

半夏白术天麻汤半仿生-酶法提取工艺的药材组合

徐 男

(山东省中医药研究院, 济南 250014)

〔摘要〕 目的:确定截留相对分子质量 ≤ 1 kDa 提取物为最终产物,优选半夏白术天麻汤方药的半仿生-酶法提取组合方式。方法:将方中 6 味中药排列组合成 15 组,以天麻素、甘草次酸、总黄酮、提取物得率及提取液 HPLC 总面积为评价指标,通过综合评分法优选半夏白术天麻汤方药的半仿生-酶法提取工艺组合。结果:6 味中药的最佳组合方式为半夏、天麻、白术合提,茯苓、橘红、甘草合提。天麻素 $1.552\ 8\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,甘草次酸 $189.864\ 2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,总黄酮 $6.767\ 4\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,HPLC 总面积 $7\ 566.3$,提取物 $0.238\ 1\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论:优选的药材组合方式合理可行,为复方提取工艺的优选提供参考。

〔关键词〕 半夏白术天麻汤; 半仿生-酶法; 天麻素; 甘草次酸; 总黄酮

〔中图分类号〕 R283.6;R284.1;R284.2;R289.3 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)13-0016-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130016

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150512.1118.006.html>

〔网络出版时间〕 2015-05-12 11:18

Herbs Combination of Extraction Process for Banxia Baizhu Tianma Tang by Semi-bionic Enzyme Method

XU Nan (Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To ascertain extract with relative molecular weight cutoff ≤ 1 kDa as the final product, then optimize extracting combination of herbs in Banxia Baizhu Tianma Tang with semi-bionic enzyme method. **Method:** Herbs combination was divided into 15 groups, taking yields of gastrodine, glycyrrhetic acid, total flavonoids, extract and total area of extract HPLC as indexes, extracting combination of herbs in Banxia Baizhu Tianma Tang with semi-bionic enzyme method was optimized by comprehensive scoring. **Result:** The best combination of six herbs was as following: mixing extraction of Pinelliae Rhizoma, Gastrodia Rhizoma and Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, mixing extraction of Poria, Citri Exocarpium Rubrum and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. Yields of gastrodine, glycyrrhetic acid, total flavonoids, extract and total area of extract HPLC were $1.552\ 8\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $189.864\ 2\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $6.767\ 4\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.238\ 1\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $7\ 566.3$. **Conclusion:** This optimized herbs combination is rational and feasible for providing a reference for extraction process of Banxia Baizhu Tianma Tang.

〔Key words〕 Banxia Baizhu Tianma Tang; semi-bionic enzyme method; gastrodine; glycyrrhetic acid; total flavonoids

中药复方提取是一个复杂的理化反应过程,方药各成分间存在相互作用,在煎提过程中会产生增溶、沉淀、催化分解、化合反应等理化现象,影响成分的提取率及药效的发挥。实际工作经验证实中药所含结构比较明确、具有药理作用的活性成分相对分子质量一般 ≤ 1 kDa。结合现代膜分离技术^[1-8],以 ≤ 1 kDa提取物作为最终产物不仅提取物得率大

大降低,可缩小服用量,而且为选用现代药物新剂型提供了可能。以 ≤ 1 kDa提取物为指标能体现中药整体、综合、客观、模糊的特点,这是中药药效物质提取研究设计的一种新思路,对中药现代化研究有借鉴意义。半仿生-酶法是先选择适宜纤维素酶对中药进行预处理,以破坏植物药材细胞壁。该法克服了半仿生法在常压下提取温度高、难以分离提纯等

〔收稿日期〕 20140114(001)

〔基金项目〕 国家科技部国际合作项目(2007DFA31180)

〔第一作者〕 徐男,博士,助理研究员,从事中药新药开发与药效物质研究,Tel:0531-82949813,E-mail:93679706@qq.com

缺点,酶的加入有利于活性物质的浸出和生物转化,有利于人体对活性物质的吸收利用^[9-10]。

为研究方药组合方式对成分提取的影响,本实验将半夏白术天麻汤中 6 味中药按君、臣、佐、使分为 4 组,包括 A(半夏、天麻),B(白术),C(茯苓、橘红),D(甘草)。排列组合成 15 种组合方式,在确定了半仿生-酶法提取工艺条件的基础上,选择一定规格中空纤维膜截留相对分子质量≤1 kDa 提取液为最终产物,以天麻素、甘草次酸、总黄酮、相对分子质量≤1 kDa 提取物及 HPLC 总面积为指标综合评判,优选半夏白术天麻汤的提取组合方式。5 个指标数据作标准化处理,以消除各指标单位和纲量不同及各指标变量范围相差悬殊所造成的影响,同时根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同加权系数。

