

不同精制方法对四逆散中 4 种有效成分含量的影响

刘 海, 杨星昊, 訾 鹏, 刘 飞, 匡惠芬

(南京师范大学新药研究中心, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用醇沉、陶瓷膜超滤、大孔树脂吸附 3 种方法精制四逆散水提液, 以 4 种有效成分保留率等为指标, 对各方法精制效果进行对比。超滤法对柴胡皂苷 a (87.29%) 保留效果较好, 醇沉法保留芍药苷 (85.04%) 和柚皮苷 (93.52%) 优势明显, 大孔树脂吸附法则能很好地保留柴胡皂苷 a (88.14%) 和柚皮苷 (85.57%), 同时此法可以显著降低固形物得率, 各有效成分在精制物中含量较高。在四逆散精制方法研究过程中应该全面考虑各类有效成分含量的变化。

[关键词] 四逆散, 醇沉法, 陶瓷膜超滤法, 大孔树脂吸附法, 柴胡皂苷 a, 芍药苷, 柚皮苷, 甘草酸

[中图分类号] R 283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)03-0075-04

Influence of Different Refining Methods on the Content of Four Active Components in Si-Ni-San

Liu Hai, Yang Xinghao, Zi Peng, Liu Fei, Kuang Huifen

(Pharmaceutical R&D Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The decoction of Si-ni-san was refined respectively by alcohol sedimentation, ultrafiltration and macroporous resin absorption. The refining effects were compared according to content of the active components and yield of the dry extract. The recovery of saikosaponin a (87.29%) by ultrafiltration was quite remarkable; the recovery of paeoniflavin (85.04%) and naringin (93.52%) by alcohol sedimentation were the highest. Macroporous resin recovered most of saikosaponin a (88.14%) and naringin (85.57%), and it also decreased the yield of dry extract by the largest amount, therefore enriched the active components. To develop a scientific and feasible refining process of Si-ni-San, the content of several kinds of active components, rather than only one kind, should be monitored.

Key words si-ni-san, alcohol sedimentation, ultrafiltration, macroporous resin absorption, saikosaponin a, paeoniflavin, naringin, glycyrrhizic acid

0 引言

四逆散是中医临床广泛应用的古方, 具有透邪解郁、疏肝理脾的功效。该方由柴胡、白芍、枳实、甘草组成, 现代主要用于功能性消化不良、肠易激综合征等症的治疗, 临床效果确切^[1, 2]。四逆散的有效物质基础是国内外研究热点。郭际用大孔吸附树脂对四逆散全方煎煮液进行富集纯化^[3]; 李春成比较了醇沉法、超滤法、澄清剂法、大孔树脂吸附法等多种方法对四逆散水提液进行了精制^[4]。但这些研究仅考察单一有效成分(芍药苷)精制前后含量的变化。而最新药理学研究表明, 柴胡皂苷 a、芍药苷、柚皮苷、甘草酸 4 种物质是四逆散全方抗炎和免疫抑制药效的主要效应成分^[5], 且这 4 种成分在按照复方中比例同时联合给药时表现出显著的药效协同作用^[6]。

收稿日期: 2007-01-22 修回日期: 2007-04-10
基金项目: 江苏省新药创制发展基金 (021220)资助项目。
作者简介: 刘海 (1981—), 硕士研究生, 主要从事中药制剂的学习与研究。Email: liuhaik@yahoo.com
通讯联系人: 杨星昊 (1964—), 副教授, 主要从事药物制剂的教学与研究。Email: yangxin@jnnu.edu.cn

醇沉法、超滤法、大孔树脂吸附法是常用的中药复方精制方法. 在本研究中, 我们考察了这三种方法精制前后四逆散中柴胡皂苷 a、芍药苷、柚皮苷、甘草酸含量的变化规律, 并结合固形物得率, 为该复方精制路线的最终确定提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

