

补阳还五汤方中红花黄芪配伍总黄酮的制备工艺

李鹏*, 张宇燕, 李金辉, 邢攀科, 万海同, 杨洁红
(浙江中医药大学, 杭州 310053)

[摘要] 目的:建立红花黄芪配伍总黄酮制备的最佳工艺。方法:采用水提醇沉法,以紫外分光光度法测定总黄酮含量, HPLC 法测定羟基红花黄色素 A(HYSA)的含量,对补阳还五汤中红花黄芪配伍总黄酮类的提取工艺进行系统研究,考察提取温度、提取时间、浸提料液比和浸提次数对提取效果的影响,用 AB-8 大孔吸附树脂对总黄酮部位进行精制纯化。结果:最佳工艺条件为:16 倍量水,60 ℃,提取 3 次,每次 2 h。AB-8 树脂纯化后,黄酮纯度达 78.26%,羟基红花黄色素 A 含量为 10.07%。结论:该工艺简便,合理,对红花黄芪总黄酮有效部位的分离纯化较好。

[关键词] 补阳还五汤;总黄酮;有效部位;制备

[中图分类号] R 283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0010-4

Preparation of Total Flavonoids of Flos Carthami and Radix Astragali from Compound Buyanghuanwu Decoction

LI Peng*, ZHANG Yu-yan, LI Jin-hui, XING Pan-ke, WAN Hai-tong, YANG Jie-hong
(Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the optimum preparation of total flavonoids from Flos Carthami and Radix Astragali. **Method:** By water extraction and alcohol precipitation method, the optimal conditions, such as extraction temperature, extraction time, solvent quantity and extraction times were determined by orthogonal design. The total flavonoid was further prepared by AB-8 macroporous resin chromatography. **Result:** The optimum extraction procedure was determined with 16 times of water, 60 ℃, 2 hours and 3 times. of extraction. The total flavonoids could reach to 78.6% and hydroxy safflor yellow A(HYSA) reach to 10.07% after further purification with AB-8 macroporous resin chromatography. **Conclusion:** This technique is suitable to prepare total flavonoids of Flos Carthami and Radix Astragali.

[Key words] Buyanghuanwu decoction; total flavonoids; effective parts; preparation

补阳还五汤系清代王清任《医林改错》首载,该方由黄芪、当归、芍药、川芎、桃仁、红花、地龙组成,具有补气、通络的功能。在抗血栓、抗血脂、抗衰老及免疫调节等方面都有广泛的作用^[1]。黄酮类成分是其抗缺血作用主要的有效部位,其化学成分为黄芪黄酮类和红花黄酮类,为研究大复方的配伍机制和临床应用,本实验选取补阳还五汤方中红花和黄芪,按原方比例联合提取总黄酮类物质,采用正交

实验主要考察水提醇沉工艺,并用大孔吸附树脂纯化总黄酮,建立红花黄芪配伍总黄酮及其指标性成分测定方法,制备出活性成分含量较高的黄酮类有效部位。

1 仪器与试剂

红花、黄芪购于北京同仁堂药店,经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室鉴定,分别为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花和豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bgo) Hsiao 的干燥根。AB-8 大孔吸附树脂(天津市海光化工有限公司)。

赛多利斯 BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司), Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), TU-1900 型双光束紫外-可见分光光

[收稿日期] 20100118(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873430);浙江省中管局项目(2008CA004,2009ZA002)

[通讯作者] 李鹏,硕士研究生,研究方向:天然药物分离与药代动力学研究,E-mail:lpcumt@126.com

度计(北京普析通用仪器有限责任公司), Millipore 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

羟基红花黄色素 A 对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 78281-02-4), 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100416-200503), 甲醇、乙腈(美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司)均为色谱纯, 水为超纯水, 其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺设计 在预试验基础上设计正交试验因素水平, 见表 1。

表 1 正交因素水平

水平	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 溶剂量/倍	D 提取温度/℃
1	1	1.0	8	60
2	2	1.5	12	75
3	3	2.0	16	90

