

半夏白术天麻汤方药用半仿生提取法工艺条件优选

蔡梅超, 徐男, 张超, 孙秀梅*, 张兆旺
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 用均匀设计优选半夏白术天麻汤的半仿生提取工艺。方法: 采用 $U_L(9^1 \times 3^3)$ 均匀试验设计表, 以天麻素、甘草次酸、HPLC 总面积、总黄酮、相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 的提取物为指标综合评判, 优选半夏白术天麻汤半仿生提取的工艺条件。结果: 3 煎用水的 pH 依次为 2.00, 6.56, 8.73; 3 煎总计时间为 4.92 h。结论: 结合生产实际, 确定 3 煎用水的 pH 依次为 2.0, 6.5, 8.5; 提取时间依次为 2.0, 1.5, 1.5 h。

[关键词] 半夏白术天麻汤; 半仿生提取法; 均匀设计; 相对分子质量 $\leq 1\ 000$ 提取物; 综合评判

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0021-05

Optimization of Technology Conditions for Banxia Baizhu Tianma Decoction by Semi-Bionic Extraction Method (SBE)

CAI Mei-chao, XU Nan, ZHANG Chao, SUN Xiu-mei*, ZHANG Zhao-wang
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technology of Banxia Baizhu Tianma decoction by SBE with uniform design. **Method:** Using uniform design table $U_L(9^1 \times 3^3)$ to optimize the technology conditions of Banxia baizhu tianma decoction by SBE with composite evaluate indexes of gastrodin, glycyrrhetic acid, total area of HPLC, total flavonoids and the extract of molecular $\leq 1\ 000$. **Result:** The suitable pH for three times of water solution should be 2.00, 6.56, 8.73 respectively and the total time was 4.916 2 h. **Conclusion:** Combined with practical production, the optimum pH was 2.0, 6.5, 8.5, the extraction time was 2.0, 1.5, 1.5 h respectively.

[Key words] Banxia Baizhu Tianma decoction; semi-bionic extraction method; uniform design; molecular $\leq 1\ 000$ extract; comprehensive evaluation

半夏白术天麻汤源于《医学心悟》, 由半夏、天麻、茯苓、橘红、白术、甘草组成, 具有燥湿化痰, 平肝息风的作用。在“半仿生提取法(SBE)”研究取得较多成果的基础上^[1-3], 本实验以半夏白术天麻汤为模型方药, 相对分子质量(Mr) $\leq 1\ 000$ 提取物为最终产物, 对该产物作天麻素、甘草次酸、总黄酮、HPLC 总面积、Mr $\leq 1\ 000$ 的提取物的测定, 综合分析评判,

优选该方药用 SBE 法提取较佳的工艺条件。

1 材料

pH S-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂), MA110 型电子分析天平(上海第二分析仪器厂), 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), UV3010 型紫外分析仪(日立公司), 箱式电阻炉(上海申光仪器仪表有限公司), 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, 半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. BL. 的干燥块茎, 天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎, 茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf. 的干燥菌核, 橘红为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco. 的未成熟或近成熟的干燥

[收稿日期] 20110615(004)

[第一作者] 蔡梅超, 在读博士, 讲师, 从事中药新药研究与中药炮制原理研究, Tel: 0531-82628081, E-mail: caimeichao@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 孙秀梅, 教授, 博士生导师, 从事中药新药与中药炮制原理研究, Tel: 0531-82628081, E-mail: sunxiumei8@163.com

外层果皮,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz 的干燥根茎,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的根及根茎。

天麻素对照品(批号 612-8206),甘草次酸对照品(批号 723-9002)均购自中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 均匀设计试验 为保证实验的可比性和可重复性,在饮片规格、煎煮温度、煎煮用水量、滤过、浓缩等条件相同的前提下,确定考察的主要因素及水平,见表 1。选用均匀设计 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 表安排实验方案,见表 2。

