

正交试验结合指纹图谱优选补骨脂-肉豆蔻药对醇提工艺

杨晓旭¹, 高家荣^{1,2*}, 韩燕全^{1,2}, 庄星星¹, 魏良兵²

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230038

2. 安徽中医药大学第一附属医院, 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031

摘要: 目的 优选补骨脂-肉豆蔻药对醇提的最佳工艺条件。方法 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 考察乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间、提取次数对提取工艺的影响, 以 HPLC 指纹图谱特征峰总面积与补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚的量以及干浸膏得率为综合评判指标。结果 最佳醇提工艺为乙醇体积分数 50%, 乙醇 6 倍用量, 每次提取 2 h, 提取 3 次。结论 本法为补骨脂-肉豆蔻药对醇提工艺的确定提供了依据。

关键词: 补骨脂-肉豆蔻药对; 醇提工艺; 正交试验; HPLC; 指纹图谱; 特征峰总面积; 补骨脂素; 异补骨脂素; 去氢二异丁香酚

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)15-2178-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.011

Optimization of ethanol extraction process of *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair by orthogonal test combined with fingerprint

YANG Xiao-xu¹, GAO Jia-rong^{1,2}, HAN Yan-quan^{1,2}, ZHUANG Xing-xing¹, WEI Liang-bing²

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

2. State Administration of Chinese Medicine Preparation Three Laboratories First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract: Objective To optimize the ethanol extraction process of *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* (psoralen-nutmeg) drug pair. **Methods** Using $L_9(3^4)$ orthogonal design, the effects of ethanol concentration, ethanol amount, extraction time, and extraction times on the extraction process were investigated. The contents of psoralen, isopsoralen, and dehydrodiisoeugenol, dry extract yield, and total area of HPLC fingerprint characteristic peaks were used as comprehensive evaluation indexes. **Results** The optimum process conditions were as follows: 50% ethanol, six times of the ethanol volume, extracted for three times, each time for 2 h. **Conclusion** The method provides the basis for the determination of ethanol extraction process of *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair.

Key words: *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair; ethanol extraction process; orthogonal test; HPLC; fingerprint; total area of characteristic peak; psoralen; isopsoralen; dehydrodiisoeugenol

补骨脂与肉豆蔻作为温肾暖脾, 涩肠止泻药对配伍, 最早出自宋·许叔微的《普济本事方》, 时称“二神丸”(补骨脂、肉豆蔻 2 药为主, 大枣、生姜为辅)^[1]。补骨脂、肉豆蔻药对自建方始, 其主证为全不进食, 病位在脾肾二脏, 病因病机为“肾气怯弱, 真元衰劣, 自是不能消化饮食……”。中药是典型的复杂体系, 具有多组分与多靶点的特点, 在目前对其临床疗效了解较多而作用机制尚未完全明

了的情况下, 单独依靠一两个指标化合物的定量测定来评价中药的提取工艺是不全面的, 中药指纹图谱是目前公认的一种综合的、可量化的质量控制手段, 可用于掌握中药多成分的信息。补骨脂素、异补骨脂素均为补骨脂的有效成分, 去氢二异丁香酚为肉豆蔻的有效成分。参考相关文献资料^[2-4], 本研究以 HPLC 指纹图谱特征峰面积、补骨脂素、异补骨脂素及去氢二异丁香酚的量以及干浸膏得率为指

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 国家中医药重点学科临床中药学建设项目(国中医药人教发[2012]32号)

作者简介: 杨晓旭(1989—), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生, 从事中药新药研发。Tel: 13485710609 E-mail: 983801319@qq.com

