

多指标成分测定结合全息谱法优化夏黄颗粒的提取工艺

胡 乔^{1,2,3}, 肖瑞颖^{1,2,3}, 廖茂梁^{2,3}, 张铁军^{2,3*}, 刘 悦^{1,2,3}, 王思路^{1,2,3},

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药物代谢动力学国家重点实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 中药现代制剂与中药质量控制技术国家和地方工程实验室, 天津 300193

摘 要: 目的 优选夏黄颗粒处方药材的最佳提取工艺。方法 采用高效液相色谱法, 建立夏黄颗粒的全息图谱以及 5 种蒽醌类成分的测定方法, 并对水回流提取、水提醇沉、醇回流提取、水煎煮、醇提结合水提、水提醇沉结合醇渗漉 6 种提取工艺进行比较。以总蒽醌转移率、结合蒽醌质量指标并结合全方全息谱优选出最佳提取方法。结果 夏黄颗粒的 6 种提取工艺中, 醇回流提取总蒽醌转移率最高、结合蒽醌质量也最高, 全息谱中各峰相对面积也较大。结论 醇回流提取工艺为夏黄颗粒处方药材的最佳工艺。

关键词: 夏黄颗粒; 提取工艺; 总蒽醌; 结合蒽醌; 全息谱

中图分类号: R284.2; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)03-0236-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.005

Comparison on extraction technology of Xiahuang Granule by multiple indicator ingredients determination combined with holographic spectrum method

HU Qiao^{1,2,3}, XIAO Rui-ying^{1,2,3}, LIAO Mao-liang^{2,3}, ZHANG Tie-jun^{2,3}, LIU Yue^{1,2,3}, WANG Si-lu^{1,2,3}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technologies and Drug Metabolism, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. The National and Local Engineering Laboratory of the Modernized Chinese Medicine and Chinese Medicine Quality Control Techniques, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the extraction technology for medicinal materials in Xiahuang Granule prescription. **Methods** HPLC method was used to establish the holographic spectrum as well as determination of five kinds of anthraquinones in Xiahuang Granule. Six extracting processes, such as water reflux extraction, water extraction and alcohol precipitation, alcohol reflux extraction, boiling water extraction, alcohol extract combined with water extraction, and alcohol precipitation combined with alcohol leakage process were compared to optimize extraction process. **Results** Ethanol extracting process had the highest yield of five anthraquinones and the highest weights of combined anthraquinones in six extracting process of Xiahuang Granule with the biggest relative area of the holographic spectrum peaks. **Conclusion** The optimal process is the ethanol reflux extracting process for medicinal materials in Xiahuang Granule prescription.

Key words: Xiahuang Granule; extracting technology; total anthraquinones; combined anthraquinones; holographic spectrum

夏黄颗粒处方来源于天津中医药大学第一附属医院肿瘤科多年临床经验方, 由大黄、半夏、芦荟、枳壳、厚朴、决明子、旋覆花等 10 味中药组成, 临

床主要用于癌痛患者服用阿片类药物所致的气滞腑实型便秘、呕吐者。研究表明蒽醌类成分(游离蒽醌和结合蒽醌类)是泻下的主要活性成分^[1], 因此

收稿日期: 2013-10-28

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BA107B01); 天津市科技计划项目(13ZCZDSY00200)

作者简介: 胡 乔(1986—), 女, 天津中医药大学中药专业硕士研究生, 研究方向为中药新药的研发与质量标准的建立。

Tel: 15122601619 E-mail: 641167800@qq.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

夏黄颗粒中蒽醌的高低决定了临床疗效。由于本复方药味较多,成分复杂,组分中的各药味的化学成分均通过一定的作用途径发挥其临床疗效,综合考虑到方中降逆止呕、理气通腑作用的药物如半夏、旋覆花、厚朴以及枳壳的理化性质^[2-4],本实验设计了6种提取工艺并通过多指标成分比较结合全方全息谱法优化最佳工艺。

