

均匀设计优选慈航丹方药半仿生提取工艺条件

于定荣¹, 孙秀梅^{2*}, 张兆旺², 麻印莲¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优选慈航丹方药用半仿生提取工艺条件。方法: 将方中含挥发性成分中药经 SFE-CO₂ 萃取后的药渣与益母草混合, 用均匀设计 U₉(9¹ × 3³) 表安排试验, 在中药规格、煎提温度、煎提溶剂用量、滤过、浓缩等条件相同的情况下, 以盐酸水苏碱、盐酸川芎嗪、阿魏酸、总糖及 ≤1 000 Da 干浸膏为指标进行综合评判, 优选慈航丹方药提取工艺条件。结果: 优选的 3 煎用水 pH 依次为 A = 5.970 7, B = 7.457 0, C = 8.800 8; 提取总时间 D = 4.988 3 h。结论: 结合生产实际, 确定 3 煎用水的 pH 依次为 6.0, 7.5, 8.8; 提取时间依次为 2.0, 1.5, 1.5 h。

[关键词] 慈航丹; SBE 法; 综合指标; 综合评判; 相对分子量 ≤1 000 Da 提取液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0074-05

Optimization of the Technical Conditions of Cihangdan Prescription Extracted by Semi-bionic Extraction Method by Homogeneous Design

YU Ding-rong¹, SUN Xiu-mei^{2*}, ZHANG Zhao-wang², Ma Yin-lian¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technical conditions of semi-bionic extraction (SBE) for Cihangdan Prescription. **Method:** The prepared slice residues, from which the volatile ingredients were extracted by SFE-CO₂, were mixed with Herba Leonuri and U₉(9¹ × 3³) homogeneous design was used taking chuanxiongazine hydrochlorid, ferulic acid, stachydrine hydrochloride, D-glucose anhydrous and dry extraction with molecular weight less than 1 000 Da as indexes; the result was comprehensively evaluated to optimize SBE technical conditions for Cihangdan Prescription based on the same drugs, extracting time, equal solvent and the same refine conditions. **Result:** The pH value of 3 times of extraction is 5.970 7, 7.457 0 and 8.800 8 respectively, and the extracting time is 4.988 3h. **Conclusion:** The pH value of three extractions is 6.0, 7.5, 8.8 respectively, and the extracting time is 2.0, 1.5, 1.5 h in turn.

[Key words] Cihangdan; semi-bionic extraction method; multicomponent indexes; comprehensive evaluation; molecular weight ≤1 000 Da extraction

慈航丹方由益母草、当归、川芎、香附组成, 方中除益母草外, 其他药均含有挥发性成分。本试验将

方中含挥发性成分中药经超临界二氧化碳流体萃取后的药渣与益母草混合, 在中药饮片、煎提温度、溶剂用量、滤过、浓缩等条件相同的情况下, 以均匀设计 U₉(9¹ × 3³) 表安排试验, 通过半仿生提取、“离心-膜滤法”精制得 ≤1 000 Da 提取物; 以盐酸水苏碱、盐酸川芎嗪、阿魏酸、多糖及 ≤1 000 Da 提取物为指标, 综合评判, 优选该方药用 SBE 法提取工艺条件。

1 材料

pHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂), 电子

[收稿日期] 20120104(004)

[基金项目] 国家科技部国际合作项目(2007DFA31180)

[第一作者] 于定荣, 助理研究员, 从事中药炮制及制剂研究,
Tel: 010-84018690, 13436821953, E-mail:
yudingrong0826@sina.com

[通讯作者] * 孙秀梅, 博士生导师, Tel: 0531-82628081, E-mail: sunxiumei8@163.com

分析天平(MA110型,上海第二天平仪器厂),LXJ-②型离心沉淀机(上海第三分析仪器厂),高效液相色谱仪(1100系列美国Agilent公司),UV-3010型紫外分光光度计(日立公司),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)。

药材经山东中医药大学张兆旺教授鉴定,益母草为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 地上部分的饮片,当归为伞形科植物 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根的饮片,川芎为伞形科植物 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根的饮片,香附为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundas* L. 的干燥根茎的饮片。