按补阳还五汤处方中红花黄芪的比例称取药材 69 g[红花 9 g, 黄芪 60 g(12 目)], 共 9 份, 按表 1 方案及正交表进行提取。提取液抽滤, 分别浓缩至 150 mL, 加入无水乙醇, 使醇浓度达到 85%, 冷藏过夜, 弃去下层多糖成分, 重复上述醇沉工艺 2 次。抽滤并浓缩至 50 mL, 使含生药量为 $1.38 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别测定其总黄酮和羟基红花黄色素 A(HYSA) 的含量。

2.2 总黄酮测定 采用紫外分光光度法测定, 精密称取在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥恒重的芦丁对照品 20 mg 于 100 mL 量瓶中, 60% 乙醇溶解并定容, 制成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。精密量取对照品溶液 4, 6, 8, 10, 12, 14 mL, 分别置 25 mL 量瓶中加入 10% NaNO_2 溶液 1 mL, 5 min 后加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 1 mL, 摇匀, 6 min 后加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 5 mL, 用 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 制成含芦丁 $6.4 \sim 22.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液, 以相应溶剂为空白, 在 510 nm 波长处测定其吸光度。以吸光度为纵坐标、浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $Y = 0.0239X - 0.01$, $R = 0.9991$; 线性范围 $6.4 \sim 22.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 羟基红花黄色素 A 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Extend- C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-乙腈-0.5% 磷酸 (28:2:70); 检测波长 403 nm; 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 10 μL 。

2.3.2 溶液制备 称取羟基红花黄色素 A 对照品 15 mg, 用甲醇溶解于 25 mL 量瓶中, 制得 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。量取 0.250 mL 制备液(生药质量浓度为 $1.38 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入 25 mL 量瓶中, 并用色谱甲醇定容。过 0.45 μm 有机滤膜, 得到供试品液。

2.3.3 系统适用性试验 分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各 10 μL , 按上述色谱条件进样, 结果羟基红花黄色素 A 保留时间为 4.804 min, 阴性对照品溶液对含量测定无干扰(图 1)。

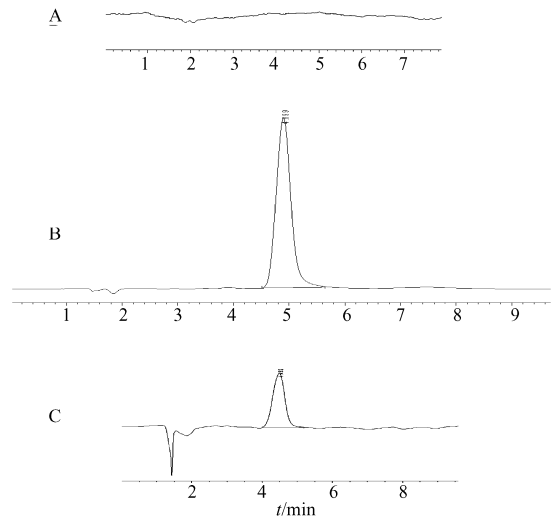


图 1 羟基红花黄色素 A HPLC 图谱

A. 阴性; B. 羟基红花黄色素 A; C. 提取物

2.3.4 线性关系考察 吸取对照品溶液 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 2.000, 4.000, 5.000 mL, 分别用流动相定容至 25 mL 量瓶中。分别吸取 10 μL 进样检测, 以峰面积为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 得回归方程: $Y = 7.8252X - 2.1546$, $r = 0.9998$ 。羟基红花黄色素 A 在 $3 \sim 120 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 吸取 $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 10 μL , 连续进样 5 次, RSD 1.07%。

2.3.6 重复性试验 取同一批制得的 5 份制备供试品溶液, 测定每份样品中 HYSA 含量, 结果 HYSA 的平均质量分数分别为 $1.816 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 1.18%。

2.3.7 回收率试验 采用加样回收测定方法, 精密称取 5 份已知含量黄酮部位样品各 0.3 g, 分别加入一定量的对照品溶液 ($48 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按供试品溶液制备方法处理制得加样回收供试品溶液, 依法测定, 计算回收率。求得平均回收率 100.65%, RSD

1. 25% ($n = 5$)。

2.3.8 稳定性试验 吸取正交试验的第一组供试品溶液 10 μL , 分别于 0, 3, 6, 12, 18, 24 h 进样, RSD 1.32%, 表明供试品在 24 h 内基本稳定。