*通信作者 高家荣 E-mail: zyfygjr2006@163.com

标,采用正交试验法优选补骨脂-肉豆蔻药对的醇提工艺。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪, DAD 检测器, 二元高压梯度泵, 柱温箱, 美国安捷伦公司; RE—852 旋转蒸发器, 巩义市峪予华仪器厂; HH—S 型电热恒温水浴锅, 江苏省医疗器械厂; TF—18 通风橱; KMD 型调温电热套, 金坛市荣华仪器制造有限公司; BP211D 电子分析天平, 德国赛多利斯公司; D2F—6020 真空干燥箱, 上海博讯医疗设备厂; KQ3200B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器厂; 101A—S1 型数显电热鼓风干燥箱, 上海浦东荣丰科学仪器有限公司。

对照品补骨脂素(批号 110739-201115)、异补骨脂素(批号 110738-201012)、去氢二异丁香酚(批号 111838-201001)均购于中国食品药品检定研究院,上述对照品质量分数均 $\geq 99.3\%$,均为定量测定用;中药饮片均由安徽中医药大学第一附属医院中药房提供,经安徽中医药大学第一附属医院李立华主任药师鉴定,分别为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实、肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁。0.22 μm 微孔滤膜,上海陆纳生物科技有限公司;甲醇,色谱纯,美国 Tedia 公司;水为屈臣氏蒸馏水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

称取本药对药材 9 份,每份称取补骨脂 24 g、肉豆蔻 12 g,按表 1 所列条件制备样品,所得提取液浓缩定容至 50 mL 量瓶中,精密吸取醇提浓缩液各 5 mL 分别置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加甲醇

溶解,分别转移至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,超声 30 min,分别编号为供试品溶液 1~9 号,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚对照品适量,分别加甲醇配制成含补骨脂素 0.109 mg/mL、异补骨脂素 0.112 mg/mL、去氢二异丁香酚 0.042 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 补骨脂素、异补骨脂素定量测定

2.3.1 色谱条件 Welch material Inc C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(50:50);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 246 nm^[7]。HPLC 色谱图见图 1。

2.3.2 阴性对照溶液的制备 根据药对组成,取肉豆蔻药材,按“2.2”项下方法制得阴性对照溶液。

2.3.3 线性关系的考察 自动进样对照品溶液各 1、2、4、8、12、16 μL ,以色谱峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线并进行线性回归。补骨脂素回归方程 $Y=767.94X-13.07$, $r=0.999\ 9$;异补骨脂素回归方程 $Y=831.23X-21.87$, $r=0.999\ 9$;结果表明,补骨脂素、异补骨脂素分别在 0.109~1.744、0.112~1.792 μg 呈良好的线性关系。

2.3.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪进行测定,计算补骨脂素、异补骨脂素的量。

2.4 去氢二异丁香酚的测定

2.4.1 色谱条件 Agilent Edipse Plus C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(75:25);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为 274 nm。HPLC 色谱图见图 2。

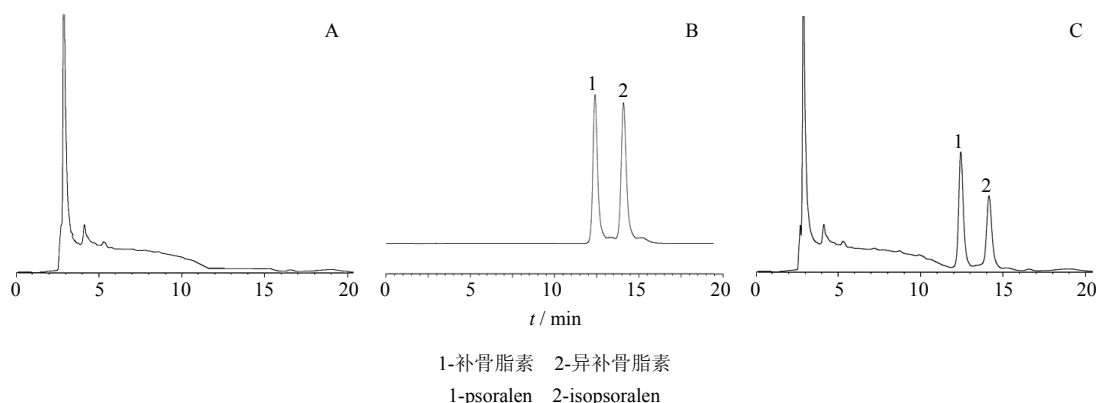


图 1 阴性对照 (A)、混合对照品 (B) 和补骨脂-肉豆蔻药对 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of negative sample (A), mixed reference substances (B), and *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair (C)