盐酸水苏碱(批号110712-200709)、阿魏酸(批号110773-200611)、盐酸川芎嗪(批号110817-200305)、D-无水葡萄糖(批号110833-200503)均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品液的制备 按处方比例称取当归、川芎、香附合格饮片,经SFE-CO₂萃取(萃取压力30 MPa、萃取温度48℃、解析温度I 60℃、解析温度II 30℃、萃取时间4.0 h),萃取后的药渣加处方比例量的益母草,混合,按均匀设计U₉(9¹×3³)表,确定考察因素和水平,见表1;试验方案见表2。常压下用半仿生提取法提取3次,加水量依次为中药量的10,8,8倍,第一煎溶剂的pH用HCl调整;第二、第三煎溶剂的pH用NaOH调整;分别将3煎提取液依次粗滤,离心(3 500 r·min⁻¹,25 min),经一定规格的中空纤维膜滤过,浓缩,合并,定容至1 000 mL,即得样品液A₁₋₉(质量浓度为174 g·L⁻¹)。

表1 因素与水平

水平	因素			
	第一煎水 pH值(A)	第二煎水 pH值(B)	第三煎水 pH值(C)	煎煮总时间 h(D)
1	2.00	6.50	8.00	2.00
2	2.50	6.50	8.00	2.00
3	3.00	6.50	8.00	2.00
4	3.50	7.00	8.50	3.50
5	4.00	7.00	8.50	3.50
6	4.50	7.00	8.50	3.50
7	5.00	7.50	9.00	5.00
8	5.50	7.50	9.00	5.00
9	6.00	7.50	9.00	5.00

表2 U₉(9¹×3³)设计

No.	第一煎水 pH A	第二煎水 pH B	第三煎水 pH C	煎煮总时间 D/h
1	2.00	7.00	9.00	5.00
2	4.00	6.50	9.00	2.00
3	2.50	6.50	8.00	3.50
4	3.00	7.50	8.50	2.00
5	5.50	7.00	8.00	2.00
6	3.50	7.00	8.00	5.00
7	4.50	7.50	9.00	3.50
8	5.00	7.50	8.50	3.50
9	6.00	6.50	8.50	5.00

注:煎煮总时间列中,3煎时间分配为2.0(1.0:0.5:0.5);3.5(1.5:1.0:1.0);5.0(2.0:1.5:1.5)。

2.2 供试液的制备 精密吸取2.1项下的样品液A₁₋₉,各50 mL,分别用乙酸乙酯萃取3次(20 mL×3),合并萃取液,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至10 mL,得供试液A₁₋₉(质量浓度870 g·L⁻¹)。

精密吸取2.1项下的样品液A₁₋₉,各4.0 mL,分别加95%的乙醇20.0 mL,搅匀,静置24 h,抽滤,取残渣挥干,用蒸馏水溶解,定容至100 mL,得供试液B₁₋₉(质量浓度为6.96 g·L⁻¹)。

按上述方法,按处方比例量,分别制备得缺川芎、缺川芎及当归、缺益母草的阴性供试液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的盐酸川芎嗪对照品5.8 mg,置25 mL量瓶中,用甲醇定容至刻度,得对照液C(0.232 g·L⁻¹);精密称取干燥至恒重的阿魏酸对照品2.6 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照液D(0.260 0 g·L⁻¹);精密称取干燥至恒重的盐酸水苏碱对照品14.4 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,摇匀,制备得对照液E(0.576 g·L⁻¹);精密称取干燥至恒重的葡萄糖5.6 mg,至10 mL量瓶中,加蒸馏水溶解并定容至刻度,得葡萄糖对照液F(0.56 g·L⁻¹)。

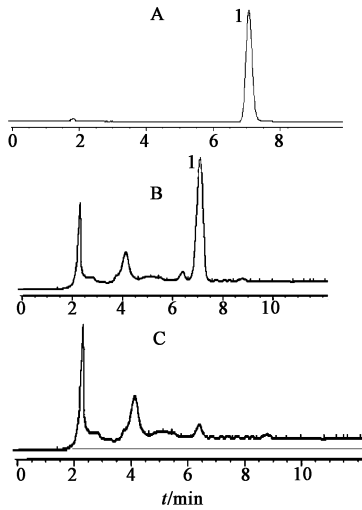
2.4 指标得率测定

2.4.1 盐酸川芎嗪含量测定^[1] Inertsil® ODS-3(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,流动相甲醇-水(52:48),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长292 nm,柱温30℃,进样量20 μL。

