

基于有效组分检测与理化表征相结合的当归补血汤制备工艺与质量控制研究

马家骅¹, 谭承佳^{2,3}, 李霞², 张海燕², 张全², 向永臣², 杨明²

1. 西南科技大学 生物科学实验中心, 四川 绵阳 621010

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

3. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621000

摘要: 目的 优选当归补血汤的制备工艺, 探索以理化表征参数作为汤剂制备工艺评价与质量控制手段的可行性。方法 采用正交试验设计, 主要以有效组分阿魏酸、黄芪甲苷、黄芪皂苷、多糖的量指标, 全面考察当归补血汤的制备工艺, 并对所得提取液进行流变学、表面化学、电化学等方面的表征, 将表征参数与组分的量进行多项式回归分析。结果 优选的当归补血汤制备工艺条件为取处方药材加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.0 h; 理化表征显示, 不同制备工艺条件所得汤剂理化参数差别较大, 且渗透压与体系组分的量关系最为密切, 表面张力、电导率次之, 而 pH 值、黏度与体系组分的量关系不密切。结论 初步表明, 表面张力、电导率和渗透压可作为当归补血汤制备工艺与质量控制的评价指标, 通过提取液的理化表征来进行质量控制具有一定的可行性。

关键词: 当归补血汤; 有效组分; 理化表征; 阿魏酸; 黄芪甲苷

中图分类号: R284.2; 286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0482-05

Preparation and quality control of Danggui Buxue Decoction based on combination of active components determination and physicochemical characterization

MA Jia-hua¹, TAN Cheng-jia^{2,3}, LI Xia², ZHANG Hai-yan², ZHANG Quan², XIANG Yong-chen², YANG Ming²

1. Experimental Center of Biological Sciences, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China

Abstract: **Objective** To optimize the preparation technique of Danggui Buxue Decoction (DBD) and explore the feasibility of technique evaluation and quality control by physicochemical characterization of extracts. **Methods** Orthogonal test was used to optimize preparation technique of DBD, and the active components of ferulic acid, astragaloside IV, astragaloside, and polysaccharides were mainly chosen as indicators, the physicochemical characterizations were determined by rheology, surface chemistry, and electrochemistry, etc. And polynomial regression analysis was used to analyze these data. **Results** The optimal preparation techniques were as follows: The dried herbs were boiled and extracted thrice with 12 times of water for once per hour. Physicochemical parameters of DBD under different conditions were of great difference. Osmotic pressure was most closely related to component content, surface tension came next, and followed by conductivity, while pH value and viscosity were not closely. **Conclusion** The results preliminarily show that physicochemical parameters such as surface tension, conductivity, and osmotic pressure could be used to evaluate the preparation and quality control of DBD. It proves the physicochemical characterization of extracts in quality control is feasible.

Key words: Danggui Buxue Decoction (DBD); active components; physicochemical characterization; ferulic acid; astragaloside IV

质量评价一直是制约中药现代化与国际化的瓶颈问题, 也是中药制剂研究的共性关键问题^[1-2]。现

行中药质量评价模式基本上是沿用化学药物的质量

控制模式, 即建立在微观和局部基础之上的成分指认, 由于中药基础研究比较薄弱, 目前还难以完全表征中药的化学成分, 已经用来表征质量的成分大

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801550); 西南科技大学博士基金资助项目 (10zx7153)

作者简介: 马家骅 (1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为中药新技术、新制剂、新剂型、物理药剂学。

Tel: (0816)6089531 E-mail: jiahuama@163.com

多为指标成分或有代表性的有效成分,基本上是对单味药的现代还原研究所得的一些指示性成分,不仅难以代表单味药的疗效,更不能代表整个中药复方的药效物质基础,具有较大的片面性。尽管目前采用的指纹图谱技术及联用仪器^[3-6]把中药的质量控制水平提高到了一个新的水平,但未能建立一种内在的谱效关系,因而也就不能对中药的内在品质做出全面的综合评价。

近年来,也出现了一些新的评价方法,如张贵君等^[7]提出以物理常数来鉴定中药的真伪和纯度,尽管有一定的宏观性,部分符合中医药的整体观,但鉴定指标过于单一,故而鉴定意义不够明确;代春美等^[8]采用生物热力学的方法来评价中药的品质,这对中药的评价提供了一种新的思路,但目前局限于清热药,且仅通过热力学有关的参数进行中药的质量评价,有失全面。为此,有必要在当前这些评价方法的基础上,探索一种更趋于全面的质量评价模式。

