

多指标正交试验优选桂枝甘草汤提取工艺

曹英杰, 原双兴, 王贺, 朱明军, 王永霞*
(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] **目的:** 优选桂枝甘草汤的提取工艺。**方法:** 采用 HPLC 测定甘草苷、肉桂酸、桂皮醛及甘草酸含量, 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% A; 10~15 min, 20%~23% A; 15~30 min, 23%~32% A; 30~40 min, 32%~35% A; 40~50 min, 35%~40% A; 50~60 min, 40%~50% A), 检测波长 254 nm。以甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和浸出物提取量的综合评分为指标, 采用正交试验考察加水量, 提取次数, 提取时间对提取工艺的影响。**结果:** 桂枝甘草汤的最佳提取条件为加 12 倍量水回流提取 3 次, 每次 1 h; 甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸及浸出物提取量分别为 5.93, 11.73, 12.25, 12.34, 172.86 mg·g⁻¹。**结论:** 多指标综合加权法能较为合理地反映桂枝甘草汤的整体药效, 为该方的临床应用与开发提供实验依据。

[关键词] 综合加权评分法; 桂枝甘草汤; 甘草苷; 肉桂酸; 桂皮醛; 甘草酸

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0035-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210035

Optimization of Extraction Process of Guizhi Gancao Tang by Multi-index Orthogonal Test

CAO Ying-jie, YUAN Shuang-xing, WANG He, ZHU Ming-jun, WANG Yong-xia*

(The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction procedure of Guizhi Gancao Tang. **Method:** Contents of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and glycyrrhizic acid were determined by HPLC, mobile phase was consisted of acetonitrile (A)-water containing 0.1% phosphoric acid (B) for gradient elution (0-10 min, 5%-20% A; 10-15 min, 20%-23% A; 15-30 min, 23%-32% A; 30-40 min, 32%-35% A; 40-50 min, 35%-40% A; 50-60 min, 40%-50% A), detection wavelength was at 254 nm. Orthogonal design was adopted to optimize extraction process with composite score of contents of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and glycyrrhizic acid as index, the amount of water, extracting time and times as factors. **Result:** Optimal extraction technology was: extracted thrice with 12 times the amount of water for 1.0 h each time; extracting amounts of liquiritin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and glycyrrhizic acid were 5.93, 11.73, 12.25, 12.34, 172.86 mg·g⁻¹. **Conclusion:** Synthetic weighted mark method can reasonably reflect overall efficacy of Guizhi Gancao Tang, this article provides experimental basis for clinical application and development of this compound.

[Key words] comprehensive weighted scoring method; Guizhi Gancao Tang; liquiritin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; glycyrrhizic acid

[收稿日期] 20140417(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102698); 河南省高校科技创新团队支持计划项目(13IRTSTHN012); 河南中医学院科技创新团队支持计划项目(2010XCXTD10)

[第一作者] 曹英杰, 硕士, 初级药师, 从事中药质量控制及有效物质基础研究, Tel: 0373-66633639, E-mail: ssilienty@163.com

[通讯作者] *王永霞, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治心血管疾病研究, Tel: 0373-66633639, E-mail: wyxchzq@163.com

桂枝甘草汤为汉代著名医家张仲景温阳益气、治疗心悸的基础方,《伤寒论》^[1]对该复方的描述为“发汗过多,其人叉手自冒心,心下悸,欲得按者,桂枝甘草汤主之”。方中巧用桂枝之辛,入心助阳,与炙甘草之辛、甘相配,辛甘合用,阳气乃生,以通阳复脉^[2]。该方古煎煮及服用法为桂枝四两(去皮),甘草二两(炙),上二味,以水三升,煮取一升,去滓,顿服^[1]。张学兰等^[3]以肉桂酸、甘草次酸、挥发油、总黄酮及干浸膏等为考察指标,采用均匀设计法优选桂枝甘草汤的提取工艺,未对经现代药理研究证实的方中有效成分——甘草苷、桂皮醛及甘草酸^[4-6]进行考察,而且甘草次酸和肉桂酸测定时采用了不同色谱条件,方法较为繁琐。由于桂皮醛的稳定性较差,易转化为肉桂酸造成肉桂酸含量变化,为更加精确、便捷反映该方剂中有效成分的含量变化,本实验选取甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸和浸出物含量的综合评分为指标,通过调整桂皮醛权重系数以反映挥发油含量,采用正交试验优选桂枝甘草汤的提取工艺参数,为该复方的开发与利用提供参考。