1 材料

FA1100 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),AE 240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),PHS2-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),LXJ-II 型离心沉淀机(上海医疗器械三厂),M-3010 型紫外-可见分光光度计(日本日立公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),MSC300 型血清超滤器(上海德宏生物医学科技发展有限公司)。半夏、天麻、白术等药材均购自山东百味堂中药饮片有限公司,经山东中医药大学张兆旺教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。天麻素、柚皮苷、甘草次酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110807-200205,110722-200309,723-9002),甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制高纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材组合方式 半夏白术天麻汤含有的 6 味中药排列组合为 15 组,分别为 1(ABCD),2(A + B + C + D),3(AB + C + D),4(AC + B + D),5(AD + B + C),6(BC + A + D),7(BD + A + C),8(CD + A + B),9(AB + CD),10(AC + BD),11(AD + BC),12(ABC + D),13(ABD + C),14(ACD + B),15(BCD + A)号。其中 AB + C + D 为前期优选的半仿生-酶法提取工艺,AB 表示半夏、天麻及白术合并提取,提取液过滤,离心(3 500 r·min⁻¹,25 min,下同),用一定规格的中空纤维膜滤过,浓缩;C 和 D 分别单独提取,提取液过滤,离心,用一定规格的中空纤维膜滤过,浓缩,合并上述 3 种浓缩液,加水定容至 1 L。其余类推。

2.2 样品溶液的制备 按处方比例称取 10~20 目

的 A,B,C,D 粉末,按 2.1 项下方式组合,将方药饮片用 1.0% 酶 I 和 1.0% 酶 II(以饮片质量计)预处理 24 h,分别加 10,8,8 倍量水提取 3 次,第 1 次加入 0.5% 酶 III,第 3 次加入 1.0% 酶 IV;每次提取时溶剂的 pH 依次为 2.0,6.5,9.0,提取时间依次为 90,60,60 min,提取温度(61±1)℃,提取液过滤,离心,经中空纤维膜滤过,浓缩,加水定容至 1 L,即得。

2.3 供试液的制备

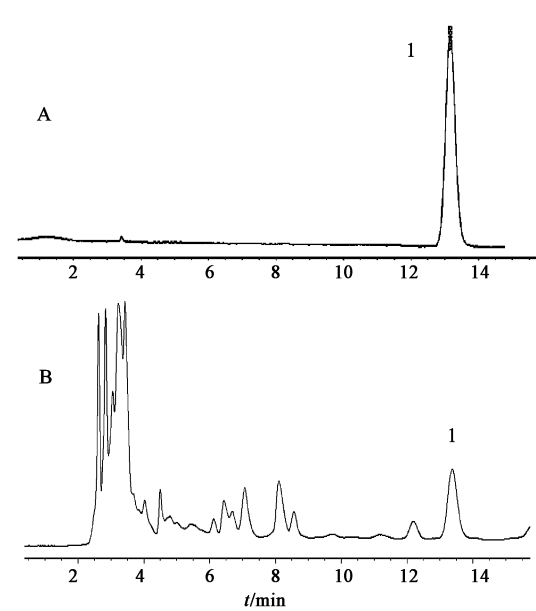
2.3.1 供试液 B 精密吸取 2.2 项下样品液 10 mL,蒸干,残渣用乙腈-水(3:97)混合液溶解并定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.2 供试液 C 精密吸取 2.2 项下样品液 25 mL,加三氯甲烷 30 mL 和盐酸 2.5 mL,水浴回流 1.5 h,用三氯甲烷萃取 2 次,每次 20 mL,回收三氯甲烷,加甲醇定容至 10 mL,经 0.45 μm 滤膜滤过,即得。

