

正交试验优化养精种玉汤提取工艺的研究

马红霞¹, 王 岩^{2*}, 吴慧琳², 王 婴²

(1. 广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120; 2 广东药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 优化养精种玉汤的提取工艺, 并考察合煎液和单煎液中马钱苷、芍药苷和阿魏酸的变化。方法 采用正交试验法优选工艺, 并在同一色谱条件下进行3种成分的HPLC测定, 其中马钱苷、芍药苷的检测波长为230 nm, 阿魏酸的检测波长为316 nm。结果 最佳提取条件为用6倍量水提取3次, 每次1 h。结论 优选工艺稳定可行, 合煎液中的马钱苷、芍药苷和阿魏酸量较单煎液均有不同程度的提高。

关键词: 养精种玉汤; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1800-04

Optimization of extraction process of Yangjing Zhongyu Decoction by orthogonal test

MA Hong-xia¹, WANG Yan², WU Hui-lin², WANG Ying²

(1 The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medicine College, Guangzhou 510120, China;

2 Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Yangjing Zhongyu Decoction and investigate the content change of loganin, paeoniflorin, and ferulic acid in the mixed and separated decoctions.

Methods Orthogonal design was used to optimize the extraction process. The contents of the three components were determined under the same chromatographic conditions by HPLC. The detective wavelength of loganin and paeoniflorin was 230 nm, and the detective wavelength of ferulic acid was 316 nm. **Results** The optimum extraction condition was as follows: six times water, extracting three times, every time for an hour. **Conclusion** The optimum process is stable and feasible. The contents of the three components are more improved in the mixed decoction in varying degrees than single decoction.

Key words: Yangjing Zhongyu Decoction; extraction process; orthogonal test

养精种玉汤系中医经典名方, 始载于《傅青主女科》, 为四物汤去川芎加山茱萸而成, 即组方为白芍 15 g, 山茱萸 15 g, 当归 15 g, 熟地黄 30 g, 临床上多用于女性身瘦血虚不孕证, 疗效显著。芍药苷、马钱苷、阿魏酸分别为白芍、山茱萸、当归的有效成分, 其中芍药苷具有促进造血祖细胞增殖、调节免疫^[1]、抗抑郁作用^[2], 马钱苷能显著增强机体免疫功能^[3], 阿魏酸具有抗血小板凝集、抗血栓、增强免疫等作用^[4]。本研究通过测定养精种玉汤配伍前后芍药苷、马钱苷、阿魏酸变化, 旨在阐明配伍对各药味中有效成分的影响, 为深入研究养精种玉汤的配伍规律提供依据。

1 仪器与试剂

LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津);

KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。马钱苷(批号 111640-200503)、芍药苷(批号 110736-200732)、阿魏酸(批号 110773-200611)对照品(中国药品生物制品检定所); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。白芍、山茱萸、当归、熟地黄由广州中芝源中药有限公司提供, 经笔者鉴定符合《中国药典》2005 年版一部的规定。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计: 为了寻找养精种玉汤的最佳提取条件, 以马钱苷、芍药苷和阿魏酸的量为指标, 考察加水量、提取时间和提取次数 3 个因素对提取效果的影响, 每因素各取 3 个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验。结果处理采用综合平衡法, 先以各指标单独进行直观分析和方差分析, 最后进行综合平

①收稿日期: 2010-01-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701119); 中山市科技计划项目(2009H019); 广东药学院师资队伍建设经费资助

作者简介: 马红霞(1974—), 女, 博士, 主要从事生殖障碍性疾病防治及药物研究。

Tel: 13682236586 E-mail: doctormaxia_1974@yahoo.com.cn

* 通讯作者 王 岩 Tel: (020)39352169 E-mail: gdpwuy@126.com

衡, 得出优选方案。因素水平见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	因 素		
	A 加水量/ 倍	B 提取时间/h	C 提取次数/ 次
1	6	0.5	1
2	8	1.0	2
3	10	1.5	3

2.2 色谱条件: Gemini C₁₈ 色谱柱(柱号 403431-6, 广州菲罗门科学仪器有限公司); 以乙腈 0.1% 磷酸溶液(13: 87) 为流动相; 检测波长为 230、316 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 ℃。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取马钱苷、芍药苷、阿魏酸对照品 4.04、6.02、12.57 mg, 加甲醇分别制成 161.6、240.8、125.7 μg/mL 的溶液。精密量取上述马钱苷对照品溶液 10 mL、芍药苷对照品溶液 5 mL、阿魏酸对照品溶液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 64.64、48.16、25.14 μg/mL 混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备: 按处方称取山茱萸 15 g、白芍 15 g、当归 15 g、熟地黄 30 g, 采用回流提取法, 按正交表中规定条件进行试验, 提取液合并, 60 ℃减压浓缩至 75 mL, 浓缩液加乙醇至含醇量为 70%, 静置 2 h, 用 70% 乙醇定容至 200 mL; 精密量取溶液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 方法学考察:

