

正交试验优选平唐复方的醇提工艺和水提工艺

周晶, 李玲, 王冰, 王成荣, 张彤*, 袁秀荣*

(上海中医药大学 中药产学研合作中心, 教学实验中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 优选平唐复方醇提工艺和水提工艺。**方法:** 选择提取时间、乙醇体积分数和乙醇用量为考察因素, 以藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚转移率及干膏得率的综合评分为指标, 采用正交试验优选醇提工艺。选择浸泡时间、加水量和提取时间为考察因素, 葛根素、阿魏酸转移率及干膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验优选水提工艺。**结果:** 最佳醇提工艺为当归、桂枝和细辛药材加 8, 6 倍量 50% 乙醇提取 2 次, 每次 0.5 h; 藁本内酯、桂皮醛及甲基丁香酚转移率分别为 72.8%, 70.5%, 82.3%, 干膏得率 27.8%。最佳水提工艺为醇提后的药渣与葛根药材浸泡 30 min, 加 12 倍量水提取 3 次, 每次 0.5 h; 葛根素和阿魏酸转移率分别为 60.28% 和 21.89%, 干膏得率 18.43%。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 醇溶性和水溶性有效成分提取率高, 为平唐复方的药效评价提供了实验依据。

[关键词] 平唐复方; 藁本内酯; 桂皮醛; 甲基丁香酚; 葛根素; 阿魏酸; 干膏得率

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0026-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220026

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1036.012.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 10:36

Optimization of Extraction Process for Pingtang Compound by Orthogonal Test

ZHOU Jing, LI Ling, WANG Bing, WANG Cheng-rong, ZHANG Tong*, YUAN Xiu-rong*

(Experiment Center of Teaching and Learning, Collaboration Center of Industry-University for Chinese Medicine Development, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize alcohol and water extraction processes of Pingtang compound. **Method:** Taking extraction time, the amount and concentration of ethanol as factors, orthogonal test was adopted to optimize alcohol extraction process with composite score of dry extract yield, transfer rates of ligustilide, cinnamic aldehyde and methyl eugenol as index. Taking soaking time, the amount of water and extraction time as factors, orthogonal test was adopted to optimize water extraction process with composite score of dry extract yield, transfer rates of puerarin and ferulic acid as index. **Result:** Optimum alcohol extraction conditions of Angelicae Sinensis Radix, Cinnamomi Ramulus, Asari Radix et Rhizoma was reflux extracting twice with 8 and 6 times of 50% ethanol for 0.5 h of each time. Transfer rates of ligustilide, cinnamic aldehyde, methyl eugenol and dry extract yield was 72.8%, 70.5%, 82.3%, 27.8%, respectively. Optimal water extraction process for residue after alcohol extraction with Puerariae Lobatae Radix was soaking 30 min and decocting thrice with 12 times of water for 0.5 h of each time. Transfer rates of puerarin and ferulic acid was 60.28% and 21.89%, dry extract yield was 18.43%. **Conclusion:** These optimized extraction processes are stable and reproducible with high extracting rates of active ingredients in Pingtang compound.

[收稿日期] 20151217(001)

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研项目(13401900301);上海市人才发展项目(2011015)

[第一作者] 周晶,在读硕士,从事中药新药研究, Tel:021-51322685, E-mail: zj54603007@163.com

[通讯作者] *张彤,博士,教授,从事中药制药及中药分析技术研究, Tel:021-51322318, E-mail: zhangtdmj@hotmail.com;

*袁秀荣,博士,研究员,从事中药新药研究与开发, Tel:021-51322044, E-mail: yuany@189.cn

[Key words] Pingtang compound; ligustilide; cinnamic aldehyde; methyl eugenol; puerarin; ferulic acid; dry extract yield

