

验, pH 8.6 时, 峰形对称, 分离度高, 保留时间 20 min 左右, 故选用 pH 8.6。

References:

- [1] Yuan Y F, Li X L, Liu Z L, et al. Determination of tetrahydropalmatine in *Corydalis Rhizoma* by SFE and HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1996, 31(4): 282-286.
- [2] Yang T Z. Determination of tetrahydropalmatine in Weidekang Powders by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(1): 31.
- [3] Liu J H, Wei J F, Wang H Z, et al. The extraction and separation of alkaloids in *Corydalis Rhizoma* with macroporous resin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 37-38.

当归的炮制对当归补血汤中活性成分的影响

赵奎君¹, 钟 萌¹, 杨思来¹, 董婷霞², 詹华强²

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050; 2. 香港科技大学 生物系 香港)

当归补血汤为金元四大家之一的李东垣所创, 至今已有近 800 年的历史, 由当归与黄芪两味中药按照质量比 1:5 组成, 具有补气生血的功效。主治血虚发热或妇女经期、产后血虚发热头痛之症。原方中当归要用酒制(酒洗)才可入药。然而现代研究中, 不论是当归补血汤方剂还是由此衍生的成药, 如当归补血丸、当归补血胶囊、当归补血口服液中, 当归都没有要求炮制使用。当归所含阿魏酸、藁本内酯、当归多糖, 黄芪中所含黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、黄芪多糖为当归补血汤中补血的有效成分^[1,2]。为探讨酒制当归对该方剂的影响, 本实验对当归炮制前后当归补血汤中阿魏酸、藁本内酯、黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮 5 种活性成分和总多糖进行了测定, 以探讨古方中当归酒制的合理性。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10Avp 高效液相色谱仪, 包括 LC-10Avp 泵、DAD SPD-M10Avp 紫外-可见光检测器, C-R6A 数据处理机。722G 型分光光度计(上海光学仪器厂)。

黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品检定所), 阿魏酸对照品(Sigma 公司), 芒柄花素、毛蕊异黄酮、藁本内酯对照品由北京大学药学院屠鹏飞教授提供。右旋糖苷(相对分子质量 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$, Sigma 公司)。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

黄芪采自山西, 当归采自甘肃岷县, 分别经过笔者鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P. K. Hsiao 和当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 酒制当归的制备: 取生当归饮片 200 g, 加黄酒 20 mL, 拌匀, 文火炒干, 得酒制当归 180 g, 得率为 90%。

