

栀子柏皮汤半仿生提取药材组合方式的优选

于定荣¹, 荆汉卫^{2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 潍坊市食品药品检验检测中心, 山东 潍坊 201601)

[摘要] **目的:** 优选栀子柏皮汤半仿生提取药材组合方式, 为栀子柏皮汤提取工艺提供依据。**方法:** 将方中方药按“君(A), 臣(B), 佐(C), 使(D)”进行组合排列, 共5种, 用半仿生提取方法进行提取; 以相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da提取物、栀子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱为指标, 将各指标测得值标准化处理, 经加权求和后得到综合评判值进行比较, 大者为优。**结果:** 5个指标综合评判值排序依次为 $B + AC > A + B + C > C + AB > ABC > A + BC$, 以 $B + AC$ (关黄柏单煎, 栀子、甘草合煎) 最大。**结论:** 栀子柏皮汤半仿生提取方法以关黄柏单煎, 栀子、甘草合煎, 最后合并提取液为最佳。

[关键词] 栀子柏皮汤; 半仿生提取方法; 综合评判; 组合方式; 相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da提取物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0022-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1404.070.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 14:04

Selection of Best Semi-bionic Extracting Mode of Zhizi Bopi Tang

YU Ding-rong¹, JING Han-wei^{2*}

(1. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*
2. *Weifang Center for Food and Drug Control, Weifang 201601, China*)

[Abstract] **Objective:** To select the best semi-bionic extraction method of Zhizi Bopi Tang, and provide the scientific basis for extracting process of Zhizi Bopi decoction. **Method:** The herbs in the prescription were arranged in different combinations based on ‘Jun (A), Chen (B), Zuo (C) and Shi (D)’ principle. There were 5 combinations in total, and semi-bionic extraction method was used for extraction. The levels of gardenoside, berberine hydrochloride, glycyrrhetic acid, total alkaloids and extracts with molecular weight $\leq 1\ 000$ Da were used as the indexes. The comprehensive evaluation values were acquired by using weighted summation of the five indexes after standardized treatment. Those with larger comprehensive evaluation values were better than others. **Result:** The comprehensive evaluation value Y was $B + AC > A + B + C > C + AB > ABC > A + BC$ respectively for the 5 indexes, and $B + AC$ was the biggest value. **Conclusion:** The semi-bionic extraction method of Zhizi Bopi Tang is decocting Cortex Phellodendri Chinensis solely first, then decocting Gardeniae Fructus and Glycyrrhizae Radix together, and finally combining the above extract Tang.

[Key words] Zhizi Bopi Tang; semi-bionic extraction method; comprehensive evaluation; combination mode; molecular weight $\leq 1\ 000$ Da

栀子柏皮汤源自《伤寒杂病论》, 由栀子、黄柏、甘草组成, 用于治疗湿热发黄、热重于湿之阳黄证。

[收稿日期] 20151230(011)

[基金项目] 国家科技部国际合作项目(2007DFA31180)

[第一作者] 于定荣, 博士, 助理研究员, 从事中药制剂与炮制研究, Tel: 010-84018690, E-mail: yudingrong0826@sina.com

[通讯作者] *荆汉卫, 硕士, 主管药师, 从事中药制剂质量控制, Tel: 15165610516, E-mail: jinghanwei2008@126.com

现代药理研究该方具有保肝利胆、解毒利尿等作用,主要用于黄疸型肝炎、皮肤瘙痒、湿疹等的治疗^[1]。

众所周知,不同提取方法的提取效果和药理作用是不相同的。目前对中药复方提取工艺的研究,多采用正交设计进行优选,不仅数据点分布均匀,而且完成试验要求所需的次数少;但正交设计也正是由于具有此特点,所以可能会导致优选出来的复方的最佳提取工艺是纯从中药成分上优选出的最佳提取工艺,该工艺中可能会漏掉君药或者臣药,缺少“君、臣、佐、使”配伍,这样优选出来的最佳提取工艺,即使工艺再好,实际上也是毫无意义的。本实验在优选出栀子柏皮汤半仿生提取工艺条件的基础上^[2],对其半仿生提取药材组合方式进行优选,能保证 5 种组合方式中,都有“君、臣、佐、使”药进行配伍,共同发挥作用,产生综合疗效。这样不仅能从中药成分方面进行工艺优选,而且能体现出中药方剂的配伍作用及其优势,这是目前没有报道的,也是本实验研究的最大特色,为栀子柏皮汤的提取工艺提供了一定的实验依据。

1 材料

PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),LC-20A 型岛津高效液相色谱仪(LC-20AT 泵,Empower 2 数据处理软件,SPD-M20A 检测器,日本岛津),JJ300 型分析天平(美国双杰),DH 系列中空纤维超滤膜(上海德宏生物医学科技发展有限公司)。

