

多指标综合评分法优选当归芍药散提取工艺

周瑜,陶春蕾,许钒*,宋欣,王成业

(安徽省高等学校省级现代中药重点实验室,安徽中医学院药学院,合肥 230038)

[摘要] **目的:** 优选当归芍药散的提取工艺。**方法:** 以芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、23-乙酰泽泻醇 B 为评定指标,用多指标综合评分法进行数据处理,选取提取时间、提取次数、乙醇体积分数及乙醇用量为考察因素,采用正交试验优化提取条件。**结果:** 最佳提取工艺为加 8 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。**结论:** 该提取工艺稳定、合理,有效成分提取率高。

[关键词] 当归芍药散; 芍药内酯苷; 芍药苷; 阿魏酸; 23-乙酰泽泻醇 B; 正交试验; 综合评分法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0020-04

Optimization of Extraction Technology for Dangui Shaoyao Powder by Multiple-index Comprehensive Scoring Method

ZHOU Yu, TAO Chun-lei, XU Fan*, SONG Xin, WANG Cheng-ye

(Anhui Province Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, College of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction conditions of Dangui Shaoyao powder. **Method:** With the content of albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid and 23-acetate alisol B as indexes, test data was handled by multiple-index comprehensive scoring method, orthogonal test was adopted in optimizing extraction technology with extraction time, extraction times, the concentration of ethanol and ethanol volume as factors. **Result:** Optimized extraction technology was: extracted 2 times with 8 times the amount of 75% ethanol, 1.5 h per time. **Conclusion:** This optimized extraction technology was rational and stable with high yield of active components.

[Key words] Dangui Shaoyao powder; albiflorin; paeoniflorin; ferulic acid; 23-acetate alisol B; orthogonal test; multi-index comprehensive scoring method

当归芍药散出自张仲景所著《金匱要略·妇人篇》,原治“妇人怀妊,腹中疝痛”、“妇人腹中诸疾病”。方中当归、芍药、川芎养血活血,柔肝疏肝;茯苓、白术、泽泻则健脾、利水、祛湿,共奏活血利水,调肝理脾之功。该方活血利水而不伤正,养血益脾而不敛邪,为治疗水瘀互阻、肝脾不调之良剂。本方既可作为散剂又可作为汤剂,病轻、缓者用散剂;病重、急者,用汤剂^[1]。多年来被广泛用于治疗妇科疾

病,具有养血疏肝、健脾利湿、和血利水等作用^[2],现代临床主治肝脾不调、腹痛等症。白芍主要活性成分为芍药内酯苷、芍药苷,阿魏酸为当归和川芎主要成分,具有解痉、活血、镇痛、镇静等功能^[3];23-乙酰泽泻醇 B 为泽泻重要化学成分,具有利尿、降血脂、抗脂肪肝及保肝作用,现代研究表明 23-乙酰泽泻醇 B 具有明显的降 TC(甘油三酯)和 LDL-C(低密度脂蛋白)作用^[4]。本试验采取正交试验优选当归芍药散提取工艺。以芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、23-乙酰泽泻醇 B 含量为指标,采用综合评分法来优选提取工艺条件。

1 材料

LC-15C 型高效液相色谱仪(日本岛津,SPD-15C 型紫外检测器,岛津 CTO-20A 柱温箱,LC-Solution 15C Lite 色谱数据系统),AB135-S 型 1/10

[收稿日期] 20120524(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173368);安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2010A213)

[第一作者] 周瑜,硕士研究生,从事中药复方研究, E-mail: 495016103@qq.com

[通讯作者] *许钒,教授,硕士生导师, Tel: 0551-5169038, E-mail: xuafan2008@yahoo.com.cn

万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

药材购自安徽亳州,经本校生药教研室刘守金教授鉴定均符合2010年版《中国药典》相关项下规定,芍药苷、阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-200933,773-9001),芍药内酯苷对照品(批号A0477,含量 $\geq 96.5\%$)、23-乙酰泽泻醇B对照品(批号A0446,含量 $\geq 98\%$)均购于鼎瑞化工(上海)有限公司,甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材吸水率、吸醇率考察 称取1/2处方量药材共21.5 g(当归1.5 g,白芍8 g,川芎4 g,白术2 g,茯苓2 g,泽泻4 g),加8倍量水浸没药材,分别于0.5,1,1.5,2 h过滤,称量药材湿重。结果发现当归芍药散药材浸泡时间均为1 h,吸水率106%,吸醇率28.8%。