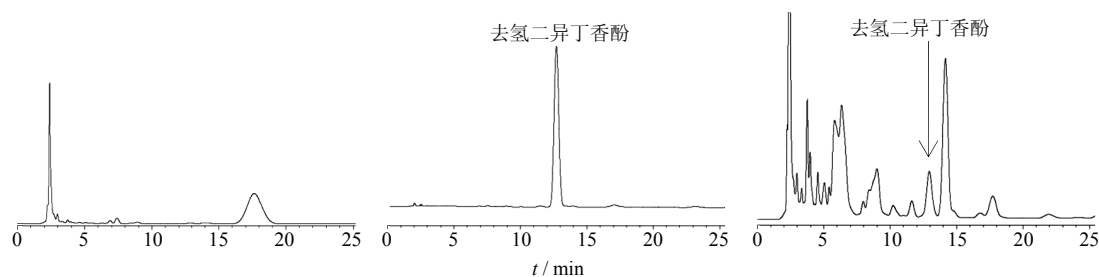


图2 阴性对照(A)、去氢二异丁香酚对照品(B)和补骨脂-肉豆蔻药对(C)的HPLC图

Fig. 2 HPLC of negative sample (A), dehydrodiisoeugenol reference substance (B), and *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair (C)

2.4.2 阴性对照溶液的制备 根据药对的组成,取补骨脂药材,按“2.2”项下方法制得阴性对照溶液。

2.4.3 线性关系的考察 自动进样对照品溶液各2、4、8、16、24、28 μL ,以色谱峰峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X),绘制标准曲线并进行线性回归。去氢二异丁香酚回归方程 $Y=169.07X+18.85$, $r=0.9999$;结果表明,去氢二异丁香酚在 $0.084\sim 1.176\mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

2.4.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 $5\mu\text{L}$,注入高效液相色谱仪进行测定,计算去氢二异丁香酚的量。

2.5 指纹图谱

2.5.1 色谱条件 Welch material Inc C_{18} 色谱柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\mu\text{m}$);流动相为甲醇-水,采用梯度洗脱: $0\sim 15\text{ min}$, 50%甲醇; $15\sim 85\text{ min}$, 50%~90%甲醇; $85\sim 90\text{ min}$, 90%~50%甲醇; $90\sim 95\text{ min}$, 50%甲醇;体积流量 1.0 mL/min ;进样量 $5\mu\text{L}$;柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;检测波长为 234 nm 。

2.5.2 方法学考察

(1)精密度试验:取1号供试品,分别按“2.6.1”项下色谱条件连续进样6次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在 $0.05\%\sim 0.32\%$ 、 $0.63\%\sim 1.55\%$,均符合指纹图谱的技术要求,表明仪器精密密度良好。

(2)稳定性试验:取1号供试品分别按“2.6.1”项下色谱条件在0、4、8、12、24 h进样测定,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别在 $0.12\%\sim 0.60\%$ 、 $0.13\%\sim 2.02\%$,均符合指纹图谱的技术要求,表明稳定性良好。

(3)重复性试验:取补骨脂、肉豆蔻药材,按“2.2”项下方法平行制备1号供试品6份,分别按“2.6.1”项下色谱条件操作,测得各共有峰相对保留

时间和相对峰面积的RSD分别在 $0.41\%\sim 1.78\%$ 、 $0.83\%\sim 2.45\%$,均符合指纹图谱的技术要求,表明此方法重复性良好。

2.5.3 测定法 取“2.2”项下处理的1~9号供试品液,按“2.5.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。

2.6 干浸膏得率的测定

取正交试验提取液,摇匀,分别精密量取1~9号浓缩液 20 mL ,置于对应干燥至恒定质量的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥3 h,至干燥器中冷却 30 min ,迅速精密称定质量,计算提取液的总浸膏量。