2.3.3 供试液 D 精密吸取 2.2 项下样品液 100 mL,浓缩并定容至 50 mL,即得。

2.4 天麻素的含量测定

2.4.1 色谱条件 DiamonsilTM(钻石)C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸(3:97),检测波长 220 nm,参比波长 360 nm,柱温 25℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 天麻素
图 1 半夏白术天麻汤中天麻素 HPLC
Fig.1 HPLC of gastrodin in Banxia Baizhu Tianma Tang

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取经 80℃干燥恒重 1 h 的天麻素对照品 4.35 mg,置 25 mL 量瓶

中,加乙腈-水(3:97)混合液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得,置于4℃冰箱中保存。

2.4.3 线性关系考察 取0.087 g·L⁻¹天麻素对照品溶液,按**2.4.1**项下条件分别进样5,10,20,40,80 μL,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归

方程 $Y = 1\,681.2X + 84.154$ ($r = 0.999\,9$),线性范围0.435 ~ 6.96 μg。

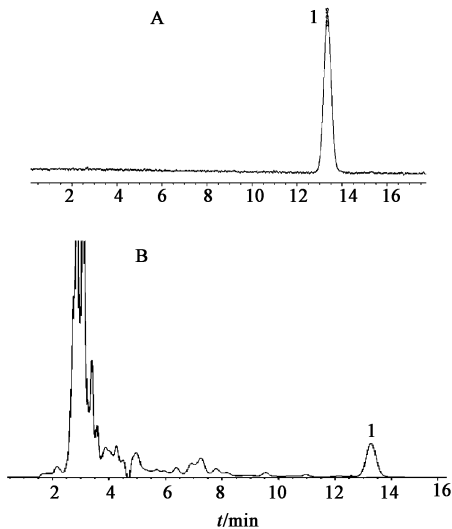
2.4.4 样品测定 取**2.3.1**项下供试品溶液B,分别按**2.4.1**项下条件测定,采用外标一点法计算天麻素含量,结果见表1。

表 1 半夏白术天麻汤仿生-酶法提取工艺的评价指标测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Evaluation measurement of semi-bionic enzyme extraction process of Banxia Baizhu Tianma Tang ($\bar{x} \pm s, n = 3$)						
No.	天麻素/mg·g ⁻¹	甘草次酸/μg·g ⁻¹	总黄酮/mg·g ⁻¹	HPLC 总面积	≤1 kDa 提取物/g·g ⁻¹	综合评分/分
1	1.365 7 ± 0.026 1	110.297 5 ± 1.174 4	9.665 3 ± 0.123 2	8 141.9 ± 142.441 9	0.272 4 ± 0.004 4	9.388 9
2	1.038 4 ± 0.018 8	57.531 1 ± 1.141 3	6.816 8 ± 0.074 0	6 302.3 ± 112.471 4	0.213 4 ± 0.004 0	-1.939 9
3	0.840 4 ± 0.014 9	65.267 6 ± 0.850 6	9.552 9 ± 0.141 8	9 257.1 ± 115.543 9	0.206 3 ± 0.004 0	2.837 0
4	0.418 8 ± 0.003 9	62.809 3 ± 1.211 2	6.215 8 ± 0.110 2	6 980.5 ± 138.053 3	0.206 2 ± 0.001 8	-5.965 6
5	0.757 1 ± 0.009 9	46.809 7 ± 0.505 7	8.008 6 ± 0.038 1	12 190.9 ± 200.880 4	0.220 3 ± 0.003 7	1.996 0
6	0.226 8 ± 0.003 9	77.063 7 ± 1.427 2	7.974 6 ± 0.122 6	4 600.1 ± 44.365 7	0.202 2 ± 0.002 8	-5.476 4
7	0.163 2 ± 0.003 1	42.858 6 ± 0.634 6	6.661 9 ± 0.102 6	7 351.5 ± 83.409 2	0.219 1 ± 0.003 4	-6.687 2
8	0.030 8 ± 0.000 6	96.606 8 ± 1.821 4	5.481 9 ± 0.080 4	4 933.2 ± 68.169 0	0.188 4 ± 0.002 8	-9.827 2
9	1.552 8 ± 0.027 5	189.864 2 ± 2.853 8	6.767 4 ± 0.113 6	7 566.3 ± 127.047 6	0.238 1 ± 0.004 4	10.803 9
10	0.524 3 ± 0.006 9	69.840 6 ± 1.390 2	6.879 8 ± 0.126 8	8 482.3 ± 168.702 3	0.202 7 ± 0.002 1	-3.282 9
11	0.701 8 ± 0.008 5	94.502 4 ± 1.457 4	7.911 6 ± 0.156 1	4 181.5 ± 73.474 3	0.193 0 ± 0.001 7	-2.914 1
12	0.973 0 ± 0.001 4	130.573 5 ± 1.942 3	7.210 1 ± 0.119 0	4 757.4 ± 58.300 5	0.250 0 ± 0.001 8	3.942 2
13	0.690 9 ± 0.003 1	115.453 1 ± 1.149 3	8.327 0 ± 0.156 7	5 515.5 ± 78.588 1	0.236 9 ± 0.001 6	2.757 8
14	0.067 2 ± 0.001 1	82.297 1 ± 1.494 9	7.228 8 ± 0.093 0	6 018.9 ± 31.035 7	0.271 6 ± 0.001 3	-1.357 6
15	0.340 0 ± 0.005 9	179.610 8 ± 1.305 4	8.662 5 ± 0.143 5	3 421.0 ± 62.436 9	0.267 6 ± 0.002 2	5.725 2