标准曲线的绘制 分别精密吸取2.3项下对照液C 0.2,0.5,0.8,1.0,1.8 mL,置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件,进样。

以峰面积为纵坐标, 盐酸川芎嗪含量 (μg) 为横坐标, 得回归方程 $Y = 1795.9X + 19.521$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $0.0928 \sim 0.8352 \mu\text{g}$ 。

含量测定 精密吸取 2.2 项下供试液 A_{1-9} 各 $20 \mu\text{L}$, 按上述色谱条件, 依法测定计算盐酸川芎嗪含量, 结果见图 1, 表 3。



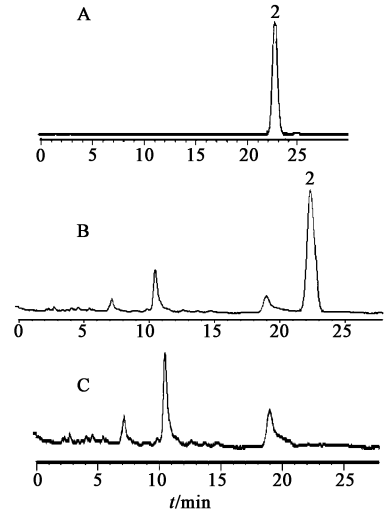
A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性供试品; 1. 盐酸川芎嗪

图 1 盐酸川芎嗪含量测定 HPLC

2.4.2 阿魏酸含量测定^[2] Inertsil® ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-5% 冰醋酸 (25:75), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 320 nm, 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

标准曲线绘制 分别精密吸取 2.3 项下对照液 D 0.1, 0.6, 1.0, 1.4, 3.0 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件, 进样。以峰面积为纵坐标, 阿魏酸含量 (μg) 为横坐标, 得回归方程 $Y = 6393.75X + 507.23$ ($r = 0.9999$), 线性范围 $0.052 \sim 1.56 \mu\text{g}$ 。

含量测定 精密吸取 2.2 项下供试液 A_{1-9} 各 $20 \mu\text{L}$, 按上述色谱条件, 依法测定计算阿魏酸含量, 结果见图 2, 表 3。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 2. 阿魏酸

图 2 阿魏酸含量测定 HPLC

表 3 各指标得率、标准化处理及综合评判

No.	盐酸川芎嗪 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	阿魏酸 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	盐酸水苏碱 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	总糖 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	相对分子质量 $\leq 1000 \text{ Da}$ 提取 物/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Y
1	23.7177 (-1.4098)	20.2222 (0.4378)	99.6220 (1.0206)	99.1511 (0.6329)	59.56 (-0.0152)	1.3009
2	25.1176 (-1.1426)	6.8953 (-0.3830)	88.1231 (0.5897)	73.8625 (-0.7901)	56.56 (-1.0602)	-6.3205
3	25.8175 (-1.0090)	4.1761 (-0.5505)	38.2801 (-1.2778)	99.5097 (0.6531)	59.37 (-0.0820)	-3.6687
4	36.8553 (1.0980)	3.1677 (-0.6126)	34.2837 (-1.4275)	65.2640 (-1.2739)	60.35 (0.2633)	-3.3283
5	31.3633 (0.0497)	53.2441 (2.4717)	87.3451 (0.5606)	87.3995 (-0.0284)	57.49 (-0.7359)	2.8720
6	37.9860 (1.3139)	16.1883 (0.1893)	86.9508 (0.5458)	117.2600 (1.6518)	61.67 (0.7217)	8.8838
7	34.5131 (0.6509)	3.4083 (-0.5978)	39.4737 (-1.2331)	74.5874 (-0.7493)	58.74 (-0.3007)	-4.3674
8	34.0555 (0.5636)	7.1819 (-0.3654)	93.3557 (0.7858)	103.0956 (0.8548)	56.84 (-0.9632)	0.4600
9	30.5019 (-0.1148)	3.5461 (-0.5893)	84.0201 (0.4360)	71.0015 (-0.9510)	65.82 (2.1724)	4.1681