表 1 半夏白术天麻汤方药均匀设计试验因素水平

水平	A 第一 煎水 pH	B 第二 煎水 pH	C 第三 煎水 pH	D 第四 煎水 pH
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 半夏白术天麻汤方药均匀设计试验 $U_9(9^1 \times 3^3)$ 实验设计

No.	A	B	C	D
1	2.00	7.00	9.00	5.00(2.0,1.5,1.5)
2	4.00	6.50	9.00	2.00(1.0,0.5,0.5)
3	2.50	6.50	8.00	3.50(1.5,1.0,1.0)
4	3.00	7.50	8.50	2.00(1.0,0.5,0.5)
5	5.50	7.00	8.00	2.00(1.0,0.5,0.5)
6	3.50	7.00	8.00	5.00(2.0,1.5,1.5)
7	4.50	7.50	9.00	3.50(1.5,1.0,1.0)
8	5.00	7.50	8.50	3.50(1.5,1.0,1.0)
9	6.00	6.50	8.50	5.00(2.0,1.5,1.5)

注:括号内数字依次为第 1,2,3 煎的煎提时间。

2.2 样品液的制备 按处方比例称取 10~20 目粗粉 92 g,按表 2 布点实验,常压下加热回流提取 3 次(加水量依次为药材质量的 10,8,8 倍)。分别将 3 煎提取液依次粗滤,离心($3\ 500\ r \cdot \min^{-1}$, 25 min),

一定规格的中空纤维膜滤过,合并,浓缩,定容至 1 000 mL,即得 $Mr \leq 1\ 000$ 提取物的样品液 $SBE_{1,9}$ (质量浓度为 $0.092\ g \cdot mL^{-1}$)。

2.3 供试液的制备 精密吸取 2.2 项下样品液 $SBE_{1,9}$ 各 10 mL,蒸干,残渣用乙腈-水(3:97)混合溶液溶解定容至 10 mL,经过 $0.45\ \mu m$ 微孔滤膜滤过,即得供试液 $A_{1,9}$,供天麻素含量和 HPLC 总面积的测定(质量浓度为 $0.092\ g \cdot mL^{-1}$)。

精密吸取 2.2 项下样品液 $SBE_{1,9}$ 各 25 mL,加三氯甲烷 30 mL、盐酸 2.5 mL,水浴回流 1.5 h,用 20 mL 三氯甲烷萃取 2 次,回收三氯甲烷,用甲醇定容至 10 mL,经过 $0.45\ \mu m$ 微孔滤膜滤过,即得供试液 $B_{1,9}$,供甘草次酸的测定(质量浓度为 $0.23\ g \cdot mL^{-1}$)。

精密吸取 2.2 项下样品液 $SBE_{1,9}$ 各 100 mL,浓缩并定容至 50 mL,即得供试液 $C_{1,9}$ (每 1 mL 相当于药材 0.184 g)。供测定 $Mr \leq 1\ 000$ 提取物得率和总黄酮含量。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取天麻素对照品 1.74 mg,用甲醇配制成对照液 I ($0.174\ g \cdot mL^{-1}$),精密称取甘草次酸对照品 0.29 mg,用甲醇配制成对照液 II ($0.029\ g \cdot mL^{-1}$),精密称取柚皮苷对照品 3.95 mg,用甲醇配制成对照液 III ($0.395\ g \cdot mL^{-1}$)。

