

·中药制剂与分析·

## 补阳还五汤提取过程中最佳提取时间和 药材粉碎度的研究

唐宇<sup>1</sup>, 胡超<sup>1</sup>, 杨娇<sup>1</sup>, 范诗琪<sup>1</sup>, 贺福元<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室,  
中医药超分子机理与数理特征化实验室,湖南长沙 410208)

**[摘要]** **目的** 研究补阳还五汤提取过程中的最佳提取时间和药材粉碎度。**方法** 显微观察不同粉碎度的补阳还五汤单味药材,观察药材的破壁情况,采用 HPLC 分析补阳还五汤不同粉碎度药材的成分溶出情况。**结果** 显微观察从 80 目到 100 目,药材细胞结构已经不完整,细胞壁开始破壁。提取过程的中段,不同粉碎度之间的有效成分共有峰的个数较多,溶出比较完全。在提取时间约 300 min 时,不同目数指纹图谱的相似度在 0.85 以上。**结论** 20 目药材在 240 min 时、40 目药材在 180 min 时、60 目在 120 min 时、80 目药材在 90 min 时、100 目药材在 30 min 时、饮片在 180 min 时补阳还五汤的溶出达到基本稳定,提取效果最佳。

**[关键词]** 补阳还五汤;提取时间;粉碎度;显微鉴别;HPLC

**[中图分类号]**R284.2 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.09

### The Research of Optimum Extraction Time and Degree of Crushing Herbs of Buyang Huanwu Decoction

TANG Yu<sup>1</sup>, HU Chao<sup>1</sup>, YANG Jiao<sup>1</sup>, FAN Shiqi<sup>1</sup>, HE Fuyuan<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Property and Pharmacodynamic Key Laboratory of Chinese Materia Medica, State Administration of Chinese Medicine, Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the optimum extraction time and particle size of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD). **Methods** The damage of different grinding degrees BYHWD cell wall was determined by microscopy and the active ingredients dissolution situation herbs broken were analyzed by HPLC. **Results** The microstructure of herbs at 80 mesh to 100 mesh was messy and irregular. Herbs cell structure was incomplete because of broking of cell wall. In the middle of the extraction process, the common peaks of active ingredients from different grinding degrees herbs are the most. The similarity of different fingerprints was basically above 0.85 at the extraction time of 300 min. **Conclusion** The dissolution of BYHWD is stable at 20 mesh/240 min, 40 mesh/180min, 60 mesh/120 min, 80 mesh/90 min, 100 mesh/30 min and decoction pieces and the extraction effect is best.

**[Keywords]** Buyang Huanwu Decoction; extraction time; grinding degree; microscopic identification; HPLC

**[收稿日期]**2015-11-30

**[基金项目]**国家自然科学基金资助项目(81073142,81173558)。

**[作者简介]**唐宇,女,讲师,博士,从事中药提取动力学研究。

**[通讯作者]**\* 贺福元,男,教授,博士研究生导师,E-mail:pharmsharking@tom.com。

中药活性成分是中药药理作用的物质基础,如何使组成有效成分尽量溶出,发挥最强的药效,是中药复方提取动力学中需要解决的难题<sup>[1]</sup>。中药粉碎后,药物有效成分在胃肠道的溶解度明显增加,从而加快药物起效时间,提高药物的生物利用度<sup>[2]</sup>,从而达到提高药物溶出的目的,因此细胞破壁为中药提取中速控的首关。本实验以补阳还五汤为研究对象,研究了细胞的破壁情况,考察不同粉碎度的药材粉末有效成分溶出情况,从而确定补阳还五汤提取过程中的最佳提取时间和药材粉碎度<sup>[3]</sup>。

## 1 材料

补阳还五汤处方:黄芪 60 g,当归 9 g,川芎 6 g,赤芍 9 g,桃仁 9 g,红花 9 g,地龙 9 g。药材购于湖南中医药大学杏林药号,由湖南中医药大学药学院刘塔斯教授鉴定为正品。乙腈、甲醇为色谱纯,蒸馏水为二次重蒸馏水,乙醇等其它试剂均为分析纯<sup>[4]</sup>。

高速万能粉碎机 LD-T100(上海鼎帅电器有限公司),三目荧光显微镜(麦克奥迪 5 000 C 冷 CCD),载玻片,盖玻片,酒精灯,镊子,解剖针,不锈钢编织筛,稀甘油,水合氯醛溶液均按中国药典规定配置。Waters 高效液相色谱仪,Breeze 工作站,Waters 2487 Dual Absorbance Detector,UV-265 型紫外分光光度仪(日本岛津),MA110 型电子天平(上海天平仪器厂),ZK-82A 型真空干燥箱(上海实验仪器总厂),超声波提取器(北京医用设备厂),微量注射器(25  $\mu$ L 上海实验仪器总厂),可调电炉(上海实验仪器总厂)<sup>[5]</sup>。