2.5 甘草次酸的含量测定

2.5.1 色谱条件 DiamonsilTM (钻石) C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(87:13),检测波长 250 nm,参比波长 360 nm,柱温 25℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。见图 2。



A. 对照品;B. 供试品;1. 甘草次酸

图 2 半夏白术天麻汤中甘草次酸 HPLC

Fig.2 HPLC of glycyrrhetic acid in Banxia Baizhu Tianma Tang

2.5.2 对照品溶液的制备 精密称取甘草次酸对照品 2.90 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并

稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5.3 线性关系考察 取**2.5.2**项下对照品溶液,分别进样5,10,20,40,60,100 μL,按**2.5.1**项下条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 2\,478.2X - 39.38$ ($r = 0.999\,8$),线性范围0.145 ~ 2.90 μg。

2.5.4 样品测定 取**2.3.2**项下供试品溶液C,分别按**2.5.1**项下条件测定,通过外标一点法计算甘草次酸含量,结果见表1。

2.6 总黄酮的含量测定

2.6.1 对照品溶液的制备 精密称取 105℃干燥至恒重的柚皮苷对照品 9.25 mg,置 50 mL 棕色量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.6.2 标准曲线绘制 精密吸取**2.6.1**项下柚皮苷对照液0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,分别置于干燥具塞试管中,各加入甲醇1 mL和10%氢氧化钾溶液0.5 mL,室温放置5 min,用甲醇稀释并定容至10 mL,以甲醇作空白对照,在412 nm处测定吸光度A。以质量浓度(C)为横坐标,A为纵坐标,得回归方程 $A = 0.053\,2C + 0.009\,2$ ($r = 0.999\,8$),线性范围3.70 ~ 18.50 mg·L⁻¹。

2.6.3 样品测定 取**2.3.3**项下供试品溶液D,按**2.6.2**项下方法测定总黄酮含量,结果见表1。

2.7 HPLC 积分总面积的测定 色谱条件为 Diamonsil™ (钻石) C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 45 min, 5% ~ 45% A; 45 ~ 60 min, 45% ~ 100% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 324 nm, 参比波长 400 nm, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL。精密吸取 2.3.1 项下供试液 B, 按上述色谱条件测定, 结果见表 1 和图 3。

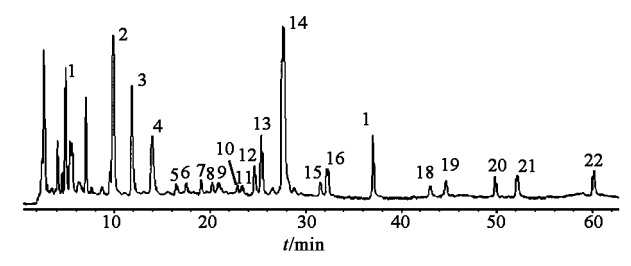


图 3 半夏白术天麻汤 HPLC
Fig.3 HPLC of Banxia Baizhu Tianma Tang

2.8 相对分子质量 ≤ 1 kDa 提取物的测定 取 2.3.3 项下供试液 D 各 25 mL, 置蒸发皿中, 水浴蒸至近干, 于 105 ℃ 烘至恒重, 计算相对分子质量 ≤ 1 kDa 提取物的得率, 结果见表 1。

