



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104983836 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510321266. 0

(22) 申请日 2015. 06. 12

(71) 申请人 天津中医药大学

地址 300193 天津市南开区鞍山西道玉泉路
88 号

(72) 发明人 任晓亮 张慧杰 刘亚男 王萌
邱喜龙 杨建文 戚爱棣

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 史霞

(51) Int. Cl.

A61K 36/734(2006. 01)

A61K 47/40(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

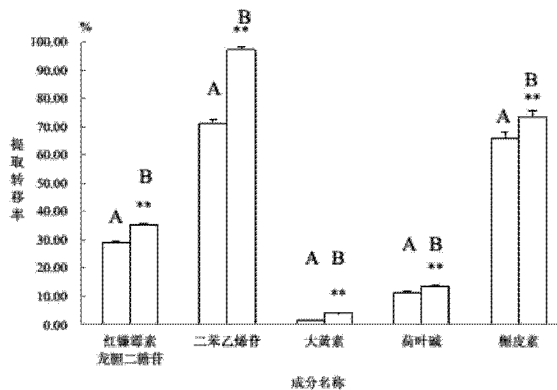
权利要求书1页 说明书17页 附图6页

(54) 发明名称

一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,包括如下步骤:将复方血脂宁的原料药加入到β-环糊精溶液中浸泡1h,之后对所述原料药和β-环糊精溶液的混合液回流提取1~3次,每次回流时间为1~2h,其中,β-环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的5%~15%,所述复方血脂宁的原料药与所述β-环糊精溶液的料液比为1:25~1:15。本发明以复方血脂宁为模型药物,以其中的降脂活性成分为指标,基于环糊精的分子选择包合作用,开展以β-CD为载体对中药复方多种活性成分的整体提取研究,获得了适宜的提取方法来有效地保持中药复方血脂宁活性的药理活性。



1. 一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,包括如下步骤:将复方血脂宁的原料药加入到 β -环糊精溶液中浸泡1h,之后对所述原料药和 β -环糊精溶液的混合液回流提取1~3次,每次回流时间为1~2h,其中, β -环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的5%~15%,所述复方血脂宁的原料药与所述 β -环糊精溶液的料液比为1:25~1:15。

2. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于, β -环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的5%。

3. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,所述复方血脂宁的原料药与所述 β -环糊精溶液的料液比为1:25。

4. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,将复方血脂宁的原料药加入到 β -环糊精溶液中浸泡1h,之后加热回流提取3次。

5. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,所述加热回流中,每次回流时间为2h。

6. 如权利要求1至5任一所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,所述复方血脂宁的原料药包括决明子、制首乌、荷叶、和山楂,所述决明子、制首乌、荷叶、和山楂的重量比例为3:2:1.5:1。

7. 如权利要求6所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,所述 β -环糊精溶液中还含有质量体积浓度为0.08mg/mL的EDTA,所述 β -环糊精溶液的pH为2.5~3.0。

8. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,首先将复方血脂宁的原料药粉碎为100目的颗粒,之后再加入到 β -环糊精溶液中浸泡。

9. 如权利要求5所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,回流提取的第1次依次经过四个阶段并在每个阶段下持续一定时间,第一阶段首先对所述原料药和 β -环糊精溶液的所述混合液体积的70%的液体进行回流,之后第二、第三和第四阶段再分别加入剩余混合液体积的1/3进行回流,其中,所述第一阶段持续40min,所述第二和第三阶段分别持续20min,所述第四阶段持续40min。

10. 如权利要求1所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,其特征在于,所述活性成分包括红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素。

一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法。

背景技术

[0002] 环糊精 (Cyclodextrin, 简称 CD) 系淀粉用嗜碱性芽孢杆菌经培养得到的环糊精葡聚糖转位酶作用后形成的产物。是由 6-12 个 D- 葡萄糖分子以 1, 4- 糖苷键连接的环状低聚糖化合物, 为水溶性, 非还原性白色结晶状粉末, 常见的有 α , β , γ 三型, 分别由 6、7、8 个葡萄糖分子构成。尤以 β -CD 最为常用。CD 结构成环状中空筒状, 环筒外部是亲水性的表面, 内部的非极性基团形成一个具有一定尺寸的疏水空腔。

[0003] 由于环糊精是环状中空圆筒型的特殊结构, 因此呈现出一系列特殊性质, 能与某些物质分子形成包合物。包合物外层的大分子物质称为“主分子”, 被包和在主分子内的物质称为“客分子”。包合物为主客体分子之间通过疏水作用、氢键和范德华力使客体分子全部或部分嵌入环糊精分子穴内而形成。使被包合药物的理化性质和生物学性质发生明显的变化, 因而在化学分离及分析、药物控制释放、有机合成与催化、食品加工和环境保护等领域得到了广泛应用。

[0004] 中药复方血脂宁收载于 2010 年版《中华人民共和国药典》一部中, 由决明子、制首乌、荷叶、山楂四味中药组成, 具有活血行气, 化瘀降脂之功效, 适用于血脉瘀滞所致高脂血症。

[0005] 中药具有极为悠久的发展历史, 具有种类繁多、用途广泛、所含化学成分多样、药理作用复杂等特点, 由于其良好的临床疗效, 受到了世界各国人民的欢迎。随着科学技术及研究手段的进步和提高, 对中药的研究也越来越深入, 特别是中药的提取工艺研究。由于中药作用机理复杂, 根据其药性及活性成分的不同, 选择适宜的提取方法来有效地保持中药活性成分的药理活性显得尤为重要。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是解决至少上述问题和 / 或缺陷, 并提供至少后面将说明的优点。

[0007] 本发明还有一个目的是提供一种复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法, 本发明以复方血脂宁为模型药物, 以其中的降脂活性成分为指标, 基于环糊精的分子选择包合作用, 开展以 β -CD 为载体对中药复方多种活性成分的整体提取研究, 获得了适宜的提取方法来有效地保持中药复方血脂宁活性的药理活性。

[0008] 本发明还有一个目的是提供 β - 环糊精在提取复方血脂宁的原料药中活性成分方法中的用途。

[0009] 为此, 本发明提供的技术方案为:

[0010] 一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法, 包括如下步骤: 将复方血脂宁的原料药加入到 β - 环糊精溶液中浸泡 1h, 之后对所述原料药和 β - 环糊精溶液的混合

液回流提取 1 ~ 3 次,每次回流时间为 1 ~ 2h,其中,β-环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的 5% ~ 15%,所述复方血脂宁的原料药与所述 β-环糊精溶液的料液比为 1:25 ~ 1:15。

[0011] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,β-环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的 5%。

[0012] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,所述复方血脂宁的原料药与所述 β-环糊精溶液的料液比为 1:25。

[0013] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,将复方血脂宁的原料药加入到 β-环糊精溶液中浸泡 1h,之后加热回流提取 3 次。

[0014] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,所述加热回流中,每次回流时间为 2h。

[0015] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,所述复方血脂宁的原料药包括决明子、制首乌、荷叶、和山楂,所述决明子、制首乌、荷叶、和山楂的重量比例为 3:2:1.5:1。

[0016] 较优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,所述 β-环糊精溶液中还含有质量体积浓度为 0.08mg/mL 的 EDTA,所述 β-环糊精溶液的 pH 为 2.5 ~ 3.0。

[0017] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,首先将复方血脂宁的原料药粉碎为 100 目的颗粒,之后再加入到 β-环糊精溶液中浸泡。

[0018] 较优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,回流提取的第 1 次依次经过四个阶段并在每个阶段下持续一定时间,第一阶段首先对所述原料药和 β-环糊精溶液的所述混合液体积的 70% 的液体进行回流,之后第二、第三和第四阶段再分别加入剩余混合液体积的 1/3 进行回流,其中,所述第一阶段持续 40min,所述第二和第三阶段分别持续 20min,所述第四阶段持续 40min。

[0019] 优选的是,所述的从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法中,所述活性成分包括红镰霉素-6-O-β-D-龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素。

[0020] 本发明至少包括以下有益效果:β-环糊精具有无毒、对热稳定以及价廉易得等优点,本发明采用 β-环糊精辅助性提取中药复方血脂宁中的活性成分,指标成分的提取转移率均有显著性提高。本发明的 β-环糊精溶液中还含有质量体积浓度为 0.08mg/mL 的 EDTA,其 pH 为 2.5 ~ 3.0。在该 pH 环境条件下,EDTA 能够促进 β-环糊精发挥更大地效力,增强 β-环糊精包合活性成分的作用力,使包合作用更强,以进一步提高对活性成分的提取转移率。为了 β-环糊精和原料药更充分地接触,本发明首先将复方血脂宁的原料药粉碎为 100 目的颗粒,之后再加入到 β-环糊精溶液中浸泡。回流提取的第 1 次依次经过四个阶段并在每个阶段下持续一定时间进行,提高了回流的效率和提取效果。与传统水提相比,β-CD 对指标成分具有显著的辅助性提取作用,能显著地提高活性成分的提取转移率,增强了复方血脂宁提取工艺的可控性,使其提取高效、节能、可控,在复方血脂宁提取工艺方面的应用有进一步的研究价值。