柴胡 *Bupleurum chinense* DC, 甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch (安徽亳州永刚饮片厂); 白芍 *Paeonia lactiflora* Pall, 枳实 *Citrus sinensis* Osbeck (南京药业股份有限公司中药饮片厂); 柴胡皂苷 a 对照品 (批号 110777-200303), 芍药苷对照品 (批号 0736-200219), 柚皮苷对照品 (批号 772-8803), 甘草酸单铵盐对照品 (批号 731-9403 每 1 mg 甘草酸单铵盐相当于 0.979 5 mg 甘草酸, 符合《中国药典》要求); 以上供含量测定用对照品均由中国药品生物制品检定所提供; AB-8 大孔吸附树脂 (天津南开大学化工厂); 乙腈, 甲醇 (GR., 上海陆都化学试剂厂).

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 岛津 LC-Solution 工作站, 氧化锆陶瓷膜超滤器 (膜孔径 50 nm, 膜面积 0.1 m²); 南京工业大学膜科学技术研究所, AE200 电子分析天平 (Mettler), KQ-250DB 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司).

1.2 方法

1.2.1 提取方法

按处方量取柴胡、白芍、枳实、甘草各 750 g 加 10 倍水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 分别用 300 目滤布滤过, 合并, 得水提液 40 L, 生药浓度为 0.075 g/mL 取其上清液适量, 使生药浓缩至 0.4 g/mL, 浓缩液密封备用.

1.2.2 精制方法

1.2.2.1 醇沉法

取生药浓缩液 (0.4 g/mL) 25 mL, 不断搅拌的同时缓慢加入计算量的无水乙醇, 至含醇量 70%, 醇沉液 4℃冷藏过夜, 滤纸抽滤, 滤液水浴蒸干, 蒸馏水定容至 25 mL.

1.2.2.2 陶瓷膜超滤法

取上清液 (0.075 g/mL) 25 L, 氧化锆陶瓷膜超滤器以错流方式进行循环超滤. 通过预实验对膜规格及操作参数进行了筛选, 确定以下优化实验条件: 膜孔径 50 nm, 膜面积 0.1 m², 温度 28~38℃, 操作压力 0.15~0.20 MPa, 错流速度 0.2 m/h 收集超滤液备用.

1.2.2.3 大孔树脂吸附法

通过预实验对大孔树脂型号及吸附、解吸参数进行了筛选, 取浓缩液 (0.4 g/mL) 25 mL 通过 AB-8 大孔树脂柱 (树脂床体积约为 50 mL), 流速为每小时 1 倍树脂床体积. 先用 100 mL 蒸馏水 (流速 1.6 mL/min) 洗脱水溶性杂质, 后用 200 mL 70% 乙醇 (流速 0.8 mL/min) 洗脱. 醇洗脱液水浴蒸干, 蒸馏水定容至 25 mL.

1.2.3 固形物得率及有效成分含量测定

1.2.3.1 固形物得率测定

精密吸取样品 10 mL, 分别置于已干燥的至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105℃干燥 3 h 取出, 置干燥器中冷却至室温, 迅速称重, 计算固形物得率.

1.2.3.2 有效成分含量测定色谱条件如下:

(1) 柴胡皂苷 a^[7]: 流动相为乙腈-水 (40:60), 检测波长 210 nm, 流速 1 mL/min (2) 芍药苷^[8]: 流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾-乙酸-异丙醇 (67:173:4:4), 检测波长 230 nm, 流速 1 mL/min (3) 柚皮苷^[9]: 流动相为乙腈-0.5% 乙酸 (20:80), 检测波长 283 nm, 流速 1 mL/min (4) 甘草酸^[10]: 流动相为甲醇-0.2 mol/L 乙酸铵-乙酸 (61:39:1), 检测波长 250 nm, 流速 1 mL/min

以上色谱条件经方法学考察, 在所选定的浓度范围内, 线性关系、精密度、稳定性、重现性均良好.

