

指纹图谱法考察活络效灵丹加减方的不同提取工艺

高文娟, 谭雪梅, 戴荣华*, 毕开顺, 陈晓辉

(沈阳药科大学药学院中药质量控制技术国家地方联合工程实验室, 沈阳 110016)

【摘要】 目的: 采用 HPLC 指纹图谱研究不同提取工艺对活络效灵丹加减方 (HLXL) 中化学成分变化的影响。方法: 以獐牙菜苦苷、芍药苷、隐丹参酮和异欧前胡素等 11 个特征指纹峰为指标, 采用 HPLC 分析测定, 条件为 YMC-Pack ODS-A 色谱柱, 流动相甲醇-水梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。系统考察不同溶剂 (水、乙醇、丙酮)、不同提取方式 (超声、回流、冷浸) 及单提混合液和混提液对各特征指纹峰相对含量的影响。结果: 不同工艺提取物中特征峰相对峰面积存在较大差异。溶剂种类和提取方式对 HLXL 成分的提取有较大影响。结论: 该方法重复性、精密性、稳定性良好, 可用于 HLXL 不同提取工艺的指纹图谱研究。

【关键词】 活络效灵丹加减方; 指纹图谱; 獐牙菜苦苷; 芍药苷; 隐丹参酮; 异欧前胡素

【中图分类号】 R283.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2013)06-0040-04

Investigation of Different Extraction Technology for Addition and Subtraction Prescription of Huoluo Xiaoling Dan by Fingerprint

GAO Wen-juan, TAN Xue-mei, DAI Rong-hua*, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

【Abstract】 **Objective:** To study influence of different extraction technology on chemical compositions changes from addition and subtraction prescription of Huoluo Xiaoling Dan (HLXL) by HPLC fingerprint. **Method:** With swertiamarin, paeoniflorin, cryptotanshinone, isoimperatorin and other seven characteristic fingerprint peaks as index, which were determined by HPLC, with YMC-Pack ODS-A column, methanol-water (gradient elution) as mobile phase, detection wavelength 210 nm, flow rate 0.8 mL·min⁻¹, column temperature 30 ℃. Effects of different solvents (water, ethanol, acetone), extract models (ultrasound, refluxing, macerating) and mixed-extract and separated-extract on relative content of each characteristic peaks were systematically investigated. **Result:** Different technology extracts had significant difference on relative peak area of eleven evaluating indexes. Kinds of solvent and extraction types and order of mixing had a great influence upon extraction efficiency of chemical compositions from HLXL. **Conclusion:** This method was reproducible, precise, stable and could be applied to study on fingerprint of HLXL with different extraction technology.

【Key words】 addition and subtraction prescription of Huoluo Xiaoling Dan; fingerprint; swertiamarin, paeoniflorin, cryptotanshinone, isoimperatorin

活络效灵丹出自张锡纯《医学衷中参西录》上册, 由当归、丹参、生乳香 (生)、没药 (生) 4 味药各

15 g 组成。活络效灵丹加减方 (HLXL) 是在活络效灵丹的基础上加减及调整的中药复方制剂, 用于骨痹 (骨关节炎)^[1-2] 的治疗, 无毒副作用^[3], 由当归、丹参、羌活、桂枝等 11 味中药组成。近年由美国 NCCAM 资助的研究中, 利用动物模型观察分析 HLXL 有治疗关节炎的疗效^[4]。

复方中药是依靠所含的多种化学成分发挥整体的治疗作用, 凭借少数几个有效成分或指标成分的含量测定是难以符合整体的质量评价^[5]。不同提

【收稿日期】 20120925(004)

【第一作者】 高文娟, 硕士, 从事中药质量控制研究, Tel: 024-23986295, E-mail: gaowenjuan.999@163.com

【通讯作者】 *戴荣华, 副教授, 硕士生导师, 从事药品质量标准研究, Tel: 024-23986295, E-mail: ronghuadai@sina.com

取工艺对各成分含量影响较大,因此,本实验考察水、乙醇体积分数、丙酮为提取溶剂,超声、回流、冷浸等提取方式,单提混合液和混提液的 HLXL 指纹图谱,为其工艺研究和质量控制提供客观、全面的评价指标,为 HLXL 的物质基础研究提供参考。