2.9 综合评判优选方药组合方式 将表 1 中天麻素、甘草次酸、总黄酮、提取物得率及 HPLC 积分总面积的数据按公式 $X'_{i,j} = (X_{i,j} - \bar{X}_j) / S_j$ 进行标准化处理 (式中 $X_{i,j}$ 为样品液 i 中成分 j 的含量, $\bar{X}_j$ 为 15 个样品液 i 中成分 j 的平均值, S_j 为成分 j 的标准偏差, $X'_{i,j}$ 为标准化后的数值)。将标准化后的 $X'_{i,j}$ 根据各指标在工艺选择中的主次, 给予不同加权系数, 计算综合评分 (Y)。 $Y = (\text{天麻素} + \text{甘草次酸}) / 2 \times 5 + (\text{总黄酮} + \text{HPLC 总峰面积}) / 2 \times 3 + \text{提取物得率} \times 2$, 见表 1。结果第 9 号供试液的综合评分最高, 即药材以 AB + CD 组合为较佳, 即半夏、天麻、白术合提, 茯苓、橘红、甘草合提, 再将 2 种提取液合并。

3 讨论

HPLC 梯度洗脱时, 保持检测波长和流动相一致的色谱条件, 15 种药材组合方式提取液的色谱峰数及峰位基本一致, 但积分值不同, 表明 15 种药材组合方式提取出的成分基本一致, 但含量各有差异。本文采用综合评分法优选该方药材组合方式, 符合中医用药特点。

不同比例的中药组分进行配伍, 必然会形成复方中组分间及组分中各成分的内在微观结构关系, 组分构成关系发生改变必导致药效的差异。目前大多数研究都缺乏对中药复方组分间或组分内部微观

的更深层次探索, 仅局限于对组方的简单优化。要解决这些问题, 将来要严抓中药物质基础研究, 不能让中药物质基础研究还拘于浅层次的组方优化, 要由浅入深、由外至内地研究中药的内在性质及组分构成性质, 形成新的中药物质基础理论体系。将探索建立谱效关系的研究模式, 采用适合的分析方法构建中药指纹图谱, 并对指纹图谱中成分进行分析; 建立适合的药效评价模型, 获取药理学数据; 采用数据处理技术将指纹图谱数据和药理学数据进行关联分析, 结合中医药专业知识, 建立有意义的谱-效关系, 以揭示中药的药效物质^[11-12]。

[参考文献]

[1] Song W H, Ravindran V, Koel B E, et al. Nanofiltration of natural organic matter with H₂O₂/UV pretreatment: fouling mitigation and membrane surface characterization [J]. J Membrane Sci, 2004, 241 (1) : 143-160.

[2] Abdessemed D, Nezzal G. Treatment of primary effluent by coagulation-adsorption-ultrafiltration for reuse [J]. Desalination, 2002, 152 (1) : 367-373.

[3] 康建雄, 白云山. 水处理絮凝剂的开发与应用 [J]. 华中科技大学学报: 城市科学版, 2004, 21 (2) : 23-26.

[4] Ma H M, Davis R H, Bowman C N, et al. Factors affecting membrane fouling reduction by surface modification and backpulsing [J]. J Membrane Sci, 2001, 189 (2) : 255-270.

[5] 于涛, 钱和. 膜分离技术在提取银杏叶黄酮类化合物中的应用 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23 (6) : 55-58.

[6] 王群, 刘文, 宋信莉, 等. 黄连提取液超滤纯化工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (4) : 34-37.

[7] 赵晓娟, 闫勇, 蔡跃明. 中草药领域中膜分离的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10 (5) : 64-65.

[8] 许桂艳, 乔建军, 张于. 膜分离技术应用于双黄连注射液工艺的探讨 [J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29 (3) : 128.

[9] 元英进. 中药现代化生产关键技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 132.

[10] 田秀兰. 纤维素酶在杭白菊总黄酮提取中的应用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26 (5) : 542.

[11] 刘丹, 贾晓斌, 郁丹红. 基于组分构成理论的中药质量控制新思路 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (6) : 865-870.

[12] 秦昆明, 郑礼娟, 沈保家, 等. 谱效关系在中药研究中的应用及相关思考 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (1) : 26-31.

[责任编辑 刘德文]