栀子饮片来源于茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实;关黄柏饮片来源于芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* 的干燥树皮;甘草饮片来源于豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 干燥根及根茎;均经山东中医药大学张兆旺教授鉴定均为正品。

对照品栀子苷(批号 110749-201316),盐酸小檗碱(批号 110713-201212),甘草次酸(批号 110723-201514)均购自中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇、乙腈,超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 组合方式设计 将栀子柏皮汤按“君、臣、佐、使”分成 3 部分:A(栀子君药),B(关黄柏臣药),C(炙甘草佐使药);组合方式 5 种分别为 1 号(ABC),2 号(A+B+C),3 号(A+BC),4 号(B+AC),5 号(C+AB)。其中 4 号(B+AC)表示,B 药单独提取、精制、浓缩,A,C 共同提取、精制、浓缩,最后将 2 种浓缩液合并,制成所需浓度的溶液,其余以此类推。

2.2 样品溶液的制备 按处方比例量称取方药 A, B, C 粗粉(10~20 目),按 2.1 项下组合方式设计,分别用半仿生提取法^[2]进行提取:依次加入 10, 8, 8 倍量水,用 HCl, NaOH 溶液调节溶剂 pH 分别为 2.0, 7.5, 8.5, 煎煮 3 次,煎煮时间依次为 2, 1, 1 h。将 3 煎提取液分别依次粗滤,以 3 500 r·min⁻¹ 离心 25 min,用一定规格的中空纤维膜(均为相对分子质量≤1 000 Da 提取物)滤过,浓缩,合并,定容至 100 mL,制备得方药不同组合的样品溶液 A1~A5,另在 1 号组合方式(ABC)中分别制备缺 A, B, C 的样品溶液,按上述方法制备得阴性样品溶液 B1~B3。

2.3 供试品溶液液制备 分别精密吸取 2.2 项下样品液 A1~A5,阴性样品液 B1~B3 各 10 mL,置于蒸发皿中,以水浴浓缩至近干,加硅藻土 2.5 g,反复拌匀,蒸干后研细,转移至具塞锥形瓶中,加甲醇 10 mL,密塞,称重;再超声提取 30 min,放冷后补足损失质量,抽滤,定容至 10 mL,即得供试品溶液 A1~A5,阴性供试品溶液 B1~B3。

2.4 对照品溶液制备 分别精密称取对照品栀子苷 5.86 mg,盐酸小檗碱 5.04 mg,甘草次酸 5.38 mg,加甲醇溶解定容至 25 mL,即得对照品液 I~III;另精密称取盐酸小檗碱对照品 5.62 mg 至 500 mL 量瓶中,用 pH 7.0 的缓冲液(取磷酸二氢钾 0.68 g,加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 29.1 mL,用水稀释至 100 mL,即得)定容至刻度,即得对照品溶液 IV。

2.5 栀子苷含量测定^[3]

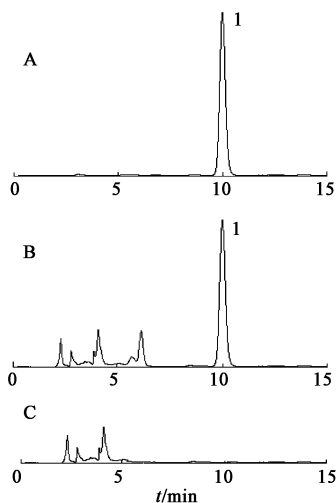
2.5.1 色谱条件 Diamonsil™ 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(15:85),检测波长 238 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,柱温 30 ℃,见图 1。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 I 1, 5, 10, 15, 20 μL,按 2.5.1 项下色谱条件进样,分别测定其峰面积。以峰面积积分值(纵坐标)对栀子苷质量(μg,横坐标)进行回归,制备得回归方程为 $Y = 1\ 204.72X - 42.38$ ($r = 0.999\ 8$)。结果栀子苷在 0.234 4~4.688 0 μg 具有良好的线性关系。

2.5.3 栀子苷含量测定 精密吸取 2.2 项下供试品溶液 A1~A5 各 10 μL,按 2.5.1 项下色谱条件分别进样,测定栀子苷含量,见表 1。

2.6 盐酸小檗碱含量测定^[4]

2.6.1 色谱条件 Diamonsil™ 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹



A. 对照品; B. 供试品; C. 缺栀子阴性; 1. 栀子苷

图 1 栀子柏皮汤 HPLC(栀子苷)