平唐复方为厦门大学附属医院的临床经验方,从当归四逆汤化裁而来,由葛根、当归、桂枝、北细辛组成,4 味药均为《中国药典》2015 年版收载品种。该复方具有活血化瘀、疏经通脉的功效,临床用于消渴病属脉络瘀阻证(diabetic peripheral neuropathy, DPN)。DPN 在初期不易受到患者重视,后期则难以治疗。现代医学对 DPN 的主要治疗方法包括纠正代谢紊乱、改善微循环、改善神经营养障碍、神经减压术、控制血糖^[1],但仍缺乏十分有效的治疗手段,因此必须针对整体和潜在发病机制的各种因素采取综合治疗。平唐复方中葛根为君药,发挥生津、止渴功效;当归为臣药,养血活血通经;桂枝、细辛取其辛温之性,外温经,内温藏,重养肝血,辅以温经、散寒、活血、通络。临床证实该方治疗 DPN 的效果较好,能有效地缓解 DPN 麻、冷、痛的症状,并能有效降低血糖^[2-3]。

《神农本草经》中记载葛根具有治疗消渴的作用^[4],现有文献报道葛根、桂枝的水煎液均具有降糖作用^[5-6]。当归中不仅阿魏酸具有镇痛作用,同时水溶性的当归多糖也具有降血糖、镇痛的作用^[7]。细辛非挥发油部分同样具有镇痛抗炎的疗效^[8]。故可选择水提法,以达到较好的镇痛、降糖等疗效。桂皮醛、藁本内酯、甲基丁香酚等脂溶性成分具有一定抗炎镇痛的作用,多采用醇提法提取这类脂溶性成分^[9-11]。为更好地发挥疗效,针对平唐复方的组成特点,采用当归、桂枝、细辛先进行醇提,药渣过滤后与葛根合并进行水提^[12],通过正交试验优化该方的醇提和水提工艺,为后续的药效筛选提供实验基础。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BS-124S 型电子天平(德国赛多利斯公司),DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),TGL-20B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),XS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

葛根、当归、桂枝、细辛均购自上海康桥中药饮片有限公司,批号分别为 141202,141117,141204 和 141129,经上海中医药大学高级实验师李俊松鉴定,均符合《中国药典》2015 年版(一部)的相关要求;葛根素、阿魏酸、桂皮醛和甲基丁香酚对照品(中国

食品药品检定研究院,批号分别为 110752-201313,110773-201313,110710-201418,111642-200301),藁本内酯对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 Z03D5B1),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 干膏得率的测定 精密称取样品液 25 mL,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,置于 105 °C 烘箱中干燥至恒重,取出,迅速置于干燥器冷却 30 min,精密称定,计算干膏得率。

2.2 藁本内酯的含量测定

2.2.1 色谱条件^[13] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(70:30),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 330 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。理论板数按藁本内酯计 > 5 000。

2.2.2 对照品储备液的制备 精密称定藁本内酯对照品适量,加甲醇制成 0.738 g·L⁻¹ 对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品溶液,过滤,精密移取 1.0 mL 用 50% 乙醇定容至 10 mL,即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按处方比例称取除当归以外的其余药材,提取后按 2.2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.5 线性关系考察 取藁本内酯对照品储备液适量,加甲醇制备质量浓度分别为 369.0,147.6,73.80,29.52,14.76,7.380 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 15.731X - 49.042$ ($r = 0.999$),线性范围 7.380 ~ 369.0 mg·L⁻¹。

2.3 桂皮醛的含量测定

2.3.1 色谱条件^[14] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(28:72),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 290 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。理论板数按桂皮醛计 > 3 000。

2.3.2 溶液的制备 精密称定桂皮醛对照品适量,加甲醇制成 1.025 3 g·L⁻¹ 对照品储备液。供试品溶液的制备同 2.2.3 项。按处方比例称取除桂枝外其余药材,提取后按 2.2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.3.3 线性关系考察 取桂皮醛对照品储备液适

量,加甲醇制备质量浓度分别为 205.06,102.35,51.265,20.506,10.253,5.126 5 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 148.93X - 255.08$ ($r = 0.9997$),线性范围 5.126 5 ~ 205.06 mg·L⁻¹。

2.4 甲基丁香酚的含量测定

2.4.1 色谱条件^[15] DiamonsilTM Plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.085% 磷酸水溶液 (37:63),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,进样量 10 μL,柱温 30 °C。理论板数按甲基丁香酚计 > 3 000。