1 材料

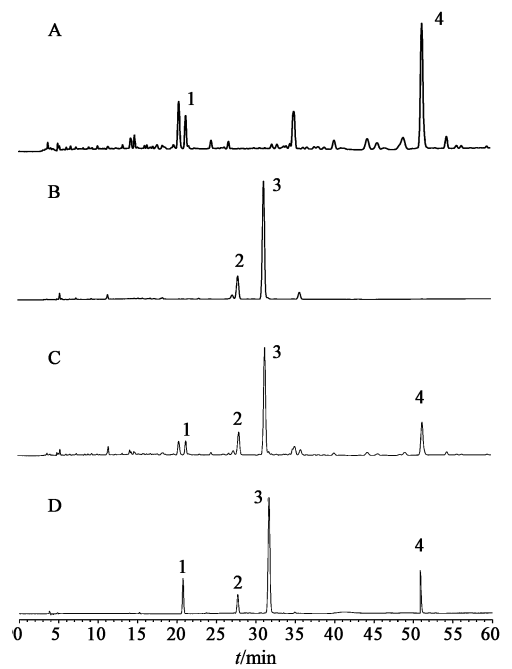
1260 型高效液相色谱仪(G4212 型紫外检测器,美国安捷伦公司),CF225D 型电子天平(德国赛多利斯集团)。桂枝、炙甘草饮片均购自江阴药业有限公司,经河南中医学院第一附属医院陈天朝主任药师鉴定,分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎和樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝;甘草苷、甘草酸铵、肉桂酸、桂皮醛(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111610-201106,110731-201116,110786-200503,110710-201016),乙腈、磷酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% A; 10~15 min, 20%~23% A; 15~30 min, 23%~32% A; 30~40 min, 32%~35% A; 40~50 min, 35%~40% A; 50~60 min, 40%~50% A),检测波长 254 nm,柱温 25 °C,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,见图 1。

2.1.2 线性关系考察 精密称取各指标成分对照品适量,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至



A. 炙甘草煎液; B. 桂枝煎液; C. 供试品; D. 混合对照品;
1. 甘草苷; 2. 肉桂酸; 3. 桂皮醛; 4. 甘草酸铵

图 1 桂枝甘草汤 HPLC

刻度,配置成每 1 mL 分别含桂皮醛、肉桂酸、甘草苷、甘草酸铵 67.17, 2.90, 40.40, 57.34 μg 的混合对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 2 \times 10^6 X - 98\ 232$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 7 \times 10^6 X - 12\ 196$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 7.40 \times 10^5 X - 13\ 931$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 9.50 \times 10^5 X - 25\ 001$ ($r = 0.999\ 8$), 线性范围依次为 0.335 8~2.015 1, 0.014 5~0.087, 0.202~1.210, 0.286 7~1.720 2。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例平行称取桂枝 12 g 和炙甘草 6 g,各 9 份,随机分为 9 个组方(18 g),按一定试验条件进行提取,提取液于 3 000 r·min⁻¹离心 15 min,滤过,滤液置 1 L 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 浸出物的含量测定 精密移取 2.1.3 项下供试品溶液 25 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿上,水浴蒸干,于 105 °C 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量^[7],计算浸膏得率。