## 2 方法与结果

### 2.1 细粉制备

黄芪、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙饮片分别干燥至水分含量为 6%,粉碎成细粉,分别过 20 目,40 目,60 目,80 目,100 目筛,备用。

### 2.2 单味药材粉末的显微处理

取黄芪、川芎、当归、地龙、红花、赤芍、桃仁细粉适量,置于载玻片上,蒸馏水润湿分散,水合氯醛溶液透化装片置于显微镜下观察。黄芪显微特征包括:木栓细胞、淀粉粒、导管和纤维等。川芎显微特征包括:淀粉粒、草酸钙晶体、木栓细胞、油室碎片、导管

碎片、木纤维、油滴等<sup>[6]</sup>。当归显微特征包括:纺锤形韧皮薄壁细胞、网纹导管、木栓细胞、油室等。地龙粉碎后大部分为干燥泥土。红花显微特征包括:草酸钙方晶、花粉粒、分泌细胞、花粉囊内壁细胞、花粉基部细胞、网纹细胞等。赤芍显微特征包括:草酸钙簇晶、网纹导管、薄壁细胞、纤维等。桃仁显微特征大部分为油滴。

### 2.3 HPLC 测定不同粉碎度的补阳还五汤有效成分溶出情况

2.3.1 饮片药材不同时间样品液的采集 取处方量补阳还五汤饮片 111 g,精密称定,用 900 mL 蒸馏水回流提取,置于圆底烧瓶中,接上三口接头,一口接温度计,另一口接定量取样器,另一口接冷凝管,整个装置可控电炉或恒温水浴锅中,先预热至所测温度,然后加入预热的蒸馏水,马上打开电炉加热至滴下第一滴回流液时开始计时,分别于 5、10、20、30、60、90、120、240、360、720、1 335、1 440 min,定时由取样器取样 2 mL,并补充同样量的蒸馏水,得到 HPLC 样品。

2.3.2 不同粉碎度药材提取试验 用回流法分别提取 20、40、60、80、100 目的一倍处方量补阳还五汤细粉,提取方法同“2.3.1”,提取液备用。

2.3.3 指纹峰的鉴定 采用相对保留时间确认指纹峰。本实验以各标准品为参照物,相对保留时间即各指纹峰保留时间与同一图谱中标准品保留时间的比值,指纹峰相对峰面积为指纹峰峰面积与同一标准品面积的比值<sup>[7]</sup>。

2.3.4 不同粉碎度补阳还五汤化学成分的溶出情况比较 分别测定不同粉碎度补阳还五汤有效成分溶出的情况。根据各图色谱峰的相对保留时间,可观察共有峰的个数。计算色谱峰峰面积。

## 3 结果

### 3.1 不同粉碎度单味中药粉末显微结果(40 倍放大倍数)

根据显微鉴别来观察不同粉碎度(20~100 目)补阳还五汤单味中药的粉碎度情况,20 目药材颗粒较大,未能在显微观察下很好地观察显微结构,故未比较 20 目粉碎度药材的显微照片。在显微镜下,40 目和 60 目药材虽然看到的只是组织碎片,但可以看到完整的细胞形态。但从 80 目开始到 100 目,显微

结构显凌乱和不规则,推测细胞结构已经不完整,细胞壁开始破壁。随着目数加大,粒度越小,细胞壁破壁率增大。其中因地龙成分含有泥土、桃仁成分以油脂为主,故显微结构差别不明显。

### 3.2 补阳还五汤不同粉碎度 HPLC 溶出比较结果

分别取补阳还五汤提取过程的开始(5 min)、中间(360 min)和结束(1 400 min)三个时间点,比较不同粉碎度补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱,对不同粉碎度的粉末进行化学成分溶出比较,结果见图1-3。