本实验以李东垣所创之当归补血汤为研究对象,主要以微观化学组分的量为指标对当归补血汤的制备工艺进行考察,以期筛选出当归补血汤的最佳制备工艺,同时,通过对汤剂的流变学、表面化学、电化学等宏观理化性质的表征,来探明中药汤剂体系的物理化学特性,并考察组分与理化参数的关系,为中药提取液(汤剂)表征参数体系的建立提供实验依据,为建立真正反映其“内在”“综合”质量的中药质量控制方法提供技术支撑。

1 仪器与材料

BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司),UV—VIS 1700 分光光度计(日本 Shimadzu 公司),LC—10A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),Physica MCR101 型流变仪(奥地利安东帕有限公司),DCAT11 表面/界面张力仪(德国 Dataphysics 公司),DDS—307A 电导率仪(上海雷磁精密仪器厂),FM—8P 全自动冰点渗透压计(上海医大仪器厂)。

黄芪甲苷(批号 110781-200613)、阿魏酸(批号 110773-200611)对照品均为中国药品生物制品检定所提供,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

实验所用当归、黄芪购自四川省中药饮片有限责任公司,经成都中医药大学杨明教授鉴定当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,黄芪为膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 评价指标的选择与测定

方中当归所含阿魏酸、藁本内酯、当归多糖,黄芪中所含皂苷、黄酮、黄芪多糖为当归补血汤中补血的主要有效组分^[9-12]。根据处方药物的成分、药效,选用黄芪的指标性成分黄芪甲苷、当归的指标性成分阿魏酸、以及方中的总皂苷和总多糖作为水煎煮提取工艺的评价指标,其中总皂苷与总多糖为当归补血汤的主要活性组分,故在综合评分中的比重各占 30%,阿魏酸也为益气补血的主要成分,在综合评分中的权重定为 20%,黄芪甲苷亦为补血的有效成分之一,定其权重为 10%,而出膏率是药品日服量、单服剂量和包装规格确定的依据,能够部分代表复方的综合疗效,故以其作为水煎煮提取的另一评价指标,定其权重为 10%。

2.1.1 总多糖的测定^[13] 本实验中总多糖的量采用苯酚-硫酸法测定。

(1) 对照品溶液制备:精密称取葡萄糖对照品适量,加水制成 0.45 mg/mL 的溶液,即得。

(2) 供试品溶液的制备:取当归补血汤醇沉液(70%)离心后的沉淀,加水溶解,稀释成 1 000 mL,再取适量用水稀释 100 倍,即得。

(3) 样品测定:分别精密量取对照品溶液与供试品溶液 2 mL 置 10 mL 具塞试管中,精密加入新配制的 5% 苯酚溶液 1 mL,缓缓加入浓硫酸 5.0 mL,摇匀后,置沸水浴中加热 10 min,冷却至室温,摇匀,在 490 nm 波长处测定吸光度(*A*)值,按回归方程 $A = 0.0142C - 0.0119$ ($r = 0.9951$) 计算,即得。

2.1.2 总皂苷的测定^[14] 皂苷成分多无色且常无紫外吸收,测定其量时常利用皂苷能与某些试剂反应后产生颜色,于可见光区进行比色测定,该类方法反应灵敏、简便易行,本实验中采用香草醛-高氯酸作为显色剂,灵敏度高、重现性好、简便准确。

(1) 对照品溶液的制备:精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.4 mg/mL 的溶液。

(2) 供试品溶液的制备:取当归补血汤醇沉上清液 50 mL,蒸干,残留物加水 30 mL,加热使溶解,置分液漏斗中,加乙醚振摇萃取 3 次,弃去乙醚液,加入水饱和的正丁醇振摇萃取 4 次,合并正丁醇液,用氨试液洗 2 次,每次 30 mL,将正丁醇液蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 100 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得。

(3) 样品测定:精密吸取对照品溶液及样品溶

液各 0.2 mL, 分别置 10 mL 具塞试管中, 热风吹干甲醇, 放冷。精密加入新配置的含 5% 香草醛-冰醋酸 0.2 mL, 高氯酸 0.8 mL, 摇匀, 密塞, 置 60 °C 水浴 15 min, 冷却 2 min。精密加入冰醋酸 5 mL, 摇匀, 在 578 nm 波长处测定 A 值, 按回归方程 $A=3.4398C-0.0422$ ($r=0.9975$) 计算, 即得。

2.1.3 阿魏酸的测定^[15] 文献报道多采用准确度较好的 HPLC, 该法简便准确、灵敏度高、重现性好, 故采用 HPLC 法测定阿魏酸的量。

(1) 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱为 Dimosil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.085% 磷酸水溶液 (20:80), 检测波长 316 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C; 理论塔板数按阿魏酸计算不得低于 4 000。色谱图见图 1。

