

当归四逆汤半仿生提取工艺

程小平¹, 吴国泰^{2*}, 徐强松³, 刘峰林², 王瑞琮²

(1. 青海省药品不良反应监测中心, 西宁 810007; 2. 甘肃中医学院方剂学重点实验室, 兰州 730000;
3. 武警河北总队秦皇岛市支队卫生队, 河北 秦皇岛 066000)

〔摘要〕 目的: 优选当归四逆汤半仿生提取工艺。方法: 采用 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 均匀设计优选当归四逆汤提取工艺, 采用小鼠耳肿胀及扭体反应试验的药效学指标和干浸膏得率综合评价制备工艺。结果: 当归四逆汤最佳提取工艺为提取温度 $(60 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 提取 3 次, 加水量分别为 10, 8, 8 倍量; 提取用水 pH 依次为 3.0, 7.5, 8.5; 煎煮时间依次为 100, 50, 25 min。结论: 以药效学指标结合化学指标综合评价和优选的当归四逆汤提取工艺方法简便易行, 适于生产实践。

〔关键词〕 当归四逆汤, 半仿生提取, 抗炎镇痛

〔中图分类号〕 R283.6 〔文献标识码〕 B 〔文章编号〕 1005-9903(2012)07-0058-03

当归四逆汤出自张仲景《伤寒论》, 具有温经散寒、养血通脉的功效, 临床用于血虚寒厥证、手足厥寒或腰、股、腿、足、肩臂疼痛等, 现代多用于感冒、老年慢性头痛、肥大性脊椎炎、冻疮等的治疗^[1]。半仿生提取技术(SBE)是从生物药剂学角度, 模拟口服给药及药物经胃肠道转运的一种新型提取工艺^[2]。本研究以药效学指标结合化学指标综合评价和优选当归四逆汤(DSD)提取工艺, 为 DSD 现代开发提供参考。

1 材料

当归、桂枝、白芍、细辛、通草、大枣、制甘草均购自兰州老百姓大药房, 经刘峰林副教授鉴定, 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* presl 的干燥茎, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根, 细辛为马兜铃科植物细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) kitag 的干燥全草, 通草为五加科植物脱木 *Tetrapanax papyriferus* (Hook) K. Koch 的干燥茎髓, 大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根及根茎, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

PHS-3R 型精密 pH 计(江苏亨利仪器厂),

WMK-08 型电热恒温鼓风干燥箱(江苏医疗器械厂), KDM 型可调电子控温电热套(成都泰盟仪器厂), BS110sartorius 型电子天平(北京赛多利斯有限公司)。

昆明种小鼠, 普通级, 体重 (20 ± 2) g, 雌雄各半, $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 控温和光暗周期各 12 h 环境饲养, 自由饮水。合格证号 SCXK(甘)2010-0004, 兰州大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 均匀设计试验 根据 SBE 法原理^[3-4], 在饮片粉碎粒度、提取温度、加水量、离心、浓缩等条件相同的情况下, 确定考察的主要因素及水平。参考文献[5], 拟采用 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 表进行试验。

取当归、桂枝、白芍、细辛、通草、大枣、制甘草 7 味饮片分别粉碎, 过 20 目筛, 按处方比例称取粗粉(当归 12 g, 桂枝 9 g, 白芍 9 g, 细辛 3 g, 通草 6 g, 制甘草 6 g, 大枣 6 g), 共 9 份, 每份 51 g, 混匀, 常压加热回流提取 3 次, 提取温度 $(60 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 加水量分别为粗粉质量的 10, 8, 8 倍量, 水煎 pH 及提取时间按表 1, 提取液用 4 层纱布加 100 目筛分别滤过, 离心 $(3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}, 10\ \text{min})$, 合并滤过液, 减压浓缩, 与提取加水相同 pH 的缓冲液稀释至 102 mL, 得 1~9 号受试物(每 1 mL 相当于原饮片 0.5 g), 备用。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 干浸膏得率的测定 精密吸取 DSD 药液 10 mL, 置干燥至恒重蒸发皿中, 水浴蒸干, 105°C 烘至恒重, 计算干浸膏得率, 见表 2。

2.3.2 DSD 对二甲苯所致小鼠耳壳肿胀的影响^[6] KM 小鼠 100 只, 体重 18~22 g, 雌雄兼用, 按性

〔收稿日期〕 20111108(004)
〔第一作者〕 程小平, 助理研究员, 从事中药新药研究与药事管理, Tel:0971-8865643, E-mail: xp0005@sina.com
〔通讯作者〕 * 吴国泰, 讲师, 从事中药药理与新药开发研究, Tel:0931-8765337, E-mail: wgt@gszy.edu.cn