2.4.2 溶液的制备 精密称定甲基丁香酚对照品适量,加甲醇制成 1.034 6 g·L⁻¹ 对照品储备液。取样品溶液于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,得供试品溶液。按处方比例称取除细辛外其余药材,提取后按供试品溶液制备方法制备阴性样品

溶液。

2.4.3 线性关系考察 取甲基丁香酚对照品储备液适量,加甲醇制备质量浓度分别为 517.30,206.92,103.46,51.730,20.692,10.346,5.173 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。按 2.4.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 12.377X - 11.648$ ($r = 0.9999$),线性范围 5.173 ~ 517.30 mg·L⁻¹。

2.5 醇提工艺优选 单因素试验结果表明回流提取 2 次,藁本内酯、桂皮醛和甲基丁香酚的转移率均 > 50%,故选择回流法提取,提取数为 2 次。按处方比例称取当归 15 g,桂枝 10 g 和细辛 3 g,选择提取时间、乙醇体积分数和乙醇用量为考察因素,选用 L₉(3⁴) 正交表设计试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。以藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚转移率及干膏得率的综合评分为指标^[16],权重系数分别为 0.3,0.3,0.3,0.1。

表 1 平唐复方醇提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of alcohol extraction process of Pingtang compound

No.	A 提取时间 /h	B 乙醇体积分数/%	C 乙醇用量/倍	D (空白)	转移率/%			干膏得率 /%	综合评分
					藁本内酯	桂皮醛	甲基丁香酚		
1	0.5	50	8,6	1	64.38	66.48	78.06	24.2	86.74
2	0.5	60	10,8	2	68.95	69.76	85.03	23.7	92.08
3	0.5	70	12,10	3	72.92	67.69	50.28	23.0	80.29
4	1.0	50	10,8	3	78.18	70.92	71.27	29.0	93.03
5	1.0	60	12,10	1	74.24	75.05	48.78	27.4	84.67
6	1.0	70	8,6	2	66.22	66.65	47.17	24.9	76.85
7	2.0	50	12,10	2	74.66	75.85	52.44	29.5	87.15
8	2.0	60	8,6	3	71.34	75.19	48.16	28.9	83.90
9	2.0	70	10,8	1	72.74	71.94	44.61	27.0	81.26

表 2 醇提工艺方差分析

Table 2 Analysis of variance for alcohol extraction process

方差来源	SS	F	P
A	8.006	2.142	> 0.05
B	149.752	40.073	< 0.05
C	64.572	17.279	> 0.05
D(误差)	3.74		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对醇提工艺的影响顺序为 $B > C > A$ 。方差分析显示因素 B 具有显著性影响,因素 A 和 C 则无显著性影响,从节约时间和能源的角度考虑,选择最佳醇提工艺组合 $A_1B_1C_1$,

即分别加 8,6 倍量 50% 乙醇提取 2 次,每次 0.5 h。按处方量称取当归 15 g,桂枝 10 g 和细辛 3 g,平行 3 份,按最佳工艺进行提取,结果藁本内酯、桂皮醛及甲基丁香酚转移率分别为 72.8%,70.5%,82.3%,RSD 依次为 4.3%,3.0%,3.4%,干膏得率 27.8%,RSD 2.0%。表明该工艺合理、可行。

2.6 葛根素的含量测定

2.6.1 色谱条件^[17] DiamonsilTM Plus C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.085% 磷酸水溶液 (25:75),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 250 nm,进样量 10 μL,柱温 30 °C。理论板数按葛根素计 > 4 000。

2.6.2 溶液的制备 精密称定葛根素对照品适量,

加 30% 乙醇制成 $989.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品储备液。取样品溶液过滤,精密移取 0.5 mL ,用 25% 甲醇定容至 10 mL ,得供试品溶液。按处方比例称取除葛根外的其余药材,提取后按供试品溶液的方法制备阴性样品溶液。

2.6.3 线性关系考察 取葛根素对照品储备液适量,制备质量浓度分别为 $791.504, 494.690, 197.876, 98.938, 49.469, 19.7936, 9.8938 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 45.762X - 35.834 (r = 0.999)$,线性范围 $9.8938 \sim 791.504 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.7 阿魏酸的含量测定