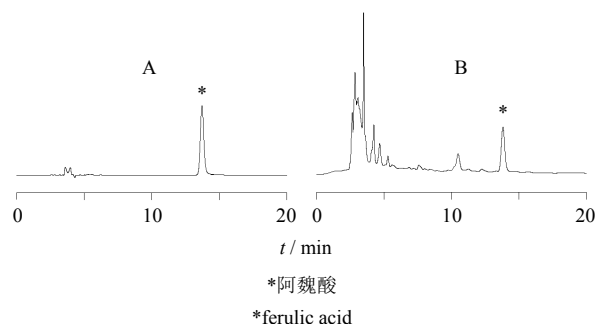


图 1 阿魏酸对照品 (A) 和当归补血汤 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of ferulic acid reference substance (A) and DBD (B)

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取阿魏酸对照品适量, 加 70% 乙醇制成 0.1 mg/mL 的溶液, 即得。

(3) 供试品溶液的制备: 取当归补血汤醇沉上清液 25 mL 至 50 mL 棕色量瓶内, 室温加 70% 乙醇至刻度, 即得。

(4) 样品测定: 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 即得。

2.1.4 黄芪甲苷的测定^[16] 根据《中国药典》2010 年版一部对黄芪中黄芪甲苷的测定方法, 采用 HPLC-ELSD 法测定当归补血汤中黄芪甲苷的量。

(1) 色谱条件与系统适用性试验: LC-10A 高效液相色谱仪 (日本岛津), 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (40:60), 蒸发光散射检测器, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 35 °C; 理论板数以黄芪甲苷峰计算应不低于 4 000。色谱图见图 2。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取黄芪甲苷对照品适量, 加甲醇制成 0.05 mg/mL 的溶液, 即得。

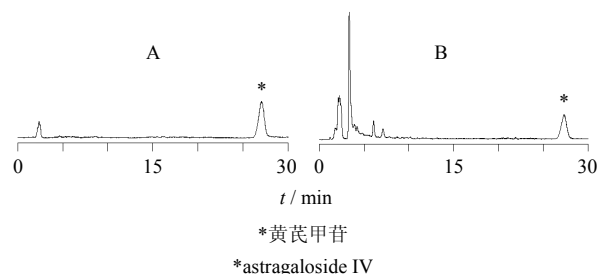


图 2 黄芪甲苷对照品 (A) 和当归补血汤 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of astragaloside IV reference substance (A) and DBD (B)

(3) 供试品溶液的制备: 取当归补血汤醇沉上清液 150 mL, 蒸干, 残留物加水 30 mL 分散, 加乙醚振摇萃取 3 次, 弃去乙醚液, 加入水饱和的正丁醇振摇萃取 4 次, 合并正丁醇液, 用氨试液洗涤 2 次, 将正丁醇液蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶内, 并用甲醇定容至刻度, 取 5 mL 至 50 mL 量瓶内, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

(4) 样品测定: 精密吸取对照品溶液 10、20 μL, 供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 以外标两点法对数方程计算, 即得。

2.1.5 出膏率测定 正交试验样品水煎液浓缩并定容至 100 mL, 精密移取 1/10 (相当于药材 7.2 g) 的当归补血汤水煎液, 分别置于已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 0.5 h, 迅速称定质量, 计算出膏率。

出膏率 = (干燥前质量 - 干燥后质量) / 药材质量

2.2 制备工艺考察

根据预试结果和文献报道, 影响汤剂提取的主要因素有加水量 (A)、煎煮时间 (B)、煎煮次数 (C) 等, 故在此基础上, 以阿魏酸 (Z)、黄芪甲苷 (V)、总皂苷 (W)、总多糖 (Y) 和出膏率 (X) 的综合评分 [综合评分 = (W / W_{max}) × 30 + (Y / Y_{ma}) × 30 + (Z / Z_{max}) × 20 + (V / V_{max}) × 10 + (X / X_{ma}) × 10] 为评价指标, 对上述 3 个因素采用正交试验进行考察, 即: 称取当归 12 g, 黄芪 60 g, 共 9 份, 按 L₉(3⁴) 正交表进行提取, 滤过, 合并滤液, 浓缩至 100 mL, 加乙醇调整乙醇体积分数至 70%, 冷藏过夜, 离心, 即得, 结果见表 1。对试验结果采用 SPSS 统计软件进行方差分析, 结果见表 2。

