

均匀设计法优化藏药多血康提取工艺[△]

吕秀梅*,王 静,赵可惠,张 静#,赖先荣,范 刚,张 艺,更藏加(成都中医药大学民族医药学院,成都 611137)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1361-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.17

摘要 目的:优化多血康的提取工艺。方法:以红景天苷、没食子酸含量及出膏率的综合评分为指标,采用 $U_6(6^3)$ 均匀设计法优化多血康提取工艺中的料液比、乙醇体积分数及提取时间,再优化提取次数,并进行验证试验。结果:最优提取工艺为采用50%乙醇,料液比1:14,浸泡1.5 h,回流提取1 h并重复2次;3次试验平均出膏率为50.18%,红景天苷和没食子酸含量分别为1.82、16.54 mg/g(RSD \leq 0.84%, $n=3$)。结论:优化的多血康提取工艺合理、简单、可行。

关键词 藏药;多血康;均匀设计法;红景天苷;没食子酸;含量;提取;工艺优化

Optimization of Extraction Technology for Tibetan Medicine Duoxuekang by Uniform Design

LYU Xiumei, WANG Jing, ZHAO Kehui, ZHANG Jing, LAI Xianrong, FAN Gang, ZHANG Yi, GENG Zangjia (College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Duoxuekang. METHODS: Using comprehensive score of salidroside, gallic acid content and extraction yield as indexes, $U_6(6^3)$ uniform design was designed to optimize the liquid-solid ratio, ethanol volume fraction and extraction time of Duoxuekang, then optimize extraction times, and verification test was conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 50% ethanol, liquid-solid ratio of 1:14, soaking time of 1.5 h, reflux extraction for 1 h and repeated twice; the average extraction yield in 3 tests was 50.18%, contents of salidroside and gallic acid were 1.82 mg/g, 16.54 mg/g (RSD \leq 0.84%, $n=3$). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology for Duoxuekang is reasonable, simple and feasible.

KEYWORDS Tibetan medicine; Duoxuekang; Uniform design; Salidroside; Gallic acid; Content; Extraction; Technology optimization

高原红细胞增多症,藏医称“多血症”,系由高原低氧引起的红细胞增多、血液黏稠的一种常见高原疾病,并可导致较严重的全身反应或全身系统性疾病,甚至死亡^[1]。我国青藏高原人群中多血症患病率约为2.5%^[2],已成为严重威胁高原人群健康的常见慢性疾病之一。此病多见于高原移居人群,少见高原世居人群,具有发病慢、早期病症不明显、病情进展缓慢的特点^[3]。多血康是著名藏医大师措如·才郎以藏医理论为指导,经多年临床实践研制的治疗多血症疗效确切的经验方,其具有活血散瘀、降低血压等功效^[4]。该方由红景天、余甘子、沙棘、干姜等4味药材组成,具有提高机体缺氧耐力、缓解疲劳等功效^[5]。本课题组在前期研究中,分析了多血康治疗多血症的分子机制,明确了其入血成分主要来源于红景天、余甘子、沙棘,并建立了同时测定其中红景天苷等6个成分的高效液相色谱(HPLC)法^[4,5-7]。

△基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81203000);公益性行业科研专项(No.201507002);成都中医药大学科技发展基金(No.CGPY1503)

*硕士研究生。研究方向:中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail:lvxiu1@163.com

#通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药及民族药药效物质基础及质量控制。E-mail:zhangjingtcm@cduetcm.edu.cn

本试验采用均匀设计法,以红景天苷、没食子酸含量及出膏率为指标,以料液比、乙醇体积分数、提取时间为因素,优化提取工艺,为其生产研发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪(美国安捷伦公司);BSA124S型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);SB5200D超声清洗仪(宁波新艺超声设备有限公司);TDZ5-WS台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