表1 DSD 提取工艺 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 试验安排

No.	A	B	C	D	平均得率/ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	肿胀度/mg	扭体次数/次
1	2.0	7.0	9.0	4.0	0.473	7.09 ± 2.11	15.3 ± 3.0
2	4.0	6.5	9.0	2.0	0.436	8.17 ± 3.03	16.6 ± 4.2
3	2.5	6.5	8.0	3.0	0.465	8.91 ± 2.10	19.9 ± 5.5
4	3.0	7.5	8.5	2.0	0.412	8.64 ± 3.08	22.1 ± 3.9
5	5.5	7.0	8.0	2.0	0.433	9.45 ± 2.91	20.4 ± 3.7
6	3.5	7.0	8.0	4.0	0.476	8.29 ± 2.01	20.0 ± 4.0
7	4.5	7.5	9.0	3.0	0.449	8.97 ± 2.00	16.3 ± 4.5
8	5.0	7.5	8.5	3.0	0.430	7.49 ± 2.50	18.1 ± 5.0
9	6.0	6.5	8.5	4.0	0.454	8.29 ± 3.00	19.0 ± 2.8

注:对照组肿胀度(14.56 ± 3.07) mm,对照组扭体数(25.7 ± 4.9)次。

别体重随机分为10组,设对照组和1~9号受试组,每组10只。1~9号受试组分别按 $20\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃1~9号受试物,对照组灌胃等容量生理盐水,每天1次,连续3 d。末次给药30 min后,于每只小鼠右耳两面涂二甲苯 $30\text{ }\mu\text{L}$ 致炎,左耳作对照。30 min后处死,用6 mm打孔器取下左右耳相同部位的圆片,称重。用下面公式计算肿胀度。结果见表1。

肿胀度 = 右耳重 - 左耳重。

2.3.3 DSD 对冰醋酸所致小鼠扭体反应的影响^[7]

KM 小鼠100只,按2.3.2项下方法分组及给药。末次给药1 h后,每只小鼠分别腹腔注射0.6%的冰醋酸溶液0.2 mL,观察并记录15 min内小鼠扭体次数。结果见表1。

2.4 数据分析 将干浸膏得率、肿胀抑制率、疼痛抑制率3项指标汇总,根据各评价指标在工艺筛选中的主次确定相应的加权系数,即得综合评价指标Y(表2)。

表2 DSD 干浸膏得率和药效变化综合评价

No.	α 干浸膏得率 处理结果/%	β 肿胀 抑制率/%	γ 疼痛 抑制率/%	Y 综合 评分
1	99.4	48.7	59.4	45.59
2	91.6	56.1	64.7	46.44
3	97.7	61.2	77.6	53.03
4	86.5	59.3	85.9	54.03
5	90.9	64.9	81.0	53.18
6	100.0	57.0	78.0	53.48
7	94.3	61.6	65.5	47.52
8	90.3	51.4	70.4	48.28
9	95.3	57.0	73.8	50.86

注:干浸膏得率 = (各组干浸膏平均得率/最大干浸膏平均得率) $\times 100\%$ 。肿胀抑制率 = (对照组平均肿胀度 - 给药组平均肿胀度)/对照组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。疼痛抑制率 = (对照组平均扭体次数 - 受试组平均扭体次数)/对照组平均扭体次数 $\times 100\%$ 。

$Y = \alpha \times 0.2 + \beta \times 0.4 + \gamma \times 0.4$

将表1中各试验水平的3个因素及表2中相应试验水平的综合指标Y值进行数据分析,用二次多项式逐步回归,得回归方程:

$Y = 29.033 + 0.158 \times \alpha + 0.366 \times \beta + 0.121 \times \alpha \times \beta + 0.335 \times \gamma + 0.028 \times \alpha \times \gamma - 0.022 \times \beta \times \gamma$ ($r = 0.9978$)。将回归方程进行优化处理,Y期望值最大为56.350,得最佳提取条件为3次用水pH依次为3.12,7.60,8.48;煎煮总时间为2.89 h。结合实际最终确定为3次煎煮用水pH依次为3.0,7.5,8.5;煎煮时间依次为100,50,25 min。

3 讨论

SBE理论强调对各指标标准化处理并加权考虑对综合评价Y值的影响,实验根据各评价指标在工艺优选中的主次加权求和,以综合评价指标Y值优选SBE最佳条件,比单纯的化学评价工艺更科学,更合理^[8]。

实验以药效学指标(肿胀抑制率和疼痛抑制率)和干浸膏得率为指标综合评价提取工艺,体现了方剂药效物质提取中坚持“有成分论,不唯成分论^[8]”,发挥活性混合物综合作用特点,同时体现用药效学指标控制制剂质量的思路和方法。

[参考文献]

[1] 姚廷周. 新伤寒论校注[M]. 北京:中国古籍出版社, 2001:231.

[2] 张兆旺,孙秀梅. “半仿生提取法”的特点与应用[J]. 世界科学技术——中药现代化,2000,2(1):35.