1 仪器与试剂

Dionex Summit 高效液相色谱仪(美国戴安公司)、Lab Alliance 高效液相色谱仪, Series II 二元泵系统, Lab Alliance 色谱工作站; AS3120 超声波提取器(江苏汉邦科技有限公司); Sartorius 十万分之一天平; Mettler Toledo 万分之一天平; R501B 星海旋转蒸发器(无锡市星海王生化设备有限公司)。

甲醇为分析纯和色谱纯(天津市康科德科技有限公司),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酚(批号 110796-201017)、大黄素甲醚(批号 110758-201013)、芦荟大黄素(批号 110795-201007)、柚皮苷(批号 110722-200610)、新橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、芦荟苷(批号 110787-200905)均购自中国食品药品检定研究院。方中各味药材,除决明子购自于天津市安舜大药房外,其余均购自天津市中药饮片厂,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定,均符合《中国药典》2010年版一部规定。

2 方法与结果

2.1 工艺路线设计

按两倍处方量(230 g)称取处方药材,提取前均用提取溶剂浸泡 30 min(大黄后下除外)。

2.1.1 水回流提取(工艺 1) 将以上药材加水回流提取 3 次,加水量依次为 10、8、8 倍,提取时间依次为 2、1、1 h,其中大黄在第 2 次提取时加入,将提取液滤过,减压浓缩至稠膏,减压干燥,即得。

2.1.2 水提醇沉(工艺 2) 按“工艺 1”提取浓缩,将滤液浓缩至相对密度约 1.13,加 95%乙醇至体积分数为 70%,静置过夜,滤过,减压浓缩至稠膏,减压干燥。

2.1.3 醇回流提取(工艺 3) 将以上药材加 75%醇回流提取 3 次,加醇量依次为 10、8、8 倍,提取时间依次为 2、1、1 h,其中大黄在第 2 次提取时加入,将提取液滤过,减压浓缩至稠膏,减压干燥。

2.1.4 传统水煎煮(工艺 4) 将以上药材加水煎煮 2 次,30 min/次,其中大黄在第一煎 20 min 后下,将提取液滤过,减压浓缩至稠膏,减压干燥。

2.1.5 全成分提取(工艺 5) 将以上药材加 95%乙醇回流提取 2 次,加乙醇量依次为 10、8 倍,提取时间依次为 2、1 h,将提取液滤过,减压浓缩至稠膏;滤渣再加水回流提取 2 次,加水量依次为 10、8 倍,提取时间依次为 2、1 h,将提取液滤过,减压浓缩至稠膏;合并上述提取物,减压干燥。

2.1.6 水提醇沉加渗漉(工艺 6) 将以上药材,大黄除外的 9 味药材按“工艺 2”处理,得稠膏,备用;将大黄粉碎成粗粉,加 60%乙醇浸泡 15 h 后,以 15 mL/(min·kg)渗漉,收集渗漉液 24 倍体积,合并渗漉液,减压浓缩至稠膏,备用;将上述稠膏合并,减压干燥。

2.2 蒽醌的 HPLC 法测定^[5]

2.2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),检测波长为 254 nm,柱温为 30 °C,体积流量为 1.0 mL/min,流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱条件:0~15 min, 60% A; 15~45 min, 60%~80% A; 45~60 min, 80%~88% A。

2.2.2 对照品溶液的制备^[2] 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品 2.98、2.85、2.09、2.07、2.19 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度;再分别从芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品溶液中精密吸取 1 mL、从大黄酸、大黄素、大黄酚对照品溶液中精密吸取 2 mL,置 10 mL 量瓶中,混匀,加甲醇至刻度,即得混和对照品溶液。

2.2.3 游离蒽醌供试品溶液的制备 精密称取药材或各工艺干粉适量,置具塞三角瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,超声处理 40 min,滤过,精密移取续滤液 5 mL 至烧瓶中,减压回收至干,加蒸馏水溶液 20 mL,超声处理 2 min 使溶解,置分液漏斗中,再加 20 mL 三氯甲烷,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,水液再用三氯甲烷萃取 3 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加 1 mL 三氯甲烷溶解,转移至 25 mL 量瓶中,再用甲醇溶解洗涤,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.2.4 总蒽醌供试品溶液的制备 精密称取药材或