2.7 正交试验法

正交试验设计根据相关文献报道^[5-6]和预试验。以乙醇体积分数(A)、乙醇用量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,以HPLC指纹图谱特征峰总面积和补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚质量浓度以及干浸膏得率为指标,在平行操作条件下,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优选醇提最佳工艺条件。各因素水平见表1。试验安排及结果见表2。HPLC指纹图谱见图3,确定了14个特征峰。将指纹图谱中的特征峰面积之和进行统计,结果见表3。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A / %	B / 倍	C / h	D / 次
1	50	6	1.0	1
2	60	8	1.5	2
3	70	10	2.0	3

指标数据进行加权评分方法,综合评分=补骨脂素质量分数评分+异补骨脂素质量分数评分+去氢二异丁香酚质量分数评分+干膏得率评分+总峰面积。

补骨脂素质量分数评分=补骨脂素质量分数/最大补骨脂素质量分数 $\times 100 \times 0.05$

异补骨脂素质量分数评分=异补骨脂素质量分数/最大异补骨脂素质量分数 $\times 100 \times 0.05$

去氢二异丁香酚质量分数评分=去氢二异丁香酚质量分数/最大去氢二异丁香酚质量分数 $\times 100 \times 0.05$

干膏得率评分=干膏得率/最大干膏得率 $\times 100 \times 0.25$

总峰面积评分=总峰面积/最大总峰面积 $\times 100 \times 0.6$

2.8 正交试验结果的分析

以多指标实验公式法统计分析 P 值为考察指标, 由表 2 中极差 R 值大小显示, 各因素作用主次为 $A > D > B > C$; 由表 4 中方差分析结果表明: 因素 A 具有显著性差异, 由表 4 可知 B 、 C 、 D 3 因素差异无统计学意义, 为降低乙醇消耗和指标成分尽量提取充分, 综合评判最佳提取工艺以 $A_1B_1C_3D_3$ 组合为佳, 即最佳工艺条件为乙醇体积分数 50%, 乙醇 6 倍用量, 每次提取 2 h, 提取 3 次。

表 2 正交试验各指标测定值及加权综合评分与极差分析结果

Table 2 Estimated values weighted composite score, and range analysis of each index in orthogonal test

试验号	A	B	C	D	质量浓度 / (mg·mL ⁻¹)			干膏得率 / %	总峰面积	综合评分
					补骨脂素	异补骨脂素	去氢二异丁香酚			
1	1	1	1	1	0.204 5	0.150 7	0.118 7	9.94	99 080.93	68.24
2	1	2	2	2	0.198 3	0.147 6	0.136 1	11.86	99 496.75	71.07
3	1	3	3	3	0.253 4	0.191 9	0.227 4	19.46	99 896.95	100.00
4	2	1	2	3	0.196 4	0.157 2	0.159 9	13.53	105 862.35	76.82
5	2	2	3	1	0.149 3	0.120 8	0.098 9	10.27	73 336.18	54.66
6	2	3	1	2	0.193 5	0.145 7	0.144 0	10.01	106 627.50	71.88
7	3	1	3	2	0.135 5	0.095 3	0.047 7	6.52	72 216.09	47.30
8	3	2	1	3	0.123 5	0.093 3	0.088 3	10.72	51 297.23	43.83
9	3	3	2	1	0.039 6	0.030 5	0.029 8	12.58	23 287.07	28.95
K_1	79.770	64.120	61.317	50.617						
K_2	67.787	56.520	58.947	63.417						
K_3	40.027	66.943	67.320	73.550						
R	39.743	10.423	8.373	22.933						