2.7.1 色谱条件^[14] DiamonsilTM Plus C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相乙腈-0.085% 磷酸水溶液 (13:87),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 316 nm ,进样量 $10 \mu\text{L}$,柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。理论板数按阿魏酸计 >5000 。

2.7.2 溶液的制备 精密称定阿魏酸对照品适量,

加 70% 甲醇制成 $0.738 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品储备液。取样品溶液按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液。按处方比例称取除当归外的其余药材,提取后按 2.4.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.7.3 线性关系考察 取阿魏酸对照品储备液适量,制备质量浓度分别为 $405.2, 104.3, 50.65, 20.26, 10.43, 5.065, 2.026 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.7.2 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标。得回归方程 $Y = 55.063X - 86.667 (r = 0.999)$,线性范围 $2.026 \sim 405.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.8 水提工艺优选 单因素试验表明提取 3 次时,葛根素转移率 $>50\%$,故选择提取数 3 次。选择浸泡时间、加水量和提取时间为考察因素,葛根素、阿魏酸转移率及干膏得率的综合评分为指标,权重系数分别为 $0.4, 0.2, 0.4$ 。按 2 倍处方量称取葛根饮片 40 g ,与相应醇提后的药渣混合,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,试验安排及结果见表 3,方差分析见表 4。

表 3 平唐复方水提工艺正交试验分析

Table 3 Orthogonal test analysis of water extraction process of Pingtang compound

No.	A 浸泡时间 /min	B 提取时间 /h	C 加水量 /倍	D (空白)	转移率/%		干膏得率 /%	综合评分
					葛根素	阿魏酸		
1	30	0.5	8	1	45.23	23.80	15.48	66.44
2	30	1.0	10	2	55.72	29.51	18.50	80.88
3	30	1.5	12	3	62.60	49.61	21.67	99.13
4	60	0.5	10	3	50.81	40.64	16.85	79.25
5	60	1.0	12	1	63.99	49.06	18.29	93.53
6	60	1.5	8	2	55.63	33.10	18.51	82.28
7	90	0.5	12	2	52.00	45.58	18.30	84.65
8	90	1.0	8	3	45.64	27.01	16.35	69.60
9	90	1.5	10	1	44.61	21.51	16.94	67.82

表 4 水提工艺方差分析

Table 4 Analysis of variance for water extraction process

方差来源	SS	f	F	P
A	195.206	2	2.547	>0.05
B	63.439	2	0.828	>0.05
C	667.663	2	8.712	<0.05
B + D(误差)	153.27	4		

注: $F_{0.05}(2,4) = 6.94_0$ 。

由直观分析可知,各因素对水提工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。由于因素 B 的 SS 小于误差项因素 D,故将其并入误差项计算。方差分析表明因素 C

为显著性影响因素,因素 A 和 B 则无显著性影响,从节约时间和能源的角度考虑,选择最佳提取工艺组合 $A_1B_1C_3$,即浸泡 30 min ,加 12 倍水量提取 3 次,每次 0.5 h 。按 2 倍处方量称取当归 30 g ,桂枝 20 g 和细辛 6 g ,按最佳醇提工艺提取后,药渣与葛根 40 g 混合,按优选的水提工艺提取,结果葛根素和阿魏酸的转移率分别为 60.28% 和 21.89% ,RSD 依次为 2.5% 和 1.8% ,干膏得率 18.43% (RSD 2.8%),表明该水提工艺稳定可行。

3 讨论

醇提工艺优选时,考察了不同体积分数乙醇对

处方中当归、桂枝和细辛3味药中脂溶性成分的影响,选择当归中藁本内酯、桂枝中桂皮醛、细辛中甲基丁香酚为评价指标^[18-20]。藁本内酯主要具有抗炎镇痛及一定的舒张血管作用^[21],可作为醇提部分脂溶性成分指标之一。桂枝挥发油具有抗炎镇痛作用,其主要活性成分为桂皮醛^[22]。甲基丁香酚具有镇痛作用,且在细辛脂溶性成分中含量较高。