各工艺干粉适量,置具塞三角瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,超声处理 40 min,滤过,精密移取续滤液 5 mL 至烧瓶中,减压回收至干,加 8%盐酸溶液 20 mL,超声处理 2 min 使溶解,再加 20 mL 三氯甲烷,水浴加热水解 1 h,放冷至室温,置分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷萃取 3 次,每次 20 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂至干,残渣加 1 mL 三氯甲烷溶解,转移至 25 mL 量瓶,再用甲醇溶解洗涤,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL ,进样测定峰面积。以峰面积对进样质量进行拟合,得回归方程。芦荟大黄素: $Y=11\,109\,X+65.001$, $r=0.999\,95$,在 0.011 92~

0.238 40 μg 线性关系良好。大黄酸: $Y=7\,013.3\,X+81.343$, $r=0.999\,9$,在 0.022 8~0.456 0 μg 线性关系良好。大黄素: $Y=12\,345\,X+111.67$, $r=0.999\,9$,在 0.016 7~0.334 0 μg 线性关系良好。大黄酚: $Y=12\,983\,X+111.44$, $r=0.999\,95$,在 0.016 6~0.331 2 μg 线性关系良好。大黄素甲醚: $Y=6\,578.8\,X+26.139$, $r=0.999\,95$,在 0.008 76~0.175 20 μg 线性关系良好。

2.2.6 样品中蒽醌的测定 将混合对照品溶液、6 个工艺的游离蒽醌供试品溶液、总蒽醌供试品溶液分别进行测定,计算总蒽醌转移率和结合蒽醌质量。结果见表 1~4。色谱图见图 1。

总蒽醌质量为结合蒽醌水解成的 5 种游离蒽醌的质量及自身 5 种游离蒽醌的质量总和

总蒽醌转移率=各工艺提取物中 5 种总蒽醌的质量/药材中 5 种总蒽醌的质量

表 1 药材中蒽醌类成分的测定结果

Table 1 Determination of anthraquinones in different herbs

药材	芦荟大黄素/%	大黄酸/%	大黄素/%	大黄酚/%	大黄素甲醚/%
芦荟	0.194	0.004	0.002	0.001	0
决明子	0	0.025	0.012	0.079	0.015
大黄	0.153	0.748	0.408	0.914	0.221

表 2 各工艺所得提取物中总蒽醌的测定结果

Table 2 Determination of anthraquinones in extracts by different processes

工艺	芦荟大黄素/mg	大黄酸/mg	大黄素/mg	大黄酚/mg	大黄素甲醚/mg
1	85.4	31.9	9.20	25.2	8.4
2	56.1	26.9	9.03	27.2	9.4
3	104.0	32.5	52.0	138.0	54.0
4	39.3	30.9	7.2	21.5	8.5
5	85.6	42.0	33.3	135.0	56.0
6	94.4	80.1	43.7	61.0	22.1

表 3 各工艺所得提取物中游离蒽醌的测定结果

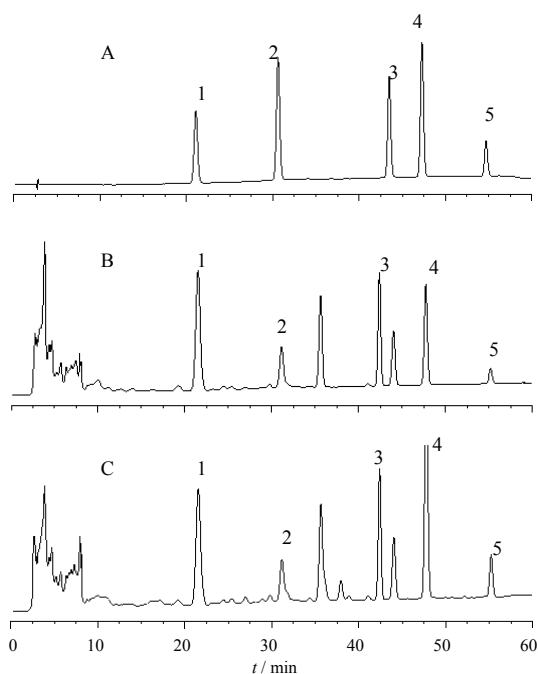
Table 3 Determination of free anthraquinones in extracts by different processes