2.3.9 含量测定 吸取 1~9 号供试品各 10 μL 进样, 测定, 计算。

2.4 正交试验结果分析 按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表的条件进行试验, 分别测得总黄酮的含量和羟基红花黄色素 A 的含量, 并进行双指标综合评分。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化, 再给出不同的权重。由于总黄酮是以黄酮类表征化合物群, 包含羟基红花黄色素 A。而羟基红花黄色素 A, 表征的是羟基红花黄色素 A 单成分含量(以羟基红花黄色素 A 计)。为了更严格的标定总黄酮有效部位, 本文将总黄酮和羟基红花黄色素 A 的权重系数分别设为 4 和 6, 以综合评分值进行统计分析^[2-3]。即为: 综合评分 = 总黄酮含量/最大总黄酮含量 $\times 4$ + 羟基红花黄色素 A 含量/最大羟基红花黄色素 A 含量 $\times 6$ 。

由表 2 可看出, 综合评分数据的极差大小显示各个因素作用主次为 $A > D > B > C$ 。C 因素影响最小, 设为误差项, 进一步进行方差分析。表 3 结果表明, 因素 A(提取次数)和因素 D(提取温度)对提取效果的影响有显著意义($P < 0.05$), 因素 B 和因素 C 的影响则无显著意义。综合直观分析与方差分析的结果, 选择最佳工艺为: $A_3D_1B_3C_2$, 即 16 倍(质量)量水, 60 $^\circ\text{C}$ 温度下(搅拌), 提取 3 次, 每次 2 h。

2.5 优选工艺验证与红花黄芪总黄酮的精制

2.5.1 优选工艺验证 称取药材 69 g(红花 9 g, 黄芪 60 g(12 目)), 共 5 份, 按优选工艺提取, 结果 5 份药材提取液所测得总黄酮质量浓度分别为 41.231 4, 43.081 2, 44.305 2, 43.837 2, 43.367 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。羟基红花黄色素 A 质量浓度(以羟基红花黄色素 A 计)分别为 2.091 2, 2.203 4, 2.143, 2.192 1, 2.201 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

结果表明: 按正交实验的最佳工艺参数进行提取, 重复性好。

2.5.2 总黄酮的精制 取经过预处理的树脂各 200 mL 分别以湿法装入 3 支交换柱中, 分别取工艺验证的样品溶液(其中 3 份)各 50 mL, 上样, 控制流速 2 $\text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$, 吸附完毕后, 分别用蒸馏水洗脱至 Molish 试验无阳性反应为止, 再分别用 30%, 50%, 70% 的

表 2 正交实验设计及结果

No.	A	B	C	D	总黄酮 / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	HYSA / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	综合 评分
1	1	1	1	1	35.902 8	1.4109 5	6.382 6
2	1	2	2	2	37.480 3	1.385 2	6.425 1
3	1	3	3	3	34.732 5	1.446 5	6.395 8
4	2	1	2	3	56.193 8	0.903 5	6.450 6
5	2	2	3	1	33.353 9	1.481 9	6.393 6
6	2	3	1	2	36.451 6	1.803	7.485 1
7	3	1	3	2	45.819	2.212 1	9.261 5
8	3	2	1	3	39.129	1.817 5	7.715
9	3	3	2	1	50.290 8	1.858 8	8.621 5
K_1	19.203	522.094	721.582	721.397 7			
K_2	20.329	320.533	721.497	223.171 7			
K_3	25.598	22.502	422.050	920.561 4			
R	2.132	0.656	0.184	0.870			

表 3 综合评分方差分析表

方差来源	SS	f	F	P
A	7.768	2	131.66	<0.05
B	0.720	2	12.20	
D	1.184	2	20.07	<0.05
C(误差)	0.059	2	1	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

乙醇洗脱, 将洗脱液浓缩、真空干燥, 得到黄色粉末。分别取提取物粉末 5.5, 5.6, 5.6 mg, 溶解于 10 mL 量瓶中, 稀释 10 倍, 用紫外分光光度法和高效液相色谱法测定总黄酮和羟基红花黄色素 A 的质量分数。结果见表 4, 表明 50% 乙醇洗脱, 不但能得到较高含量的产品, 而且产率也较高。