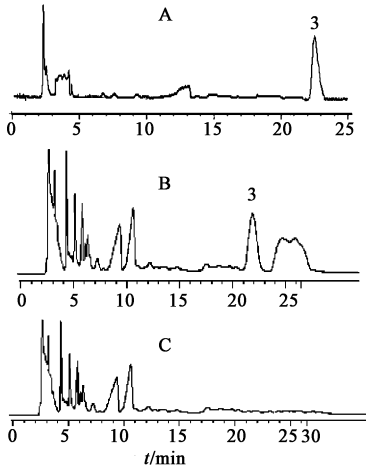
注: 括号中的数据为标准化处理后结果(表 4 同)。

2.4.3 盐酸水苏碱含量测定^[3] Inertsil® / Wondasil™ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 氨基色谱柱, 流动相乙腈-水 (80:20), 检测波长 202 nm, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

标准曲线绘制 分别精密吸取 2.3 项下对照液

E 0.5, 1.2, 2.0, 3.0, 5.0 mL, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。按上述色谱条件进样, 以峰面积为纵坐标, 盐酸水苏碱含量 (μg) 为横坐标, 得回归方程 $Y = 1309.875X - 160.12$ ($r = 0.9997$), 线性范围 $0.2304 \sim 2.304 \mu\text{g}$ 。

含量测定 精密吸取 2.2 项下供试液 A₁₋₉ 各 20 μL,按上述色谱条件,依法测定计算盐酸水苏碱含量,结果见图 3,表 3。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 3. 盐酸水苏碱

图 3 盐酸水苏碱含量测定 HPLC

2.4.4 总糖含量测定 标准曲线绘制:精密吸取 2.3 项下对照品溶液 F 0.25, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 mL, 置干燥具塞的试管中,加蒸馏水使成 2.0 mL, 分别加入 0.12% 的蒽酮试剂 4.0 mL (精确称取蒽酮 0.12 g, 用浓硫酸定容至 100 mL, 冷至室温即得) 混匀。以蒸馏水 2.0 mL 加蒽酮试剂 4.0 mL 为随行空白。水浴加热 7 min, 然后冰水浴中恒温 3 min, 在 625 nm 处测吸收度, 以吸收度为纵坐标, 供试液浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 得回归方程 $Y = 2.3397X - 0.0047$ ($r = 0.9997$), 线性范围 0.07 ~ 0.28 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

含量测定 精密吸取 2.2 项下供试液 B₁₋₉ 各 0.5 mL, 按上述方法测定吸收度, 依法计算各供试液中总糖含量, 结果见表 3。

2.4.5 提取物测定 (相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da)

精密吸取 2.1 项下样品液 A₁₋₉ 各 10 mL, 分别置已恒重的蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 105 °C 烘至恒重, 计算相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物干膏得率, 结果见表 3。

2.5 数据处理 以盐酸川芎嗪、阿魏酸、盐酸水苏碱、总糖及相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物为指标, 按公式 $X'_{i,j} = (X_{i,j} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理。式中 $X'_{i,j}$ 为标准化后得值, $X_{i,j}$ 为样品液 i 中成分 j 的含量, \bar{X}_j 为各种样品液 i 中成分 j 的平均值, S_j 为成分 j 的标准差。根据各指标在工艺中的主次地位, 给予不同的加权系数, 即得综合评价指标 Y 值, $Y = [(盐酸水苏碱 + 盐酸川芎嗪 + 阿魏酸) \div 3] \times 5 + 相对分子质量 \leq 1\ 000$ Da 提取物干浸膏 $\times 3 + 总糖 \times 2$, 结果见表 3。

将表 1 及表 3 中 Y 值用 JYSYSj 软件处理, 经二次多项式逐步回归统计处理, 得回归方程:

$$F = 2.93376 + 9.306932E - 02 * A * A + 2.1475 * D * D + 0.8587915 * A * B - 0.4348275 * A * C - 0.510100875 * A * D - 1.213201 * C * D;$$

$$SS = 0.3800, r = 0.9999, F = 166.3902。$$

查 F 值表 $F_{0.05}(6, 2) = 19.33, F_{0.05}(6, 2) < F, P < 0.05$, 优化结果为 $A = 5.9707, B = 7.4570, C = 8.8008, D = 4.9883$ 。预测值 $Y = 83.7$ 。结合生产实际, 确定 3 煎用水的 pH 依次为 6.0, 7.5, 8.8; 提取时间依次为 2.0, 1.5, 1.5 h。

3 验证试验

按 2.5 项下优选出的工艺条件, 依 2.4 项下各指标得率的测定方法、2.5 项下数据处理方法, 依法测定和计算, 即得综合评价 $Y' = 19.8088$, 结果表明, 验证试验所得综合评判 Y 与预测值最接近, 结果见表 4。