2.5.1 线性关系考察: 精密量取混合对照品溶液 1、2、4、6、8 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 20 μL, 测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 进行线性回归处理。结果表明, 马钱苷在 0.129 28~ 1.292 8 μg、芍药苷在 0.096 32~ 0.963 2 μg、阿魏酸在 0.050 28~ 0.502 8 μg 线性关系良好。回归方程为: $Y = 1391.5 X (r = 0.9998)$; $Y = 1175.0 X (r = 0.9998)$; $Y = 396.48 X (r = 0.9996)$ 。由于曲线过原点, 可采用外标一点法进行测定。

2.5.2 专属性试验: 照供试品溶液的制备项下方法, 分别制备不含山茱萸、白芍、当归的阴性对照溶液, 按上述色谱条件同法进样测定。结果在与 3 种对照品色谱相应位置上阴性对照无干扰, 表明本法具有良好的专属性。

2.5.3 精密度试验: 精密吸取 2 号正交试验的供试品溶液 20 μL, 连续进样 6 次, 测定马钱苷、芍药苷和阿魏酸的峰面积, 结果 RSD 分别为 1.95%、

2.58%、1.94%。

2.5.4 稳定性试验: 精密吸取上述供试品溶液 20 μL, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 进行测定, 结果马钱苷、芍药苷和阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 2.95%、2.86%、2.98%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.5 重现性试验: 取 2 号正交试验的水提浓缩液, 按供试品溶液的制备项下方法, 自“浓缩液加乙醇……”起, 平行制备 6 份供试品溶液。精密吸取 20 μL 分别进样测定, 结果马钱苷、芍药苷和阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 2.50%、2.90%、2.91%。

2.5.6 加样回收率试验: 精密吸取 2 号正交试验的水提浓缩液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 按 1: 1 精密加入混合对照品乙醇溶液 1 mL(含马钱苷 1.4 mg、芍药苷 0.86 mg、阿魏酸 0.44 mg), 加乙醇至含醇量为 70%, 静置 2 h, 加 70% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 同法平行制备 6 份供试品溶液, 进行测定, 结果马钱苷、芍药苷和阿魏酸的回收率分别为 99.82%、99.88%、98.55%, RSD 分别为 0.69%、1.10%、0.53%。

2.6 正交试验结果分析: 按照上述建立的测定方法, 分别测定 9 份正交试验供试品溶液中马钱苷、芍药苷和阿魏酸, 各成分的质量分数以各单味药材投料量计, 如马钱苷质量分数 = 马钱苷提出量(mg)/山茱萸投料量(g)。分别进行直观分析和方差分析, 结果见表 2、3。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

样品号	A	B	C	D(误差)	质量分数/(mg · g ⁻¹)		
					马钱苷	芍药苷	阿魏酸
1	1	1	1	1	3.809	1.954	1.685
2	1	2	2	2	6.383	4.440	2.131
3	1	3	3	3	6.694	4.533	2.560
4	2	1	2	3	2.758	2.744	0.965
5	2	2	3	1	4.913	4.695	1.919
6	2	3	1	2	3.763	3.215	1.649
7	3	1	3	2	2.990	2.914	1.866
8	3	2	1	3	4.676	3.090	1.522
9	3	3	2	1	5.147	3.863	1.812
马	I 5.629	3.186	4.083	4.623			
钱	II 3.811	5.324	4.763	4.379			
苷	III 4.271	5.201	4.866	4.709			
	R ₁ 1.818	2.138	0.783	0.330			
芍	I 3.642	2.537	2.753	3.504			
药	II 3.551	4.075	3.682	3.523			
苷	III 3.289	3.870	4.047	3.456			
	R ₂ 0.353	1.538	1.294	0.067			
阿	I 2.125	1.505	1.619	1.805			
魏	II 1.511	1.857	1.636	1.882			
酸	III 1.733	2.007	2.115	1.682			
	R ₃ 0.614	0.502	0.496	0.200			