[0021] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

附图说明

[0022] 图 1A 展示了一样品的色谱图,其中,图 1A 中 1 代表荷叶碱、2 代表二苯乙炔苷、3 代表红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、4 代表槲皮素、5 代表大黄素。

[0023] 图 1B 展示了对照品的色谱图,图 1B 中 1 代表荷叶碱、2 代表二苯乙炔苷、3 代表红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、4 代表槲皮素、5 代表大黄素。

[0024] 图 2A 为不同料液比下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图。

[0025] 图 2B 为不同料液比下二苯乙炔苷的提取转移率图。

[0026] 图 2C 为不同料液比下大黄素的提取转移率图。

[0027] 图 2D 为不同料液比下荷叶碱的提取转移率图。

[0028] 图 2E 为不同料液比下槲皮素的提取转移率图。

[0029] 图 3 为本发明中的不同提取方法中五种成分的提取转移率的比较图,其中,图 3 中 1 标识柱体展示热浸提取(80 $^{\circ}$ C)方法中五种成分的提取转移率,2 标识柱体展示超声提取方法中五种成分的提取转移率,3 标识柱体展示回流提取方法中五种成分的提取转移率。

[0030] 图 4A 为不同提取时间下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图。

[0031] 图 4B 为不同提取时间下二苯乙炔苷的提取转移率图。

[0032] 图 4C 为不同提取时间下大黄素的提取转移率图。

[0033] 图 4D 为不同提取时间下荷叶碱的提取转移率图。

[0034] 图 4E 为不同提取时间下槲皮素的提取转移率图。

[0035] 图 5A 为不同提取次数下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图。

[0036] 图 5B 为不同提取次数下二苯乙炔苷的提取转移率图。

[0037] 图 5C 为不同提取次数下大黄素的提取转移率图。

[0038] 图 5D 为不同提取次数下荷叶碱的提取转移率图。

[0039] 图 5E 为不同提取次数下槲皮素的提取转移率图。

[0040] 图 6A 为不同 β -CD 用量下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图。

[0041] 图 6B 为不同 β -CD 用量下二苯乙炔苷的提取转移率图。

[0042] 图 6C 为不同 β -CD 用量下大黄素的提取转移率图。

[0043] 图 6D 为不同 β -CD 用量下荷叶碱的提取转移率图。

[0044] 图 6E 为不同 β -CD 用量下槲皮素的提取转移率图。

[0045] 图 7 为本发明中的水溶液提取和 β -CD 提取方法中五种成分的提取转移率的比较图,图中 ** 表示与水提取相比有显著性差异, $P < 0.01$,图 7 中 A 展示水溶液提取方法中五种成分的提取转移率,图 7 中 B 展示 β -CD 提取方法中五种成分的提取转移率。

具体实施方式

[0046] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0047] 本发明提供一种从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法,包括如下步骤:将复方血脂宁的原料药加入到 β -环糊精溶液中浸泡 1h,之后对所述原料药和 β -环糊精溶液的混合液回流提取 1~3 次,每次回流时间为 1~2h,其中, β -环糊精的用量占所述

复方血脂宁的原料药总重量的 5%~15%，所述复方血脂宁的原料药与所述 β -环糊精溶液的料液比为 1:25~1:15。

[0048] 本发明采用 β -环糊精辅助性提取中药复方血脂宁中的活性成分，能显著地提高活性成分的提取转移率，增强了复方血脂宁提取工艺的可控性，使其提取高效、节能、可控，在复方血脂宁提取工艺方面的应用有进一步的研究价值

[0049] 作为优选， β -环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的 5%。

[0050] 作为优选，所述复方血脂宁的原料药与所述 β -环糊精溶液的料液比为 1:25。

[0051] 作为优选，将复方血脂宁的原料药加入到 β -环糊精溶液中浸泡 1h，之后加热回流提取 3 次。

[0052] 作为优选，所述加热回流中，每次回流时间为 2h。

[0053] 作为优选，所述复方血脂宁的原料药包括决明子、制首乌、荷叶、和山楂，所述决明子、制首乌、荷叶、和山楂的重量比例为 3:2:1.5:1。

[0054] 作为优选，所述 β -环糊精溶液中还含有质量体积浓度为 0.08mg/mL 的 EDTA，所述 β -环糊精溶液的 pH 为 2.5~3.0。在该 pH 环境条件下，EDTA 能够促进 β -环糊精发挥更大地效力，增强 β -环糊精包合活性成分的作用力，使包合作用更强，以进一步提高对活性成分的提取转移率。

[0055] 作为优选，为了 β -环糊精和原料药更充分地接触，首先将复方血脂宁的原料药粉碎为 100 目的颗粒，之后再加入到 β -环糊精溶液中浸泡。

[0056] 作为优选，为提高回流的效率和提取效果，回流提取的第 1 次依次经过四个阶段并在每个阶段下持续一定时间，第一阶段首先对所述原料药和 β -环糊精溶液的所述混合液体积的 70% 的液体进行回流，之后第二、第三和第四阶段再分别加入剩余混合液体积的 1/3 进行回流。回流提取中，所述第一阶段持续 40min，所述第二和第三阶段分别持续 20min，所述第四阶段持续 40min。

[0057] 作为优选，所述活性成分包括红镰霉素 -6-O- β -D- 龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素。

[0058] 复方血脂宁由决明子 (30g)、制首乌 (20g)、荷叶 (15g)、山楂 (10g) 等四味中药组成，具有活血行气，化瘀降脂之功效，适用于血脉瘀滞所致的高脂血症。现代药理学研究表明，血脂宁中具有多种药效活性成分。本发明从已鉴定的复方血脂宁源自决明子、制首乌、荷叶中的 17 个成分中，选取了 5 种结构类型的药效活性成分作为 β -CD 辅助性提取工艺研究的评价指标：红镰霉素 -6-O- β -D- 龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素。首先通过对料液比、提取方法、 β -CD 用量等进行单因素考察，进一步设计正交试验对 β -CD 辅助性提取复方血脂宁工艺进行研究，总结 β -CD 对五种成分的选择性提取规律以及各因素对其选择提取的影响。

[0059] 实施例 1

[0060] 1. 材料

[0061] 1.1 药品

[0062] 荷叶碱 (111566-200703)、槲皮素 (100081-200907)、大黄素 (110756-200110)、大黄酚 (110796-201017) 购自中国食品药品检定研究院；红镰霉素 -6-O- β -D- 龙胆二糖苷 (纯度 $\geq 98\%$) 购自南京拓海生物科技有限公司；二苯乙烯苷 (纯度 $\geq 98\%$) 为自制。

[0063] 决明子(产地:越南)、制首乌(产地:四川)、荷叶(产地:山东)、山楂(产地:承德)。

[0064] 1.2 试剂

[0065]

试剂名称	生产公司
甲醇(色谱纯)	美国 sigma 公司
甲酸(色谱纯)	美国 Meridian Medical Technologies 公司
β -CD	孟州市华兴生物化工有限责任公司

[0066] 1.3 仪器

[0067]

仪器名称	型号	生产厂家
超高效液相色谱仪	ACQUITY UPLCTM system	美国 Waters 公司
十万分之一天平	METTLER TOLEDO AX205	瑞士 METTLER 公司
万分之一天平	FA2004A	上海精天电子仪器有限公司
电子天平	JA31002	上海精天电子仪器有限公司
电热套	ZDHW	北京中兴伟业仪器有限公司
超声波清洗器	SB-2512DTN	宁波新芝生物科技股份有限公司
恒温水浴	DH-98-IIA	天津市泰斯特仪器有限公司
纯水机	Elix/RiO 纯水系统	美国 Millipore 公司
真空干燥箱	DZF-6050	上海博迅实业有限公司医疗设备厂

[0068] 2. 方法与结果

[0069] 2.1 色谱条件

[0070] 色谱柱:Acquity UPLC BEH shield RP18(2.1×100mm, 1.7 μ m);流动相:甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序见下表1;流速:0.2ml/min;柱温:45℃;检测方法采用波长切换法,具体见表2;分析时间:40min;进样量3 μ L。色谱图见图1A和图1B,图1A展示了样品的色谱图,图1B展示了对照品的色谱图,其中,在图1A和图1B中1代表荷叶碱、2代表二苯乙炔苷、3代表红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、4代表槲皮素、5代表大黄素。其中对照品储备液制备如2.2.1中所述,样品为随机选取的一样品。从图1A和图1B中,都可以看出色谱条件良好,适于测定这五种成分。

[0071] 表1梯度洗脱表

[0072]

时间/min	A%	B%
0	10	90
2	25	75
9	35	65
12	40	60
40	90	10

[0073] 表2波长切换表

[0074]

时间/min	波长/nm	测定化合物
0.00-8.00	270	荷叶碱
8.01-10.5	320	二苯乙烯苷
10.51-19.00	277	红镰霉素-6-O-β-D-龙胆二糖苷
19.01-30.00	360	槲皮素
30.01-40.00	254	大黄素