2.5 含量测定

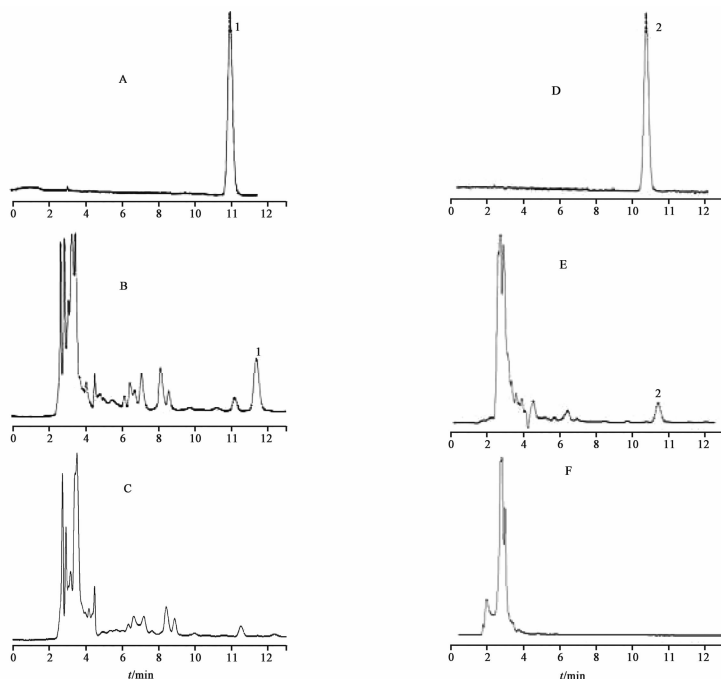
2.5.1 天麻素的含量测定 Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6\ mm \times 250\ mm, 5\ \mu m$),流动相 乙腈-0.05% 磷酸(3:97),检测波长 220 nm,流速 $1.0\ mL \cdot \min^{-1}$,柱温 $25\ ^\circ C$,进样量 20 μL ,见图 1。

标准曲线的绘制 精密吸取 2.4 项下对照液 I,按上述色谱条件,各进样 1,3,5,7,9 μL ,以峰面积为纵坐标,天麻素的含量(μg)为横坐标,得回归方程 $Y = 1\ 646.1X + 153.27 (r = 0.999\ 8)$,线性范围 0.763~6.867 μg 。

含量测定 精密吸取 2.3 项下的供试液 $A_{1,9}$,各进样 20 μL ,按上述色谱条件,依法测定计算天麻素的含量,结果见表 3。

2.5.2 甘草次酸的含量测定 Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6\ mm \times 250\ mm, 5\ \mu m$),流动相 甲醇-0.1% 磷酸(87:13),检测波长 250 nm,流速 $1.0\ mL \cdot \min^{-1}$,柱温 $25\ ^\circ C$,进样量 20 μL ,见图 1。

标准曲线的绘制 精密吸取 2.4 项下对照液 II,按上述色谱条件,各进样 2,6,10,14,18 μL ,以峰面积为纵坐标,甘草次酸的含量(μg)为横坐标,得



A. 对照品(220 nm); B. 供试品(220 nm); C. 阴性(缺天麻); D. 对照品(250 nm); E. 供试品(250 nm); F. 阴性(缺甘草)
1. 天麻素; 2. 甘草次酸

图1 半夏白术天麻汤 HPLC

表3 半夏白术天麻汤方药半仿生提取法工艺条件各指标成分含量及标准化处理

No.	天麻素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	甘草次酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	HPLC 总峰面积	总黄酮/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$\leq 1\ 000\ \text{D}$ 提取物/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	Y 值
1	1.434 1(1.325 9)	26.658 5(-0.011 4)	4 495.47(1.737 8)	3.100 1(0.757 1)	0.222 2(1.335 3)	9.699 5
2	1.437 5(1.333 7)	38.641 3(1.184 3)	2 628.56(-0.650 3)	2.491 8(-0.273 7)	0.109 1(-1.543 5)	1.822 1
3	1.185 0(0.767 8)	37.544 8(1.074 9)	3 490.23(0.452 0)	3.292 0(1.082 3)	0.193 5(0.605 9)	8.119 9
4	0.249 0(-1.329 6)	12.295 9(-1.444 5)	3 151.16(0.018 24)	2.871 8(0.370 3)	0.121 8(-1.221 0)	-8.794 3
5	0.714 6(-0.286 1)	12.298 5(-1.444 2)	2 300.34(-1.070 5)	2.387 7(-0.450 1)	0.214 0(1.126 3)	-4.354 0
6	1.048 0(0.460 9)	22.895 3(-0.386 9)	3 675.76(0.689 2)	3.544 4(1.510 0)	0.161 7(-0.203 8)	3.076 4
7	0.419 8(-0.948 9)	30.737 6(0.395 7)	2 466.62(-0.857 4)	2.394 0(0.439 5)	0.175 4(0.145 0)	-3.038 3
8	0.488 0(-0.793 9)	23.746 2(-0.302 0)	3 783.13(0.826 6)	2.031 2(-1.054 2)	0.186 7(0.432 9)	-2.215 2
9	0.605 8(-0.529 9)	36.132 5(0.934 0)	2 241.17(-1.148 1)	1.766 8(-1.502 2)	0.143 2(-0.677 1)	-4.316 1