方差分析结果表明, C 因素对提取工艺有显著影响 ($P < 0.05$), A、B 两因素无显著影响, 结合直观分析结果, 确定最佳提取条件为 A₃B₁C₃, 即加 12 倍量水, 提取 3 次, 每次 1.0 h。采用该工艺参数,

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 1 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因 素				评价指标					综合评分
	A / 倍	B / h	C / 次	D (空白)	W / %	Y / %	Z / %	V / %	X / %	
1	8 (1)	1.0 (1)	1 (1)	(1)	0.086	4.17	0.007 2	0.012 7	26.06	48.74
2	8 (1)	1.5 (2)	2 (2)	(2)	0.118	5.78	0.006 7	0.026 1	37.38	66.37
3	8 (1)	2.0 (3)	3 (3)	(3)	0.146	6.03	0.009 0	0.027 7	31.25	74.26
4	10 (2)	1.0 (1)	2 (2)	(3)	0.104	5.47	0.015 3	0.036 1	45.49	75.41
5	10 (2)	1.5 (2)	3 (3)	(1)	0.151	7.78	0.019 6	0.021 1	42.58	93.51
6	10 (2)	2.0 (3)	1 (1)	(2)	0.065	4.88	0.005 3	0.018 8	32.11	48.22
7	12 (3)	1.0 (1)	3 (3)	(2)	0.154	7.66	0.018 0	0.032 1	41.22	94.47
8	12 (3)	1.5 (2)	1 (1)	(3)	0.099	5.56	0.005 9	0.014 6	34.17	57.45
9	12 (3)	2.0 (3)	2 (2)	(1)	0.110	6.63	0.010 9	0.040 0	48.33	78.11
K_1	189.36	218.62	154.41	220.36						
K_2	217.14	217.33	219.89	209.06						
K_3	230.04	200.59	262.23	207.13						
R	40.68	18.03	107.82	34.06						

表 2 方差分析表
Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	288.043	2	8.457 70	
B	67.450 5	2	1.980 52	
C	1 967.34	2	57.766 4	$P < 0.05$
D (误差)	34.056 8	2	1.000	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

进行 3 批验证试验, 结果见表 3。结果表明, 该工艺稳定可行, 重现性好。

2.3 理化表征

中药提取液(汤剂)作为一种复杂体系, 有其独特的理化性质, 本实验依据中药提取液有什么样的成分, 必然有什么样的理化性质, 提出中药提取液的宏观性质是其微观粒子运动的客观反应, 结合

表 3 验证试验结果

Table 3 Results of verification test

试验号	V / %	W / %	Y / %	Z / %	X / %
1	0.033 5	0.147	7.92	0.016 9	40.56
2	0.032 3	0.139	7.51	0.018 4	40.95
3	0.031 5	0.136	7.68	0.017 2	41.63

成分与理化性质之间的规律, 通过对汤剂的流变学、表面化学、电化学等宏观理化性质的表征, 来建立汤剂基于微观之上的宏观质量控制。本实验采用正交试验设计, 称取两倍处方量药材, 加水提取, 合并滤液, 离心, 取上清液测定表面张力、流变曲线、黏度、pH 值、电导率和渗透压, 理化参数测定结果见表 4。

不同工艺所制备出的药液的表面张力、pH 值、电导率和渗透压差别较大, 说明表面张力、pH 值、

表 4 理化参数测定结果 (25 ℃, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Determination of physicochemical parameters (25 ℃, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

序号	表面张力 / (mN·m ⁻¹)	pH 值	电导率 / (μs·cm ⁻¹)	黏度 / (mPa·s)	渗透压 / (mOsm·kg ⁻¹)
1	50.210±0.153	5.57±0.021	718±1.000	1.050±0.007	51±0
2	48.799±0.106	5.30±0.006	1 035±2.082	1.038±0.002	64±0
3	46.734±0.033	5.22±0.021	1 155±1.528	1.133±0.028	68±0
4	46.125±0.009	5.55±0.026	929±0.577	1.001±0.015	69±0
5	45.614±0.185	5.46±0.021	1 024±1.528	1.040±0.015	70±0
6	48.263±0.096	5.54±0.029	769±0.000	1.013±0.015	58±0
7	46.766±0.115	5.30±0.010	1 078±1.528	1.039±0.013	69±0
8	48.692±0.143	5.57±0.042	814±1.000	0.996±0.015	56±0
9	46.613±0.096	5.25±0.010	1 075±0.577	1.066±0.033	69±0

电导率和渗透压这4个理化参数可以作为当归补血汤制备工艺的评价指标,而不同工艺所制药液的黏度差别很小,流变曲线重合度较高,说明黏度基本不能反映当归补血汤的制备工艺。