[0075] 2.2 方法学考察

[0076] 2.2.1 线性关系和检测限

[0077] 分别称取红镰霉素龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素对照品适量,置于 10mL 容量瓶中,以甲醇定容,得浓度依次为 536 μg/mL, 1050 μg/mL, 492 μg/mL, 168 μg/mL, 503 μg/mL 的对照品储备液五种成分对照品适量,分别吸取对照品溶液适量混合成对照品溶液,逐级稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,进样测定峰面积。以对照品浓度 (c) 对峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归分析,得各成分的线性回归方程、线性范围和相关系数,结果见表 3。

[0078] 表 3测定成分回归方程、相关系数、线性范围

[0079]

化合物	回归方程	相关系数	线性范围/μg · mL ⁻¹
红镰霉素龙胆二糖苷	y=70237.97x+1693.49	1.0000	0.21-13.40
二苯乙烯苷	y=51738.43x+4810.90	1.0000	1.59-101.50
大黄素	y=56434.93x+636.19	1.0000	0.04-4.92
荷叶碱	y=46815x-149.0	0.9995	0.07-4.20
槲皮素	y=42870.71x-1355.06	0.9999	0.10-3.14

[0080] 2.2.2 精密度

[0081] 配制各成分与测定样品响应相近的混标溶液,按“2.1”项下色谱条件进样 6 针测定峰面积,计算精密度。如表 4所示,结果表明 5 个成分的 RSD 值均小于 1.27%,表明仪器精密度良好。

[0082] 表 4精密度试验结果

[0083]

化合物	1	2	3	4	5	6	RSD/%
红镰霉素龙胆二糖苷	250183	250326	253267	253005	251359	252625	0.54
二苯乙烯苷	691381	692331	700691	700112	695797	699315	0.58
大黄素	18288	18336	18115	18428	18532	18502	0.84
荷叶碱	26317	26384	26680	26675	26046	26578	0.93
槲皮素	12901	12732	12572	12701	12496	12879	1.27

[0084] 2.2.3 稳定性试验

[0085] 供试品溶液的制备按照处方称取复方血脂宁两份,分别加入 10 倍量的水、β-CD 的 25℃ 饱和水溶液,浸泡 1h,回流 1h,趁热过滤,减压浓缩得浸膏;浸膏 40℃ 真空干燥并研细得血脂宁水提物粉末、β-CD 水溶液提取物粉末。分别称取水提物粉末、β-CD 水溶液提取物粉末 0.05g,加入甲醇 5mL,称重,超声 30min,放至室温后补足失重,摇匀,溶液离心

(12000rpm, 10min) 后取上清液, 加水稀释 1 倍后过滤 (0.22 μm), 续滤液进样。

[0086] 分别于 0、2、4、6、8、10、12h 进样, 测定各成分的峰面积考察供试品溶液的稳定性, 计算 RSD 值。结果表明 5 个成分的 RSD 均小于 2.44%, 供试品溶液室温放置 24h 基本稳定。

[0087] 2.2.4 重复性试验

[0088] 按 2.2.3 稳定性试验下“供试品溶液制备”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 计算 RSD 值, 计算结果见表 5, 各成分 RSD 值均小于 2.56%, 表明试验重复性良好。

[0089] 表 5 重复性试验结果 ($\mu\text{g/g}$, $n = 6$)

[0090]

化合物	1	2	3	4	5	6	RSD/%
红镰霉素龙胆二糖苷	497.33	477.69	471.46	484.59	472.61	485.51	2.01
二苯乙烯苷	4377.15	4392.33	4182.78	4309.75	4356.61	4236.89	1.94
大黄素	16.77	16.64	16.98	16.95	16.59	16.33	1.45
荷叶碱	206.83	196.38	209.78	200.48	201.05	207.94	2.56
槲皮素	72.14	69.66	67.92	68.86	70.09	70.89	2.13

[0091] 2.2.5 加样回收率试验

[0092] 按照处方称取复方血脂宁 6 份, 分别 β -CD 的 25 $^{\circ}\text{C}$ 饱和水溶液, 浸泡 1h, 回流 1h, 趁热过滤, 冷却至室温量取体积后取 1mL 置于 10mL 容量瓶中, 以纯甲醇稀释, 超声 30min, 稀释液离心 (12000rpm, 10min) 后取上清液过滤 (0.22 μm), 续滤液分别进样分析。测得样品含量后, 分别取 6 份提取液各 0.5mL 置于 10mL 容量瓶中, 加入适量对照品溶液, 以纯甲醇稀释, 超声 30min, 稀释液离心 (12000rpm, 10min) 后取上清液过滤 (0.22 μm), 续滤液分别进样分析测定加样回收率, 结果见表 6。

[0093] 表 6 加样回收率试验结果

[0094]

化合物	样品中量/mg	加入量/mg	检出量/mg	回收率/%	RSD/%
红镰霉素龙胆二糖苷	5.93	5.96	11.95	101.14	0.92
二苯乙烯苷	35.74	36.03	71.65	99.66	1.29
大黄素	0.37	0.37	0.72	96.16	1.11
荷叶碱	1.23	1.26	2.47	98.12	1.42
槲皮素	0.43	0.43	0.84	95.48	2.17

[0095] 2.3 药材中各指标成分的含量测定

[0096] 2.3.1 供试品溶液的制备

[0097] 红镰霉素龙胆二糖苷的测定称取决明子样品 (过三号筛) 0.05g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25mL, 称重, 回流提取 2h, 放至室温, 再称重, 补足失重, 摇匀, 静置, 上清液用微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即为供试品溶液, 备用。

[0098] 二苯乙烯苷的测定称取制首乌样品 (过四号筛) 0.2g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 25mL, 称定重量, 加热回流 30min, 放冷, 再称定重量, 用稀乙醇补足失重, 摇匀, 静置, 上清液用微孔滤膜过滤, 取续滤液 1mL 至 10mL 容量瓶, 以稀乙醇定容, 即为供试品溶液, 备用。

[0099] 大黄素在决明子中的含量测定称取决明子样品 (过三号筛) 0.5g, 精密称定, 精密

加入 70%乙醇 50mL,称重,回流提取 2h,放至室温,再称重,补足失重,摇匀,静置,上清液用微孔滤膜过滤,取续滤液,即为供试品溶液,备用。

[0100] 大黄素在制首乌中的含量测定称取制首乌样品(过四号筛)1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50mL,称定重量,加热回流 1h,放冷,再称定重量,用甲醇补足失重,摇匀,静置,上清液用微孔滤膜过滤,精密量取续滤液 1mL 至 10mL 容量瓶中以甲醇定容,即为供试品溶液,备用。

[0101] 荷叶碱的测定称取荷叶样品(粗粉)0.5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50mL,称定重量,加热回流 2.5h,放冷,再称定重量,用甲醇补足失重,摇匀,滤过,续滤液经甲醇稀释 10 倍后,精密量取稀释液 5mL,置 10mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即为供试品溶液,备用。

[0102] 槲皮素供试品溶液制备:称取荷叶样品(粗粉)2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60%乙醇 40mL,称定重量,加热回流 1h,放冷,再称定重量,补足失重,摇匀,静置,上清液用微孔滤膜过滤,精密量取续滤液 1mL 至 10mL 容量瓶中以 60%乙醇定容,即为供试品溶液,备用。

[0103] 2.3.2 测定结果

[0104] 各成分在药材中的含量测定结果如表 7 所示。

[0105] 表 7 含量测定结果

[0106]

测定成分	决明子		制首乌		荷叶	
	红镰霉素龙胆二糖苷	大黄素	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素
成分含量 /mg·g ⁻¹	5.43	0.01	17.98	1.76	5.93	0.38

[0107] 2.3.3 各成分提取转移率的计算方法

[0108]

$$\text{提取转移率}/\% = \frac{c \times V}{m \times w}$$

[0109] c 为复方提取液浓度 (mg · mL⁻¹) ;V 为提取液体积 (mL) ;m 为复方提取时称得的药材实际质量 (g) ;w 为复方中来源药材中该成分含量 (mg · g⁻¹) 。

[0110] 注:大黄素的提取转移率计算时,m 为复方提取时称得的决明子与制首乌质量 (g) 之和,w 为决明子与制首乌中大黄素的含量 (mg · g⁻¹) 之和。

[0111] 2.4.1 料液比

[0112] 分别按复方量称取四味药材 3 份,分别加入料液比为 10 倍、20 倍、30 倍的 β-CD 饱和溶液 (25℃),浸泡 1h 后,回流 1h,提取液趁热过滤,冷却至室温量取体积后移取 1mL 置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm,10min) 后取上清液过滤 (0.22 μm),续滤液进样分析。计算各成分提取转移率(表 8),以料液比为横坐标,各成分提取转移率为纵坐标作图,如图 2A、图 2B、图 2C、图 2D、和图 2E 所示,图 2A、图 2B、图 2C、图 2D、和图 2E 分别为本发明复方血脂宁和 β-CD 溶液的不同料液比下五种成分的考察结果图,其中,图 2A 为不同料液比下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图,图 2B 为不同料液比

