多糖含量, 可开发成动物饲料。选择 2 种处理方式多角度、多途径分析药渣, 以扩大药渣再利用价值, 最大程度实现中药废弃物的资源化利用。

3.4 酶解过程中甘草苷的转化途径 甘草中黄酮类物质分为游离苷元和结合型糖苷, 酶可将糖苷分解为游离性苷元^[27]。结合甘草苷和甘草素结构分析, 发生转化的原因为甘草苷在酶解条件下糖苷键断裂, 失去一分子葡萄糖后转化为甘草素, 见图 4。甘草素具有抗肿瘤、抗炎、保肝等药理作用, 其在医药、食品、化妆品行业具有广泛的应用前景^[28]。市场上, 甘草素的商业价值高于甘草苷, 目前提取分离甘草素的常用方法是有机溶剂法, 而酶解转化提取甘草素成本低廉、环境友好, 是分离提取甘草素的一种新思路, 更易被企业和社会所接受。

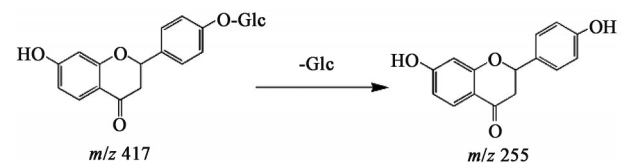


图4 甘草苷的转化过程

Fig. 4 Conversion process of licoritin

4 结论

本实验研究了经典名方芍药甘草汤药渣有机溶剂提取、酶法提取 2 种前处理方法, 定性分析了芍药甘草汤药渣中的 16 个小分子化学成分, 并建立了

基于HPLC的7个指标成分含量测定方法。结果发现,芍药甘草汤经水提后,药渣中芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、五没食子酰葡萄糖、甘草酸残留较多,均达到原饮片的70%以上;纤维素酶酶解处理后甘草苷可转化为甘草素,转化后甘草素质量分数达到0.43%,相比空白组提升了十几倍;酶法提取后粗多糖质量分数达12%,显著提高了粗多糖的提取效率。本文研究结果明确了芍药甘草汤水提后仍残留大量有效化学成分,具有较大的资源再利用前景,可为经典名方大生产过程中所产生药渣的再利用提供开发思路,并探索了药渣的高值化利用可能途径。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 马驰. 我国甘草资源退化状况分析和保护恢复对策[D]. 兰州:兰州大学, 2019.
- [2] 马帅,王诺,杨光,等. 我国甘草及其制品进出境调查研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2193-2199.
- [3] 边育红,王丽,张晓雨,等. 甘草产业链的现状与技术提升[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(1): 19-26.
- [4] 段金廛,唐志书,吴启南,等. 中药资源产业化过程循环利用适宜技术体系创建及其推广应用[J]. 中国现代中药, 2019, 21(1): 20-28.
- [5] 王明威,周林,刘顺会,等. 中药渣资源化利用探讨[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 140-143.
- [6] CHEN X Y, ZHANG Q H, YU Q, et al. Depolymerization of holocellulose from Chinese herb residues by the mixture of lignin-derived deep eutectic solvent with water[J]. Carbohydr Polym, 2020, 248: 116793.
- [7] LI K, LI S Y, WANG D, et al. Extraction, characterization, antitumor and immunological activities of hemicellulose polysaccharide from Astragalus Radix herb residue[J]. Molecules, 2019, 24(20): 3644.
- [8] 刘双双,刘丽芳,朱华旭,等. 酶解等4种方法用于中药废弃物资源化研究初探(I)——以脉络宁注射液生产中石斛药渣的多糖资源化研究为例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 34-40.
- [9] 李华伟,黎智华,祝倩,等. 饲料添加中药渣和酶解中药渣对母猪繁殖性能与子代发育的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(1): 257-263.
- [10] ZHANG L, SUN X Y. Effects of waste lime and Chinese medicinal herbal residue amendments on physical, chemical, and microbial properties during green waste composting [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(31): 31381-31395.
- [11] 王明欢,张小娜,林冰,等. 中药药渣中固氮菌、解磷菌、解钾菌的筛选[J]. 中成药, 2020, 42(2): 531-533.
- [12] 刘新红,宋修超,罗佳,等. 以中药渣有机肥为主要材料的番茄育苗基质筛选[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(22): 149-153.
- [13] 刘博文,戴静,杨杰,等. 川贝母药渣综合质量研究[J]. 成都大学学报:自然科学版, 2020, 39(3): 241-245.
- [14] 何方. 古汉养生精中药渣的酶解处理及其对小鼠的功效研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2015.
- [15] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录(第一批) [EB/OL]. (2018-04-16) [2021-03-06]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [16] 钱浩良,凌哲宇,顾亚萍. 分析芍药甘草汤的临床应用及方剂研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(21): 131-132.
- [17] 陈畅,程锦堂,刘安. 经典名方研发策略[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1814-1818.
- [18] 张鹏,刘安,邹兰,等. 经典名方概述与开发探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 183-194.
- [19] 陈士林,刘安. 经典名方开发指引[M]. 北京:科学出版社, 2020: 362-366.
- [20] 段金廛. 中药废弃物的资源化利用[M]. 北京:化学工业出版社, 2013: 1-13.
- [21] 刘杰,陈琳,范彩荣,等. 基于HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
- [22] 贺晶,高晓霞,田俊生,等. UPLC-MS分析柴胡、白芍水煎液的化学成分及其对逍遥散的贡献[J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(4): 375-382.
- [23] 任娟,刘晓,李伟东,等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS的白芍炒制前后化学成分研究[J]. 世界中医药, 2019, 14(2): 268-273.
- [24] 陈佩东,周习,丁安伟. 炙甘草水煎液的HPLC-MS分析[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2115-2120.
- [25] 马海娟,高简,张亚丽,等. 基于HPLC-MSⁿ的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1120-1123.
- [26] 赵艳敏,刘素香,张晨曦,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS技术的甘草化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [27] 张艳聪,马维维,张洪梅,等. 蝉拟青霉-甘草渣双向发酵过程中成分含量变化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1902-1904.
- [28] 石盘棋,周博,孙晓燕,等. 甘草黄酮苷元甘草素的研究及其应用[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(5): 108-112.

[责任编辑 刘德文]