吸水率=(药材湿重-药材干重)/药材干重 $\times 100\%$
(吸醇率同法计算)

2.2 正交试验设计 从成分性质分析,芍药苷和芍药内酯苷易溶于水和醇类,23-乙酰泽泻醇B和阿魏酸醇溶性较好,为兼顾4种成分,本试验选用乙醇为提取溶剂。采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,以芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、23-乙酰泽泻醇B的含量为考察指标,全概率评分法^[5]确定最佳醇提工艺。按处方配比取处方药材9份,每份21.5 g,按因素水平表(表1)操作,用乙醇加热回流提取,真空干燥48 h,得干浸膏。每个试验平行操作3次。

表1 当归芍药散提取工艺优选正交试验因素水平

水平	A 乙醇 体积分数/%	B 加醇量/倍	C 提取时间/h	D 提取数/次
1	25	8	1	1
2	50	10	1.5	2
3	75	12	2	3

2.3 芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸含量测定

2.3.1 色谱条件及系统适用性试验 Welchrom-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),流动相乙腈-0.05%磷酸水溶液(15:85),流速1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长230 nm,进样20 μ L,柱温25 $^{\circ}$ C,进样量20 μ L,结果芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸的保留时间分别为8.87,11.34,19.6 min,阴性对照品溶液对含量测定无干扰。

2.3.2 线性关系考察 精密称取芍药内酯苷对照

品适量,加甲醇制得含芍药内酯苷43.60 mg \cdot L⁻¹的对照品溶液,用甲醇依次稀释成21.8,10.9,5.45,2.725,1.362 5,0.681 25 mg \cdot L⁻¹系列对照品溶液。精密称取芍药苷对照品适量,加甲醇制得含芍药苷600 mg \cdot L⁻¹的对照品溶液,用甲醇依次稀释成300,150,75,37.5,18.75,9.375 mg \cdot L⁻¹系列对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品适量,加甲醇制得含阿魏酸12 mg \cdot L⁻¹的对照品溶液,用甲醇依次稀释成3,2.5,2.0,1.5,1.0,0.5 mg \cdot L⁻¹系列对照品溶液。分别精密吸取20 μ L进样,以峰面积对成分质量浓度进行线性回归,结果见表2。

表2 芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸线性关系考察

对照品	回归方程	r	线性范围/mg \cdot L ⁻¹
芍药内酯苷	$Y = 24\ 072X - 884.65$	0.999 9	21.8 ~ 0.681 25
芍药苷	$Y = 28\ 048X + 1\ 995.8$	0.999 9	300 ~ 9.375
阿魏酸	$Y = 49\ 924X + 704.77$	0.999 9	3.0 ~ 0.5

2.3.3 供试品溶液制备 取本品干浸膏约0.16 g,精密称定,置20 mL棕色量瓶中,加甲醇20 mL,称定质量,超声30 min,放冷,补足减失的质重,摇匀,滤过。精密量取续滤液4 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备