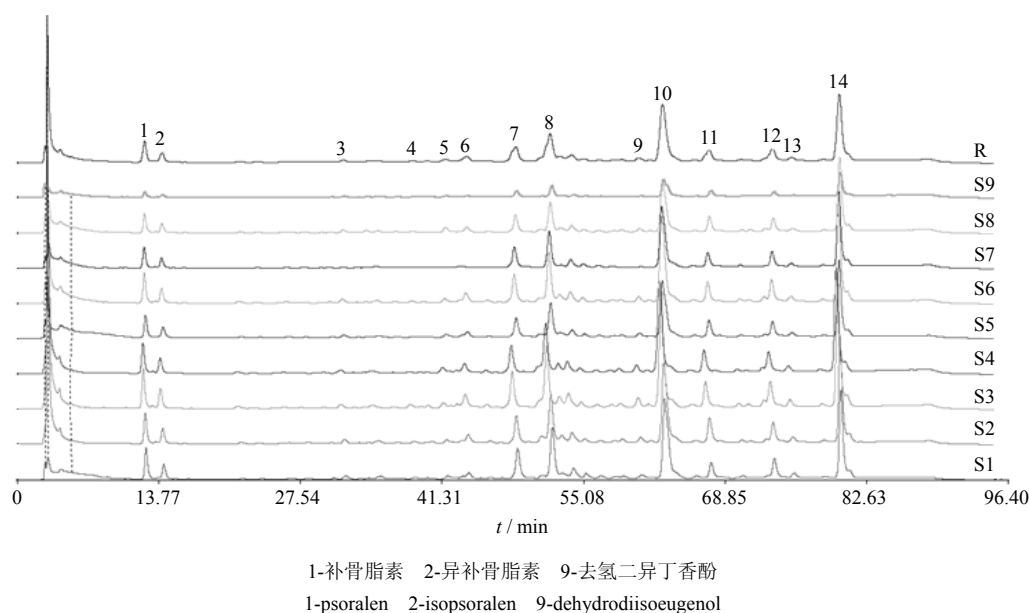


图 3 醇提制备工艺补骨脂-肉豆蔻药对 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair using ethanol extract preparation

表3 补骨脂-肉豆蔻药对不同提取物指纹图谱特征峰面积统计

Table 3 Area of characteristic peaks in fingerprint of different extracts in *Psoraleae Fructus-Myristicae Semen* drug pair

共有峰	样品峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	5 933.27	5 649.67	7 297.65	5 888.06	4 181.81	5 361.44	3 918.60	3 365.74	1 118.92
2	3 750.81	3 077.95	4 022.55	3 122.22	2 680.65	2 894.64	2 045.03	1 808.51	585.26
3	980.04	1 108.99	1 210.43	1 100.43	740.74	1 062.11	179.48	744.60	322.20
4	972.41	984.64	1 311.73	1 045.52	738.77	865.42	628.36	637.26	226.60
5	1 004.68	849.36	1 136.22	1 403.37	924.87	1 189.59	1 515.08	1 387.60	389.54
6	1 646.44	2 231.08	3 437.83	2 371.54	1 429.98	2 563.46	235.87	1 403.65	338.78
7	8 283.95	7 033.78	9 417.84	7 144.25	5 201.29	7 463.46	5 599.73	4 693.76	1 822.33
8	13 839.47	12 107.78	18 407.49	14 582.43	8 658.15	13 105.38	9 468.01	7 442.97	2 872.45
9	2 785.20	2 205.92	3 765.88	2 952.39	1 507.67	2 732.20	2 372.98	1 423.70	486.89
10	28 596.13	27 618.93	3 627.00	28 215.79	20 350.34	30 060.03	21 662.87	18 684.44	6 636.36
11	4 038.19	6 440.79	6 282.36	5 510.94	4 145.34	5 165.14	3 603.78	3 907.29	1 598.71
12	5 164.16	5 192.27	6 632.43	5 210.20	3 725.48	5 523.35	3 785.01	297.60	1 175.28
13	1 324.03	1 393.74	1 801.54	1 476.09	1 041.44	1 403.60	806.27	767.48	244.17
14	20 761.91	23 601.85	31 546.00	25 839.12	18 009.65	27 237.68	17 895.05	1 732.64	5 469.59
总峰面积	99 080.93	99 496.75	99 896.95	105 862.35	73 336.18	106 627.50	72 216.09	51 297.23	23 287.07