红景天药材于2016年1月21日购自四川省阿坝州藏医院,余甘子、干姜药材于2016年3月18日购自成都市荷花池药材市场,沙棘药材于2015年11月13日采自陕西省延安市志丹县旦八乡。原药材均由成都中医药大学张艺研究员鉴定,分别为大花红景天[*Rhodiola crenulata*(Hook. f. et Thoms)H. Ohba]的干燥根和根茎、余甘子(*Phyllanthus emblica* L.)的干燥成熟果实、中国沙棘(*H. rhamnoides* L. subsp. *sinensis* Rousi.)的干燥成熟果实、干姜(*Zingiber officinale* Rosc.)的干燥根茎;红景天苷对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号:Must-15082610,纯度:98.96%);没食子酸对照品(中国食品药

品检定研究院,批号:110831-201204,纯度:89.9%);甲醇、磷酸为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 吸水率考察

为考察药材吸水性对提取条件的影响,先进行吸水率试验。按处方比例精密称取该混合药材 45 g,加入 4 倍量 60% 乙醇溶液,每隔 30 min 观察 1 次浸泡透心情况直至 1.5 h。待药材全部浸透后滤出未被药材吸收的溶液,计算吸水率(药材吸水体积/药材加入量)^[8],结果吸水率约为 1.8 倍。

2.2 出膏率的测定

参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 2201 方法^[9]测定。精密量取多血康提取液 25 mL,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴挥干后,于 105 ℃ 干燥 3 h,置于干燥器中冷却 30 min,迅速称定质量。以干燥品计算供试品中浸出物的含量(%),并计算出膏率(浸膏质量/药材质量×100%)。

2.3 红景天苷、没食子酸的含量测定

2.3.1 色谱条件确立 色谱柱:WondaSil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 I:甲醇-水(15:85),检测波长:275 nm^[10];流动相 II:甲醇-0.2% 磷酸溶液(5:95),检测波长:273 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 ℃。取“2.3.2”和“2.3.3”项下溶液进样测定,色谱图见图 1。

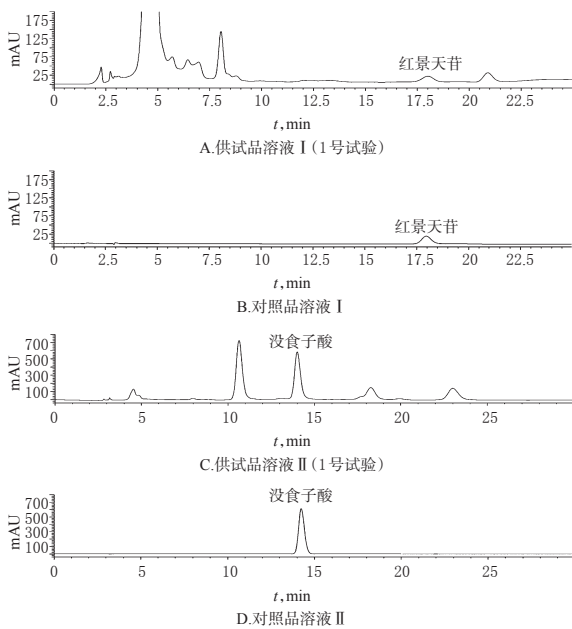


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 对照品溶液的制备 参照 2015 年版《中国药典》(一部)红景天和余甘子项下方法制备红景天苷、没食子酸对照品溶液^[10]。(1)对照品溶液 I:取红景天苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液,即得。(2)对照品溶液 II:取没食子酸对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.734 mg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 按照处方比例称取多血康各组成药材 45 g,经提取后将提取液滤过,回收溶剂,浓缩、定容,制得多血康贮备液。参照 2015 年版《中国药典》(一部)红景天和余甘子含量测定项下方法^[10]制备供试品溶液。(1)供试品溶液 I:精密量取贮备液 20 mL,置于锥形瓶中,水浴挥干后,精密加入甲醇 10 mL,密塞,称定质量,超声(功率:250 W,频率:400 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。(2)供试品溶液 II:精密量取贮备液 5 mL,置于锥形瓶中,水浴挥干后,精密加入 50% 甲醇 10 mL,密塞,称定质量,超声(功率:250 W,频率:400 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 标准曲线的绘制及方法学考察 精密吸取红景天苷、没食子酸对照品溶液各 5、8、10、12、15、20 μL 进样,按流动相 I、流动相 II 分别进行洗脱,记录各峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行回归处理,建立红景天苷、没食子酸的标准曲线,结果分别为 $y=311.112x+9.444$ ($r=0.9992$)、 $y=2 \times 10^6 x + 300.78$ ($r=0.9999$),线性范围分别为 0.508~2.032、3.67~14.68 μg。按相关方法学考察要求进行考察,结果均符合要求。