2.3.4.1 芍药苷阴性对照液 按处方工艺制备不含芍药的阴性样品,按2.3.3项下方法制备,即得。

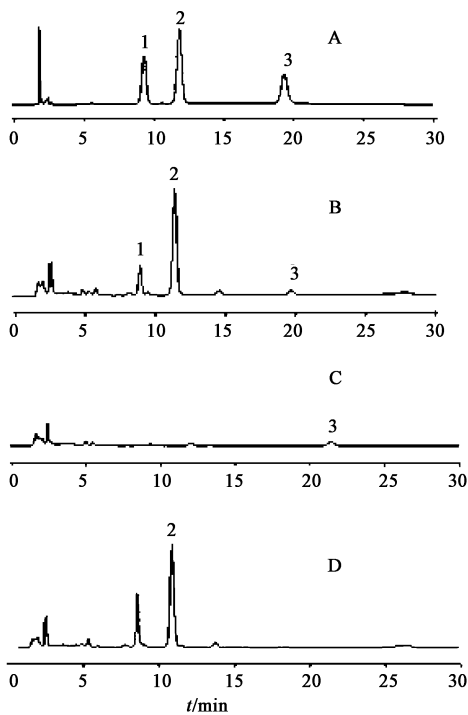
2.3.4.2 阿魏酸阴性对照液 按处方工艺制备不含当归和川芎的阴性样品,按2.3.3项下方法制备,即得。

2.3.5 样品测定 精密吸取供试品溶液20 μ L注入液相色谱仪,每个样品平行进样2次。以外标两点法计算,测定各样品中的芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸的含量。见图1。

2.4 23-乙酰泽泻醇B含量测定

2.4.1 色谱条件及系统适用性试验 Welchrom-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),流动相乙腈-水(75:25),流速1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长208 nm,进样量20 μ L,柱温25 $^{\circ}$ C,进样量20 μ L,结果23-乙酰泽泻醇的保留时间22.71 min,阴性对照品溶液对含量测定无干扰。

2.4.2 线性关系考察 精密称取23-乙酰泽泻醇B对照品适量,加甲醇制得344 mg \cdot L⁻¹的对照品溶液,用甲醇依次稀释成43,34.4,17.1,4.3,1.075,0.263 75 mg \cdot L⁻¹系列对照品溶液,分别精密吸取续滤液20 μ L进样,以峰面积对其质量浓度进行线性



A. 对照品; B. 供试品;
C. 白芍阴性对照; D. 当归、川芎阴性对照;
1. 芍药内酯苷; 2. 芍药苷; 3. 阿魏酸

图 1 当归芍药散醇提液 HPLC

回归,得标准曲线方程 $Y = 18\ 669X - 4\ 908.1$ ($r = 0.999\ 3$),结果表明 23-乙酰泽泻醇 B 在 $0.263\ 75 \sim 43\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.3 样品溶液制备 同 2.3.3 项下制备,取 1 mL,高速离心,过微孔滤膜,即得。

2.4.4 阴性对照溶液 按处方工艺制备不含泽泻的阴性样品,按 2.3.3 项下制备,即得。

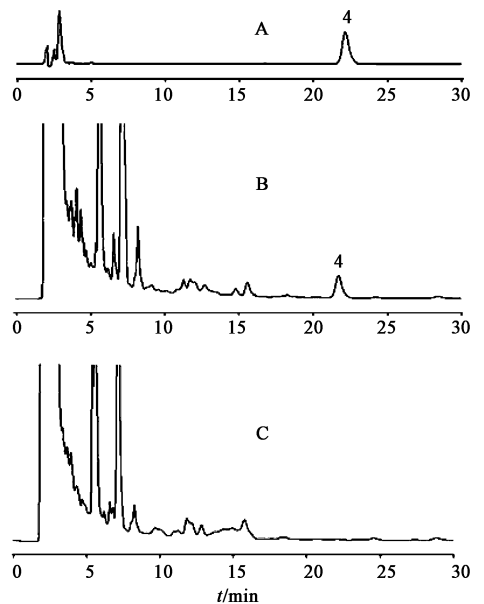
2.4.5 样品测定 精密吸取供试品溶液 $20\ \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,每个样品平行进样 2 次。见图 2。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取对照品溶液,分别按各自液相方法重复进样 6 次,结果芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、23-乙酰泽泻醇 B 的 RSD 分别为 0.91%, 1.11%, 1.96%, 0.65%。说明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样 $20\ \mu\text{L}$,测定各峰面积值,结果芍药内酯苷 RSD 1.99%, 芍药苷 RSD 0.73%, 阿魏酸 RSD 0.94%, 23-乙酰泽泻醇 B RSD 1.40%,表明溶液在 12 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同一供干浸膏,按 2.3.3 和 2.4.3 项下处理,按 2.3.1, 2.4.1 项下色谱条件进



