

[9] 魏 莉,周 浩.大孔吸附树脂分离纯化三七花蕾总皂苷的研究[J].中药材,2008,31(9):1418-1421.

[10] 周 萍,廖庆文,刘绍贵,等.大孔树脂富集构骨叶中总皂甙的研究[J].湖南中医杂志,2002,18(1):51-52.

指纹图谱法优选诃子提取工艺的研究

刘雅敏¹, 郭丹丹¹, 杨 晋², 张正伟³, 刘延泽¹

(1. 河南中医学院,河南 郑州 450008; 2. 北方民族大学化工学院,宁夏 银川 750021; 3. 洛阳市中心医院,河南 洛阳 471000)

摘要:目的 优选诃子有效部位的提取工艺参数。方法 运用正交 $L_8(2^7)$ 实验,以各提取实验条件的 HPLC 指纹图谱色谱峰面积的变化量和相似度为指标,考察提取工艺条件。结果 优化的诃子提取工艺参数为药材粒度 60 目、70%乙醇、8 倍溶剂量、浸渍提取 3 次,每次 30 min。结论 指纹图谱技术可以作为工艺筛选过程中的有效评价手段。

关键词: 诃子; 提取工艺; 指纹图谱

中图分类号: R944.2+7

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2011)07-1168-04

诃子为使君子科榄仁属植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 及其变种绒毛诃子 *Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt. 的干燥成熟果实,具有涩肠止泻、敛肺止咳、降火利咽、调和药性、解毒等功效^[1]。现代研究显示,诃子具有抗氧化、抗菌、抗病毒、强心、抗诱变、抗癌、抗阿米巴原虫、抗动脉粥样硬化以及强心作用等药理作用^[2-3],这些作用主要集中在可水解丹宁类成分^[4]。目前在诃子提取工艺研究中,多采用总丹宁含量作为工艺优选指标。但这类成分化学稳定性差,总丹宁量变化不能全面反映出工艺因素对药材中丹宁类成分的提取率以及稳定性的影响,因而无法得出真正的最佳提取工艺条件,也使制剂质量难以进行标准化控制。目前指纹图谱被认为是能够较全面地反映药材提取物质量变化的质控技术。故本实验以选定指纹图谱色谱峰面积的变化量和相似度为指标,以诃子中的主要有效成分和特征性成分诃子酸(chebulinic acid)^[5]为参照物,采用多指标综合评分法优选提取工艺参数,为保证诃子提取物的质量,制备出诃子标准提取物奠定了基础。

1 实验材料

1.1 仪器 LC-2010A 高效液相色谱仪(日本岛津); DiamonsilTM C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm); 工作站: CBM-102(日本岛津); 检测器: SPD-20A(日本岛津); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(版本 2004A)(中国药典委员会推荐)。

1.2 试剂 诃子酸对照品由刘延泽教授提供,经光谱鉴定、HPLC 检测纯度在 95% 以上; 甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。柱层析用吸附剂 Toyopearl HW-40(C) 为日本 Tosoh 公司产品。

1.3 药材 诃子,产地云南,由陈随清教授鉴定为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz.。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm); 流动相采用线性梯度洗脱,A 相为甲醇,B 相为 0.5% 的冰醋酸水溶液,体积流量 1.0 mL/min,SPD-20A 检测器,柱温 30 ℃,波长 254 nm,分析时间 60 min。线性梯度洗脱程序见表 1。

表 1 线性梯度洗脱程序

梯度时间/min	A 甲醇/%	B 0.5% 冰醋酸水溶液/%
0	5	95
10	20	80
40	40	60
45	50	50
50	5	95
60	5	95

2.2 提取因素水平的确定 用浸渍法进行提取。实验因素水平见表 2。

2.3 正交实验方案设计 采用正交实验表 $L_8(2^7)$ 设计实验方案。

2.4 提取液的制备^[6] 称取诃子粗粉 8 份,每份 10 g,精密称定,分别按照 2.3 项条件提取,过滤,合

收稿日期: 2010-08-31

基金项目: 河南省科技攻关项目(524410076)

作者简介: 刘雅敏(1960—),教授,研究方向: 中药固体制剂技术。Tel: (0371) 65575822, E-mail: lyml2001@yahoo.com.cn

表 2 因素水平

水平	因素				
	A	B	C	D	E
	粒度/目	乙醇浓度/%	溶剂量/倍	时间/min	次数/次
1	20	30	8	15	2
2	60	70	6	30	3

