

多指标正交试验法优选桂圆益气补血汤煎煮工艺

蒋洁¹, 何舟², 黄燕军¹, 蒙法艳¹, 李福森¹, 李雪华^{1*}

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 优选桂圆益气补血汤的煎煮工艺条件。方法: 采用 HPLC 测定阿魏酸、黄芪甲苷含量, 流动相分别为甲醇-0.05% 磷酸溶液(60:40), 乙腈-水(33:67), 检测波长分别为 320, 203 nm。以干膏得率和黄芪甲苷、阿魏酸、总多糖含量的综合评分为指标, 通过正交试验考察煎煮时间、料液比、煎煮次数对桂圆益气补血汤煎煮工艺的影响。结果: 最佳煎煮工艺条件为加 12 倍量水煎煮 3 次, 每次 36 min, 煎煮前浸泡 30 min; 浸膏得率 39.3%, 阿魏酸、黄芪甲苷提取量分别为 18.24, 68.17 mg·g⁻¹, 多糖得率 6.80%。结论: 优选的煎煮工艺条件稳定且重复性好, 适用于桂圆益气补血汤的工业生产。

[关键词] 桂圆益气补血汤; 煎煮工艺; 正交试验; 多指标成分; 综合评价; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0026-04

[doi] 10.11653/syfy2014060026

Optimization of Decocting Technology for Guiyuan Yiqi Buxue Decoction by Multi-index Orthogonal Design

JIANG Jie¹, HE Zhou², HUANG Yan-jun¹, MENG Fa-yan¹, LI Fu-sen¹, LI Xue-hua^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize decocting technology conditions of Guiyuan Yiqi Buxue decoction. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of ferulic acid and astragaloside with mobile phases of methanol-0.05% phosphoric acid (60:40) and acetonitrile-water (33:67), detection wavelength of 320 and 203 nm, respectively. Taking dry extract yield, contents of astragaloside and ferulic acid, yield of total polysacchrides as comprehensive evaluation index, orthogonal test was used to optimize decoction conditions with solid-liquid ratio, decoction time and decoction times as factors. **Result:** Optimum decoction conditions were as follows: decocted 3 times with 12-fold water, 36 minutes each time, soaked 30 min before decocting; Under these conditions, dry extract yield was 6.80%, extraction amount of astragaloside and ferulic acid were 68.17 and 18.24 mg·g⁻¹, yield of total polysacchrides was 6.80%. **Conclusion:** This optimized decoction technology was stable and reproducible, which was suitable for industrial production of Guiyuan Yiqi Buxue decoction.

[Key words] Guiyuan Yiqi Buxue decoction; decoction technology; orthogonal test; multi-index ingredients; comprehensive evaluation; HPLC

桂圆益气补血汤为中医临床验方,由龙眼肉、黄芪、当归、山药和甘草共 5 味药组成,具有益气补血、安神健脾、提高免疫力的功效。中药汤剂的有效成分极为复杂,为避免单一指标进行工艺优化时产生偏差而影响制剂疗效,根据 2010 年版《中国药典》对汤剂质量鉴定要求^[1],本实验以黄芪甲苷、阿魏酸、总多糖含量及干膏得率为综合评分指标,采用多指标正交试验优选桂圆益气补血汤的煎煮工艺,为

[收稿日期] 20130717(013)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 12118005-1-2)

[第一作者] 蒋洁,在读硕士,从事中药保健食品的开发研究, Tel:18677161689, E-mail:jiangjieddgg@163.com

[通讯作者] *李雪华,教授,从事天然产物活性物质提取与活性研究, Tel:13006918166, E-mail:onlythankforyou@163.com