A. 对照品; B. 供试品; C. 泽泻阴性对照; 4. 23-乙酰泽泻醇 B

图 2 当归芍药散醇提液中 23-乙酰泽泻醇 B HPLC

行测定,结果芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸的 RSD 分别为 2.30%, 0.29%, 2.19%; 23-乙酰泽泻醇 B RSD 1.96%。表明方法重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验 称取 3 份已知含量的供试品溶液,分别精密加入定量的芍药内酯苷、芍药苷和阿魏酸对照品溶液和 23-乙酰泽泻醇 B 对照品溶液。按 2.3.3 和 2.4.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1, 2.4.1 项下色谱条件进行测定,计算的芍药内酯苷平均回收率 96.99%, RSD 1.26%, 芍药苷平均回收率 103.59%, RSD 1.09%, 阿魏酸平均回收率 97.20%, RSD 1.79%, 23-乙酰泽泻醇 B 平均回收率 103.83%, RSD 0.85%。

2.6 正交试验安排^[6] 按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,分别测得芍药内酯苷、芍药苷、阿魏、23-乙酰泽泻醇 B 的含量。将结果用多指标试验全概率方法进行数据处理。具体运算公式及相关符号的意义可参考文献[4-6]。根据各指标成分所代表的药味在原方中的比重计算权重,即芍药内酯苷和芍药苷代表芍药(原方中为 16,芍药内酯苷和芍药苷分别为 8),阿魏酸代表当归和川芎($3 + 8 = 11$),23-乙酰泽泻醇 B 代表泽泻(8),换算的 $m_1:m_2:m_3:m_4 = 8:8:11:8$,计算 $P(A_j)$ 及各指标 $P(B_i/A_j) = X_{ij}/S_j$,则综合评分 $(M) = P(B_i)^2 = P(A_1)P(B_i/A_1) + P(A_2)P(B_i/A_2) + P(A_3)P(B_i/A_3) + P(A_4)P(B_i/A_4) = X_{i1}/S_1 + X_{i2}/S_2 + X_{i3}/S_3 + X_{i4}/S_4$ 。在上述各式中 B_i 为第 i 号试验, A_j 为第 j 个指标。 X_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值,以 S_j 表示第 j 个指标下各次 (n

次)试验结果的和。 $i = 1, 2, \dots, n; j = 1, 2, \dots, k$ 。数据处理见表3,方差分析表4。

表3 当归芍药散提取工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	X芍药 内酯苷 /%	Y芍药 苷/%	Z阿魏酸 /%	W乙酰 泽泻醇 B/%	M 综合 评分
1	1	1	1	1	0.174	0.673	0.014	0.002	0.056
2	1	2	2	2	0.238	0.873	0.020	0.010	0.085
3	1	3	3	3	0.279	0.990	0.024	0.011	0.098
4	2	1	2	3	0.318	1.196	0.030	0.050	0.149
5	2	2	3	1	0.245	1.049	0.026	0.036	0.121
6	2	3	1	2	0.200	0.890	0.021	0.040	0.108
7	3	1	3	2	0.250	1.043	0.020	0.049	0.123
8	3	2	1	3	0.345	1.231	0.025	0.051	0.148
9	3	3	2	1	0.304	1.117	0.022	0.027	0.115
K_1	0.239	0.328	0.312	0.292					
K_2	0.378	0.353	0.349	0.315					
K_3	0.385	0.321	0.341	0.395					
R	0.146	0.025	0.037	0.103					