文献报道葛根素含量测定时流动相选择甲醇-水(25:75)^[23],预试验发现,该流动相下葛根素色谱峰的对称度、分离度及理论板数均未达到要求,且峰形较差。葛根素为异黄酮类成分,可在流动相中加入少量磷酸,峰形得到改善,理论板数>10 000,故将流动相调整为甲醇-0.085%磷酸水溶液(25:75)。葛根为方中君药,且葛根素是其主要降糖活性成分,权重设为0.4,阿魏酸在醇提过程中已有部分溶出,基于阿魏酸易溶于热水的特点,在水提过程中有一定溶出^[24],故权重设置为0.2;同时水提工艺中干膏得率的权重设置为0.4。

[参考文献]

[1] 边秀娟. 加味黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变的理论、临床和实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.

[2] 吴灵敏,杨叔禹. 平糖胶囊D方治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[C]. 厦门:第十五次全国中医糖尿病大会,2014.

[3] 吴灵敏. 当归四逆汤加减方干预血虚寒凝型糖尿病周围神经病变的临床疗效观察[D]. 福州:福建中医药大学,2014.

[4] 马运明,李大鸣,张静,等. 葛根素对糖尿病小鼠降血糖功能的研究[J]. 中国慢性病预防与控制,2010,18(4):373-374.

[5] 刘竹青,张克良,麻风华. 葛根煎剂对糖尿病大鼠降血糖机理的研究[J]. 中医药信息,2006,23(3):56-58.

[6] 李静华,赵玉堂,郭玉成,等. 桂枝汤对四氧嘧啶致糖尿病小鼠模型的降糖作用[J]. 承德医学院学报,2006,23(2):152-153.

[7] 孙元琳,杨萍芳,吴海霞,等. 水法提取当归多糖工艺条件优化[J]. 中国食品学报,2009,9(5):130-134.

[8] 熊玉兰,荆宇,尚明英,等. 细辛非挥发性提取物抗炎镇痛作用研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(17):2252-2257.

[9] 林佳,徐丽珍,刘江云,等. 桂枝中桂皮醛、肉桂酸的含量与分布研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(23):

1784-1787.

[10] 王婕,赵建邦,宋平顺. 30批当归中阿魏酸、藁本内酯含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):70-73.

[11] 黄鲛,易进海,刘玉红,等. 炒制对细辛中黄樟醚、甲基丁香酚和细辛脂素含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):90-92.

[12] 金福,易红,冯伟红,等. 葛根不同提取工艺的实验研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(9):1171-1172.

[13] 李慧,边宝林,孟繁蕴,等. 藁本内酯的稳定性及 β -环糊精包合工艺的考察[J]. 中草药,2005,36(10):1483-1486.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:133,230,276,333.

[15] 朱华李,毛先兵,李紫薇,等. HPLC测定北细辛根中的甲基丁香酚[J]. 华西药学杂志,2011,26(4):378-379.

[16] 陈卓瀚,张慧,陆海玲,等. 正交试验优选复方广金钱草颗粒的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):43-47.

[17] 闫春风,徐晓伟,李君,等. HPLC测定柴苓软胶囊中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):98-100.

[18] 林乔,赵爱国,陈建南,等. 藁本内酯的镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):165-168.

[19] 周慧秋,于滨,乔婉红,等. 甲基丁香酚药理作用研究[J]. 中医药学报,2000(2):79-80.

[20] Han Y, Jung H W, Bae H S, et al. The extract of *Cinnamomum cassia* Twigs inhibits adipocyte differentiation via activation of the insulin signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Pharm Biol*,2013,51(8):961-967.

[21] 左爱华,王丽,肖红斌. 藁本内酯药理学和药代动力学研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3350-3353.

[22] 马悦颖,李沧海,李兰芳,等. 桂皮醛解热镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(12):1336-1339.

[23] 李宝红,吴君,程怡,等. 正交试验优化葛根中葛根素的闪式提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):27-29.

[24] 金汝城,李贵文,马素丽,等. 当归中阿魏酸提取工艺的优化研究[J]. 中成药,2008,30(4):516-519.

[责任编辑 刘德文]