该制剂的临床推广提供实验依据。

1 材料

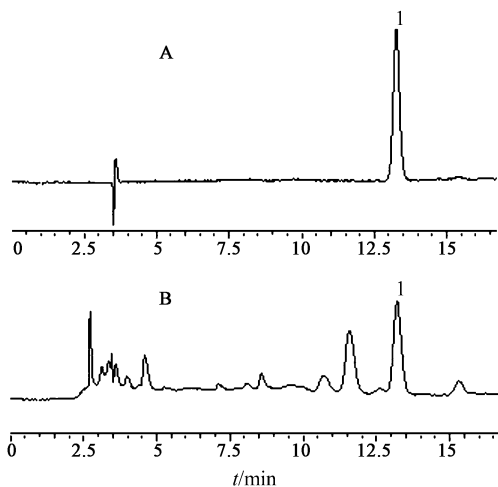
LC20Avp 型高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器,日本岛津),ME215s 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),EL20K 型酸度计(梅特勒-托利多上海有限公司),TDL-5A 型低速台式离心机(上海菲哈尔分析仪器有限公司)。

黄芪、当归、山药、甘草均购自南宁恒乐大药房,经广西医科大学药学院朱丹讲师鉴定均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;龙眼肉购自广西南宁交易市场,经广西中医药研究所严克俭检验员鉴定为石硖龙眼 *Dimocarpus longan* Lour. 的假种皮;黄芪甲苷对照品(南京科朗医药化工有限公司,批号 120412),阿魏酸对照品(上海哈灵生物科技有限公司,批号 120319),乙腈、甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸的含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸溶液 (60:40),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长 320 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL。理论塔板数按阿魏酸峰计算应不低于 5 000,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 阿魏酸

图 1 桂圆益气补血汤中阿魏酸 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 0.55 mg,置 250 mL 量瓶中,加 70% 甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

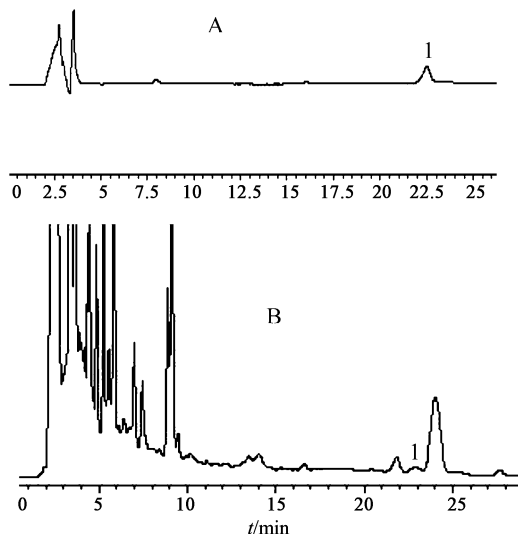
2.1.3 供试品溶液的制备 将按 1/2 处方量煎煮的桂圆益气补血汤浓缩至 50 mL (相当于生药质量浓度 7.1 g · mL⁻¹),置于 100 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,称定质量,超声 10 min,称定质量,用

70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,精密移取 10 mL 至 250 mL 量瓶中,用 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,静置,取上清液滤过,即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取阿魏酸对照品溶液 2,4,6,8,10,12,14,16,18 μL 按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分值为横坐标,进样量为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.29 \times 10^{-6} X + 0.00019$ ($r = 1.0000$),线性范围 0.0207 ~ 0.1918 μg。

2.2 黄芪甲苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水 (33:67),流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。理论塔板数按黄芪甲苷峰计算应不低于 3 000,见图 2。



A. 对照品;B. 供试品;1. 黄芪甲苷

图 2 桂圆益气补血汤中黄芪甲苷 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 2.59 mg 至 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 将按 1/2 处方量煎煮的桂圆益气补血汤浓缩至 50 mL (生药质量浓度 7.1 g · mL⁻¹),精密量取 20.00 mL,用水饱和的正丁醇液提取 5 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨水洗涤 2 次,每次 25 mL,弃去氨水液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇 10 mL 溶解,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 6,10,14,18,22,26 μL 按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分值为横坐标,进样量为纵坐标,得回归方程 $Y = 2.653 \times 10^{-5} X + 0.074$ ($r = 1.0000$),线性范围 1.5576 ~ 6.8727 μg。

2.3 总多糖的含量测定^[2]