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	2 493.750	2	22.336	$P < 0.05$
B	174.377	2	1.560	
C	111.770	2	1.000	
D	792.462	2	7.096	
误差	3 572.360	8		

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

2.9 验证试验

为了验证上述结果的准确性, 保证提取工艺的合理可行, 按已确定的最佳提取工艺条件进行3次重复实验, 结果提取液中补骨脂素质量浓度分别为0.238 0、0.239 5、0.242 5 mg/mL; 异补骨脂素质量浓度分别为0.184 0、0.190 2、0.182 6 mg/mL; 去氢二异丁香酚质量浓度分别为0.213 4、0.210 9、0.226 0 mg/mL; 干膏得率分别为17.53%、17.40%、17.66%, 总峰面积分别为130 085.80、129 855.70、129 625.60, 该工艺的综合评分为95.6%。实验证明, 优化的提取工艺方法稳定可靠, 合理可行, 具重复性和可操作性。

3 讨论

在多指标综合评定优化提取工艺过程中, 根据

各指标在工艺提取选择中的地位, 给予不同的加权系数。处理数据采用加权综合评分法, 由于补骨脂素、异补骨脂素、去氢二异丁香酚在总面积峰中均有体现, 故采用较小的加权比重。

吸取上述药对样品溶液5 μ L进样, 利用DAD检测器进行全波段扫描检测分析, 结果表明, 该样品分别在225、234、265、274 nm检测处都有比较显著的特征色谱峰, 其中又以234 nm为检测波长时所得色谱图指纹信息最多, 各色谱峰分离度较好, 色谱峰的形状也好。因此, 本实验选取234 nm作为检测波长。

本实验以总峰面积为指标既能体现中药复方多成分、多靶点的特点, 又能降低单一或多个成分作为指标引起的实验误差。采用正交试验结合HPLC指纹图谱法优选补骨脂-肉豆蔻药对醇提工艺, 从多方面、多指标对醇提工艺进行整体评价, 较单独正交试验优选工艺更具科学性, 但特征峰所对应成分的药效作用尚未建立相关性联系, 在未来工作中, 有待于结合先进的药效组分提取与检测手段及药理学想法追踪该药对的药物活性成分, 进一步确定该药对的活性成分^[8-9]。

药对是联系中药和方剂的桥梁, 中药药对的现代研究包括: 药对功效的研究、药对成分的研究、

药对剂量配比的研究、药对在全方中的作用研究。本实验则为药对成分研究初步奠定基础。

参考文献

- [1] 王 缙, 付庆会. 宋明期间二神丸和五味子散两方的发展演变 [J]. 四川中医, 2010, 28(9): 115-116.
- [2] 李俊娟, 李 军. HPLC 法测定补骨脂药材中补骨脂素和异补骨脂素 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1545-1548.
- [3] 袁子民, 陈剑锋, 贾天柱. RP-HPLC 测定麸煨肉豆蔻中去氢二异丁香酚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 60-61.
- [4] 容 蓉, 陈明强, 吕青涛, 等. 正交实验结合高效液相色谱指纹图谱优选芍药汤醇提工艺 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(8): 580-584.
- [5] 李婷婷, 冯 云, 曾文婷, 等. HPLC 测定两种不同浓度乙醇提取补骨脂素的含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(1): 190-191.
- [6] 王显凤, 吴品江, 魏 萍, 等. 田口 (Taguchi) 实验设计法优选中药材补骨脂的提取工艺 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(2): 80-82.
- [7] 刘起华, 文 谨, 孙玉雯. 正交试验法优选补肾益髓颗粒提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 8-11.
- [8] 陈 芳, 汪 毅. 中药药对配伍的现代研究认识 [J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(5): 1-3.
- [9] 王可人. 知母百合药对的化学成分分析及药动学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2011.