2.4 均匀设计法优化多血康的提取工艺

2.4.1 因素与水平的设计 根据文献[11-13]和前期试验结果,本研究以料液比(X_1)、乙醇体积分数(X_2)、提取时间(X_3)为考察因素进行均匀设计。采用均匀设计表 $U_6(6^3)$ ^[14],以出膏率(Y_1)、红景天苷含量(Y_2)、没食子酸含量(Y_3)为指标,并分别赋予权重系数为 0.1、0.7、0.2,计算综合评分值(Y), $Y_i=(X_{1i}/X_{1max} \times 0.1 + X_{2i}/X_{2max} \times 0.7 + X_{3i}/X_{3max} \times 0.2) \times 100$ ^[15],对多血康提取工艺进行优化。因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平					
	1	2	3	4	5	6
X_1 , 倍	6	8	10	12	14	16
X_2 , %	30	40	50	60	70	80
X_3 , h	0.5	1	1.5	2	2.5	3

2.4.2 均匀设计试验结果 每个试验号均按处方比例称取该混合药材 45 g,根据均匀设计安排各因素和水平进行试验,测定 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 ,计算 Y ,详见表 2。

表 2 试验安排与结果

Tab 2 Test arrangement and result

试验号	X_1 , 倍	X_2 , %	X_3 , h	Y_1 , %	Y_2 , mg/g	Y_3 , mg/g	Y
1	6	40	1.5	35.96	1.06	9.82	69.82
2	8	60	3	41.14	1.25	12.29	82.86
3	10	80	1	38.60	1.27	11.89	82.69
4	12	30	2.5	41.41	1.43	13.38	92.56
5	14	50	0.5	41.34	1.54	13.96	98.06
6	16	70	2	43.46	1.49	15.05	97.82

2.4.3 结果处理 采用DPS 7.05软件对试验结果进行逐步回归分析,得到优化方程,见表3。

表3 回归分析结果

Tab 3 Results of regression analysis

来源	回归方程	R	F	P	S
Y_1	$Y_1=30.7197+0.6535X_1+1.3770X_3$	0.9577	16.6245	0.0238	0.9794
Y_2	$Y_2=0.8403+0.0454X_1$	0.9441	32.9501	0.0046	0.0662
Y_3	$Y_3=6.5221+0.4899X_1+0.4690X_3$	0.9840	45.5297	0.0056	0.4212
Y	$Y=56.5850+2.7924X_1$	0.9534	39.8452	0.0032	3.7012

根据各回归方程的回归系数R、F及P结果,结合试验原理和经验可知, Y_1 、 Y_2 及 Y_3 均只与因素 X_1 有显著相关性($P<0.05$),因素 X_2 和 X_3 对3个指标均无显著性影响($P>0.05$),与综合评分的回归分析结果一致。结合“2.4.2”项下试验结果,第5号试验结果中 Y_2 和Y均为6次试验中最高者。因此,在第5号提取工艺的基础上适当增加提取时间(X_3),选取14倍50%乙醇回流提取1h作为优化工艺。该工艺下预测红景天苷含量为1.48 mg/g、没食子酸含量为13.85 mg/g、出膏率为41.25%。

2.4.4 优化工艺的验证试验 按照处方比例称取多血康45g,共3份,以14倍50%乙醇回流提取1h,测定并计算各指标。结果3次试验检测指标均高于预测值,提示该工艺稳定、可行,详见表4。

表4 验证试验结果(n=3)

Tab 4 Results of the verification test(n=3)

试验次数	X_1 ,倍	X_2 ,%	X_3 ,h	Y_1 ,%	Y_2 ,mg/g	Y_3 ,mg/g
1	14	50	1	42.90	1.61	13.51
2	14	50	1	41.20	1.59	13.00
3	14	50	1	42.51	1.58	13.25
RSD,%				2.11	0.96	1.92