1 材料

HITACHIL-2130 型高效液相色谱仪(日本日立公司),D-2000 Elite 型色谱工作站(天美科学仪器有限公司),BP210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(湘仪仪器)。复方中 11 味中药均购于沈阳同仁堂大药房,经沈阳药科大学药学院生药教研室路金才教授鉴定,均符合《中国药典》2010 年版相关要求。甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[2] YMC-Pack ODS-A 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~60 min, 20%~100% A; 60~70 min, 100% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm。在此条件下 HLXL 中有效成分分离良好。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 不同提取溶剂及提取方式样品 精密称取粉碎后过 80 目筛的中药乳香与桂枝各 0.5 g,当归、丹参、羌活、独活等中药各 0.4 g(1/30 处方量),置于 100 mL 锥形瓶中,分别加入各溶剂(水, 65% 乙醇, 95% 乙醇, 70% 丙酮, 95% 丙酮) 50 mL,称定质量,分别以超声(室温, 30 min)、回流(保持微沸 1 h)、冷浸(室温放置过夜)不同方式进行提取,称定质量,用相应溶剂补足减失的质量,备用。

2.2.2 单提混合液样品 取粉碎后过 80 目筛的 1/30 处方量各单味中药,依次用 8, 6, 6 倍量 70% 丙酮超声提取 3 次,合并上清液,减压浓缩,冷冻干燥,得各单味中药干燥粉末,称取所得各干燥粉末适量,混合,加适量甲醇超声 15 min,过滤后将滤液定容至 50 mL,每个样品制备 3 份,备用。

2.2.3 混提液样品 取 1/30 处方量的各单味中药,混合,其他操作同 2.2.2 项下。混提所得干燥粉末加适量甲醇超声 15 min,过滤后将滤液定容至 50 mL,每个样品制备 3 份,备用。

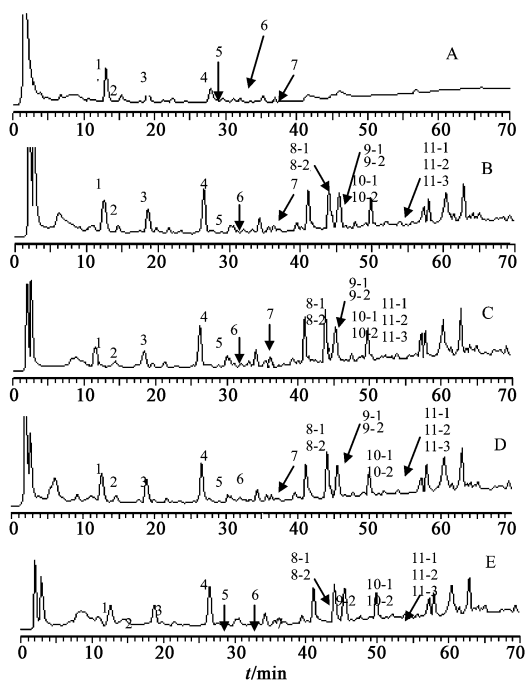
2.3 重复性试验 取 2.2 项下平行制备的 70% 丙酮超声提取的 HLXL 样品溶液 6 份,进样测定,记录色谱图,以 7 号峰川芎内酯 A 的保留时间和峰面积为基准,分别计算其余 10 个峰的相对保留时间和相对峰面积。结果 11 个特征峰的相对保留时间 RSD

均 < 1.5%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.1%, 表明本方法的重复性良好。

2.4 精密度试验 取 2.2 项下平行制备的 70% 丙酮超声提取的 HLXL 样品溶液,平行进样 6 次,记录色谱图。结果 11 个特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.8%, 相对峰面积 RSD 均 < 1.7%, 表明精密度较好。

2.5 稳定性试验 取 2.2 项下 70% 丙酮超声提取的 HLXL 样品溶液,置于 4 °C 冷藏保存,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进样测定,记录色谱图。结果 11 个特征峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.4%, 相对峰面积 RSD 均 < 1.9%, 表明该制备样品在 4 °C 下放置 12 h 基本稳定。

2.6 样品测定 取 2.2.1 项下制备的溶液适量,经 0.22 μm 滤膜过滤,准确吸取 20 μL,进样分析(图 1),各特征峰峰面积与 70% 丙酮超声提取所得 7 号峰峰面积比值见表 1。分别取单提混合液与混提液样品适量,经 0.22 μm 滤膜过滤后,准确吸取 20 μL,进样分析(图 2),所得特征峰的峰面积与单提混合所得 7 号峰峰面积比值见表 2。



A. 水提取物; B. 65% 醇提取物; C. 95% 醇提取物; D. 70% 丙酮提取物; E. 95% 丙酮提取物; 1. 獐子菜苦苷(秦艽); 2. 芍药苷(芍药); 3. 甘草苷(甘草); 4. 桂枝未知成分; 5. 当归醇 B(独活); 6. 香柑内酯(独活); 7. 川芎内酯 A(川芎); 8-1. 苯乙基反式阿魏酸(羌活); 8-2. 蛇床子素(独活); 9-1. 异欧前胡素(羌活); 9-2. 二氢山芹醇当归酸酯(独活); 10-1. 镰叶芹二醇(羌活); 10-2. 隐丹参酮(丹参); 11-1. 丹参酮 II A(丹参); 11-2. 王草素(羌活); 11-3. 无水羌活醇(羌活)(图 2 同)