下二苯乙烯苷的提取转移率图,图 2C 为不同料液比下大黄的提取转移率图,图 2D 为不同料液比下荷叶碱的提取转移率图,图 2E 为不同料液比下槲皮素的提取转移率图;红镰霉素龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、荷叶碱提取转移率在 20 倍与 30 倍的料液比中没有明显改变,槲皮素的提取转移率随料液比的增加而增加,而大黄提取转移率在 20 倍量为最大,综合考虑经济性及后处理等因素,进行其他单因素考察时选取 20 倍料液比。

[0113] 表 8 料液测定结果

[0114]

料液比	提取转移率/%				
	红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素
10 倍	14.36	43.69	2.08	4.72	32.07
20 倍	20.75	52.76	3.20	9.61	40.43
30 倍	21.64	51.96	2.51	9.91	44.79

[0115] 2.4.2 提取方法考察

[0116] 分别按复方量称取四味药材 3 份,提取溶剂为 β -CD 饱和溶液 (25℃),料液比为 20:1,浸泡 1h 后,分别采用热浸提取 (80℃) 3h、超声提取 1h、回流 1h 进行提取,提取液过滤,冷却至室温量取体积后移取 1mL 置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm, 10min) 后取上清液过滤 (0.22 μ m),续滤液进样分析。计算各成分提取转移率 (表 9),对比不同提取方法各成分的提取转移率,如图 3 所示,其中,图 3 中 1 标识柱体展示热浸提取 (80℃) 方法中五种成分的提取转移率,2 标识柱体展示超声提取方法中五种成分的提取转移率,3 标识柱体展示回流提取方法中五种成分的提取转移率,综合考虑各成分结果,回流效果较好,因此选用加热回流法对复方进行提取。表 9 也展示了本次结果。

[0117] 表 9 提取方法比较结果

[0118]

提取方法	时间/h	提取转移率/%				
		红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	荷叶碱	大黄素	槲皮素
热浸提取 (80℃)	3	2.82	60.80	6.23	1.43	39.94
超声提取	1	-	1.83	4.57	0.89	37.30
回流提取	1	20.75	52.76	9.61	3.20	40.43

[0119] 2.4.3 提取时间考察

[0120] 按复方量称取四味药材,提取溶剂为 CD 饱和溶液 (25℃),料液比为 20:1,浸泡 1h 后,分别回流 0.5、1、1.5、2、3h 进行提取,提取液趁热过滤,冷却至室温量取体积后移取 1mL 置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm, 10min) 后取上清液过滤 (0.22 μ m),续滤液进样分析。计算各成分提取转移率 (表 10),以提取时间为横坐标,各成分提取转移率为纵坐标,如图 4A、图 4B、图 4C、图 4D、和图 4E 所示,图 4A、图 4B、图 4C、图 4D、和图 4E 分别为本发明中的不同提取时间下五种成分的考察结果图。其中,图 4A 为不同提取时间下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图,图 4B 为不同提取时间下二苯

乙烯苷的提取转移率图,图 4C 为不同提取时间下大黄的提取转移率图,图 4D 为不同提取时间下荷叶碱的提取转移率图,图 4E 为不同提取时间下槲皮素的提取转移率图,各成分提取转移率随时间的变化趋势差异较大,需要进一步通过正交试验综合评价。

[0121] 表 10 提取时间考察结果

[0122]

时间/h	提取转移率/%				
	红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素
0.5	8.95	40.99	1.09	6.33	64.91
1	21.93	52.23	1.54	10.59	74.73
1.5	28.24	62.08	1.83	7.70	79.75
2	31.04	66.86	1.80	5.89	70.17
3	29.08	72.73	1.76	4.29	68.57

[0123]

[0124] 2.4.4 提取次数

[0125] 按复方量称取四味药材 3 份,提取溶剂为 CD 饱和溶液 (25℃),料液比为 20 :1,浸泡 1h 后,回流 1h 进行提取,分别提取 1、2、3 次,提取液趁热过滤,冷却至室温量取提取液的体积。移取 1mL 提取液置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm,10min) 后取上清液过滤 (0.22 μm),续滤液进样分析。计算各成分提取转移率 (表 11),以提取次数为横坐标,各成分提取转移率为纵坐标,如图 5A、图 5B、图 5C、图 5D、和图 5E 所示,图 5A、图 5B、图 5C、图 5D、和图 5E 分别为本发明中的不同提取次数下五种成分的考察结果图。其中,图 5A 为不同提取次数下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图,图 5B 为不同提取次数下二苯乙烯苷的提取转移率图,图 5C 为不同提取次数下大黄的提取转移率图,图 5D 为不同提取次数下荷叶碱的提取转移率图,图 5E 为不同提取次数下槲皮素的提取转移率图;各成分提取转移率随提取次数的增多而增大。

[0126] 表 11 提取次数结果

[0127]

	各成分提取转移率/%				
	红镰霉素龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素
1 次	20.75	52.76	3.20	9.61	40.43
2 次	39.15	77.21	5.77	16.34	57.72
3 次	46.34	88.41	7.54	22.35	65.28

[0128] 2.4.5 β-CD 用量

[0129] 按复方量称取四味药材若干份,按表 12 所示“β-CD 加入量与药材质量比/%”分别加入不同质量的 β-CD,料液比为 20 :1,浸泡 1h 后,回流 1h 进行提取,提取液趁热过滤,冷却至室温量取提取液的体积。移取 1mL 提取液置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm,10min) 后取上清液过滤 (0.22 μm),续滤液进样分析。计算各成分提取转移率 (表 12),以“β-CD 加入量与药材质量比/%”为横坐标,各成分提取转移率为纵坐标,如图 6A、图 6B、图 6C、图 6D、和图 6E 所示,图 6A、图 6B、图 6C、图 6D、和图 6E 分别为本发明中的不同 β-CD 用量下五种成分的考察结果图。其中,图 6A 为不同 β-CD

用量下红镰霉素龙胆二糖苷的提取转移率图,图 6B 为不同 β -CD 用量下二苯乙烯苷的提取转移率图,图 6C 为不同 β -CD 用量下大黄的提取转移率图,图 6D 为不同 β -CD 用量下荷叶碱的提取转移率图,图 6E 为不同 β -CD 用量下槲皮素的提取转移率图,各成分提取转移率随 β -CD 用量的增加而呈现不同趋势,对于复方血脂宁提取工艺的整体评价还需进一步通过正交试验优化 β -CD 用量。

[0130] 表 12 β -CD 用量考察结果

[0131]

β -CD 加入量与药材质量比/%		0	5	10	12.5	17	25	50
各成分提取 转移率/%	红镰霉素龙胆二糖苷	15.79	19.04	21.40	23.45	22.28	22.51	20.82
	二苯乙烯苷	34.40	48.66	61.37	53.76	53.15	51.22	46.16
	大黄素	1.30	1.70	3.04	2.86	2.47	2.48	2.58
	荷叶碱	8.52	9.50	12.36	12.54	11.96	12.11	10.82
	槲皮素	31.73	42.59	61.20	63.74	76.39	58.66	55.75

[0132] 2.5 正交试验

[0133] 2.5.1 正交试验设计

[0134] 根据“2.4”项下各单因素考察结果设计四因素三水平正交试验,选取 β -CD 用量、提取时间、提取次数以及料液比四个因素,每个因素选取三个水平, $L_9(3^4)$ 正交设计见表 13。

[0135] 表 13 正交试验表

[0136]

试验号	A (β -CD 加入量与复方质量比/%)	B (提取时间/h)	C (提取次数)	D (料液比)
1	5	1	1	1: 15
2	5	1.5	2	1: 20
3	5	2	3	1: 25
4	10	1	2	1: 25
5	10	1.5	3	1: 15
6	10	2	1	1: 20
7	15	1	3	1: 20
8	15	1.5	1	1: 25
9	15	2	2	1: 15

[0137] 按复方量称取四味药材 9 份,按表 13 所示分别对其进行提取,提取液趁热过滤,冷却至室温量取提取液的体积。移取 1mL 提取液置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心 (12000rpm, 10min) 后取上清液过滤 (0.22 μ m),续滤液进样分析,计算各成分提取转移率。提取液浓缩后,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,干燥至恒重,取出,置干燥器内冷却后称重,计算浸膏得率,结果见表 17 和表 18。

[0138] 2.5.2 权重系数的计算

[0139] 本试验采用多指标综合评价法对正交试验结果进行评价,从红镰霉素龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱、槲皮素 5 个成分的提取转移率作为评价指标,采用层次分析法 (AHP)^[50] 确定各成分的权重系数。

[0140] 建立评价目标树 β -CD 辅助性提取复方血脂宁提取工艺评价目标可通过红镰霉素龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱、槲皮素 5 个次级目标来反映。

[0141] 构成两两比较优先矩阵比较目标的相对重要性,并构成两两比较矩阵,5 个目标成对比较的优先矩阵见表 14,评分标准见表 15。

[0142] 表 14 5 项目标成对比较判断优先矩阵

[0143]

	红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素
红镰霉素龙胆二糖苷	1	1	3	4	5
二苯乙烯苷	1	1	3	4	5
大黄素	1/3	1/3	1	2	3
荷叶碱	1/4	1/4	1/2	1	2
槲皮素	1/5	1/5	1/3	1/2	1