2 结果

醇沉、超滤及大孔树脂吸附 3 种方法精制四逆散水提液效果比较见表 1, 复方中各有效成分 HPLC 色谱图见图 1~图 4

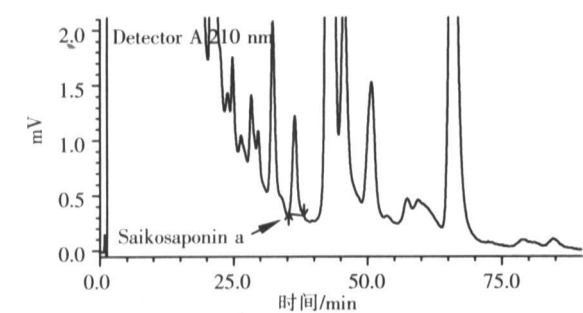


图 1 四逆散柴胡皂苷 a HPLC 色谱图

Fig.1 Chromatogram of saikosaponin a in Sinisan decoction

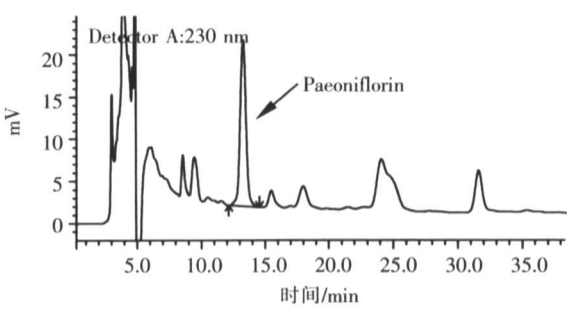


图 2 四逆散芍药苷 HPLC 色谱图

Fig.2 Chromatogram of paeoniflorin in Sinisan decoction

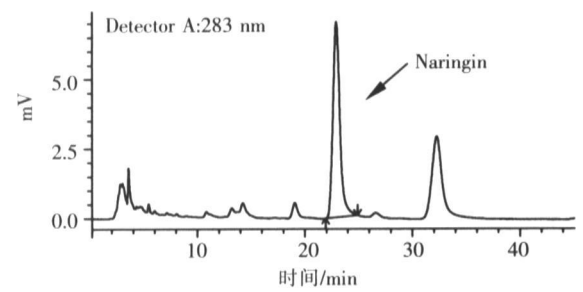


图 3 四逆散柚皮苷 HPLC 色谱图

Fig.3 Chromatogram of naringin in Sinisan decoction

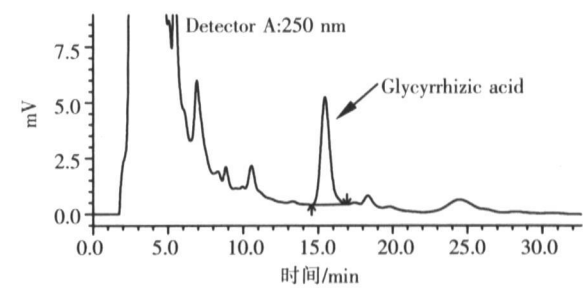


图 4 四逆散甘草酸 HPLC 色谱图

Fig.4 Chromatogram of glycyrrhizic acid in Sinisan decoction

指标成分保留率 = $\frac{\text{精制液有效成分含量}}{\text{水提液有效成分含量}} \times 100\%$

表 1 不同方法对四逆散水提液的精制效果对比 (n = 3)

Table 1 Purifying effect of three different purifications on Sinisan decoction

样品	固形物 得率 %	有效生药成分含量 (mg/100 g)				有效成分保留率 %			
		柴胡皂苷 a	芍药苷	柚皮苷	甘草酸	柴胡皂苷 a	芍药苷	柚皮苷	甘草酸
水提液	26.60	11.8	267.3	1712	269.6				
醇沉液	22.37	7.7	227.3	1601	167.8	65.25	85.04	93.52	62.24
超滤液	23.17	10.3	208.0	1264	157.4	87.29	77.82	73.83	58.38
树脂洗脱液	10.18	10.4	172.6	1465	149.2	88.14	64.57	85.57	55.34