工艺	芦荟大黄素/mg	大黄酸/mg	大黄素/mg	大黄酚/mg	大黄素甲醚/mg
1	193.0	44.7	8.5	11.9	0
2	58.5	22.9	5.3	7.4	0
3	270.0	99.0	98.7	130.0	39.9
4	39.1	15.4	3.9	6.7	0
5	102.0	52.8	38.1	53.3	17.1
6	93.7	69.5	44.7	28.6	10.7

表 4 各工艺所得提取物中总蒽醌质量、转移率和结合蒽醌的测定结果

Table 4 Determination of total anthraquinones, transfer rate of total anthraquinones, and combined anthraquinones in extracts by different processes

工 艺	总蒽醌质 量/mg	总蒽醌转移 率/%	结合蒽醌质 量/mg
1	160	28.85	45.6
2	129	23.22	34.8
3	381	68.59	97.5
4	107	19.33	42.1
5	352	63.34	88.1
6	301	54.30	54.2



1-芦荟大黄素 2-大黄酸 3-大黄素 4-大黄酚 5-大黄素甲醚
1-aloe-emodin 2-rhein 3-emodin 4-chrysophanol 5-phycione

图 1 混合对照品 (A)、游离蒽醌 (B) 和总蒽醌 (C) 的色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), free anthraquinones (B), and total anthraquinones (C)

2.3 各工艺指纹图谱测定

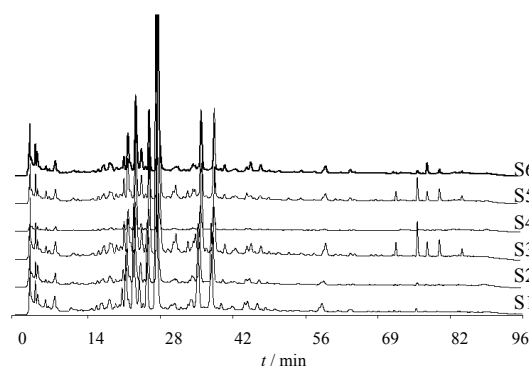
2.3.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 283 nm, 柱温为 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 流动相为甲醇 (A) -

0.2%冰醋酸 (B), 梯度洗脱条件: 0~5 min, 30% (A); 5~15 min, 30%~40% (A); 15~60 min, 40%~66% (A); 60~80 min, 66%~90% (A); 80~85 min, 90% (A)。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称定厚朴酚对照品 2.06 mg, 置 25 mL 量瓶中; 分别精密称定和厚朴酚、柚皮苷、新橙皮苷、芦荟苷对照品 2.40、2.55、2.65、1.98 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释到刻度, 混匀, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 将各工艺所得提取物干粉按等生药量精密称量适量, 置具塞三角瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 超声处理 45 min, 滤过, 取续滤液, 即得。分别精密称取决明子、芦荟、莱菔子、厚朴、枳壳、大黄、旋覆花适量, 置具塞三角瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 超声处理 45 min, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 各工艺所得样品全息谱的测定 将各工艺所得提取物供试品溶液各取 10 μL, 分别进样测定, 得全息谱, 以“工艺 3”为基准, 确定了 27 个特征峰, 将各工艺全息图谱进行比对, 色谱图见图 2, 结果见表 5。



S1-工艺 1 S2-工艺 2 S3-工艺 3 S4-工艺 4 S5-工艺 5 S6-工艺 6
S1-process 1 S2-process 2 S3-process 3 S4-process 4 S5-process 5 S6-process 6

图 2 各工艺所得提取物的全息图谱

Fig. 2 Holographic spectra of extracts by different processes

2.3.5 各工艺特征峰的药材归属 将各药材供试品溶液各取 10 μL, 分别进样测定, 得各药材指纹图谱, 通过与“工艺 3”、出峰时间比较分别对各药材进行色谱峰归属, 见图 3。根据相对峰面积=工艺中各峰面积/药材中相应峰的峰面积对各工艺所得提取物进行归属, 结果见表 5。