注:①括号内为标准化处理后数值;② $Y = (\text{天麻素} + \text{甘草次酸})/2 \times 5 + (\text{总黄酮} + \text{HPLC 总峰面积})/2 \times 3 + \text{分子量} \leq 1\ 000\ \text{提取物} \times 2$ 。

回归方程 $Y = 1\ 606.2X + 14.7 (r = 0.999\ 7)$ 。线性范围 $0.538 \sim 1.614\ \mu\text{g}$ 。

含量测定 精密吸取 2.3 项下的供试液 B_{1-9} , 各进样 $20\ \mu\text{L}$, 按上述色谱条件, 依法测定计算甘草次酸的含量, 结果见表 3。

2.5.3 总黄酮的测定 取 2.2 项下供试品溶液 D_{1-9} 。

标准曲线的绘制 精密吸取 2.4 项下对照品 III 柚皮苷对照液 $0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1\ \text{mL}$, 加入甲醇 $1\ \text{mL}$, 再加入 10% KOH 溶液 $0.5\ \text{mL}$, 室温放

置 $5\ \text{min}$, 用甲醇稀释并定容至 $10\ \text{mL}$, 以甲醇作空白对照, 在 $412\ \text{nm}$ 处测定吸收度。以质量浓度 $C (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果总黄酮的线性范围为 $20 \sim 100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 回归方程 $A = 0.053\ 2C + 0.015\ 1 (r = 0.999\ 7)$ 。

含量测定 精密量取 2.2 项下供试液 SBE_{1-9} 各 $4.0\ \text{mL}$, 用甲醇稀释并定容至 $10\ \text{mL}$ 。取上述稀释液 $1\ \text{mL}$, 加 10% KOH 溶液 $0.5\ \text{mL}$, 室温放置 $5\ \text{min}$, 用甲醇稀释至 $10\ \text{mL}$, 在 $412\ \text{nm}$ 处测定 A , 另取上述稀释液 $1\ \text{mL}$, 用甲醇稀释至 $10\ \text{mL}$, 作为空白对照。

结果见表 3。

2.5.4 HPLC 总面积 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B), 线性梯度洗脱时间程序: 0 ~ 45 min (5% ~ 45% A), 45 ~ 60 min (45% ~ 100% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 324 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。

精密吸取 2.3 项下供试液 A_{1,9}, 按上述液相色谱条件, 依法测定计算 HPLC 总峰面积, 结果见表 3。

2.5.5 相对分子质量 ≤ 1 000 提取物得率的测定 取 2.2 项下供试液 SEB_{1,9} 各 10 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 于 105 °C 烘至恒重, 计算相对分子质量 ≤ 1 000 提取物量。结果见表 3。

2.6 数据处理 以天麻素、甘草次酸、总黄酮、HPLC 总面积、Mr ≤ 1000 提取物为指标, 各指标数据按公式 $X'_{i,j} = (X_{i,j} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理 (式中, $X_{i,j}$ 为样品液 i 中成分 j 的含量, \bar{X}_j 为 9 个水平样品液 i 中成分 j 的平均值, S_j 为成分 j 的标准偏差, 即 $S_j =$

$$\sqrt{\frac{\sum (X_{i,j} - \bar{X}_j)^2}{n - 1}}, X'_{i,j} \text{ 为标准化后的值})。将标准化$$