[3] 张兆旺,孙秀梅,王英姿. 用均匀设计优选复壮胶囊的半仿生提取工艺条件[J]. 中国中药杂志,2002,27(2):103.

大蒜总多糖、总皂苷的提取纯化工艺

王瑞海, 柏冬, 刘丽梅*

(中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 优选大蒜总多糖、总皂苷的提取纯化工艺。方法: 采用双提法提取大蒜油和大蒜总多糖, 乙醇提取总皂苷, 以大蒜总多糖、总皂苷收得率为考察指标, 对料液比、提取时间、提取次数以及药液浓缩浓度等进行 $L_9(3^4)$ 正交试验和单因素考察。结果: 优选大蒜总多糖提取工艺条件为加 5 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h; 纯化条件为药液浓缩至含生药 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。85% 乙醇沉淀; 总皂苷提取工艺为加 5 倍量乙醇提取 2 次, 每次 1 h; 纯化条件为药液减压回收乙醇至无醇味 ($53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 相对密度 1.065), 加水至药材质量的 0.8 倍 ($1.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。结论: 该工艺稳定, 利用一批大蒜原料, 可同时得到大蒜油、大蒜总多糖和总皂苷, 大蒜总多糖提取物出膏率为 21.36%, 含多糖 51.36%, 大蒜总皂苷提取物出膏率为 6.04%, 含总皂苷 3.79%。

[关键词] 大蒜多糖; 大蒜皂苷; 正交设计; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0060-04

大蒜主要含有挥发油、氨基酸、糖、苷类化合物等, 其中大蒜多糖和皂苷是大蒜的有效成分。大蒜多糖能够增强免疫力, 对肝损伤有保护作用, 具有抗氧化抗病毒等多种生物活性^[1]。大蒜皂苷类成分具有抗真菌、抗肿瘤、抗血栓、降低胆固醇的作用^[2-3]。目前大蒜多糖的提取多采用大蒜脱脂、草酸铵提取, 用酸调节 pH 后, 在大蒜提取液中加入乙醇使多糖析出^[4]。大蒜皂苷的提取采用脱水蒜粉, 用 40%~80% 乙醇提取^[5]。本课题以同一批大蒜为原料, 采用双提法, 水蒸气蒸馏提取大蒜油后, 水提取大蒜总多糖、醇提大蒜总皂苷。之前报道了大蒜油的优选工艺^[6], 本文报道大蒜总多糖、总皂苷提取、纯化工艺。

1 材料

1.1 仪器 SPS202F 型天平(奥豪斯公司), DS200 型高速组织捣碎机(江苏江阴周庄科研器械厂), 挥发油提取器(北京玻璃仪器厂), 98-1-B 型电热套(天

津泰斯特仪器有限公司), 8453 型紫外-可见分光光度计(美国安捷伦), HW·SY11-K 型数显恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司), CX-250 型超声波清洗机(天海双龙医疗设备有限公司), P225D 型天平(德国赛多利斯)。

1.2 试药 大蒜生药材购自北京市东直门内南小街奥士凯菜市场, 产地为山东金乡, 经课题组鉴定为百合科植物大蒜 *Allium sativum* L. 的鳞茎。浓硫酸、苯酚、无水乙醇、甲醇(均为分析纯, 北京化工厂); 大蒜皂苷对照品 Proto-iso-eruboside-B (PIEB, 实验室自制, 经核磁共振光谱及质谱测试鉴定结构, HPLC 归一化法测试纯度 >98%)。D-无水葡萄糖(中国药品生物检定所, 批号 110833-200503)。

2 方法和结果

2.1 大蒜总多糖、总皂苷提取工艺流程 大蒜药材→粉碎(3~5 mm 颗粒)→提取挥发油(加 5 倍水, 保温 1 h, 提取油 1 h)→过滤→蒜渣→提取多糖→

[收稿日期] 2011-12-08

[基金项目] 国家重大科技专项(2009ZX09301-005-11)

[第一作者] 王瑞海, 副主任技师, 从事中药学相关研究, Tel:010-64014411-2592, E-mail: betterhairui@126.com

[通讯作者] * 刘丽梅, 研究员, 从事中药化学、质量、工艺研究, Tel:010-64014411-2592, E-mail: liulimeihb@sina.com

[4] 张瑞亭, 张兆旺, 孙秀梅. 思维方式的转换与中药“半仿生提取法”[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(9): 542.
[5] 方开泰. 均匀设计——数论方法在试验设计中的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363.
[6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 901.

[7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 355.
[8] 吕青涛, 张兆旺, 孙秀敏, 等. 乙肝颗粒剂 4 种提取方法提取液的成分比较[J]. 中成药, 2000, 22(11): 752.

[责任编辑 全燕]