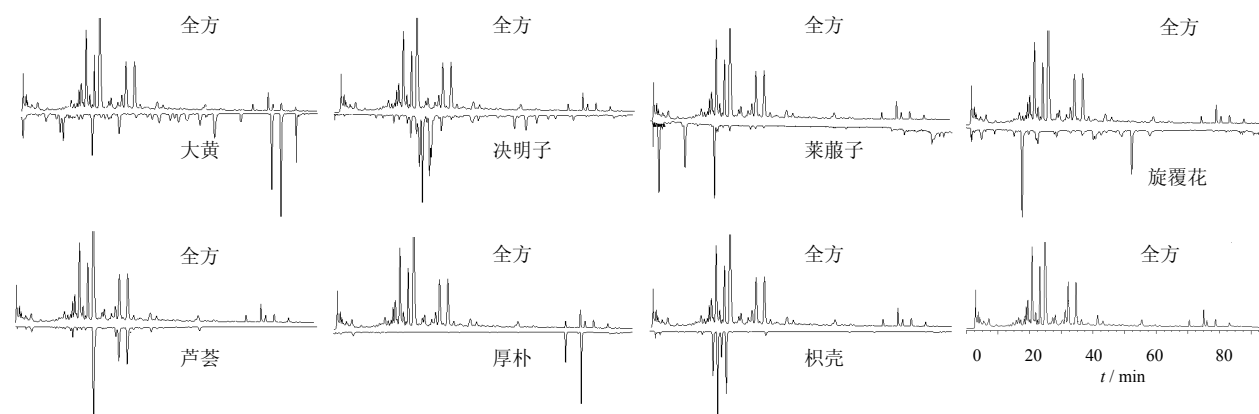


图 3 各药材与工艺 3 所得提取物的全息对照图谱

Fig. 3 Holographic spectra of various herbs and extract by process 3

表 5 不同工艺所得提取物和药材全息图谱中色谱峰比较

Table 5 Comparison on chromatographic peaks in holographic spectra from extracts by different processes and herbs

峰号	药材归属	色谱峰归属	相对峰面积/%					
			工艺 1	工艺 2	工艺 3	工艺 4	工艺 5	工艺 6
1	大黄、芦荟、决明子		53.01	47.20	54.34	37.13	58.25	61.13
10			42.51	38.68	50.38	40.39	53.01	38.27
13			63.56	72.07	84.32	51.61	78.58	53.28
14			23.89	27.21	44.89	18.06	32.47	20.28
21			51.18	34.18	81.14	26.60	63.99	64.67
19	大黄		61.14	47.89	52.77	61.41	56.10	42.03
22		大黄酸	14.37	12.47	27.74	0	31.18	37.71
25		大黄素	4.28	5.83	50.11	4.15	42.58	50.71
26		大黄酚	7.89	8.78	58.38	8.35	54.65	21.28
27		大黄素甲醚	3.31	8.65	43.72	4.47	38.86	18.75
3	决明子		61.05	49.33	82.05	61.40	75.11	45.20
11			27.19	14.73	82.01	39.02	72.79	35.22
20			49.31	81.68	76.95	31.17	58.28	79.08
4			40.19	29.27	53.94	29.35	41.07	28.05
15	芦荟		52.11	45.58	50.23	51.85	62.07	36.81
17		芦荟苷	61.02	51.41	54.96	56.59	67.16	46.80
18			54.51	50.50	74.58	36.36	56.91	62.81
5			74.30	68.21	56.41	56.12	64.30	64.57
6	枳壳	柚皮苷	75.27	77.64	90.83	63.28	79.33	68.67
7			68.07	68.02	53.45	49.42	64.59	66.78
9		新橙皮苷	74.55	70.67	87.76	60.27	80.30	66.67
23		和厚朴酚	7.73	7.51	56.47	0	50.17	4.79
24	厚朴	厚朴酚	8.44	7.85	66.89	3.83	54.61	5.63
8			57.08	51.66	75.07	43.84	61.82	55.37
2	莱菔子		40.22	41.16	72.03	42.31	77.06	61.30
12			31.58	21.01	85.05	34.68	75.04	54.40