图 1 活络效灵丹加减方提取物 HPLC 指纹谱

表 1 活络效灵丹加减方提取物的提取溶剂及提取方式指纹图谱比较

提取溶剂	提取方式	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
水	超声	11.9	3.6	4.5	8.7	0.3	0.2	0.2	-	-	-	-
	回流	11.9	2.7	5.8	5.8	0.3	0.5	0.2	-	-	-	-
	冷浸	10.3	2.4	2.8	5.9	0.2	0.1	0.2	-	-	-	-
65% 乙醇	超声	16.3	2.3	9.6	14.0	0.4	0.6	1.6	11.4	10.4	6.1	1.6
	回流	15.0	2.5	9.8	14.6	0.5	0.7	1.5	12.5	9.4	7.1	2.0
	冷浸	15.4	2.4	8.8	14.2	0.4	0.5	1.7	11.7	9.8	6.3	1.7
95% 乙醇	超声	9.7	1.2	5.5	14.0	0.5	0.4	1.6	11.9	10.0	6.0	1.8
	回流	12.8	1.9	7.1	13.6	0.5	0.4	1.7	11.7	8.9	6.9	2.0
	冷浸	9.0	1.3	6.1	14.4	0.5	0.3	1.7	11.5	9.9	6.0	1.7
70% 丙酮	超声	14.7	1.3	8.0	23.3	0.5	1.0	1.0	17.1	11.7	5.6	0.6
	回流	15.4	1.9	10.0	24.0	0.4	0.8	0.8	18.4	11.4	9.1	0.6
	冷浸	11.6	1.9	7.4	17.2	0.4	0.7	0.6	12.4	8.0	7.2	0.7
95% 丙酮	超声	12.2	2.5	7.8	14.4	0.4	0.3	1.5	10.2	9.8	5.5	1.5
	回流	15.8	1.9	7.8	15.7	0.4	0.4	1.9	11.3	9.9	6.1	1.7
	冷浸	11.9	1.9	8.1	14.3	0.5	0.4	1.5	11.3	9.8	5.8	1.7

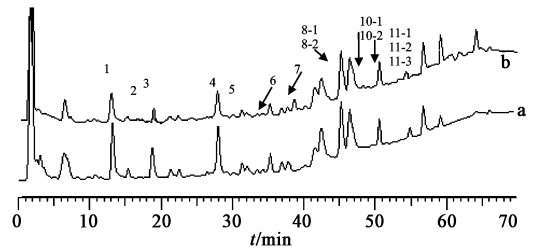
由图 1 及表 1 可知,水作为提取溶剂时提取的成分种类较少,极性较小的成分几乎没有,但极性较大成分含量较高;采用 65% 乙醇和 70% 丙酮提取所得大多标示成分含量较高,其中以 70% 丙酮提取为最佳;95% 乙醇和丙酮提取所得极性较大成分含量比其他溶剂提取的低;不同溶剂比不同提取方式提取所得特征峰比值差别明显。总之,70% 丙酮超声和回流提取所得标示成分含量除 7 号峰外其余均高于其他溶剂不同提取方式提取所得的含量。

表 2 活络效灵丹加减方单提与混提指纹图谱比较

No.	单提混合液	混提液
1	23.1	13.8
2	4.4	2.5
3	14.2	9.9
4	17.2	13.1
5	0.9	0.5
6	0.8	1.4
7	1.0	2.5
8	21.4	16.5
9	26.7	10.2
10	17.3	7.0
11	3.3	0.8

由图 2 及表 2 可知,单提所得大多标示成分含量较混提高,可能与混提时各中药之间的相互作用有关,且混提中未标示的极性很小的成分(60 min 以后)在单提混合液中未出现,可能是各单味中药混合后在提取过程中相互作用而产生,或者其他中药中某种成分促进该成分提取而产生,有待进一步研究。总之,本实验得出 70% 丙酮单提、超声或回流提取所得各标示成分含量较高^[6-7]。

2.7 共有峰的标定 对测定的指纹图谱进行分析,由于 7 号峰川芎内酯 A 峰面积适中,且在考察的特



a. 单提混合液; b. 混提液

图 2 活络效灵丹加减方提取物 HPLC 指纹谱

征峰中属中等极性,水和其他有机相提取时均含有此峰,故将其作为参照峰。测得结果显示水提样品中共有 7 个共有峰,65% 乙醇,95% 乙醇,70% 丙酮,95% 丙酮提取样品中共有 11 个共有峰。