[0144] 表 15 目标树各层次评分表

[0145]

对比打分	相对重要程度	说明
1	同等重要	两者对目标的贡献相同
3	略为重要	根据经验一个比别的一个评价稍有利
5	基本重要	根据经验一个比别的一个评价更为有利
7	确实重要	一个比别的一个评价更有利,且在实践中证明
9	绝对重要	重要程度明显
2, 4, 6, 8	相两相邻程度的中间值	需要折衷时采用

[0146] 计算初始权重系数按公式 $w'_i = \frac{1}{\sqrt[m]{a_{i1}a_{i2}a_{i3} \dots a_{im}}}$ 计算初始权重系数 w'_i 。
 $w'_1 = \sqrt[5]{1 \times 1 \times 3 \times 4 \times 5} = 2.2679$, $w'_2 = 2.2679$, $w'_3 = 0.9221$, $w'_4 = 0.5743$, $w'_5 = 0.3671$ 。

[0147] 计算归一化权重系数按公式 $w_i = \frac{w'_i}{\sum_{i=1}^m w'_i}$ 计算归一化权重系数。 $w_1 = 2.2679 / (2.2679 + 2.2679 + 0.9221 + 0.5743 + 0.3671) = 0.3544$, $w_2 = 0.3544$, $w_3 = 0.1441$, $w_4 = 0.0898$, $w_5 = 0.0574$ 。

[0148] 计算权重系数随机一致比率 按公式 $CR = CI/RI$ 计算随机一致性比率, $CI = \frac{\lambda_{max} - m}{m - 1}$ ($\lambda_{max} = 1/m \sum_{i=1}^m (\sum_{j=1}^m a_{ij} \times w_j + w_i)$, m 为受检验层次的次目标数, m = 5), 查找相应的平均随机一致性指标 RI (random index), 见表 16。

[0149] $\lambda_{max} = 1/5 [(1 \times 0.3544 + 1 \times 0.3544 + 3 \times 0.1441 + 4 \times 0.0898 + 5 \times 0.0574) / 0.3544 + (1 \times 0.3544 + 1 \times 0.3544 + 3 \times 0.1441 + 4 \times 0.0898 + 5 \times 0.0574) / 0.3544 + (1/3 \times 0.3544 + 1/3 \times 0.3544 + 1 \times 0.1441 + 2 \times 0.0898 + 3 \times 0.0574) / 0.1441 + (1/4 \times 0.3544 + 1/4 \times 0.3544 + 1/2 \times 0.1441 + 1 \times 0.0898 + 2 \times 0.0574) / 0.0898 + (1/5 \times 0.3544 + 1/5 \times 0.3544 + 1/3 \times 0.1441 + 1/2 \times 0.0898 + 1 \times 0.0574) / 0.0574] = 5.0620$, $CI = (5.0620 - 5) / (5 - 1) = 0.0155$, $CR = 0.0155 / 1.12 = 0.0138$, $CR < 0.1$, 因此认为判断矩阵具有满意的一致性,表明权重系数合理有效,可用在下一步提取工艺优选的综合评分中。

[0150] 表 16 平均随机一致性指标 RI 表

[0151]

矩阵阶数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RI	0.00	0.00	0.58	0.90	1.12	1.24	1.32	1.41	1.45

[0152] 2.5.3 正交试验结果分析及验证试验

[0153] 表 17 正交试验结果

[0154]

试验号	各成分提取转移率/%					综合评分	出膏率/%
	红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素		
1	14.23	44.88	0.98	7.32	28.22	39.19	20.24
2	35.26	77.66	2.04	11.53	45.29	77.85	33.39
3	37.14	99.00	4.47	12.23	73.63	97.34	43.93
4	31.99	68.31	1.55	13.32	59.42	71.96	31.58
5	35.19	81.31	2.77	13.34	91.39	85.57	50.79
6	26.86	75.06	1.02	8.39	25.35	62.44	20.86
7	38.02	62.65	1.67	12.14	64.68	75.50	52.17
8	23.13	66.67	0.87	10.98	25.33	57.22	18.98
9	35.03	97.69	2.88	11.32	49.60	87.65	44.69

[0155] 注：综合评分 = 红镰霉素龙胆二糖苷评分 + 二苯乙烯苷评分 + 大黄素评分 + 荷叶碱评分 + 槲皮素评分；各成分评分 = 该成分提取转移率 / 最大提取转移率 × 权重系数 × 100。

[0156] 表 18 直观分析表

[0157]

综合评分	K1	71.46	62.22	52.95	70.80
	K2	73.33	73.55	79.15	71.93
	K3	73.46	82.48	86.14	75.51
	R	2.00	20.26	33.19	4.70

[0158] 表 19 方差分析表

[0159]

因素	偏差平方和	自由度	F _比	F _{临界值}	显著性
A	7.476	2	1.000	19.000	P>0.05
B	618.581	2	82.742	19.000	P<0.05
C	1836.736	2	245.684	19.000	P<0.05
D	36.183	2	4.840	19.000	P>0.05
误差	7.48	2			

[0160] 由直观分析可知，综合评分数的极差大小显示各因素作用主次为 C>B>D>A，最佳工艺为 A₃B₃C₃D₃，方差分析结果表明，提取时间及提取次数为显著性影响因素。综合分析，考虑到显著性影响因素以及辅助提取材料不宜过多，确定最佳工艺组合为 A₁B₃C₃D₃，即采用 β-CD 加入量占复方药材总量 5%，25 倍量回流提取 3 次，每次 2h。按已确定的最佳提取工艺条件，重复试验 3 次。采用水作为提取溶剂，其他提取工艺保持不变，平行试验 3 次，对比水溶液提取及 β-CD 辅助性提取之间的差异（表 20）。如图 7 所示，图 7 为本发明中的水溶液提取和 β-CD 提取方法中五种成分的提取转移率的比较图，图中 ** 表示与水提取相比有

显著性差异, $P < 0.01$, 图 7 中 A 展示水溶液提取方法中五种成分的提取转移率, 图 7 中 B 展示 β -CD 提取方法中五种成分的提取转移率。

[0161] 表 20 验证实验结果

[0162]

验证实验	编号	各成分提取转移率/%						综合评分	出膏率/%
		红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素			
β -CD	1	35.63	97.22	4.10	13.55	74.53	95.04	46.45	
	2	35.21	98.97	3.84	13.07	73.12	94.02	46.64	
	3	35.37	96.11	3.98	14.23	72.66	94.37	46.60	
	均值	35.40	97.43	3.97	13.62	73.44	94.48	46.56	
	SD	0.21	1.44	0.13	0.58	0.98	0.52	0.10	
H_2O	1	28.85	71.43	1.41	10.98	65.19	68.49	36.14	
	2	29.31	70.34	1.45	11.44	68.59	69.17	36.85	
	3	29.71	72.59	1.58	11.64	64.12	70.65	36.52	
	均值	29.29	71.45	1.48	11.35	65.96	69.44	36.51	
	SD	0.43	1.13	0.09	0.34	2.33	1.10	0.36	

[0163]

[0164] 结果表明, β -CD 溶液使复方血脂宁中 5 种指标性成分的提取转移率显著性提高, 但对不同种类化合物的影响程度不同, 其中对二苯乙烯苷、大黄素提取转移率影响较大, 对于红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、槲皮素的提取转移率有一定的影响, 对荷叶碱的提取转移率影响则较弱。

[0165] 通过对单因素考察及正交试验确立了 β -CD 辅助性提取中药复方血脂宁的最佳工艺, 以相同工艺分别以 β -CD 溶液和水溶液对复方血脂宁进行提取, 5 个指标成分的提取转移率均有显著性提高。与传统水提相比, β -CD 对 5 个指标成分具有显著的辅助性提取作用, 在对复方血脂宁的提取工艺中具有应用价值。

[0166] 3. 结论与讨论

[0167] 3.1 出膏率亦是提取工艺研究中考查工艺水平的重要评价指标, 其对于后续的制剂研究具有重要参考价值, 在一定范围内, 出膏率高意味着提取充分, 但其过高则说明提取方法没有针对性, 在提取活性成分的同时, 还增加了杂质的提取量, 且不利于制剂。本试验中以出膏率作为参考指标, 如表 17 所示, 3 号提取工艺の出膏率在 9 组实验中较为适中, 综合考虑 5 个指标成分的加权评分, 确定最佳工艺组合为 $A_1B_3C_3D_3$, 即采用 β -CD 加入量占复方药材总量 5%, 25 倍量回流提取 3 次, 每次 2h。 β -CD 辅助性提取所得出膏率对比水溶液提取有所提高 (表 20), 说明 β -CD 整体提高复方血脂宁的活性成分的提取转移率。