表4 综合评价方差分析

方差来源	SS	N	MS	F	P
A	0.013 6	2	0.006 8	67.996 6	<0.01
B	0.000 6	2	0.000 3	2.833 6	>0.1
C	0.000 8	2	0.000 4	3.761 4	<0.05
D	0.005 8	2	0.002 9	28.993 3	<0.01
误差	0.001 7	18	0.000 1		

注： $F_{0.01}(2, 18) = 6.01, F_{0.05}(2, 18) = 3.55, F_{0.1}(2, 18) = 2.62$ 。

直观分析表明,各因素作用主次顺序为 $D > C > B$ 。方差分析表明 A, C, D 为主要影响因素,其中 A, D 因素有极显著差异, B 因素无显著差异, C 因素有显著差异。确定最佳提取工艺 $A_3B_1C_2D_2$, 即 8 倍量 75% 乙醇回流提取 2 次,每次 1.5 h。

2.7 验证试验 取处方药材 3 份,每份 21.5 g,按优选工艺进行 3 次验证试验,结果芍药内酯苷质量分数为 0.33%, RSD 2.3%; 芍药苷质量分数 1.17%, RSD 0.29%; 阿魏酸质量分数 0.02%, RSD 2.19%; 23-乙酰泽泻醇 B 质量分数 0.05%, RSD 1.99%。表明该工艺稳定可行。

3 讨论

$L_9(3^4)$ 方差分析表中,第 i 号试验重复 3 次数

据的 $X_i = X_{i1} + X_{i2} + X_{i3}$,第 j 列的离差平方和 $S_j = (K_{1j}^2 + K_{2j}^2 + K_{3j}^2)/(3 \times 3) - CT$,第 2 类离差 $S_{E2} = S_T - S_{T1}$,其自由度 $f_{E2} = 9(3 - 1) = 18$,而 $ST = \sum_{i=1}^9 (X_{i1}^2 + X_{i2}^2 + X_{i3}^2) - CT, S_{T1} = 1/3 \sum_{i=1}^9 X_i^2 - CT$ 。在因素水平相同的情况下,正交设计重复试验既避免了使用更大的正交表,又提高了试验精确度。通过重复试验,可较好地消除操作误差、方法误差等对结果的影响。

中药复方是中医临床用药的主要形式和手段,方以药成,方中各药味又含有各种化学成分,其固有的化学成分是复方发挥药效作用的物质基础,中药的功效具有多靶点、多环节、多成分的特点,不同功效有其不同的物质基础,所以以方中任一活性成分都不可能全面反映中医用药所体现的整体疗效^[7],这是中药复方与化学合成药品在研究思路的根本区别,综合分析成为中药复方发展的必然趋势。本试验根据芍药、当归、川芎和泽泻中已知有效成分的性质,选择了合适的提取溶剂,采用多指标成分综合评价的方法,对 4 个药合用的多个有效成分采取了量的控制,符合中药“多靶点、多方位”的原则,较控制药材某种单一成分的含量更为科学合理。

[参考文献]

- [1] 王付. 仲景方临床应用指导[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:512.
- [2] 张志耘,胡志洁. 当归芍药散研究的新进展[J]. 中草药,2000,31(7):8.
- [3] 郑虎占,董泽宏,余靖,等. 中药现代研究与应用. 第 1 卷[M]. 北京:学苑出版社,1997:629.
- [4] 吴永平,王梦,卢定强. 乙酰泽泻醇 B 与洛伐他汀对大鼠降血脂作用的比较[J]. 华西药理学杂志,2011,26(3):243.
- [5] 倪永兴,彭婉,曾论. 多指标试验全概率公式评分法研究糯米炭炮制工艺[J]. 中国药科大学学报,1995,26(6):359.
- [6] 闫小平,郭宇洁,郑蕊杨,等. 多指标综合评价法考察肠安 I 号方醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):12.
- [7] 张霞,蓝苑元,任萃文. 中药复方制剂制备工艺研究进展[J]. 中国现代中药,2007,9(4):38.

[责任编辑 全燕]