2.4 数据分析

可以清楚地看出,总蒽醌质量、转移率以及结合蒽醌质量高低均为:工艺3>工艺5>工艺6>工艺1>工艺2>工艺4。由全方全息谱及表5可以看出,按各峰面积平均转移率比较得出:工艺3>工艺3>工艺1>工艺6>工艺2>工艺4。综合以上数据得出,工艺3为最佳工艺。

3 讨论

在设计工艺路线时,考虑到“大黄汤剂应后下,久煎则泻下力减弱”的传统理论^[6],所以提取时采用了大黄后下的步骤。

由于某些蒽醌类成分如大黄素甲醚极性较小,在供试品溶液的制备时用甲醇溶解有不溶物出现,为了更好地溶解,在溶解时加1 mL三氯甲烷,然后再用甲醇溶解,可有效地溶解不溶物。

在检测各工艺全息谱时,由于本复方中成分较多,各成分特征吸收波长不同,实验采用DAD检测器进行样品色谱峰的全波长扫描,最终确定了283 nm为检测波长;流动相分别考察了甲醇-0.2%甲酸水溶液、甲醇-0.2%冰醋酸水溶液,结果发现采用甲醇-0.2%冰醋酸水溶液系统梯度洗脱,峰较多,峰形也较好。

本方的特色是以泻下为主、理气通腑为辅,只测定代表泻下类的蒽醌类成分进行质量控制则有一定的局限性。为了更全面反映复方的整体化学信息,实验除了测定代表泻下作用的蒽醌类成分,还采用全方全息谱指认了代表理气、降逆止呕作用的枳壳、厚朴、旋覆花等,通过工艺中各峰面积与药材中相应峰面积之比得出各峰相对转移率,从化学成分的角度反映了不同工艺所得产物在功效上的差异。

根据文献可知^[7-9],方中主要成分结合蒽醌及游离蒽醌均有泻下作用,故选用总蒽醌转移率及结合蒽醌质量为主要指标,同时以全方全息谱指认为辅

优选最佳工艺。

实验主要以蒽醌转移率、结合蒽醌质量指标,结合全方全息谱,更有助于实现全方图谱特征与药性相关性的研究^[10],与传统的提取工艺研究只是针对复方中主要活性成分的提取率进行分析的方法相比,能获取更多的信息,从而通过药效学以及质谱分析找到复方中除蒽醌外的其他活性成分,为本复方以后的工艺筛选提供更多的依据。

参考文献

- [1] 唐大轩,谭正怀,梁媛媛,等. 大黄蒽醌致泻作用及其机理的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1312-1314.
- [2] 吴皓,王媚,许凤清,等. 正交试验法优选半夏有效部位的提取工艺 [J]. 中药材, 2004, 27(7): 524-525.
- [3] 张建和,符伟玉,莫丽儿. 中药厚朴及其提取工艺的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(5): 313-314.
- [4] 刘学仁,蔡品品,向显智,等. 中药枳壳中柚皮苷和橙皮苷的提取方法研究 [J]. 湖北师范学院学报, 2011, 31(1): 78-83.
- [5] 胡乔,廖茂梁,张铁军,等. 正交试验法优选夏黄颗粒处方药材的乙醇提取工艺 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 519-522.
- [6] 薛芳,许占民. 中国药物大全(中药卷)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 95.
- [7] 聂克. 大黄药理作用研究及思考 [J]. 山东中医药大学学报, 2009, 33(3): 239-240.
- [8] 马晓莉,曹松云,贾镜鸿,等. 大蒜硝黄膏中大黄游离蒽醌类成分体外经皮渗透实验研究 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2852-2858.
- [9] 闵光宁,武新安,祈有亮,等. 大黄中游离蒽醌泻下作用的初步实验研究 [J]. 兰州大学学报, 2008, 34(1): 41-43.
- [10] 雷钧涛,孙晓华,张笑波,等. 基于理化指纹图谱信息提取及模式识别的中药药性理论研究方法 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(2): 317-318.