3 讨论

组分中药学理论提出, 中药复方由各种不同组分组成, 既包括有效组分, 如苷类、黄酮类、生物碱类成分等, 又含有大量无效组分或微效组分, 如鞣质、多糖类、蛋白质类成分^[11]. 对于中药的研究其本质即是对这些不同组分的研究, 中药复方有效性的物质基础实际上是这些有效组分的合理组合. 中药精制的宗旨是尽可能的去除无效组分或微效组分、保留各有效组分的种类、数量及相对比例.

最新研究证明, 柴胡皂苷 a 芍药苷、柚皮苷、甘草酸 4 种物质在其复方药效中表现出显著的协同作用^[6], 它们分别代表了三萜皂苷类(柴胡皂苷 a 甘草酸)、醇苷类(芍药苷)、黄酮苷类(柚皮苷)等类型有效成分, 相对分子质量、分子结构、极性各不相同.

本文考察了这 4 种有效成分在不同方法精制前后含量的变化. 从柴胡皂苷 a 保留率看, 超滤法 (87.29%) 和树脂吸附法 (88.14%) 较高, 醇沉法 (65.25%) 偏低; 从芍药苷保留率看, 醇沉法 (85.04%)

最高, 树脂吸附法 (64. 57%) 最低; 从柚皮苷保留率看, 醇沉法 (93. 52%) 和树脂吸附法 (85. 57%) 较为理想, 超滤法 (73. 83%) 稍低; 从甘草酸保留率看, 三种工艺接近, 约 60%. 从固形物收率角度看, 大孔树脂吸附法 (10. 18%) 可以显著降低固形物得率, 所得精制产物中各有效成分含量较高.

本研究结果表明, 每一种精制方法对各类有效成分保留率不一致, 只能很好地保留其中一类或两类有效成分, 对其他类成分造成不同程度的损失. 因此, 在该复方精制方法研究过程中应该全面考虑各类有效成分含量的变化, 如仅考察某一类有效成分的变化, 则往往会忽略另一类组分的流失, 不利于保留复方的整体药效. 此外, 精制后 4 种有效成分的相对比例与水煎液中差别较大, 其与临床疗效的关系还有待今后在药效学研究中揭示.

[参考文献]

[1] 高玉祥. 四逆散治疗功能性消化不良 60 例 [J]. 安徽中医临床杂志, 2002 14(3): 179.
[2] 周向阳, 王世勋, 王荣林. 四逆散为主治疗肠易激综合征 120 例 [J]. 国医论坛, 1999, 14(1): 7.
[3] 郭际. 四逆散有效成分提取和成分分析研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2003.
[4] 李春成. 复方四逆散活性部位分离纯化的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2005.
[5] Zhang L, Dong Y, Sun Y, et al. Role of four major components in Si- Ni- San a traditional Chinese prescription against contact sensitivity in mice [J]. J Pharm Pharmacol 2006, 58(9): 1 257-1 264.
[6] 徐强. 中药成分在方剂中的作用及其研究思路 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 327-331.
[7] 刘岱, 杨立新, 崔淑莲. 高效液相色谱法测定柴贯冲剂中柴胡皂甙 A 的含量 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(2): 92-93.
[8] 国家药典编委会. 中国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000 79.
[9] 李秀玲, 李龙, 肖红斌. 反相高效液相色谱法测定枳实枳壳中橙皮甙和柚皮甙的含量 [J]. 色谱, 2002, 20(6): 585-586.
[10] 国家药典编委会. 中国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005 59-60.
[11] 付建华, 付宇, 刘建勋. “组分中药学”假说的构想 [J]. 中药研究与开发, 2006, 13(1): 52-54.

[责任编辑: 孙德泉]