3 讨论

冯果等^[8]结合药效学指标正交优选复方止呕颗粒提取工艺,HLXL 采用不同提取方式和单提与混提均会对指标成分产生较大影响,可能是引起不同药效或药效作用大小的主导因素。提取工艺指纹图谱的研究结合 HLXL 发挥药效的成分比例可为制备颗粒剂时优化提取工艺提供参考,同时也可为制剂的质量控制提供多维的评价指标。

复方中药大多在药效得以证实的基础上进行药理学研究,有效成分往往是一定的,其药效成分由所包含成分群数量及各成分含量及比例决定的^[9]。不同提取方法的药效差异主要由提取物中有效成分含量和多个有效成分比例的差别引起。HPLC 指纹图谱既可框定具有特定疗效的植物药的质量,也可区别不同提取工艺生产的植物药产品。指纹图谱中各成分峰的峰面积(或峰高)值比例差异即为不同制品产生不同疗效的物质基础。

跌打康复酊提取工艺优选

王谨慧, 郭钰龙, 靳子明, 陶翠祥, 杨锡仓*

(甘肃中医学院附属医院, 兰州 730020)

[摘要] 目的: 优选跌打康复酊的浸出提取工艺条件。方法: 以浸出物质量及红花黄色素 A 质量为指标, 采用正交试验法, 考察乙醇体积分数、浸渍时间及浸渍次数等因素对提取工艺的影响。结果: 从浸出物质量角度考虑, 乙醇体积分数具有极显著性影响, 浸渍次数具有显著性影响; 由红花黄色素 A 质量角度考虑, 乙醇体积分数具有显著性影响, 其他因素均无显著性影响。最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3$, 即加 75% 乙醇浸渍 3 次, 每次 30 d。结论: 该优选工艺既保证了传统散剂改成现代酊剂时有效成分的提取, 且简单易行, 适合于中、小型医院推广使用。

[关键词] 跌打康复酊; 正交试验; 提取工艺; 浸出物; 红花黄色素 A

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0043-03

Optimization of Extraction Technology of Dieda Kangfu Tinctures

WANG Jin-hui, GUO Yu-long, JIN Zi-ming, TAO Cui-xiang, YANG Xi-cang*

(University Hospital of Gansu Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology conditions of Dieda Kangfu tinctures. **Method:** With weight of extract and the content of safflower yellow A as indexes, effects of ethanol concentration, extraction time and extraction times on extraction technology were investigated by orthogonal test. **Result:** According to weight of extract, the concentration of ethanol had very significant effect, extraction times had significant effect; According to the content of safflower yellow A, only the concentration of ethanol had significant effect. Optimum

[收稿日期] 20121013(002)

[基金项目] 甘肃省科学事业费资助项目(GS061-C33-29)

[第一作者] 王谨慧, 本科, 副主任中药师, 从事中药制剂研究与开发, E-mail: chuaihui@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 杨锡仓, 教授, 主任中药师, 从事中药制剂及鉴定研究, Tel: 0931-8635920

[参考文献]

- [1] Lao L X, Fan A Y, Zhang R X, et al. Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of the modified Chinese herbal formula Huoluo Xiaoling Dan (HLXL) in rats[J]. Am J Chin Med, 2006, 34(5): 833.
- [2] Zhang R X, Fan A Y, Zhou A N, et al. Extract of Chinese herbal formula Huoluo Xiaoling Dan inhibited adjuvant arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121(3): 366.
- [3] Fan A Y, Lao L X, Zhang R X, et al. Preclinical safety evaluation of the aqueous acetone extract of Chinese herbal formula modified Huoluo Xiaoling Dan[J]. J Chin Integr Med, 2010, 8(5): 438.
- [4] 何巍. 美国研究者证实活络效灵丹的抗关节炎作用

- [J]. 中医药国际参考, 2010, 5(5): 25.
- [5] 沈嘉, 曹现峰, 刘九飞. 几种黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2003, 25(6): 433.
- [6] 尹雪, 黄月纯, 魏刚. 黄芪、白术、防风单煎、合煎对玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 15(3): 1.
- [7] 崔景朝, 赵自明. 中药配方颗粒研究进展(II)——中药单煎与合煎对比研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 240.
- [8] 冯果, 刘文, 张永萍, 等. 结合药效学指标正交优选复方止咳颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 32.
- [9] 王宁宁, 焉媛媛, 李月, 等. 不同提取方式对天麻复方的药效学影响[J]. 中药材, 2007, 30(4): 452.

[责任编辑 仝燕]