4 小结与讨论

本试验以盐酸川芎嗪、阿魏酸、盐酸水苏碱、多糖及相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物为评判指标, 优选出慈航丹方药药效物质提取工艺参数为 $A = 5.9707, B = 7.4570, C = 8.8000, D = 4.9883$ 。结合生产实际, 确定 3 煎用水的 pH 依次为 6.0, 7.5, 8.8; 提取时间依次为 2.0, 1.5, 1.5 h。验证试验结果与预测值最接近, 表明优选条件可行。

表 4 3 批验证试验结果

序号	盐酸川芎嗪 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	阿魏酸 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	盐酸水苏碱 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	总糖 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da 提取物 $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Y'
1	59.373 8	63.204 6	71.882 2	86.8407	64.80	19.808 8
2	59.771 1	63.349 0	73.676 3	87.2974	64.85	
3	60.053 1	63.826 1	70.859 8	86.992 9	65.32	
\bar{x}	59.732 7(5.465 1)	63.459 9(3.100 9)	72.139 4(-0.009 2)	87.043 7(-0.048 4)	64.99(1.881 4)	
RSD/%	0.57	0.51	1.98	0.27	0.44	

一测多评法结合指纹图谱对杜仲质量控制的研究

林芳¹, 王云红², 万丽¹, 杨荣平^{2,3*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065;
3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

[摘要] 目的: 建立杜仲多指标 HPLC 指纹图谱, 并应用一测多评法对药材中松脂醇二葡萄糖苷(PDG)、绿原酸(CA)、京尼平苷酸(PA)的含量同时进行测定。方法: 采用 Welchrom™ C₁₈ 110A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.3% 冰醋酸进行梯度洗脱, 柱温 20 ℃, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 238 nm, 以松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸和京尼平苷(GP)为指标性成分建立杜仲药材的指纹图谱。以绿原酸为参照内标, 通过相对校正因子对松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸进行含量测定。结果: 建立了杜仲多指标 HPLC 指纹图谱, 标定了 12 个共有指纹峰。对杜仲中 3 个成分用一测多评法进行了测定, 其计算值与外标法实测值之间没有明显差异。结论: 建立了杜仲药材多指标 HPLC 指纹图谱和一测多评法对松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、京尼平苷酸进行同时测定的方法, 该方法简便可行, 为更全面合理科学地对杜仲药材质量的评价提供了技术支撑。

[关键词] 杜仲; 一测多评; 多指标指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0078-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1211.016.html>

[网络出版时间] 2012-05-04 12:11

Study on the Quality Control of Eucommiae Cortex by Multi-components Quantitation by One Marker Method and Fingerprint

LIN Fang¹, WANG Yun-hong², WAN Li¹, YANG Rong-ping^{2,3*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China;

2. China Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;

3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

[收稿日期] 20111227(015)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30801546)

[通讯作者] * 杨荣平, 博士, 从事中药新制剂新剂型研究, Tel: 023-89029056, E-mail: rongpingyang18@yahoo.com.cn

本试验根据“SBE 法理论”, 以上述 5 个指标的数据进行标准化处理, 可消除各指标之间由于单位和量纲的不同, 以及各指标变量范围相差悬殊而造成的影响。针对各指标在工艺选择中的主次, 赋予不同的加权系数, 确定综合评判 Y 值的关系式; 以标准化值加权后再求和, 得到综合评判指标值^[4], 优选出 SBE 法最佳提取工艺条件。用多指标综合评判方法, 体现了中药药效物质提取中, 坚持“有成分论, 不唯成分论”, 发挥活性混合物综合作用的特点, 同时也有利于用单体成分控制制剂质量。

[参考文献]

- [1] 桂双英, 郝枝花, 刘道金. 高效液相色谱法测定川芎嗪葡萄糖注射液中盐酸川芎嗪的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(4): 46.
- [2] 刘放, 黄卫平. 归脾丸中阿魏酸含量测定[J]. 河南中医药学刊, 1996, 11(1): 23.
- [3] 严优芍, 李卫民. HPLC 法测定益母草分散片中盐酸水苏碱的含量[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(6): 604.
- [4] 张兆旺. 中药药剂学专论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 68.

[责任编辑 顾雪竹]