2.5 提取次数考察

按处方比例称取药材45g,按上述最优工艺提取3次,每次单独取样测定,重复3次。计算红景天苷转移率[(提取物的量×提取物中红景天苷含量)/(处方中红景天的投料量×红景天药材中红景天苷含量)×100%]^[10]。结果第3次提取时红景天苷转移率占总转移率的1.90%、1.84%、2.00%,低于5%。因此,对多血康进行2次回流提取即可,详见表5。

表5 提取次数考察结果

Tab 5 Results of extraction times test

回流提取次数	Y_1 ,%	Y_2 ,mg/g	Y_3 ,mg/g	红景天苷转移率,%
第1次	42.90	1.62	13.51	72.84
第1次	41.20	1.59	13.00	71.62
第1次	42.51	1.58	13.25	71.22
第2次	10.20	0.24	3.57	10.91
第2次	9.66	0.23	3.33	10.38
第2次	10.03	0.24	3.38	10.67
第3次	3.39	0.04	2.00	1.62
第3次	3.33	0.03	1.97	1.54
第3次	3.35	0.04	1.98	1.67

2.6 放大验证试验

根据上述试验结果,按处方比例称取药材180g,以

上述优化工艺回流提取2次,进行3次平行验证试验。结果3次试验 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 平均值分别为50.18%、1.82 mg/g、16.54 mg/g(RSD≤0.84%,n=3),红景天苷转移率数据接近,表明该提取工艺稳定、可行,详见表6。

表6 放大验证试验结果(n=3)

Tab 6 Results of the amplification verification test(n=3)

试验次数	X_1 ,倍	X_2 ,%	X_3 ,h	Y_1 ,%	Y_2 ,mg/g	Y_3 ,mg/g	红景天苷转移率,%
1	14	50	1	50.16	1.84	16.46	82.87
2	14	50	1	50.57	1.81	16.68	81.46
3	14	50	1	49.80	1.82	16.48	82.19
RSD,%				0.77	0.84	0.74	0.86

3 讨论

多血康作为藏医治疗多血症的临床常用方,为发挥其治疗效果,研究其提取工艺具有重要意义。由于复方制剂成分复杂,一般需多种有效成分共同作用才能达到疗效的有效发挥,以单一成分作为提取工艺优化的指标,不免存在片面性。多血康以余甘子为君药,红景天为臣药,因此,本研究选取红景天、余甘子在《中国药典》中的规定成分即红景天苷与没食子酸的含量共同作为提取工艺考察指标。红景天苷作为指标性有效成分,其含量是首要参考指标,故其权重设置最高。

均匀设计法是一种用少量试验处理多因素多水平的试验设计方法,可减少试验意外并便于统计数据处理,具有操作方便且可行性强的特点,因而常运用于制剂的提取工艺、成型工艺等的研究^[16]。本研究在前期预试验中,比较了多血康水提取和70%乙醇提取对红景天苷的影响,结果显示70%乙醇提取的红景天苷转移率为67.11%,高于水提取的红景天苷转移率63.74%。因此,后期则只选择了乙醇体积分数作为考察因素之一。由于提取次数不仅影响提取时间,而且影响料液比。提取1次的提取时间、料液比与提取2次的提取时间、料液比对试验结果的影响是不一样的,所以本研究将提取次数进行单独考察。

参考文献

- [1] 吴天一.我国青藏高原慢性高原病研究的最新进展[J].中国实用内科杂志,2012,32(5):321-323.
- [2] 达瓦次仁,央金,巴桑卓玛,等.慢性高原红细胞增多症藏医临床症状特征分析[J].中国民族医药杂志,2013,11(11):12-14.
- [3] 曹祯吾.高原红细胞增多症[M].北京:军事医学科学出版社,1996:8.
- [4] 伍文彬,赖先荣,索朗其美,等.多血康对高原红细胞增多症的影响研究[J].中药药理与临床,2009,25(5):93-95.
- [5] 索朗其美,张艺,松桂花,等.一种预防或/和治疗红细胞增多症的药物或保健食品组合物:中国,102526656 A[P].2012-07-04.
- [6] 伍文彬,赖先荣,索朗其美,等.藏药多血康对家兔血瘀症模型全血黏度及红细胞流变性的影响[J].西藏科技,