后的 $X'_{i,j}$ 值, 根据各指标在工艺选择中的主次, 给予不同的加权系数, 以标准化后的值 $X'_{i,j}$ 加权后求和, 即得综合评价指标 Y 值。其关系式: $Y = (\text{天麻素} +$

甘草次酸) / 2 × 5 + (总黄酮 + HPLC 总峰面积) / 2 × 3 + Mr ≤ 1 000 提取物 × 2, 结果见表 3。

将表 3 中 Y 值用 JYSYSJ 软件经计算机线性回归处理, 得回归方程:

$$F = -292.6527 - 35.3056A + 87.3547C + 5.8078D - 2.0805B^2 - 4.9973C^2 + 5.3205AB - 0.9947ADr = 0.9999, F(7, 1) = 250.53。查 F 值表 F_{0.05}(7, 1) = 236.8, F_{0.05}(7, 1) < F, P < 0.05, 所以 F 检验通过, 回归方程有意义。再将方程在计算机上进行优化处理, Y 的期望值方向大者为佳。得出优化条件为 $A = 2.0035, B = 6.5580, C = 8.7274, D = 4.9162$, 预测值 $Y = 10.511$ 。结合生产实际, 确定半夏白术天麻汤用 SBE 法提取的工艺条件为 3 煎用水的 pH 依次为 2.0, 6.5, 8.5; 提取时间依次为 2.0, 1.5, 1.5 h。$$

2.7 验证试验 按处方比例称取方药粗粉 92 g, 3 份, 按照 2.6 项下优选出的工艺条件制备样品液, 以 2.3 项下方法制备各指标成分的供试品液, 按 2.5 项下各指标成分的测定方法, 各指标成分数据按 2.6 项下方法处理, 依法测定和计算, 即得综合评价 Y' , 结果表明验证试验提取液综合评价 Y' 值接近预测值, 见表 4。

表 4 验证性实验各指标成分含量的标准化及综合评价值

指标	试验号			\bar{X}	RSD/%	Y'
	1	2	3			
天麻素/mg · g ⁻¹	1.454 1	1.419 6	1.439 8	1.437 8(1.162 6)	1.21	
甘草次酸/mg · g ⁻¹	28.641 9	28.198 9	27.065 4	27.968 7(0.113 9)	2.90	
总黄酮/mg · g ⁻¹	3.693 2	3.815 6	3.810 4	3.673 0(1.427 1)	1.83	10.656 2
HPLC 总峰面积	5 119.21	5 131.39	5 105.95	5 118.85(1.843 6)	2.49	
Mr ≤ 1 000 提取物/mg · g ⁻¹	0.407 6	0.418 4	0.404 6	0.410 2(2.558 9)	1.77	

注: ①括号内为标准化处理后数值; ② $Y = (\text{天麻素} + \text{甘草次酸}) / 2 \times 5 + (\text{总黄酮} + \text{HPLC 总峰面积}) / 2 \times 3 + \text{Mr} \leq 1 000 \text{ 提取物} \times 2$ 。

3 讨论

在多指标实验中, 通常采用“综合评分法”或“综合平衡法”进行数据处理。本实验先将天麻素、甘草次酸、HPLC 总面积、总黄酮、≤ 1 000 Da 的提取物 5 个指标的数据进行标准化处理, 以消除各指标之间的单位和和量纲的不同, 以及指标变量范围相差悬殊所造成的“拉平效应”影响, 提高了组间综合评判数据的相关性和可比性。再根据 SBE 法“有成成分论, 不惟成分论, 重在机体药效学反应”的理论, 按照各指标在提取工艺选择中的主次地位, 给予不同的加权系数。以标准化后的值加权后求和, 即得综