2.3.1 标准溶液的制备 精密称取于 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品 49.1 mg, 置于 250 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.2 标准曲线的制备 精密吸取葡萄糖对照品溶液 100, 140, 180, 220, 260, 300, 380 μL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 加水定容至 10 mL, 配制成系列对照品溶液。精密吸取系列对照品溶液各 1 mL, 各加入新配制的 6.0% 苯酚溶液 1 mL 和浓硫酸 5 mL 于室温下进行反应, 待反应完成并冷却后, 以不含葡萄糖的反应试剂为空白, 于 486 nm 处测定吸光度 (A), 每个质量浓度平行测定 3 管, 以 A 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标, 得回归方程 $A = 75.624C + 0.003$ ($r = 0.9992$), 线性范围 0.0019 ~ 0.0106 g · L⁻¹。

2.3.3 总多糖的制备 将按 1/2 处方量煎煮的桂圆益气补血汤浓缩至 50 mL, 加无水乙醇使醇浓度达 80%, 放入 4 ℃ 冰箱静置 12 h, 于 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚各洗 3 次, 透析, 过 DEAE 纤维素柱后合并各流分, 于 45 ℃ 真空干燥, 即得。

2.3.4 多糖换算因子的测定 精密称取 2.3.3 项下总多糖 0.05 g, 加水溶液并转移至 250 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 摇匀, 精密量取 0.50 mL 于具塞试管中, 加水补至 1.0 mL, 按 2.3.2 项下方法显色, 以不含多糖的反应试剂为空白, 于 486 nm 处测定 A

($n = 3$), 计算总多糖含量, 按 $f = m / (C \times D)$ 求解换算因子, 式中 m 为称取的总多糖质量, C 为通过标准曲线计算的总多糖质量浓度, D 为溶液稀释倍数。

2.3.5 样品测定 精密称取 2.3.3 项下总多糖 0.01 g, 加水溶解并移至 100 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 精密吸取 1 mL 置于试管中, 按 2.3.2 项下方法显色, 以不含多糖的反应试剂为空白, 于 486 nm 处测定 A, 按 $m_{\text{总多糖}} = C \times D \times f / m$ 计算总多糖含量。

2.4 干膏得率的测定 将按 1/2 处方量煎煮的桂圆益气补血汤浓缩至 50 mL, 精密量取 10.00 mL, 水浴蒸干, 于 105 ℃ 烘 5 h, 称定质量, 计算干膏得率。

2.5 正交试验设计 选择煎煮时间、料液比、煎煮次数为考察因素, 以干膏得率和黄芪甲苷、阿魏酸、总多糖含量的综合评分为指标, 权重系数依次为 0.2, 0.2, 0.3, 0.3, 按 1/2 处方配比称取龙眼肉、黄芪、当归、山药和甘草共 9 份, 每份 35.5 g, 按 L₉(3⁴) 正交表进行试验, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 桂圆益气补血汤煎煮工艺正交试验因素水平

水平	A 料液比	B 煎煮时间/min	C 煎煮数/次
1	1:8	28	1
2	1:10	32	2
3	1:12	36	3

表 2 桂圆益气补血汤煎煮工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	浸膏得率/%	阿魏酸/mg · g ⁻¹	黄芪甲苷/mg · g ⁻¹	多糖得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	25.8	4.76	19.70	4.84	42.63
2	1	2	2	2	37.9	7.76	40.06	4.37	67.73
3	1	3	3	3	37.5	13.35	43.20	3.69	80.75
4	2	1	2	3	32.4	8.13	32.60	5.44	60.73
5	2	2	3	1	39.6	15.14	66.20	4.78	93.81
6	2	3	1	2	29.3	10.49	25.80	5.44	60.82
7	3	1	3	2	38.7	14.11	45.89	6.64	84.47
8	3	2	1	3	28.3	9.26	23.06	4.84	56.23
9	3	3	2	1	38.0	17.91	64.99	4.59	98.02
K ₁	61.28	65.03	52.21	73.39					
K ₂	69.79	68.66	72.67	69.67					
K ₃	77.21	74.61	83.42	65.23					
R	15.94	9.58	31.21	8.16					