并提取液,定容至 500 mL,备用。精密量取各正交实验条件下提取液 10 mL,挥干溶剂,以 70% 丙酮定容于 100 mL 量瓶中,于 60 ℃ 减压浓缩至 5 mL,上 ToyopearlHW-40(C) 柱(1 cm,柱长 20 cm,吸附剂高 10 cm) 进行柱层析,依次用蒸馏水 50 mL、5 % 甲醇

表 3 指标峰峰面积值

样品	指标峰保留时间/min													
	9.981	11.579	14.724	18.188	23.333	31.571	31.854	32.875	38.166	39.055	39.837	45.133	49.316	
1	614 899.8	2 929 622	1 930 671	6 061 756	1 468 183	2 034 334	2 039 997	4 642 832	588 913.3	621 577.9	10 116 964	1 760 874	11 097 865	
2	541 977.2	2 950 049	2 506 508	6 854 078	1 145 821	1 837 228	1 321 622	1 243 397	335 387.3	197 864.3	10 106 961	1 398 307	3 245 510	
3	510 476.2	2 668 655	1 667 136	5 806 982	1 140 294	2 194 493	2 194 493	6 233 283	576 063.9	598 990.8	12 389 678	1 614 125	10 921 546	
4	149 914.1	3 547 812	2 660 596	8 276 240	1 582 570	2 799 407	2 799 407	2 375 113	842 187.5	862 976.6	17 414 978	2 128 565	15 052 039	
5	318 375	1 557 141	1 274 800	3 671 285	687 436.2	4 581 137	4 534 973	11 751 478	357 807.5	381 985.9	7 213 249	1 101 310	7 213 942	
6	956 021.1	3 934 864	5 151 207	12 441 312	2 188 364	171 722.4	2 444 350	780 497	277 100.5	764 843.5	21 110 331	1 219 730	9 347 925	
7	1 019 651	3 831 978	2 658 170	8 881 977	1 567 218	281 722.4	1 481 744	1 430 797	687 969	724 158.2	17 552 926	1 963 739	15 783 700	
8	709 449.7	3 190 482	2 844 094	7 530 567	1 550 487	3 854 592	3 266 358	10 078 044	735 642.5	778 079.9	14 882 369	1 972 877	14 319 005	
9	978 623.5	4 851 400	2 764 802	9 621 929	2 189 680	2 626 908	2 063 972	3 254 667	831 733.6	906 277.9	14 960 420	2 309 279	18 094 711	

注:9 号样品为以 70% 丙酮为提取溶剂的峰面积值。

2.5 对照品溶液的制备与测定 精密称取诃子酸对照品 1.19 mg,置 1 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,制成对照品溶液。精密吸取对照品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,测定,作为对照。

2.6 诃子提取工艺与 HPLC 图谱的相关性 通过指纹图谱分析软件,把诃子各提取工艺条件下的色谱图重叠比较;然后求得各提取工艺与 70% 丙酮提取结果的相似度 K。结果见表 4、表 7、表 8。

2.7 结果分析 选定正交表各个实验指纹图谱当中 13 个共有色谱峰的峰面积作为提取工艺的评价指标,采用多指标综合评分法进行数据标准化综合处理^[8]。以 X_{ij} 表示正交实验的第 i 次实验的色谱图中第 j 个色谱峰峰面积值,以各指标的最大值 $(X_j)_{\max}$ (即各色谱图中同一相对保留时间的各色谱峰中峰面积值最大者) 作为参照,对同一指标各数据进行标准化处理, D_{ij} 表示第 j 个指标下的第 i 个测定值的标准化数据。

$$D_{ij} = 100 \times X_{ij} / (X_j)_{\max} \quad (1)$$

再按各指标的重要程度和各组数据的相对标准差确定加权系数。以 SD_j 表示第 j 个指标下 D_{ij} 的标准差,以 RSD_j 表示第 j 个指标的相对标准差,然后再根据各指标相对标准差赋权 RSD/RSD_j ,其中 RSD 为指定指标(参照物诃子酸)的相对标准差;根据各

50 mL 洗脱除去杂质,然后用甲醇-丙酮-水(6 : 2 : 2) 300 mL 洗脱(至洗脱液三氯化铁-铁氰化钾薄层显色反应为阴性),所得洗脱液于 60 ℃ 减压浓缩至干,用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液进样 10 μ L 进行 HPLC 分析,选定的色谱峰面积结果见表 3。

另称取诃子粗粉 10 g,用 70 % 丙酮提取 3 次,每次 150 mL,过滤,合并提取液,定容至 500 mL。余操作同上,取续滤液进样 10 μ L 进行 HPLC 分析,以选定色谱峰面积作为单宁类成分近似完全浸出的基准。