合评价值。

经对 380 余种常用中药中已知活性成分的统计, 绝大多数 Mr < 1 000, 只有极少数 > 1 000, 如天花粉蛋白、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rc 等。这也与“中药活性成分分子量表”对 245 种成分的统计结果相符合^[4]。因为多数蛋白质、淀粉、多糖、树脂等大分子的物质没有药理活性, 故选择 Mr ≤ 1 000 Da 的提取物作为评价指标, 即使对有效成分一无所知的中药, 也可以 Mr ≤ 1 000 的提取物为指标, 选择提取工艺和控制其质量。以 Mr ≤ 1 000 提取物为最终产物, 作天麻素、甘草次酸、HPLC 总面

黄芪有效部位的复合型纯化工艺

段立军, 孙博航*

(沈阳药科大学中药学院 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 确定黄芪有效部位的复合型纯化工艺。方法: 采用正交试验设计法, 以多糖收率、多糖含量为指标, 优选了多糖醇沉和除蛋白工艺; 以单因素考察法优选了黄芪总皂苷的纯化工艺。结果: 总多糖最佳醇沉工艺为醇沉前生药量与浓缩液体积比 1:1, 醇沉温度 40 ℃, 加入 3 倍量 95% 的工业乙醇, 醇沉静置 18 h, 粗多糖除蛋白的最佳工艺为配制质量浓度为 15 g·L⁻¹ 的粗多糖溶液, 加入粗多糖溶液 1/3 体积的 Sevage 试剂, 连续脱除 2 次; 大孔树脂纯化黄芪总皂苷的最佳工艺为使用 D101 型树脂, 树脂-药材比为 5:2, 以 4BV 水洗除杂, 再以 4 BV 70% 乙醇洗脱, 收集乙醇洗脱液, 蒸干即可。结论: 此法优选出的工艺可以实现黄芪总多糖、总皂苷的次序提取。工艺流程科学、经济, 可有效节约资源, 指导工业生产。

[关键词] 黄芪; 多糖; 总皂苷; 正交试验; 综合评分

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0025-04

Complex Purification Technology of Effective Parts from Astragali Radix

DUAN Li-jun, SUN Bo-hang*

(Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery, Ministry of Education, College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize complex purification technology of effective parts from Astragali Radix. **Method:** The technology of polysaccharide alcohol precipitation and removing protein were optimized by orthogonal test with the yield and content of polysaccharide in the extract as index. Purification technology of total saponins from Astragali Radix was optimized by single factor test. **Result:** Optimum ethanol deposition technology was as follows: 3 times of 95% ethanol was added to the solution and keep still in 18 hours at 40 ℃ with the concentration of 1:1 (material: solution volume); The optimum technology of polysaccharide removing protein was as follows: one

[收稿日期] 20110126(001)

[第一作者] 段立军, 在读硕士研究生, 从事天然药物化学研究

[通讯作者] * 孙博航, 副教授, 硕士生导师, 从事天然活性成分的纯化工艺和质量控制研究, Tel: 024-23986468, E-mail: sunbohag@hotmail.com

积、总黄酮、Mr ≤ 1 000 的提取物的测定, 较通常以粗提物为最终产物, 不仅提取物得率大大降低, 可缩小服用剂量, 而且为选用现代药物新剂型提供了可能, 同时提高了技术含量。以 Mr ≤ 1 000 的提取物量为指标能体现中药整体、综合、客观、模糊的特点, 这是中药药效物质提取研究设计中一种新思路, 对中药现代化研究很有借鉴意义。

[参考文献]

[1] 张兆旺. 中药药剂学专论[M]. 北京: 人民卫生出版社,

2009: 68.

[2] 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.

[3] 孙秀梅, 张兆旺. 用均匀设计优选麻杏石甘汤的半仿生提取法工艺条件[J]. 中成药, 2002, 24(12): 914.

[4] 季宇彬. 中药活性成分与药理应用[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2004: 604.

[责任编辑 全燕]