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	F 值	显著性
马钱苷 A	5 357	30.44	$P < 0.05$
	8 650	49.15	$P < 0.05$
	1 086	6.170	
	0.176		
芍药苷 B	0.202	28.86	$P < 0.05$
	4.183	597.6	$P < 0.01$
	2.672	381.7	$P < 0.01$
	0.007		
阿魏酸 C	0.581	9.525	
	0.398	6.525	
	0.476	7.803	
	0.061		

由直观分析可见,各因素对马钱苷提取效果的影响顺序为: B> A> C, 优选水平组合为 A₁B₂C₃; 对芍药苷提取效果的影响顺序为: B> C> A, 优选水平组合为 A₁B₂C₃, 与马钱苷一致; 对阿魏酸提取效果的影响顺序为: A> B> C, 优选水平组合为 A₁B₃C₃。方差分析结果表明, 因素 A 和 B 对马钱苷的提取影响显著; 因素 A、B 和 C 均对芍药苷的提取影响显著; 而各因素对阿魏酸的提取均无显著性影响。综合以上分析, 确定最佳提取工艺为 A₁B₂C₃, 即加 6 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.7 样品测定: 按处方称取 4 味药材, 按照最佳工艺进行提取, 制得合煎供试品溶液; 另分别称取以上药材, 同法制得山茱萸、白芍、当归单煎供试品溶液。分别测定 3 种成分, 结果见表 4, 色谱图见图 1~ 4。

表 4 配伍前后煎液中有效成分的对比(n= 3)
Table 4 Comparison of effective ingredients before and after compatibility (n= 3)

指标	养精种玉汤/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%	单煎液/ (mg·g ⁻¹)	RSD/%
马钱苷	7.024	0.53	4.511	1.74
芍药苷	4.782	1.19	4.057	1.64
阿魏酸	2.597	1.56	2.254	0.81

3 讨论

《中国药典》2005 年版一部山茱萸、白芍、当归药材项下马钱苷、芍药苷、阿魏酸的 HPLC 检测波长分别为 240、230、316 nm。由于马钱苷与芍药苷的紫外最大吸收波长接近, 可考虑在同一波长下测定。经过比较发现, 马钱苷在 230~ 240 nm 吸光度差异不大, 而两成分在 230 nm 的分离度较其他波长更理想, 故检测波长确定为 230 nm。阿魏酸因为在此波长下无吸收, 故仍采用 316 nm 波长进行测定。

养精种玉汤由山茱萸、白芍、当归和熟地黄组成, 熟地黄有效成分的测定并未涉及。目前一般认为地黄的有效成分是以梓醇为代表的环烯醚萜苷

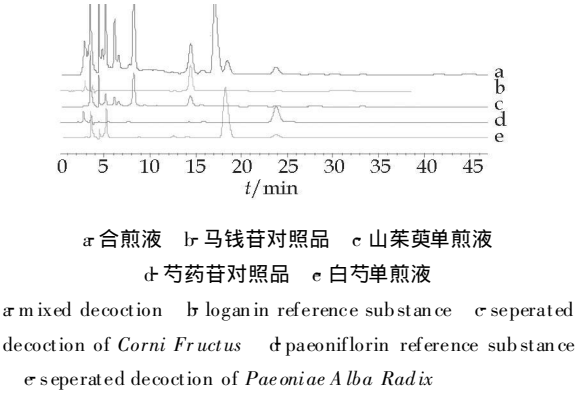


图 1 合煎液与山茱萸、白芍单煎液 HPLC 图 (230 nm)

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed and separated decoctions of *Corni Fructus* and *Paeoniae Alba Radix* (230 nm)

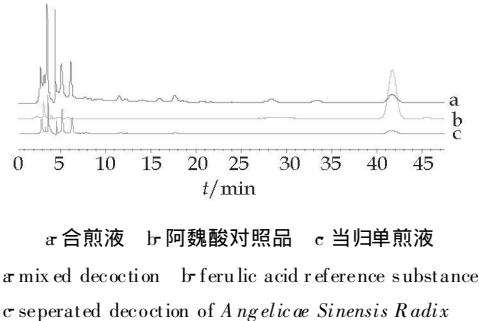


图 2 合煎液与当归单煎液 HPLC 图(316 nm)

Fig. 2 HPLC Chromatograms of mixed and separated decoctions of *Angelicae Sinensis Radix* (316 nm)