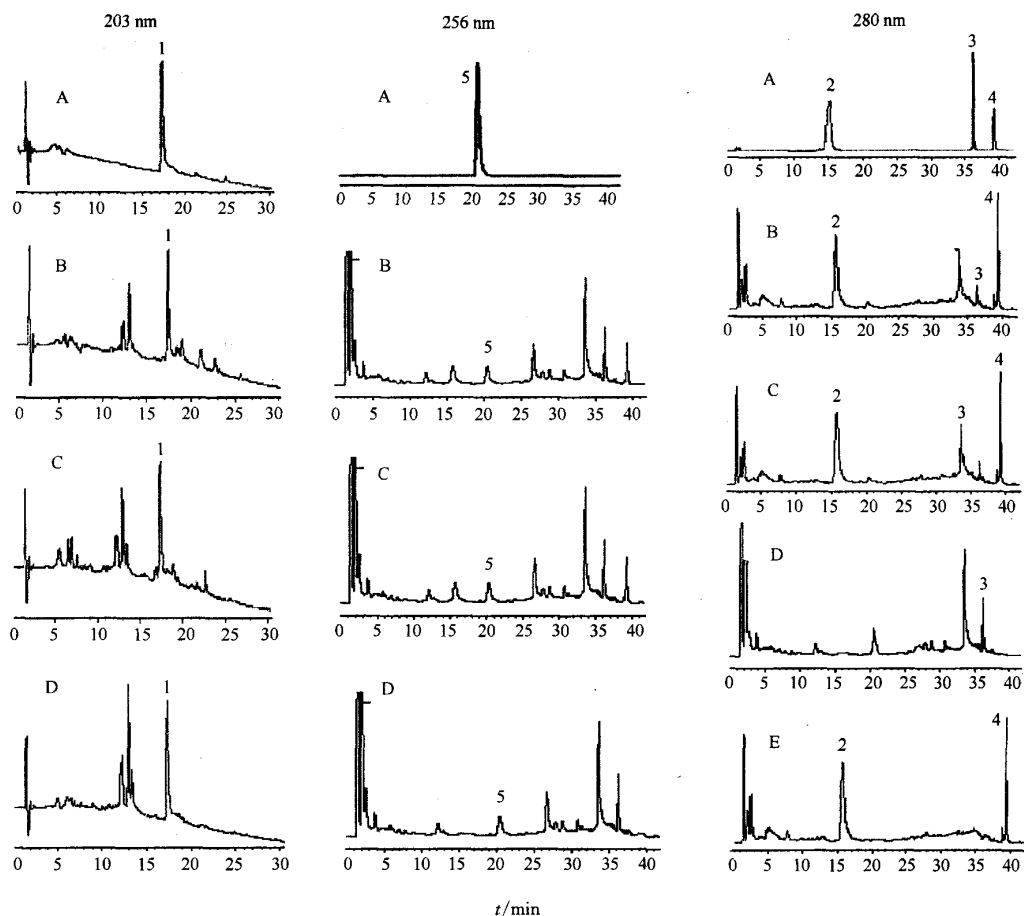
2.2 生品当归与酒制当归入药的当归补血汤的制备: 将黄芪、生当归和酒制当归粉碎成粗粉, 分别按照质量比 1:5 混合, 总量约 30 g。加水 240 mL, 加热, 沸腾后保持 40 min。煎煮 2 次, 滤过, 滤液离心, 合并 2 次上清液, 冰冻干燥, 即得生当归和酒制当归制备的当归补血汤样品。另取生当归、酒制当归和黄芪粗粉同法制备生当归、酒当归、黄芪单味药提取物。

2.3 色谱条件: NOVA-PAK C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 4 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱。黄芪甲苷测定: 0~15 min, 8%~30% 乙腈; 15~45 min, 30%~75% 乙腈。芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯测定: 0~20 min, 0~6% 乙腈; 20~30 min, 6%~20% 乙腈; 30~50 min, 20%~98% 乙腈; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 黄芪甲苷为 203 nm, 芒柄花素、阿魏酸、藁本内酯为 280 nm, 毛蕊异黄酮为 256 nm; 柱温: 室温。在选定条件下, 上述 5 种成分与样品中其他组分色谱峰可达基线分离, 相邻色谱峰分离度大于 1.5, 当归与黄芪相互无干扰。色谱图见图 1。

2.4 对照品溶液的制备及对照品质量分数检查: 精密称取五氧化二磷减压干燥 36 h 的黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯对照品适量, 分别加甲醇制成 1 mg/mL 的溶液。将芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藁本内酯对照品溶液稀释 10 倍, 备用。分别吸取黄芪甲苷对照品溶液及后 4 种对照品

收稿日期: 2006-08-08

作者简介: 赵奎君(1959—), 男, 满族, 辽宁省抚顺市人, 教授, 硕士研究生导师, 长期从事生药学教学及科研工作, 在该领域发表论文 40 余篇, 出版专著 3 部, 获省部级以上奖 6 项。 Tel: (010)63138520 E-mail: zhao1959@hotmail.com



1-黄芪甲苷 2-阿魏酸 3-芒柄花素 4-藜本内酯 5-毛蕊异黄酮
1-astragaloside IV 2-ferulic acid 3-formononetin 4-ligustilide 5-calycosin