[0168] 3.2 β -CD 辅助提取均可使复方血脂宁中的 5 个指标成分提取转移率相对于水提取有显著性的提高, 对各成分提取转移率影响程度的不同可以说明 β -CD 对于各成分具有不同的选择提取能力, 其原因之一是其结构的不同使 β -CD 对它们具有不同的包合能力, 例如: 二苯乙烯苷中连有一个羟基的苯环易进入 β -CD 空腔中, 其中的羟基可在 β -CD 空腔内形成氢键, 有利于包合作用, 而荷叶碱为一种阿朴啡型生物碱, 结构中未连支链的苯环较容易进入到 β -CD 空腔中, 但甲氧基对这种包合造成了结构位阻, 不利于包合物的形成, 从而 β -CD 对荷叶碱的提取转移率影响较为微弱。为研究 β -CD 对各成分选择提取能力不

同的原因,将在 β -CD 与各成分的包合常数等方面进行探讨。

[0169] 本发明还分别测定了 5 个指标成分与 β -CD 的包合常数,研究了 β -CD 对水溶性较好的成分(红镰霉素-6-O- β -D-龙胆二糖苷、二苯乙烯苷)的稳定性的影响、以及水溶性较差的成分(大黄素、荷叶碱和槲皮素)的溶解度的影响,结果显示 β -CD 与 5 个指标成分发生包合作用,包合比均为 1:1,推断其对于各成分的辅助提取作用机理是 β -CD 与各成分发生包合作用,一方面增加了水难溶性成分在水的溶解度,从而增加提取过程中各成分在提取液中的浓度,另一方面提高了不稳定成分的稳定性,减少了各成分在提取过程中由于高温等作用发生降解而产生的损失,而 β -CD 对不同化合物选择提取能力不同的原因之一是其与不同结构类型化合物的包合能力不同。

[0170] 综上所述, β -CD 通过与 5 个指标成分发生包合作用,增加了其溶解度、提高了稳定性,从而显著性的提高了 5 个指标成分的提取转移率,说明其可辅助性提取复方中药复方中的活性成分,在复方提取工艺方面的应用有进一步研究的价值。

[0171] 各成分包合常数测定结果如表 21 所示,其中大黄素水溶性差,无法通过双倒数法测定其与 β -CD 的包合常数,因而采用相溶解度的方法,为使各成分间测定的包合常数具可比性,同时采用双倒数法及相溶解度法测定槲皮素的包合常数,测定结果显示两种测定方法测得结果虽有差别,但仍为同一数量级内,说明相溶解度法测得大黄素包合常数与其他 4 个成分双倒数法测得结果具有一定可比性。

[0172] 表 21 包合常数测定结果

[0173]

化合物名称	测定方法	回归方程	相关系数 r	包合常数 /L·mol ⁻¹
红镰霉素 龙胆二糖苷	双倒数法	$y = 0.0301x + 30.25$	0.9986	1005
二苯乙烯苷	双倒数法	$y = 0.0074x + 26.577,$	0.9947	3591
荷叶碱	双倒数法	$y = 0.1596x + 60.03$	0.9990	376
槲皮素	双倒数法	$y = 0.028x + 42.77$	0.9989	1502
	相溶解度法	$y = 0.00562x + 0.00000547$	0.9970	1033

[0174]

大黄素	相溶解度法	$y = 0.000064x + 0.000047$	0.9979	1362
-----	-------	----------------------------	--------	------

[0175] 从表 21 中可看出,二苯乙烯苷与 β -CD 包合常数最大,红镰霉素龙胆二糖苷、大黄素与槲皮素次之,荷叶碱较小,如表 20 所示, β -CD 对于各成分的选择提取能力与包合常数测定结果相吻合,据此推断, β -CD 对于包合常数较大物质的选择提取能力较强,辅助性提取作用越明显,提示 β -CD 对于与其包合能力较强的化学成分辅助性提取作用明显,不仅可应用于中药提取工艺,还可应用于某些成分对照品的制备,可减少有机溶剂的使用,从而保护生态环境。

[0176] β -CD 可增加红镰霉素龙胆二糖苷和二苯乙烯苷在高温(90℃)环境中的稳定性,一方面说明 β -CD 可在提取过程中通过增加成分稳定性,减少其在高温条件发生的降解,从而提高了二者的提取移率;另一方面 β -CD 辅助性提取后,提取物中各成分稳定性有一

定程度的提高,减少其在保存过程中的损失,从而增加了药材利用率。

[0177] 对水难溶成分(大黄素、荷叶碱及槲皮素)的增溶作用研究结果显示,β-CD对大黄素、荷叶碱及槲皮素均具有一定的增溶作用,可以推断,β-CD通过与化合物形成包合物后提高其在水中的溶解度,使该化合物的溶解平衡向右移动,使其更易从药材中向提取液转移。

[0178] 实施例 2

[0179] 复方血脂宁的原料药包括决明子、制首乌、荷叶、和山楂,所述决明子、制首乌、荷叶、和山楂的重量比例为 3:2:1.5:1,活性成分包括红镰霉素-6-O-β-D-龙胆二糖苷、二苯乙烯苷、大黄素、荷叶碱和槲皮素。

[0180] β-环糊精溶液中,β-环糊精的用量占所述复方血脂宁的原料药总重量的 5%、含有质量体积浓度为 0.08mg/mL 的 EDTA,其 pH 为 2.5~3.0,复方血脂宁的原料药与 β-环糊精溶液的料液比为 1:25。

[0181] 从复方血脂宁的原料药中提取活性成分的方法包括如下步骤:将原料药粉碎为 100 目的颗粒,之后再加入到 β-环糊精溶液中浸泡 1h,之后对所述原料药和 β-环糊精溶液的混合液回流提取 3 次,每次回流时间为 2h,其中,回流提取的第 1 次依次经过四个阶段并在每个阶段下持续一定时间,第一阶段首先对所述原料药和 β-环糊精溶液的所述混合液体积的 70% 的液体进行回流,之后第二、第三和第四阶段再分别加入剩余混合液体积的 1/3 进行回流。回流提取中,所述第一阶段持续 40min,所述第二和第三阶段分别持续 20min,所述第四阶段持续 40min。每个阶段之间加混合液时均至前一次的混合液冷却至室温时再添加。

[0182] 最后一次回流完成后,提取液趁热过滤,冷却至室温量取提取液的体积。移取 1mL 提取液置于 10mL 容量瓶中,以纯甲醇稀释定容,超声 30min,稀释液离心(12000rpm,10min)后取上清液过滤(0.22 μm),续滤液进样分析,计算各成分提取转移率。提取液浓缩后,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,干燥至恒重,取出,置干燥器内冷却后称重,计算浸膏得率,结果如表 22 所示。

[0183] 表 22 各成分提取转移率

[0184]

实验	各成分提取转移率/%						出膏率/%
	红镰霉素 龙胆二糖苷	二苯乙烯苷	大黄素	荷叶碱	槲皮素	综合 评分	
实施例 2	38.75	99.09	4.21	13.77	74.32	95.72	48.34

[0185] 科学合理的中药提取工艺,对于传统中药的继续开发、药理学深入研究、中药剂型研制、提高中药产品生产效率等方面具有重要和深远的意义。对于中药提取工艺的研究,需要根据中药材特点、提取目标成分特性的不同,合理选择工艺优化的统计学方法,综合考虑、全面把握影响提取效率的各种因素,尽可能使活性成分、有效组分的提取效率提高,增强提取工艺的可控性,使中药提取工艺研究向高效、可控、节能方向发展。