2.4 有效组分与理化参数的关系研究

以当归补血汤正交工艺所得提取液的理化参数值为横坐标(x),有效组分的综合评分为纵坐标(y),进行多项式回归分析,其回归方程如下:(1)表面张力为横坐标, $y=1.0116x^2-106.28x+2835.1$ ($r=0.845$);(2)pH值为横坐标, $y=-62.416x^2+631.22x-1514.3$ ($r=0.541$);(3)电导率为横坐标, $y=-0.0003x^2+0.6689x-276.06$ ($r=0.850$);(4)黏度为横坐标, $y=-1963.1x^2+4270.2x-2244.4$ ($r=0.323$);(5)渗透压为横坐标, $y=0.1419x^2-15.211x+457.51$ ($r=0.925$)。由所得方程的回归系数可知,渗透压与体系组分量的关系最为密切,表面张力、电导率次之,而pH值、黏度与体系组分量的关系不密切。结合“2.3”项,初步表明采用渗透压、表面张力和电导率这3个理化参数可以从整体上反映当归补血汤的质量。

3 讨论

本研究主要采用UV-Vis与HPLC法测定了各有效组分的量,筛选出了当归补血汤的最佳制备工艺条件,表征了各制备工艺所得提取液的理化性质,并进行了体系组分的量与理化参数的回归分析,结果不同制备工艺条件下,当归补血汤的理化性质除黏度与流体类型基本不变外,其余各参数值差别较大,表明中药提取液分散体系的理化参数具有一定的灵敏性,以其作为汤剂制备工艺评价与质量控制的指标具有一定的可行性。

本研究表明不同提取工艺条件影响汤剂有效组分的量与特征参数,结合前期研究发现^[17-18],当归补血汤体系的表面张力主要受黄芪甲苷类成分影响,pH值和电导率主要受阿魏酸类成分影响,渗透压可能主要受多糖类成分的影响,不仅如此,当归补血汤的理化参数还与其益气补血药效作用呈一致性变化,二者间具有较强的相关性,理化参数能够反映药效强弱,即理化参数与成分、药效间存在内在的必然联系,通过理化参数能够表征体系的内在质量,因此,用其作为中药提取液(汤剂)的质量控制指标具有可行性,但适宜特征参数的确定、微观各类成分与复方宏观理化特征参数间的关系及参数传变规律等有待探讨。后期将在此基础上,对上

述问题进行深入研究,从而为建立多维多息的中药提取液质量控制模式提供理论依据和实验支撑。

参考文献

- [1] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [2] 肖小河, 金城, 鄢丹, 等. 中药大质量观及实践 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 505-508.
- [3] 韩凤梅, 蔡敏, 陈勇. 中药指纹图谱技术研究现状 [J]. 分析科学学报, 2004, 20(6): 647-651.
- [4] Zhang H Y, Hu P, Luo G A, *et al.* Screening and identification of multi-component in Qingkailing injection using combination of liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography / ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 577(2): 190-200.
- [5] 张依倩, 王玉, 黄芝娟, 等. 基于HPLC-DAD-MS的道地产区大黄药材质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 179-183.
- [6] 韦辉, 刘素香, 刘毅, 等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 343-347.
- [7] 张贵君, 李仁伟, 雷国莲, 等. 常用中药物理常数鉴定 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [8] 代春美, 肖小河, 王迪, 等. 微量热法对不同生长年份黄连品质的评价 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 205-209.
- [9] 范颖, 陈信义. 当归补血汤的实验研究进展 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(9): 1643-1646.
- [10] 黄兆胜, 危建安, 吴利. 当归补血汤补血功效及其物质基础研究(二) [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(5): 10-11.
- [11] Wen X D, Qi L W, Chen J, *et al.* Analysis of interaction property of bioactive components in Danggui Buxue Decoction with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852(1/2): 598-604.
- [12] 宁炼, 陈长勋, 金若敏, 等. 当归补血汤促进造血功能的成分及其作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(1): 50-53.
- [13] 程磊, 周秀佳. 海芋中海芋多糖的组成和含量测定 [J]. 中草药, 2004, 35(6): 644-646.
- [14] 张全英, 施爱明, 袁心慧. 参麦注射液中人参皂苷含量测定 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 750-751.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [16] 陈有根, 辛敏通, 杨滨, 等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定方法的改进 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(21): 1857-1859.
- [17] 马家骅, 李霞, 张明令, 等. 当归补血汤主要活性成分与其理化参数的关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 1953-1956.
- [18] 马家骅, 李霞, 熊永爱, 等. 当归补血汤表征参数与其益气补血功效的关系初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 111-116.