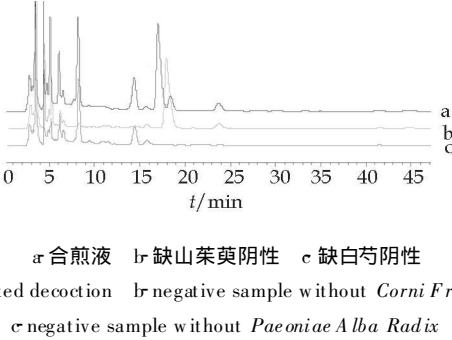
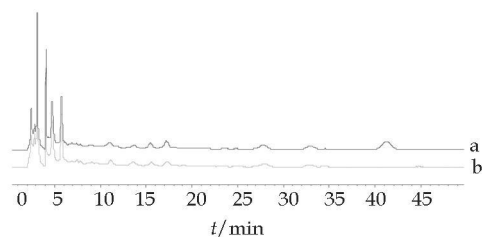


图 3 缺山茱萸、缺白芍阴性对照 HPLC 图(230 nm)

Fig. 3 HPLC Chromatograms of negatives sample without *Corni Fructus* and *Paeoniae Alba Radix* (230 nm)

类, 但该类成分遇热极不稳定, 经蒸制成熟地黄后仅剩余 1/20, 再加上提取过程中的破坏, 导致水提液中该成分不能被检出^[5], 笔者在研究中也得出了相同的结论。熟地黄中有效成分的确认及其量变规律有待进一步的研究、探讨。

实验结果可知, 与山茱萸、白芍和当归各单煎液相比较, 养精种玉汤合煎液中的马钱苷、芍药苷和阿魏酸均有不同程度的提高, 表明该汤剂的组方配伍



a 合煎液 b 缺当归阴性
a mixed decoction b negative sample
without *Angelicae Sinensis Radix*

图 4 缺当归阴性对照 HPLC 图(316 nm)

Fig. 4 HPLC Chromatograms of negative sample without *Angelicae Sinensis Radix* (316 nm)

在煎煮过程中更有利于 3 种有效成分的溶出, 实验结果从主要成分变化的角度支持了养精种玉汤配伍合煎的合理性, 并为其物质基础的阐明提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] 胡南, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(9): 1093-1095
- [2] 崔广智. 芍药苷抗抑郁作用的实验研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 131-133
- [3] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135
- [4] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255
- [5] 王太霞, 李景原, 胡正海. 地黄的形态结构与化学成分研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(5): 585-587

知母皂苷 B II 对照品的快速制备研究

冀旭^{1,2}, 吴智宇¹, 陈千良^{1*}, 孙文基¹

(1 西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069;

2. 西北大学 国家微检测工程技术中心, 陕西 西安 710069)

摘要: 目的 从知母药材中快速分离制备知母皂苷 B II 对照品。方法 知母药材粗粉用 80% 乙醇提取, 经大孔树脂 D-101 柱吸附, 以 30% 乙醇洗脱, 得到知母总皂苷。用制备 RP-HPLC 对总皂苷进行分离纯化, 采用柱后分流, ELSD 同时检测, 收集含高质量分数知母皂苷 B II 的组分。结果 制备产品经化学方法和 ¹³C-NMR 鉴定; HPLC-ELSD 检测, 质量分数大于 99%。结论 该制备方法简单, 重复性好, 效率较高, 所得化合物质量分数高, 可用于知母皂苷 B II 对照品的制备。

关键词: 知母皂苷 B II; 分离; 纯化; 制备高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1803-04

Rapid preparation of timosaponin B II reference substance

Ji Xu^{1,2}, Wu Zhiyu¹, Chen Qianliang¹, Sun Wenji¹

(1 Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2 National Engineering Research Center for Miniaturize Detection System,

Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Objective To establish a method to isolate and prepare timosaponin B II reference substance from *Anemarrhenae Rhizoma*. **Methods** Raw material of *Anemarrhenae Rhizoma* was extracted with 80% ethanol. The concentrated crude extract was separated on a D-101 macroporous resin column, by eluting the macroporous resin column with 30% ethanol, total saponins were collected. The timosaponin B II was separated by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with ELSD and collected according to the chromatography. **Results** The prepared product was identified by nuclear magnetic resonance and chemical method. The purity of timosaponin B II was > 99% assayed by analytical HPLC-ELSD. **Conclusion** The preparation method is simple and rapid, and it can be used for preparation of timosaponin B II reference substance.

Key words: timosaponin B II; separation; purification; preparative HPLC

①收稿日期: 2010-03-07

基金项目: 国家药典委员会 2010 版一部标准研究项目(YZ-196~198); 西北大学科研启动基金资助项目(OXYQDF159)

作者简介: 冀旭(1987-), 男, 硕士研究生, 中药学专业。

* 通讯作者 陈千良 Tel: (029) 88304569 E-mail: cq1999@hotmail.com