[0186] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限

于特定的细节和这里示出与描述的图例。

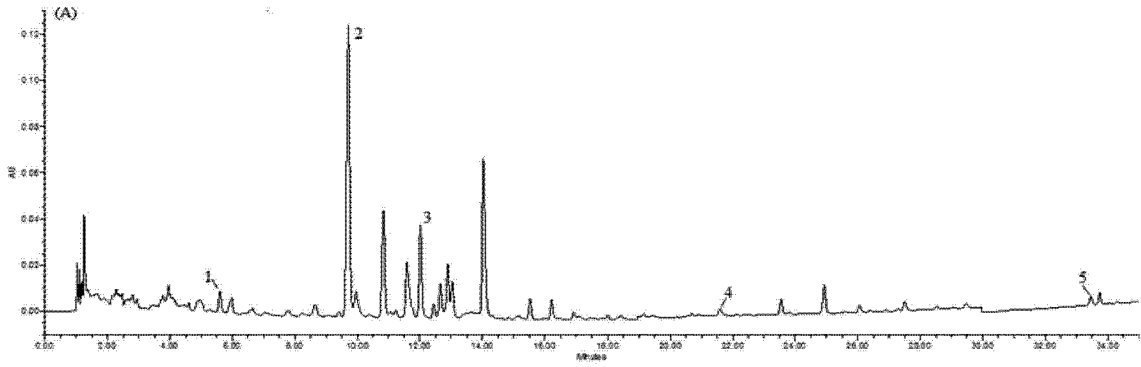


图 1A

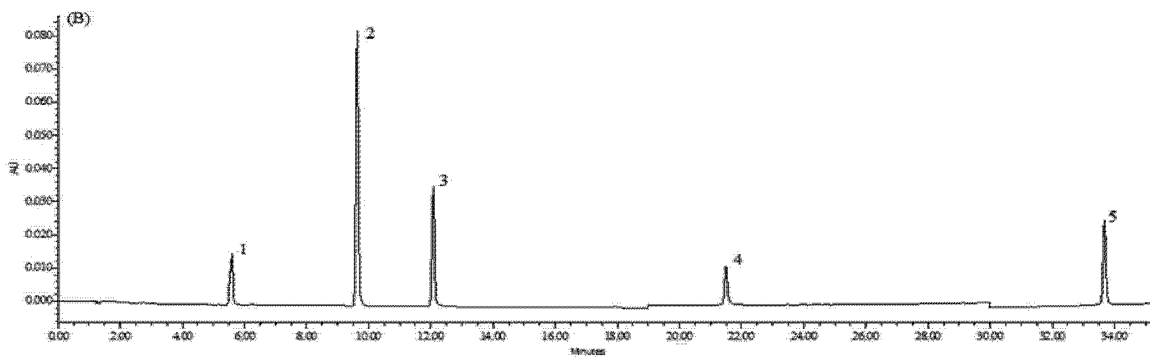


图 1B

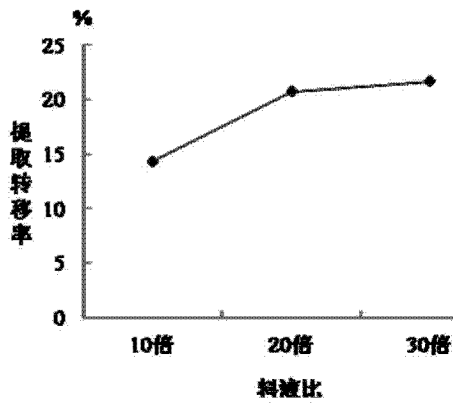


图 2A

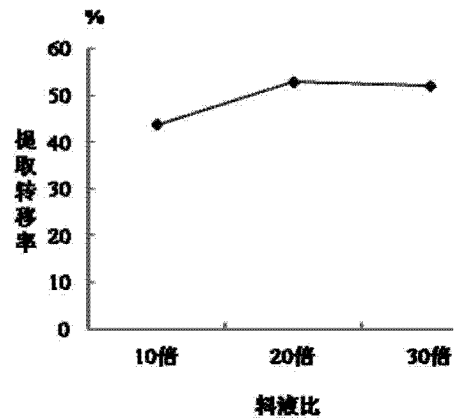


图 2B

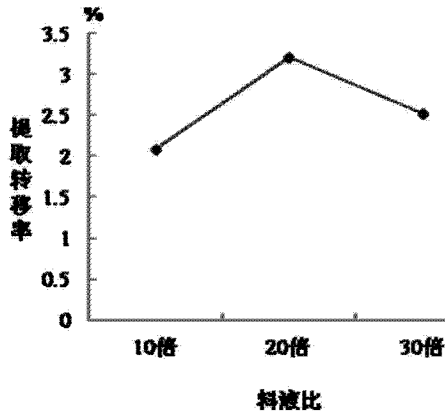


图 2C

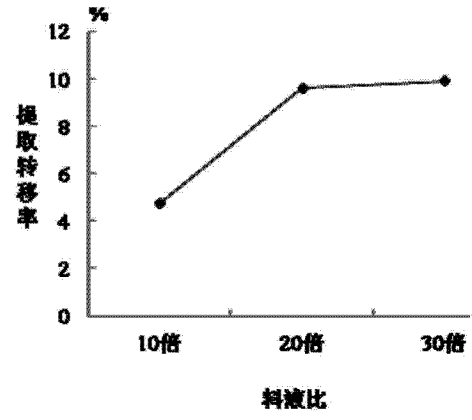


图 2D

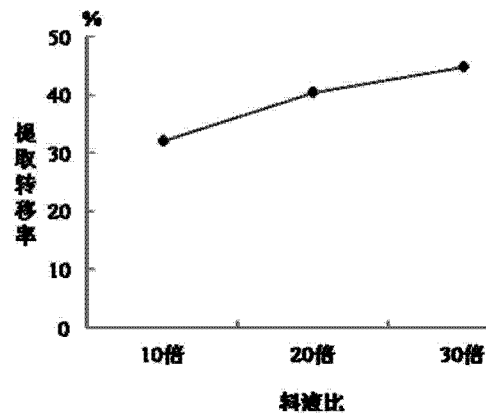


图 2E

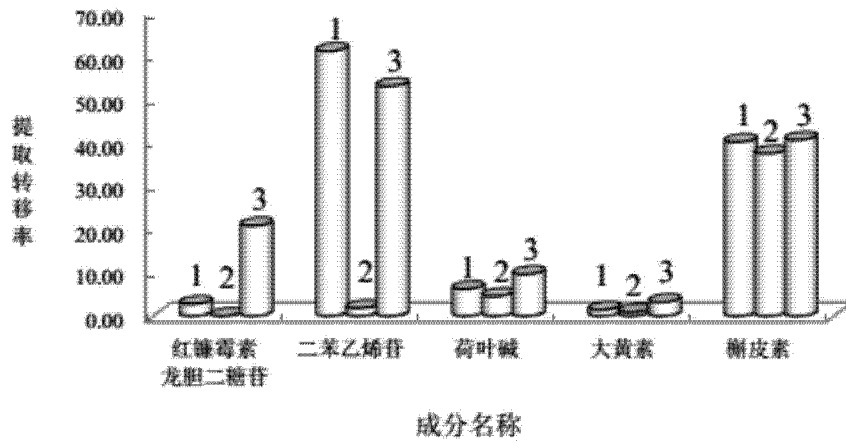


图 3

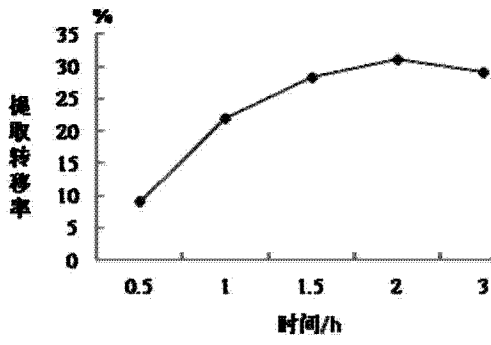


图 4A

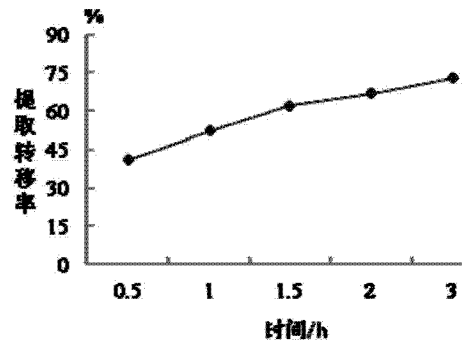


图 4B

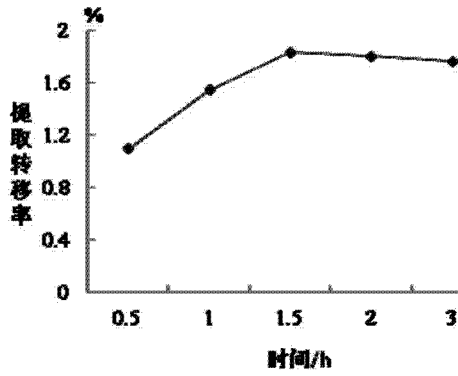


图 4C