指标的重要程度赋权为 E_j ,由于要全面考虑到诃子中的各个组分,故认为指纹图谱中的各个色谱峰(群)所代表的各组分(群)都很重要,均设为 1 即 $E_j = 1$ 。结合各指标的重要程度和各组数据的相对标准差确定的权重系数为:

$$F_j = E_j \times RSD / RSD_j \quad (2)$$

因此,多指标实验公式为:

$$P_i = \sum (F_j \times D_{ij}) / \sum F_j \quad (3)$$

设 P_9 为 1,则其余各实验丹宁提取率为

$$M_i = P_i / P_9 \times 100\% \quad (4)$$

[8] 式计算所得为兼顾各指标综合效应结果,得分越大越好。对所得数据进行直观分析和方差分析。结果见表 4 ~ 8。

以提取率为指标时,诃子的粒度、乙醇浓度、提取时间、乙醇浓度与提取次数的相互作用对诃子指纹图谱所指定的 13 个色谱峰峰面积变化有显著影响。各因素对测定结果的影响次序为 $B > D > A > E > C$ 。由于 B、E 的交互作用显著,根据表 4 得 $B_2 E_2$ 为最优搭配。以相似度为指标时,溶剂量对各实验条件下所提成分与丙酮提取物的相似性有显著影响。综合上述分析结果,确定优化的提取工艺条件为 $A_2 B_2 C_1 D_2 E_2$,即诃子粉碎粒度 60 目、乙醇浓度 70%、8 倍溶剂量、搅拌提取 3 次、每次 30 min。

表 4 正交实验方案与结果

试验号	列号							提取率/%	相似度
	1	2	3	4	5	6	7	M	K
	因素								
	A	B	C	D	E	B × E			
1	1	1	1	1	1	1	1	69	0.859
2	1	1	1	2	2	2	2	58	0.931
3	1	2	2	1	1	2	2	66	0.793
4	1	2	2	2	2	1	1	84	0.775
5	2	1	2	1	2	1	2	54	0.709
6	2	1	2	2	1	2	1	83	0.892
7	2	2	1	1	2	2	1	87	0.924
8	2	2	1	2	1	1	2	89	0.888
提 Ij	69.250	66.000	75.750	69.000	76.750	74.000	80.750		
取 IIj	78.250	81.500	71.750	78.000	70.750	73.500	66.750		
率 IIIj	9.000	15.500	4.000	9.500	6.000	0.500	14.000		
相 Ii	0.840	0.848	0.900	0.821	0.858	0.808	0.862		
似 IIi	0.853	0.845	0.792	0.871	0.835	0.885	0.830		
度 IIIi	0.013	0.003	0.108	0.050	0.023	0.077	0.032		

表 5 提取率交互作用

因素 E	因素 B	
	1	2
1	76.975	78.155
2	58.600	85.445

表 6 提取率方差分析

方差来源	偏均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	162.000	1	12.728	324.000	*
B	480.500	1	21.920	961.000	*
C	32.000	1	5.657	64.000	
D	180.500	1	13.435	361.000	*
E	72.000	1	8.485	144.000	*
B × E	392.000	1	19.799	784.000	*
误差 SSe	0.50	1			

注: $F_{0.05}(1,1) = 161.4, F_{0.01}(1,1) = 4\ 052.18$

表 7 相似度交互作用

因素 E	因素 B	
	1	2
1	0.875	0.841
2	0.820	0.850

表 8 相似度方差分析

方差来源	偏均差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.000	1	0.000	0.000	
B	0.000	1	0.000	0.000	
C	0.023	1	0.152	6.9	*
D	0.005	1	0.071	1.5	
E	0.001	1	0.032	0.3	
B × E	0.002	1	0.045	0.6	
误差 SSe	0.50	6			

注: $F_{0.05}(1,6) = 5.990$

2.8 验证实验 按照优选出的最佳工艺条件,用
1170

同一批药材重复提取 3 次,实验结果按照 2.7 项下
方法进行数据处理,结果见表 9。

表 9 验证试验

实验号	M	K
	提取率	相似度
1	99.54	0.992
2	99.96	0.984
3	98.88	0.959
平均	99.46	0.978
RSD/%	0.55	1.76

表明此提取工艺合理可行、稳定。

3 讨论

3.1 诃子中的有效成分丹宁为多羟基化合物,该类成分在光照和高温条件下不稳定,极易发生结构降解。成分稳定性差的特点限制了它的制剂开发。在对诃子中的丹宁成分进行提取时,应控制好提取的温度和时间,力求快速、完全,以达到不破坏丹宁类成分之目的。所以我们选用多重冷浸并搅拌提取的方法,通过正交实验考察粒度、乙醇浓度、溶剂量、搅拌时间、提取次数等因素,最终确定最优提取条件为:将诃子粉碎成 60 目粗粉,8 倍量 70% 乙醇提取 3 次,每次 30 min。