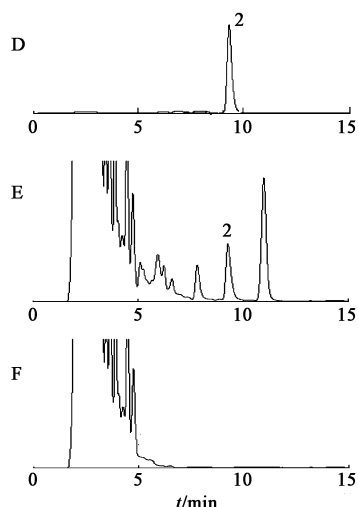
Fig. 1 HPLC of Zhizi Bopi Tang(gardenoside)

表 1 栀子柏皮汤中各成分质量分数测定

Table 1 Determination of Zhizi Bopi Tang

No.	栀子苷 /mg·g ⁻¹	盐酸小檗碱 /mg·g ⁻¹	甘草次酸 /mg·g ⁻¹	总生物碱 /mg·g ⁻¹	≤1 000Da 提取物 /g·g ⁻¹
A1	16.557	0.596	0.086	0.226	0.226
A2	12.687	1.151	0.059	0.255	0.255
A3	11.936	0.965	0.042	0.244	0.244
A4	14.542	1.195	0.072	0.260	0.260
A5	13.950	1.093	0.041	0.268	0.268

KH₂PO₄(35:65), 检测波长 265 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 柱温 20 °C, 见图 2。



D. 对照品; E. 供试品; F. 缺黄柏阴性; 2. 盐酸小檗碱

图 2 栀子柏皮汤 HPLC(盐酸小檗碱)

Fig. 2 HPLC of Zhizi Bopi Tang(berberine hydrochloride)

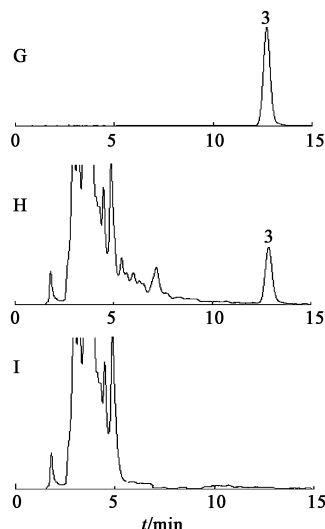
2.6.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 II 2, 4, 8, 10, 20 μL, 按 2.6.1 项下色谱条件测定峰面积。

以峰面积积分值(纵坐标)对盐酸小檗碱质量(μg, 横坐标)进行回归, 得回归方程为 $Y = 1\ 643.2X + 123.80$ ($r = 0.999\ 6$)。结果盐酸小檗碱具有良好线性关系, 线性范围为 0.403 2 ~ 4.032 μg。

2.6.3 盐酸小檗碱含量测定 分别精密吸取 2.3 项下供试液 A1 ~ A5, 按 2.6.1 项下色谱条件进样, 测定盐酸小檗碱含量, 见表 1。

2.7 甘草次酸含量测定^[5]

2.7.1 色谱条件 Diamonsil™ 钻石 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 磷酸(87:13), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温 25 °C。见图 3。



G. 对照品; H. 样品; I. 缺甘草阴性对照液; 3. 甘草次酸

图 3 栀子柏皮汤 HPLC(甘草次酸)

Fig. 3 HPLC of Zhizi Bopi Tang(glycyrrhetic acid)

2.7.2 线性关系考察 精密吸取对照溶液 III 1, 4, 6, 10, 20 μL, 按 2.7.1 项下色谱条件进样, 测定峰面积。以峰面积积分值为纵坐标, 甘草次酸的质量(μg)为横坐标, 得线性回归方程 $Y = 1\ 548.5X + 21.476$ ($r = 0.999\ 6$), 结果在 0.215 2 ~ 4.034 0 μg 甘草次酸与峰面积线性关系良好。

2.7.3 甘草次酸含量测定 精密吸取 2.3 项下供试液 A1 ~ A5 各 20 μL, 按照 2.7.1 项下色谱条件进样, 测定甘草次酸含量, 见表 1。

2.8 总生物碱含量测定^[6]

2.8.1 线性关系考察 分别精密吸取 2.4 项下对照品溶液 IV 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 mL 至具塞锥形瓶中, 水浴蒸干溶剂, 加 pH 7.0 的缓冲溶液稀释至 2.0 mL。精密加入 0.007% 溴麝香草酚蓝 8.0 mL, 充分摇匀, 再精密加入三氯甲烷 10.0 mL, 反复振摇 2 min 后移入分液漏斗, 静置。分取三氯甲烷层, 滤

过,以相应的试剂为空白,将滤液于 413 nm 处测定吸光度。得回归方程 $Y = 110.306X - 0.0089$ ($r = 0.9990$)。结果总生物碱含量与吸光度呈良好的线性关系,线性范围为 $1.124 \sim 6.744 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.8.2 含量测定 精密吸取 2.3 项下供试液 A1 ~ A5 各 0.2 mL,按照 2.8.1 项下方法,测定吸光度,计算总含量,见表 1。