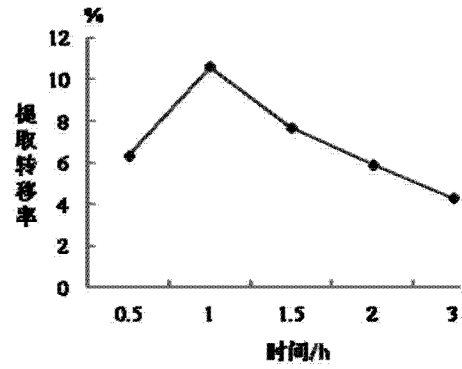


图 4D

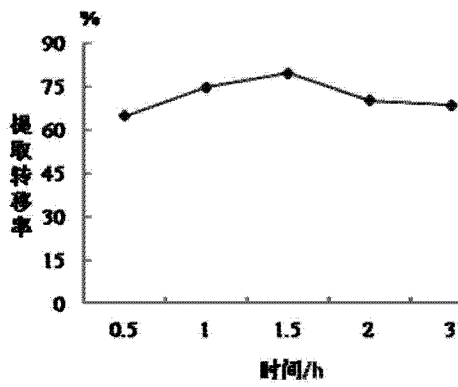


图 4E

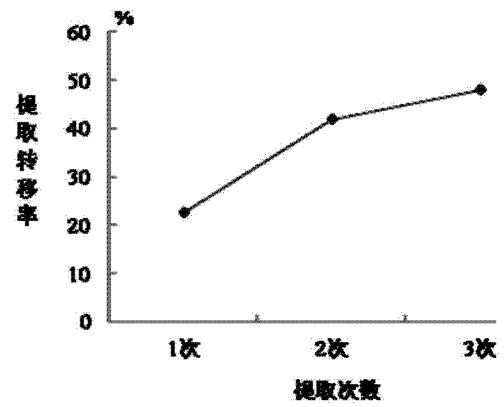


图 5A

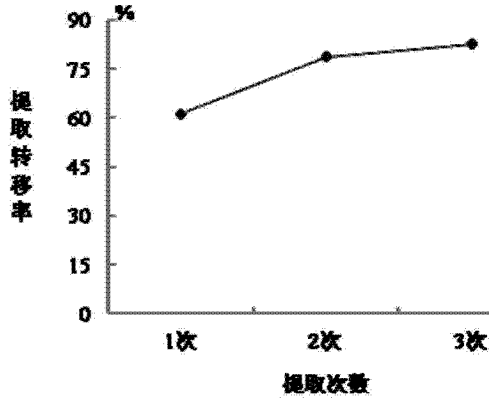


图 5B

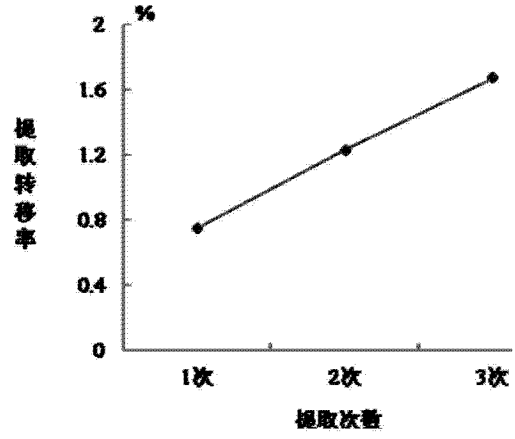


图 5C

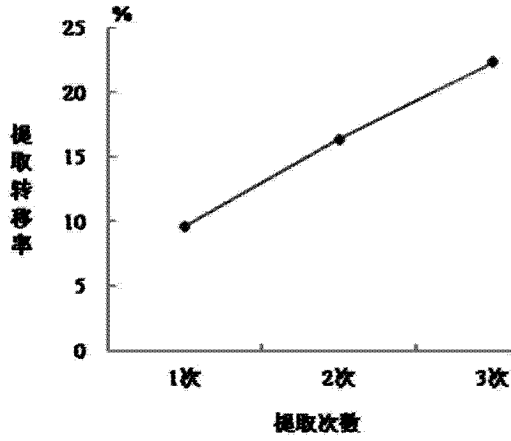


图 5D

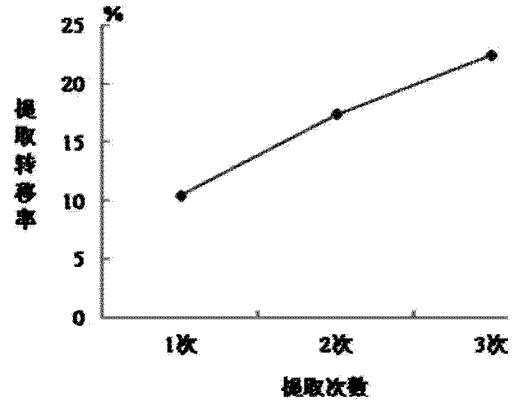


图 5E

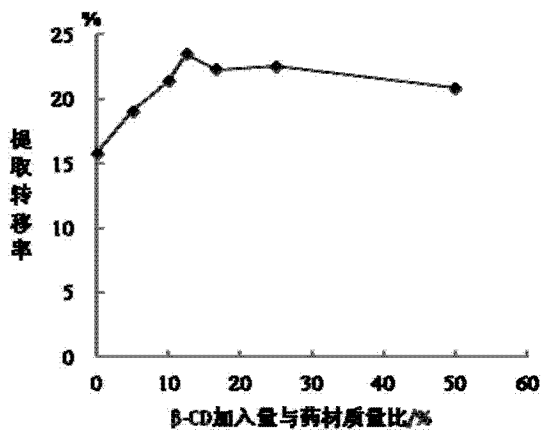


图 6A

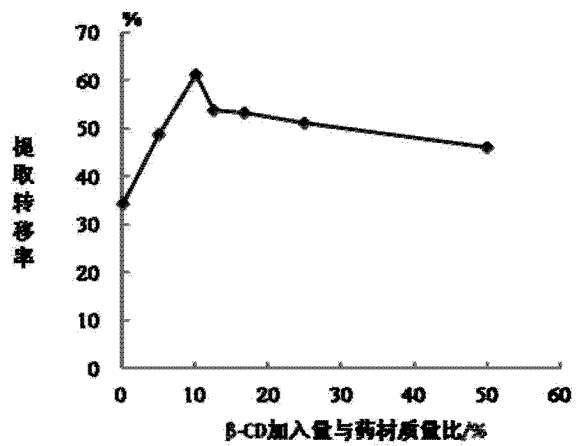


图 6B

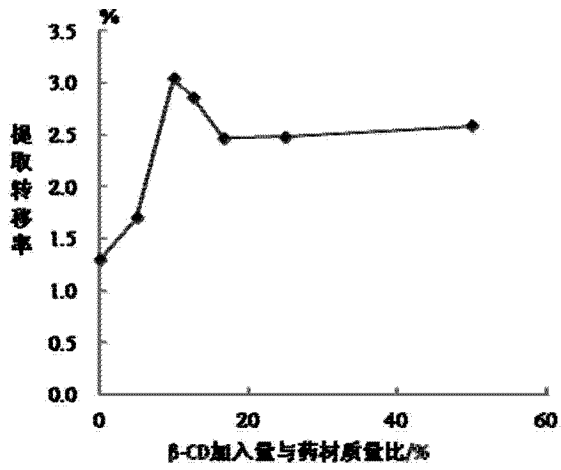


图 6C

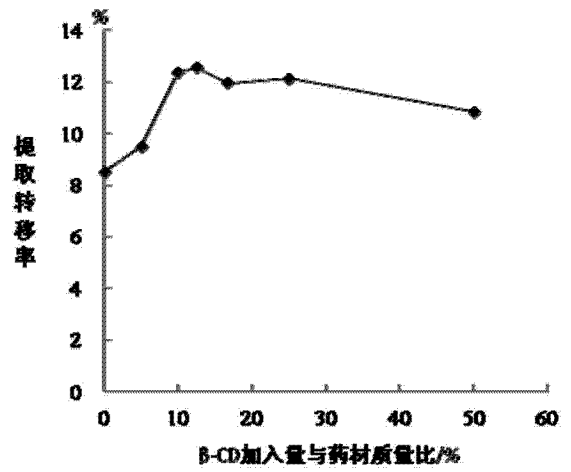


图 6D

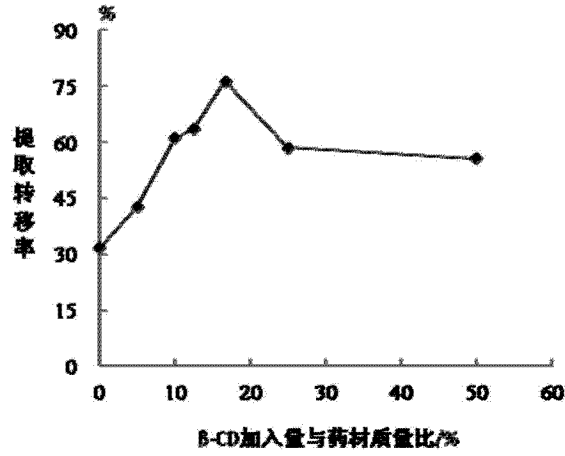


图 6E

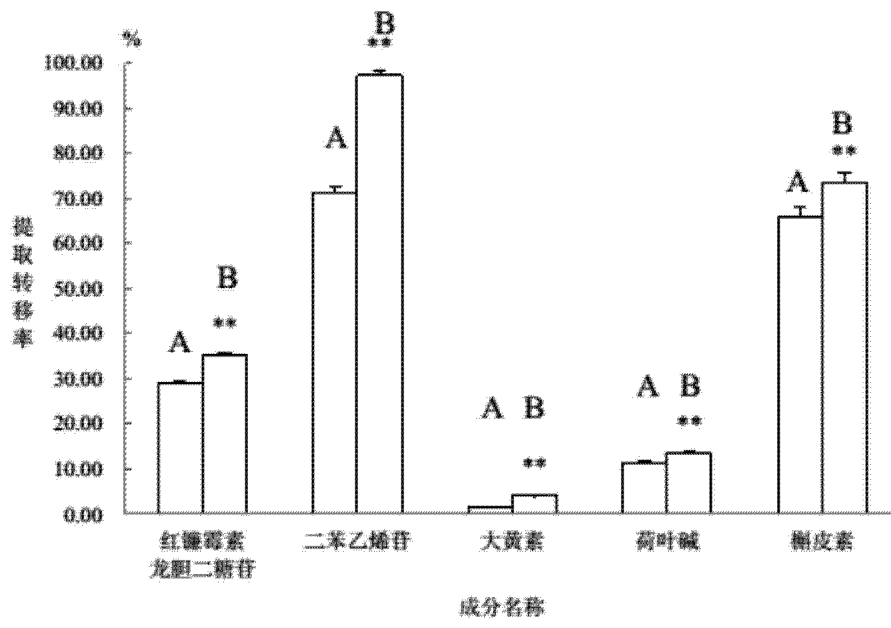


图 7