图 1 混合对照品(A)、当归补血汤(生当归)(B)、当归补血汤(酒制当归)(C)、黄芪(D)和生当归(E)HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed references substances (A), Danggui Buxue Decoction with non-processed *Radix Angelicae Sinensis* (B), Danggui Buxue Decoction with wine processed *Radix Angelicae Sinensis* (C), *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (D), and *Radix Angelicae Sinensis* (E)

稀释液、空白试剂各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。除去甲醇溶剂峰后, 按峰面积归一化法计算各对照品质量分数, 各对照品质量分数均在 99% 以上。另精密称取右旋糖苷(105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重)0.1 g, 定容至 100 mL 量瓶中, 得 0.1% 右旋糖苷储备液。

2.5 供试品溶液的制备: 精密称取生当归、酒制当归的当归补血汤样品及黄芪单味药提取物各 2 g, 溶解在 20 mL 热水中, 用水饱和的正丁醇萃取(20 mL $\times$ 5), 合并正丁醇萃取液, 用氨试液洗涤(80 mL $\times$ 2), 再用水洗(100 mL $\times$ 2), 弃去氨试液及水层, 正丁醇液蒸干, 残渣精密加甲醇 1 mL 溶解, 供测定黄芪甲苷用。

另精密称取生当归、酒制当归的当归补血汤样品及生当归、酒制当归、黄芪单味药提取物各 1 g, 置

50 mL 离心管中, 加甲醇 20 mL, 超声提取 40 min, 离心后收集上清液, 重复提取 1 次, 合并两次提取液, 回收甲醇至干, 精密加甲醇 2 mL 溶解, 供测定芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯用。

另精密称取生当归、酒制当归的当归补血汤样品及生当归、酒制当归单味药提取物各 0.5 g, 加水 2 mL 溶解, 再加 95% 乙醇使其体积分数达 85%。静置 24 h, 抽滤。滤饼用 70% 乙醇洗涤 5 次, 然后溶解在 60 $^{\circ}$ C 水中, 2 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液加水定容至 100 mL 量瓶中, 供多糖测定。

2.6 线性关系考察: 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液及芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯对照品稀释液 2、4、8、16、32、64 μ L, 依次注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积

积分值为纵坐标,各成分的质量为横坐标,绘制标准曲线;另精密吸取右旋糖苷储备液 0.10、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 分别置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,得各系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液 2.50 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入 5.00 mL 0.2% 蒽酮-浓硫酸显色剂,摇匀,置沸水浴中加热 10 min,取出,放至室温,于 625 nm 波长处进行测定。另取 2.5 mL 蒸馏水同样操作,作空白对照。各对照品的回归方程、相关系数及线性范围分别为黄芪甲苷: $Y=21\,496\,X-29\,767$, $r=0.999\,7$,线性范围 0.005~0.2 mg/mL;芒柄花素: $Y=2\times 10^7\,X+4\times 10^6$, $r=0.9998$,线性范围 0.01~0.5 mg/mL;毛蕊异黄酮: $Y=3\times 10^7\,X+337\,627$, $r=0.999\,1$,线性范围 0.01~0.5 mg/mL;阿魏酸: $Y=1\times 10^8\,X+15\,675$, $r=0.998\,1$,线性范围 0.002~0.1 mg/mL;藜本内酯: $Y=4\times 10^7\,X+1\times 10^6$, $r=0.996\,4$,线性范围 0.02~1.0 mg/mL;右旋糖苷: $Y=7.07\times 10^{-3}\,X+6.72\times 10^{-3}$, $r=0.999\,4$,线性范围 0.01~0.11 mg/mL。

2.7 精密密度试验:分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液及芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯对照品稀释液 20 μ L,重复进样 6 次,测定各成分峰面积。另取当归补血汤多糖测定样品液 2.50 mL,重复进样 5 次,测定吸光度值。结果黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯峰面积的 RSD 分别为 2.6%、2.5%、1.7%、1.9%、1.87%,多糖吸光度值的 RSD 为 2.8%。