2.3 正交试验设计 在预试验基础上,选取加水量、提取次数、提取时间为考察因素,每个因素选取 3 个水平,以桂枝甘草汤中 4 个指标性成分和浸出物含量的综合评分为指标,设定综合评分总分为 7,其中甘草苷、甘草酸和肉桂酸提取量的权重系数均

为1,浸出物和桂皮醛提取量权重系数均为2。按处方比例称取桂枝12 g和炙甘草6 g,共9份,采用

$L_9(3^4)$ 正交表设计试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。

表1 桂枝甘草汤提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 提取数 /次	C 提取时间 /h	D(空白)	提取量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$					综合评分
					甘草苷	肉桂酸	桂皮醛	甘草酸	浸出物	
1	8	1	1	1	2.88	3.04	5.24	6.17	114.89	3.34
2	8	2	1.5	2	4.80	3.44	8.65	10.43	155.67	5.03
3	8	3	2	3	5.97	3.96	9.84	12.36	174.67	5.82
4	10	2	1	3	3.31	6.26	5.82	6.41	104.22	3.68
5	10	3	1.5	1	5.55	7.48	7.95	9.50	165.00	5.42
6	10	1	2	2	4.88	7.70	10.13	11.73	167.11	5.86
7	12	3	1	2	3.60	9.79	6.53	7.82	111.44	4.33
8	12	1	1.5	3	5.05	11.76	9.70	10.73	156.11	5.96
9	12	2	2	1	5.96	11.70	13.28	11.44	154.22	6.69
K_1	4.730	3.783	5.053	5.150						
K_2	4.987	5.470	5.133	5.073						
K_3	5.660	6.123	5.190	5.153						
R	0.930	2.340	0.137	0.080						

表2 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	1.384	0.692	112.635	<0.01
B	8.747	4.374	711.805	<0.01
C	0.028	0.014	2.302	>0.05
D(空白)	0.012	0.006		

注: $F_{0.05}(2,2)=19$, $F_{0.01}(2,2)=99$ 。

由直观分析可知,各因素影响桂枝甘草汤提取工艺顺序为 $B > A > C$ 。方差分析表明A,B因素均对提取工艺具有极显著性影响,因素C则无显著性影响,确定最佳提取工艺为 $A_3B_3C_1$,即加12倍量水回流提取3次,每次1 h。按处方比例称取桂枝12 g和炙甘草6 g,共3份,按优选的工艺条件进行验证试验,结果甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸及浸出物提取量平均值分别为5.93,11.73,12.25,12.34,172.86 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD依次为0.72%,1.1%,1.3%,0.87%,1.5%,表明该工艺稳定可行,重复性良好。

3 讨论

2010年版《中国药典》中甘草和桂枝含量测定的检测波长分别为237,290 nm。在前期试验采用HPLC-DAD建立桂枝甘草汤指纹图谱的过程中发现,选取检测波长237 nm时基线漂移较为明显,选取290 nm时甘草酸铵的响应值非常低,可能会影响测定结果的准确性,而在254 nm处检测出的色谱峰

较多且分离度较好,能较全面反映该复方的化学成分,且选取的指标成分在该波长处均有较好的响应值。

桂枝甘草汤以桂枝为君,甘草为辅^[8],具有温阳益气、治疗心悸的功效。桂皮醛和肉桂酸为方中君药的主要成分,具有降压、改善心脏供血、抗血小板聚集等药理作用^[4,6],且桂皮醛占桂枝挥发油含量的60%~80%^[9];甘草苷和甘草酸为炙甘草中主要活性成分,具有保护心肌细胞损伤、抗心律失常、降血脂等作用^[5];浸出物中含有黄酮类化合物等非挥发性成分,挥发油和浸出物能较全面反映全方的药效物质基础。故本文增加桂皮醛的权重系数以同时反映君药的作用和挥发油类药效物质的含量,增加浸出物的权重系数以反映全方非挥发性药效物质含量。本文综合桂枝甘草汤中4个主要活性成分及浸出物提取量为指标,通过加权评分法优选提取工艺,符合中药多靶点及桂枝为君、甘草为辅的组方特性^[8],较选择单一指标进行提取工艺考察更为合理。

[参考文献]

- [1] 张仲景. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:41.
- [2] 王秋,王占石. 桂枝甘草汤温经通脉的药效学研究[J]. 中医药研究,2002,18(5):41.