表 4 洗脱剂浓度的选择

乙醇体积分数	总黄酮质量分数	HYSA 质量分数
30	69.13	7.76
50	78.26	10.07
70	48.14	5.68

可见按优化工艺进行提取, 总黄酮和 HYSA 的含量均取得较理想的结果, 表明该优选工艺合理、稳定可行。且经过 AB-8 树脂的进一步纯化, 可以得到纯度更高的总黄酮有效部位。

3 讨论

文献报道, 利用微波技术辅助测定补阳还五汤中黄酮的含量, 采用 70% 乙醇回流提取方法^[4], 而本实验依据《中国药典》现行版所载复方制剂多是用提醇沉工艺法提取, 故采用水提醇沉工艺。又

根据中药复方拆方原理,选取补阳还五汤中含有黄酮成分的红花和黄芪两味中药,并按原比例配伍联合提取总黄酮,最大限度提取黄酮类有效部位。结果表明,此方法可得到高纯度的总黄酮。

本实验以黄酮和 HYSA 含量为指标,采用正交实验,考察了提取次数,提取温度,提取温度等因素对提取工艺的影响,并分别进行统计分析,确定水提工艺为:16 倍(质量比)量水,60 ℃(搅拌),提取 3 次,每次 2 h。并利用 AB-8 大孔吸附树脂,考察不同乙醇浓度对总黄酮类洗脱能力,结果为,先用水洗脱至 Molish 反应阴性,再用 50% 乙醇洗脱,浓缩,低温真空干燥,得到总黄酮类有效部位的黄色粉末,总黄酮纯度为 78.26%,HYSA 质量分数为 10.07%。

“有效部位”作为一类化学组分与复方有效成分(化学成分复杂)相比,其“相对有限”,且更能反映中医药防病治病的整体特征,其与中药材相比,较之富集了有效物质,并可避免因药材产地、品种不同

所带来的质量难控制。本实验制备的总黄酮类有效部位,可以用于有效部位配伍角度中药复方配伍的机制研究,也可以为开发红花黄芪配伍的制剂研究提供基础。

[参考文献]

- [1] 贺庆平,贺福元,邓凯文,等. 高效液相色谱法测定补阳还五汤及总苷部位中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(7):3.
- [2] 周素琴,赵慧,焦海胜,等. 多指标综合评分法优选抗毒颗粒水提工艺的研究[J]. 中成药,2008,30(3):440.
- [3] 陈富超,方宝霞,李鹏,等. 多指标综合评分法优化生化膏的提取工艺[J]. 中国药业,2009,18(15):35.
- [4] 赵金尧,李晓如,李贵银. 微波技术辅助测定补阳还五汤中黄酮的含量[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(4):49.

[责任编辑 全燕]

(上接第 9 页)

- [8] 常明,潘卫三,武玉杰,等. 盐酸氨溴索渗透泵控释片的研制[J]. 中国新药杂志,2003,12(9):543.
- [9] 胡容峰,马凤余,张虹,等. 黄杨宁渗透泵型控释片的设计及释放度的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(12):18.
- [10] 颜耀东. 缓释控释制剂的设计与开发[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:298.
- [11] Liu L X, Che B J. Preparation of monolithic osmotic pump system by coating the indented core tablet[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006, 64: 180.
- [12] 王英,申嫣. 阿魏酸钠单室渗透泵片的研制[J]. 当代医学,2009,31(15):6.
- [13] Makhija S N, Vavia P R. Controlled porosity osmotic pump-based controlled release system of pseudophed-

rine. I. Cellulose acetate as a semipermeable membrane [J]. J Controlled Release,2003,89(1):5.

- [14] Black H S, Okotie-Eboh G, Gerguis J, et al. Dietary fat modulates immunoresponsiveness in UV-irradiated mice [J]. Photochem Photobiol,1998, 62(6):964.
- [15] Muller K, Carpenter K, L Challis I R, et al. Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1 [J]. Free Radical Research, 2002, 36(7):791.
- [16] 吴清,陈贤春,杜守颖. 缓释辅料对三七总皂苷缓释片中人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 释药特性的影响[J]. 中国中药杂志,2004,29(4):944.

[责任编辑 全燕]