2.8 重现性试验:取生当归制的当归补血汤样品,

平行制备供试品溶液 5 份,进样,测定黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯峰面积积分值。另取生当归制的当归补血汤样品 0.5 g,平行制备供测定多糖用的供试品溶液 5 份,测定多糖的质量分数。各指标的 RSD:黄芪甲苷 3.9%,芒柄花素 4.4%,毛蕊异黄酮 2.8%,阿魏酸 4.7%,藜本内酯 4.6%,多糖 3.8%。

2.9 稳定性试验:取各供试品溶液,分别于配制后 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12 h 测定并计算各成分的质量分数。结果供试品溶液中黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯质量分数在 12 h 内基本稳定,多糖质量分数在 2 h 内稳定, RSD 分别为 1.54%、1.23%、0.82%、0.50%、2.12%。

2.10 回收率测定:精密称取 3 批已知各成分量的生当归制备的当归补血汤样品各 5 份,其中供测多糖的样品每份 0.5 g,测黄芪甲苷的样品每份 2.0 g,测其余 4 个成分的样品每份 1.0 g。样品分别加入右旋糖苷对照品 4.0 mg、黄芪甲苷及芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯对照品各 1.0 mg,制备供试品溶液,测定,计算回收率。结果各成分的平均回收率分别为右旋糖苷 97.5%,黄芪甲苷 96.8%,芒柄花素 99.1%,毛蕊异黄酮 98.3%,阿魏酸 97.6%,藜本内酯 99.6%,RSD 在 0.82%~3.23%。

2.11 样品测定:分别精密吸取对照品和供试品溶液,注入液相色谱仪,测定黄芪甲苷及芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、藜本内酯峰面积,按外标法计算,即得。精密量取供试品溶液 2.50 mL,比色测定,计算样品中多糖的量。结果见表 1。

表 1 当归补血汤中各活性成分的测定结果(mg·g⁻¹生药, n=5)

Table 1 Determination of active compositions in Danggui Buxue Decoction (mg·g⁻¹ crude drug, n=5)

供试品	黄芪甲苷	芒柄花素	毛蕊异黄酮	阿魏酸	藜本内酯	总多糖
当归补血汤(生)	0.507 8	0.154 6	0.186 1	0.351 1	0.048 0	227.3
当归补血汤(酒制)	0.956 7*	0.186 4	0.323 2*	0.485 0*	0.012 1	311.6*
生当归				0.253 4	0.292 6	92.22
酒制当归				0.490 3	0.087 5	100.81
黄芪	0.865 6	0.142 8	0.253 2			

* 与生当归制备的当归补血汤相比,具有显著性差异(P<0.01)
* Difference by comparing to DBT with unprocessed Radix Angelicae Sinensis is significant (P<0.01)

3 讨论

结果表明,当归酒制后,其阿魏酸和总多糖的量明显上升,而藜本内酯的量显著降低。而采用酒制当归入药的当归补血汤中黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、阿魏酸、总多糖的量均有提高,其中,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、总多糖的量与生当归入药的当归补血汤相比,具有显著性差异。

当归炮制后,无论是当归还是当归补血汤,其藜本内酯的量均明显降低。中医认为,挥发油类物质性燥,对人体具有刺激性。藜本内酯是当归挥发油中的主要成分,当归炮制后入药,藜本内酯的量下降,可以减少其对身体的刺激性,更有利于当归补血汤的补气生血作用的发挥。

从上述实验结果看,李东垣在当归补血汤中使

用酒制当归是合理的。因此,建议当归补血汤及其制剂应该遵循古人的用药经验,使用酒制当归。

仅仅从活性物质的量上研究炮制对当归补血汤的意义尚不全面。为此,笔者利用细胞生物学方法对当归酒制前后当归补血汤的生物活性做了比较,结果将在后续论文中报道。

References:

- [1] Miao M S, Zhang L P, Fang X Y, et al. Studies of Danggui Buxue Tang polysaccharides on the blood deficiency model mice [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2002, 8(12): 926-927.
- [2] Qi L W, Li P, Sheng L H. A new method to identify active components of traditional Chinese medicine using dialysis and high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34(2): 196-199.