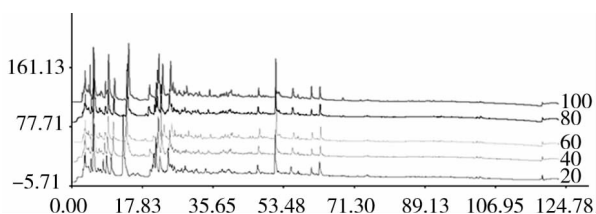


图 1 HPLC 法测定不同粉碎度补阳还五汤 5 min 时有效成分溶出的比较图

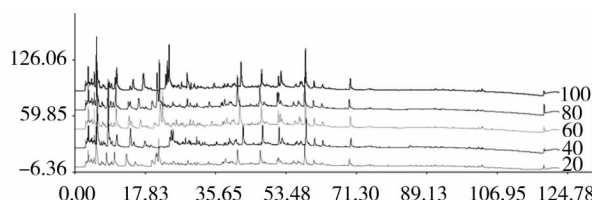


图 2 HPLC 法测定不同粉碎度补阳还五汤 360 min 时有效成分溶出的比较图

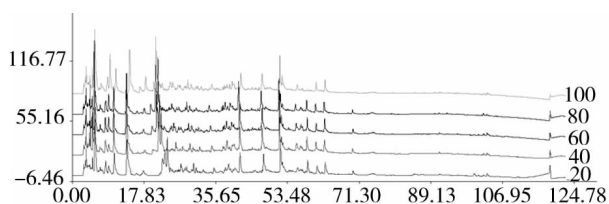


图 3 HPLC 法测定不同粉碎度补阳还五汤 1440 min 时有效成分溶出的比较图

在同一条件所得图谱中,样品提取至 5 min,共有峰个数有 16 个;至提取中间时段的 360 min,共有峰个数有 18 个;到最后截止点的 1 440 min,共有峰个数有 13 个。在提取时间中段 360 min 时,共有峰个数最多,这时溶出比较完全。提取结束时共有峰个数减少,推测有效成分随着时间的推移有发生了消除。这表明提取补阳还五汤提取时间不宜过长,否则会导致成分被破坏。根据图 3,比较在 1 440 min 时 20 目~100 目的 HPLC 指纹图谱图形(见图 4)。

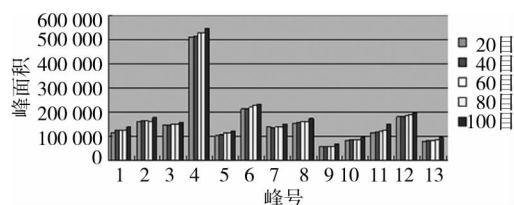


图 4 补阳还五汤不同粉碎度在 1 440 min 时共有峰峰面积对比图

在同一分离条件下所得色谱图中,选取其中分离效果较好且明显的主要共有峰做图,比较补阳还五汤 20~100 目共有峰峰面积,可以看出 20~100 目的图形相似,虽然随着粉碎度的增大,峰的面积有所增加,但峰面积相差不大。说明在补阳还五汤提取的时间后段,不同粉碎度药材对补阳还五汤提取的差异不大。至于从何时开始不同粉碎度对提取无影响,可从补阳还五汤各提取时间点不同粉碎度溶出的相似度研究得出。

表 1 补阳还五汤不同粉碎度提取时间 5 min 的指纹

		图谱相似度结果				
		20 目	40 目	60 目	80 目	100 目
20 目	1	1	0.433	0.584	0.502	0.416
40 目	0.433	1	0.674	0.269	0.414	
60 目	0.584	0.674	1	0.532	0.329	
80 目	0.502	0.269	0.532	1	0.344	
100 目	0.416	0.414	0.329	0.344	1	

表 2 补阳还五汤不同粉碎度提取时间 10 min 的指纹

		图谱相似度结果				
		20 目	40 目	60 目	80 目	100 目
20 目	1	1	0.285	0.304	0.168	0.319
40 目	0.285	1	0.796	0.144	0.637	
60 目	0.304	0.796	1	0.206	0.600	
80 目	0.168	0.144	0.206	1	0.244	
100 目	0.319	0.637	0.600	0.244	1	

表 3 补阳还五汤不同粉碎度提取时间 300 min 的指纹

		图谱相似度结果				
		20 目	40 目	60 目	80 目	100 目
20 目	1	1	0.882	0.904	0.868	0.919
40 目	0.885	1	0.896	0.844	0.837	
60 目	0.904	0.896	1	0.906	0.876	
80 目	0.868	0.944	0.906	1	0.856	
100 目	0.919	0.837	0.900	0.944	1	

### 3.3 补阳还五汤各提取时间点不同粉碎度溶出的相似度结果

在补阳还五汤提取前期的 12 个时间点均考察

了指纹图谱的相似度结果(见表4)。根据结果可知在提取之初,各不同粉碎度之间的相似度较低,证明不同粉碎度对补阳还五汤的提取存在影响,粉碎度越大成分溶出越快。在提取时间约300 min时,不同目数指纹图谱的相似度基本上在0.85以上,可知在300 min左右,补阳还五汤的提取基本达到稳定,不同药材粉碎度对成分的提取没有太大影响。