2.9 相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物测定 分别平行精密吸取 2.3 项下供试液 A1 ~ A5 各 3 份,每份 10 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥至恒重,测定相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物,见表 1。

2.10 数据处理及综合评判^[7] 将表 1 中梔子苷、盐酸小檗碱、甘草次酸、总生物碱、相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 共 5 个指标经标准化处理 $x'_{ij} = (x_{ij} - \bar{x}_j) / s_j$,其中 x'_{ij} 是标准化值, x_{ij} 为供试液 i 中成分 j 的含量, \bar{x}_j 为各种供试液 i 中成分 j 的平均值, s_j 为成分 j 的标准偏差。将各指标赋予相应的加权系数,得综合评价指标 Y 值, $Y = [(\text{梔子苷} + \text{小檗碱} + \text{甘草次酸}) \div 3] \times 7 + \text{总生物碱} \times 2 + \text{相对分子质量} \leq 1\ 000 \text{ Da 提取物} \times 1$ 。由表 2 可得出第 4 号组合方式综合评判指标 Y 值最大,即本方药材以 B + AC 组合较佳,结果见表 2。

表 2 各指标及标准化处理

Table 2 Results of all indexes standardized

No.	梔子苷	盐酸小檗碱	甘草次酸	总生物碱	相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da	Y
A1	1.466	-1.671	1.349	-1.671	-1.525	-2.196
A2	-0.698	0.625	0.434	-0.269	0.709	0.746
A3	-1.117	-0.144	-0.390	0.051	-0.139	-4.577
A4	0.340	0.806	-1.058	1.631	1.068	7.220
A5	0.009	0.384	-0.446	-0.342	-0.113	-1.193

2.11 验证性试验 用 2.10 项下优选出的工艺条件平行试验 3 次,依法测定各指标得率,按照 2.10 项下方法进行数据标准化处理,计算。结果表明,综合评判指标值 2.955,大于其他值,确定优选出的工艺合理,结果见表 3。

3 讨论

针对多指标成分存在的情况下,本实验坚持 SBE 理论中“有成分论,不惟成分论,重在机体药理学反应”的观点。根据各指标在提取工艺中的主次,赋予其不同的加权系数,以标准化处理后的值进行加权后求和得综合评价值,能有效消除各指标之

表 3 3 批验证试验数据

Table 3 Result of sample verified by three test

指标	平均质量分数 $/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	标准化处理 结果	RSD/%
梔子苷	14.576	0.354	0.1
盐酸小檗碱	1.125	0.607	0.3
甘草次酸	0.027	-1.043	2.1
总生物碱	8.847	1.035	0.5
相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da	0.263	1.077	0.8

注:验证结果为 $Y_4(2.955) > Y_2(1.900) > Y_5(0.293) > Y_1(-1.889) > Y_3(-3.261)$ 。

间由于单位和量纲的不同而引起的误差,使组间综合评判数据更科学、合理;更具有可比性。

本实验对梔子柏皮汤半仿生提取组合方式进行了优选,将多指标进行标准化处理,通过加权求和得到 5 种半仿生提取组合方式的综合评判值 Y ,其大小顺序依次为 $B + AC > A + B + C > C + AB > ABC > A + BC$,说明梔子柏皮汤以半仿生提取时,宜将关黄柏单煎、梔子与甘草合煎,最后将 2 种提取液合并为最佳,与 3 批验证试验结果相符合。研究结果显示,对复方进行组方研究的确可以提高药效成分的提取率,减少提取过程中造成药效成分损失,并且能为其提取工艺提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 肖旭,朱继孝,罗光明,等. 梔子柏皮汤对小鼠急性肝损伤的保护作用及对大鼠的利胆作用研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(12):2998-3000.
- [2] 荆汉卫,孙秀梅,张兆旺,等. 用均匀设计优选梔子柏皮汤半仿生法提取的工艺条件[J]. 天津中医药,2011,28(2):154-157.
- [3] 杜成智,谭建宁,马雯芳. HPLC 测定复方龙胆胶囊中梔子苷和大黄素甲醚[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):135-138.
- [4] 段冀江,李沙沙,翁立冬,等. HPLC 测定田七跌打风湿软膏中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):85-87.
- [5] 吉艳彬,孙瑶,王春华,等. HPLC 法检测甘草中甘草次酸的含量[J]. 山东化工,2013,42(10):68-69.
- [6] 张学兰,张兆旺,徐霞,等. 黄柏 SBE 法与 WE 法的成分比较[J]. 中国中药杂志,1999,20(20):600-602.
- [7] 张兆旺. 中药药剂学专论[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:68.
- [8] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:518.

[责任编辑 顾雪竹]