由直观分析可知, 各因素影响煎煮效果的顺序为 C > A > B。方差分析显示各因素对煎煮工艺均

无显著性影响, 确定最佳煎煮工艺条件为 A₃B₃C₃, 即加 12 倍量水煎煮 3 次, 每次 36 min。

2.6 验证试验 按 1/2 处方量称取桂圆益气补血汤饮片各 3 份,每份 35.5 g,按优选的工艺条件进行煎煮,分别合并各份水煎液,浓缩成浸膏,取样测定。结果浸膏得率分别为 39.8%,38.9%,39.2%,阿魏酸提取量分别为 17.65,18.92,18.16 mg·g⁻¹,黄芪甲苷提取量分别为 68.92,67.43,68.15 mg·g⁻¹,多糖得率依次为 6.72%,6.88%,6.81%,表明优选的提取工艺条件稳定可行且重复性好。

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	381.567	2	0.564	>0.05
B	140.340	2	0.207	>0.05
C	1 508.303	2	2.229	>0.05
D(误差)	227.181	2		

3 讨论

桂圆益气补血汤为 5 味药组成的复方,成分复杂,为使其工艺可控稳定,本文借鉴 2010 年版《中国药典》对复方汤剂的质量检测要求^[1],选择黄芪甲苷、阿魏酸、总多糖含量及干膏得率等多重指标进行考察。臣药黄芪中黄芪甲苷具有抗心肌缺血、抗血小板聚集、清除自由基、免疫调节等药理作用^[3-4],该成分作为 2010 年版《中国药典》中黄芪药材指纹图谱中含量测定指标,专属性强且药效具有代表性,故综合评分权重定为 20%。阿魏酸为臣药当归中有效成分,为 2010 年版《中国药典》中当归药材指纹图谱中含量测定指标,具有抗血小板聚集、抗炎、抗氧化和提高免疫等药理作用^[5-6],对本方安神健脾的功效贡献大,故其综合评分权重定为 30%。由于 2010 年版《中国药典》中关于龙眼肉和山药指纹图谱含量测定的方法尚无记载,而且君药龙眼肉和臣药山药按优选工艺煎煮的水溶液经 HPLC 检测无显著特征峰,鉴于龙眼肉和山药在本方中占据重要

地位,且本方中多糖类成分含量较多,如龙眼肉多糖、山药多糖、黄芪多糖和当归多糖等,对该方的免疫活性作用贡献较大^[7-10],故考虑选择水浸出多糖作为另一个质量鉴定指标,设定综合评分权重 30%。浸膏中其他成分对本方功效亦有一定贡献,故设定干膏得率权重 20%。

[参考文献]

- [1] 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,2010:附录 30.
- [2] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342.
- [3] 张峰,高鹏,彭俊华. 黄芪多糖及黄芪甲苷对巨噬细胞吞噬结核杆菌作用的研究[J]. 西北国防医学杂志,2005,26(6):434.
- [4] 于世增,王永红. 补阳还五汤和黄芪对血小板聚集性的影响[J]. 中成药,1983,4(8):31.
- [5] Kawabata K, Yamamoto T, Hara A, et al. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats[J]. Cancer Lett, 2000, 157(1):15.
- [6] 李天锡,袁才英,杨俊旺. 阿魏酸衍生物高分子药物的合成及其对血小板聚集和对 TXB₂,6-Keto-PGF_{1α} 释放的影响[J]. 中国药物化学杂志,1999,9(2):98.
- [7] 苏东晓,张名位,廖森泰,等. 龙眼果肉水溶性提取物对正常小鼠免疫调节作用的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(9):1919.
- [8] 吴瑕,杨薇,张磊,等. 不同分子量段黄芪多糖对整体及黏膜免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):169.
- [9] 孙文平,罗红,杨光,等. 当归多糖激发免疫反应的特征研究[J]. 大连医科大学学报,2009,31(3):262.
- [10] 杨宏莉,李少春,张伟伟,等. 山药多糖的药理作用[J]. 医学研究与教育,2010,27(3):80.

[责任编辑 仝燕]