养正消积胶囊真空带式干燥工艺优选

陈红专, 张静*, 王青, 王燕臣, 王晓楠
(石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] 目的:优化养正消积胶囊浸膏真空带式干燥的工艺参数。方法:采用 HPLC-ELSD 测定齐墩果酸含量,流动相乙腈-甲醇-0.5%乙酸(20:70:10)。以干膏含水率和齐墩果酸转移率为评价指标,采用正交试验考察进料速度、履带速度、加热系统温度对养正消积胶囊浸膏真空带式干燥工艺的影响。结果:最佳带式干燥工艺条件为履带速度 $6 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$,进料速度 $12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,干燥温度 $110 \text{ }^\circ\text{C}$,物料温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,冷却区温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$,浸膏初始含固量约 45%,真空度 $< -0.1 \text{ MPa}$;干膏含水率 2.62%,RSD 1.2%;齐墩果酸转移率 95.4%,RSD 0.42%。结论:优选的真空带式干燥工艺合理可行,干膏含水率低,质量好,适合养正消积胶囊的大生产推广。

[关键词] 养正消积胶囊;真空带式干燥法;齐墩果酸;含水量

[中图分类号] R283.6;R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0038-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210038

Optimization of Vacuum-belt Drying Process of Yangzheng Xiaoji Capsules

CHEN Hong-zhuan, ZHANG Jing*, WANG Qing, WANG Yan-chen, WANG Xiao-nan
(Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co. Ltd, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize vacuum-belt drying process parameters of Yangzheng Xiaoji capsules extract. **Method:** HPLC-ELSD was employed to determine the content of oleanolic acid with mobile phase of acetonitrile-methanol-0.5% acetic acid (20:70:10). Taking water content of dry extract and transport rate of oleanolic acid as indicators, orthogonal design was adopted to investigate effects of feeding speed, belt speed and heating system temperature on vacuum-belt drying process of Yangzheng Xiaoji capsules. **Result:** Optimal parameters of vacuum-belt drying process were as follows: belt speed of $6 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, feeding speed of $12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, heating system temperature at $110 \text{ }^\circ\text{C}$, material temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$, cooling zone temperature at $45 \text{ }^\circ\text{C}$,

[收稿日期] 20140402(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-306)

[第一作者] 陈红专,硕士,高级工程师,从事药品生产工艺技术改进和优化研究,Tel:0311-87223205,E-mail:chz1012@sina.com

[通讯作者] *张静,硕士,中级工程师,从事药品研发与申报,Tel:0311-85901749,E-mail:fr45_419@163.com

- [3] 张学兰,徐萍.均匀设计优选桂枝甘草汤的半仿生提取工艺条件[J].中成药,2006,28(8):1116.
- [4] 许卷卷,吴玉彬,何意林.肉桂酸的合成与应用[J].甘肃石油和化工,2008(4):14.
- [5] 郝飞.甘草酸国外研究进展[J].中国药房,2001,12(8):500.
- [6] 张荣发.桂皮醛的药理作用研究进展[J].中国药业,2008,17(10):75.
- [7] 郑礼娟,秦昆明,蔡皓,等.多指标正交试验优选白术芍药散提取工艺[J].中国中药杂志,2013,38(10):1504.
- [8] 吕英,高洁.桂枝甘草汤“辛甘化阳”配伍的实验研究[J].中药材,2010,23(8):256.
- [9] 邱琴,刘廷礼,崔兆杰,等.桂枝挥发油化学成分的GC/MS分析[J].药物分析杂志,2000,20(4):248.

[责任编辑 刘德文]