3.2 对于丹宁类成分,目前公认 70% 丙酮是提取率高、使结构保持较好稳定性的提取溶剂,故本实验将其提取物的指纹图谱总峰面积作为比较丹宁类成分提取率的基准,以及提取条件对丹宁成分结构变化(相似度)的比较基准。但是由于丙酮的毒性和价格原因,不宜作为诃子总丹宁工业化提取的溶剂^[5,7-8],因此本实验采用乙醇为提取溶剂,结果表

明提取效果与丙酮相接近。

3.3 对于成分复杂的中药制剂,在其制剂工艺研究中,仅仅考察单一指标性成分或总成分的提取率,往往不能够全面反映制剂工艺因素对总体有效成分的含量与稳定性的影响,因而也就不能真正找到合理的制剂工艺条件,无法做到制剂质量的稳定可控。指纹图谱技术是目前认为比较能反映中药制剂综合成分状态的质量控制方法,其用于中药制剂工艺还处于探索阶段。本研究用诃子提取工艺的 HPLC 指纹图谱特征色谱峰的面积变化量,以及与 70% 丙酮提取物的色谱峰相似度作为评价指标,基本能够体现工艺条件对诃子中有效成分的提取效果的全面影响,准确说明该工艺的优劣,最大限度地保留诃子中的有效成分,从而更加全面的体现诃子自身的药理活性,保证成品的质量。

参考文献:

[1] 赵国平,戴 慎,陈仁涛. 中药大辞典: 上 [M]. 2 版. 上海: 上海

科技出版社, 2006. 1641.

[2] 刘玉梅,宋宝安. 诃子化学成分与生物活性的研究进展 [J]. 贵州大学学报, 2007, 2(2): 208-212.

[3] 张庆容,田 红. 诃子的药理活性研究进展 [J]. 国外医药,植物药分册, 2004, 19(6): 237-240.

[4] 石 碧,狄 莹. 丹宁的药理活性 [J]. 中草药, 1998, 29(7): 487-490.

[5] 丁 岗,刘延泽. 不同来源诃子中 3 种可水解丹宁的定量分析 [J]. 中药材, 2000, 23(6): 329-331.

[6] 韩可勤,杨静化,刘晓东. 药理学应用概率统计 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2000: 1301.

[7] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 378-379.

[8] 黄朝生,彭 轩. 某市 54 家企业有机溶剂职业危害情况调查 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(5): 1093-1094.

星点设计-响应面法优化急性子多糖提取工艺

佟苗苗, 翟延君*, 王添敏, 李 娜
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 目的 利用响应面分析法对急性子多糖的提取工艺进行优化。方法 以提取温度、提取时间、料液比为自变量, 多糖得率为因变量, 通过对自变量各水平的多元线性回归及二项式拟合, 用星点设计-响应面法选取最佳工艺, 并进行预测分析。结果 最优工艺条件为: 料液比为 1: 25.8, 提取温度为 92.0 ℃, 浸提时间为 120.5 min, 浸提 2 次; 提取实际值与预测值偏差为 -2.9%。结论 方法简便合理, 稳定, 可预测性较优。

关键词: 急性子; 多糖; 星点设计; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011) 07-1171-04

急性子为凤仙花科植物凤仙花 *Impatiens balsamina* L. 的干燥成熟种子, 始载于《救荒本草》, 为我国传统药物之一; 性温、味微苦, 归肝、脾经; 具有破血软坚、消积的功效, 用于癥瘕痞块、经闭、噎膈^[1]。急性子除含脂肪油、挥发油外, 还含多糖、蛋白质、皂苷、黄酮类等化合物, 本实验采用响应面分析法对急性子多糖的提取工艺进行了研究, 该实验方法应用于中药材提取工艺研究报道较少, 国内常

用均匀设计和正交设计进行优化, 但这两种方法实验精度不够, 建立的数学模型预测性较差^[2], 其回归结果多为线性模型, 而星点设计实验所得的信息量大、直观、更适合于探索性试验研究^[3]。本研究可为急性子多糖类化学成分研究提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 紫外可见分光光度计(UV24802 型), 电子天平(上海天平仪器厂)。葡萄糖、浓硫

收稿日期: 2010-10-18

作者简介: 佟苗苗(1985—), 女, 硕士, 主要从事中药鉴定与质量评价研究。Tel: 13624267965, E-mail: tilaimisu2599@126.com

* 通信作者: 翟延君, 教授。Tel: (0411) 87586003, E-mail: lnzyzyj@sohu.com