正交试验优选元宝枫果壳中鞣质的提取工艺研究

陈大全^{1,2}, 王昌利¹, 王剑波², 王四旺²

(1. 陕西中医学院 药理学系, 陕西 咸阳 712046; 2. 第四军医大学药物研究所, 陕西 西安 710023)

元宝枫 *Acer truncatum* Bunge 系槭树科槭树属植物,在我国黄河中下游广为分布。民间用于除湿祛风,治疗关节疼痛、骨折、跌打损伤等。元宝枫种皮和果翅中的鞣质具有明显的镇静、催眠、镇痛、抗凝血和止泻作用^[1]。元宝枫果皮、种皮含缩合鞣质约 60%。元宝枫鞣质作为抗脑血栓新药的研究具有广阔前景,因此本实验对元宝枫中鞣质的提取工艺进行研究。

1 仪器和材料

德国 Sartorius R200D 十万分之一电子分析天平,250LH 超声波清洗仪(上海科岛超声仪器有限公司)。

元宝枫果壳药材由陕西杨凌元宝枫药业公司提供,经自然干燥后,用粉碎机研成细粉,过 50 目筛,室温保存备用,药材经西北农林科技大学王性炎教授鉴定。丙酮等试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 因素和水平的确定:根据预试验和鞣质对热的不稳定性特点,选取不同体积分数的丙酮水溶液(A)、加入溶剂的倍量(B)、回流提取时间(C)和提取次数(D)为因素,每个因素各设置 3 个水平,见表 1。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素			
	A/%	B/倍	C/min	D/次
1	10	8	15	1
2	30	10	30	2
3	50	12	45	3

2.2 干膏收率的测定:取正交试验所得提取液适量置已干燥至恒重的 100 mL 蒸发皿中,水浴蒸干后,置烘箱内 105 ℃ 干燥 3 h,取出置干燥器内冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算,即得。

2.3 鞣质的测定^[2,3]:精密称取除杂的干浸膏,加去离子水约 150 mL,80 ℃ 水浴上加热 30 min,精密吸取 1 mol/L 醋酸锌溶液 20 mL,置 500 mL 量瓶中,加氨水 14 mL,摇匀,使白色沉淀溶解,35 ℃ 水浴温热 30 min。取出冷却至室温,摇匀后滤过,弃去初滤液。取上述滤液,精密吸取 20 mL 于 500 mL 三角烧杯中,加去离子水 300 mL,氨-氯化铵缓冲液(pH 10)25 mL,铬黑 T 指示剂少量,摇匀,用标定过的 EDTA-2Na 标准液滴定至溶液由紫红色变为蓝绿色,结果再做空白校正,计算鞣质的提取率。

鞣质的提取率 = $0.1556 \times 25 \times (V_1 - V_2) \times M / W \times 100\%$
0.1556 为滴定的锌离子的消耗量与鞣质量的关系常数, V_1 为空白对照所消耗的 EDTA-2Na 的体积, V_2 为样品所消耗的 EDTA-2Na 的体积, M 为 EDTA-2Na 标准溶液的质量浓度, W 为元宝枫果壳取样量

2.4 正交试验结果:取元宝枫果壳 10 g,9 份,每份平行设置 2 份,按 $L_9(3^4)$ 正交设计表条件进行试验,以干膏收率和鞣质的提取率作为指标,结果见表 2。方差分析见表 3。

方差分析表明,因素 D(提取次数)为主要影响因素,具有显著性,因素 C(回流提取时间)次之,因素 A(提取溶剂的体积分数)和因素 B(溶剂用量)不明显,无显著性;干膏收率影响因素依次为 $D > C > A > B$,鞣质提取率影响因素顺序依次为 $D > C >$

收稿日期:2006-02-10

作者简介:陈大全(1981—),男,山东潍坊人,在读硕士,从事中药新技术与新剂型研究。

Tel:(029)38183793 E-mail:cdq1981@126.com