维药神香草提取物体外抗炎作用的谱效关系研究^Δ

毛艳^{1*}, 贺金华^{1#}, 蔡晓翠¹, 铁 侃², 王新堂¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.中国医学科学院北京协和医学院药物研究所/天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1364-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.18

摘要 目的:为阐明维药神香草抗炎作用的药效物质基础提供参考。方法:采用高效液相色谱法建立神香草8个不同极性提取物的指纹图谱;以巨噬细胞RAW264.7为研究对象,考察神香草不同极性提取物对细胞培养上清液中炎症因子一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)的抑制作用,比较其体外抗炎活性的差异性;采用灰色关联分析法分析指纹图谱共有峰的峰面积与抗炎活性的谱-效关系。结果:神香草8个不同极性提取物的指纹图谱具有明显的差异。体外抗炎结果提示,神香草30%乙醇提取物对体外炎症因子的抑制作用最强。对其建立的HPLC指纹图谱有共有峰14个,与体外炎症因子的抑制作用关系密切的5个共有峰分别为8、6、5、10、13号,其中8号峰为迷迭香酸。结论:所建立的指纹图谱及其与体外抗炎活性的谱效关系可为该药材的药效物质基础研究提供一定参考。

关键词 神香草;不同极性提取物;抗炎活性;指纹图谱;谱效关系;炎症因子

Study on the Spectrum-effect Relationship of Anti-inflammation Effect *in vitro* of Extracts from Uygur Medicine *Hyssopus cuspidatus*

MAO Yan¹, HE Jinhua¹, CAI Xiaocui¹, TIE Cai², WANG Xintang¹(1.Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College / State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for clarifying the pharmacodynamic material basis of anti-inflammation effect of Uygur medicine *Hyssopus cuspidatus*. METHODS: HPLC was conducted to establish the fingerprint of 8 extracts with different polarities. Using macrophage RAW264.7 as object, the inhibitory effect of extracts with different polarities on inflammatory factor nitric oxide (NO), TNF- α and IL-6 in supernatant of cell culture medium was detected, the differences of anti-inflammatory activity *in vitro* were compared. Grey correlation analysis method was used to analyze the spectrum-effect relationship of peak area of common peaks and anti-inflammation activity. RESULTS: The fingerprint of 8 extracts with different polarities showed obvious differences. Anti-inflammation *in vitro* results suggested that 30% ethanol extract had the strongest inhibitory effect on inflammatory cytokines *in vitro*. There were 14 common peaks in the established HPLC fingerprints, the 5 common peaks that was closely related to the in-

2009(2):39-40.

- [7] 黄宇,王毓杰,杨文娟,等. HPLC法测定多血康胶囊中6个成分[J]. 中成药, 2015, 37(11):2418-2422.
- [8] 刘新国. DF喷雾剂的药剂学研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2007:1-101.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:202.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年

- 版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:154-155, 179.
- [11] 袁海龙,谭锐,李仙逸,等. 均匀设计法优选五味子的提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5):355-357.
- [12] 段晓颖,高卫芳,吴彩丽,等. 均匀设计法优选胡黄连中胡黄连苷的提取工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(39):3675-3676.
- [13] 易延途,蔡光先,申传璞. 复方红景天颗粒提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):54-56.
- [14] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京:科学出版社, 1994:98-98.
- [15] 王洛临,吴小斌,周蓉,等. 复方苳麻胶囊的提取工艺研究[J]. 中国药房, 2016, 27(22):3128-3131.
- [16] 徐维佳,周海虹,陈少东. 均匀设计在中药复方研究中的应用分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):236-239.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560644);新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No. KY2014062);新疆维吾尔自治区中医民族医药科技人才培养项目(No.2016-03-03)

* 副研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:maoyan7529@163.com

通信作者:研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-11-03)

(编辑:刘 萍)