根据表4,选定不同粉碎度趋于稳定的RSD值,认为这个值即为不同粉碎度药材的最佳提取时间。可知:20目的药材在240 min时、40目药材在180 min时、60目在120 min时、80目药材在90 min时、100目药材在30 min、饮片在180 min时溶出达到基本稳定,为补阳还五汤提取的最佳稳定粒径和时间。

表4 补阳还五汤各提取时间不同粉碎度  
相似度 RSD 结果

	20目	40目	60目	80目	100目	饮片
20 min	12.69	17.89	9.51	2.706	1.56	2.98
30 min	10.36	16.52	8.12	8.030	11.86	4.60
60 min	16.83	14.33	11.35	24.00	11.19	7.53
90 min	15.05	13.26	10.26	21.40	11.92	6.97
120 min	14.40	14.25	13.48	21.44	13.65	6.47
180 min	13.43	13.20	12.64	23.52	12.66	5.98
240 min	16.68	12.53	12.15	22.68	11.99	5.84
300 min	16.63	12.58	11.56	21.64	11.34	5.72
420 min	16.13	11.99	12.89	20.75	10.88	5.46
720 min	15.40	12.63	12.32	22.41	10.46	5.32
1 355 min	15.43	12.29	14.33	21.44	10.01	5.19
1 440 min	15.58	11.92	14.49	20.71	10.58	5.17

## 4 讨论

中药活性成分是中药药理作用的物质基础,如何使中药有效成分尽量溶出,发挥最强的药效,是中药复方提取动力学中需要解决的难题。一般情况下,药用有效成分主要存在于细胞内,在细胞完整无损的状态下,有效成分只有透过细胞壁和细胞膜释放后才能被释放。完整的细胞壁和细胞膜对有效成分的释出形成阻力,这种阻力随细胞团内细胞数量的增多而增大<sup>[8]</sup>。对药材进行粉碎,粉碎细胞可使

细胞打碎,使中药材细胞破壁,将细胞壁打破可使细胞膜内的有效成分直接接触溶媒而溶出<sup>[9]</sup>,而不再是通过细胞壁的透壁形式释放。细胞破壁以后,胞内有效成分可充分暴露出来,使储存于细胞内和细胞间的有效成分直接接触到提取用溶媒,或直接与机体受体结合,发挥治疗效果<sup>[10]</sup>。

选择药材最佳粉碎度的时候,应该根据提取工艺参数来选取不同粒径药材,粒径过大或过小都不利于药材溶出。粒径过大,稳定的时间较长;粒径过小,杂质成分也同时溶出,影响有效成分溶出<sup>[11]</sup>。本实验的结果不一定适用于中试或大型生产。例如在实际操作中,要想达到100目的药材粒径,往往费时费工加大生产成本。故要考虑生产中的最佳粒径还需进一步根据实际情况而定。

## 参考文献:

- [1] 贺福元,邓凯文,黄胜,等.总量统计矩标准相似度数学模型的建立及应用研究[J].药学学报,2013,48(9):1453-1458.
- [2] 江一唱,刘云海.超微粉碎对复方中药药效的影响[J].中国药师,2011,4(9):1352-1355.
- [3] 陈雪琴,刘云海.超微粉碎对单味中药药效的影响[J].中南药学,2011,9(4):292-295.
- [4] 邹欢.补阳还五汤总苷类成分提取分离过程中溶解迁移规律的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2010.
- [5] 贺福元,邓凯文,刘文龙,等.左金方与黄连中小檗碱型生物碱提取动力学差异性的研究[J].中成药,2009,31(9):1354-1359.
- [6] 张琴,刘莉.川芎超微粉的粉体学性质研究[J].中草药,2010(11):1796-1799.
- [7] 江欢英.鱼腥草挥发油及黄连生物碱的“网通性”研究[D].长沙:湖南中医药大学,2009.
- [8] 任利,李伟,聂爱国,等.当归超微粉和普通粉的显微特征观察[J].河南中医学院学报,2005,20(6):27-28.
- [9] 黎冬明,刘成梅,刘伟,等.中药细胞级粉碎及其发展趋势[J].农产品加工(学刊),2006(3):46-48.
- [10] 侯连兵.中药细胞级微粉碎技术在中药药剂中的应用[J].中药材,2001,24(10):765-766.
- [11] 杨岩涛,吴春英,唐宇,等.中药多成分控缓释剂研究方向探索[J].湖南中医药大学学报,2014,8(34):1-5.

(本文编辑 苏维)