

# 正交试验法优选补阳还五汤水煎煮工艺

王弋然<sup>1</sup>, 张星<sup>2</sup>, 毛春芹<sup>2</sup>, 陆兔林<sup>2\*</sup>

(1. 南京市中医院, 南京 210001; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210046)

**[摘要]** 目的: 优选补阳还五汤的水煎煮工艺。方法: 以黄芪甲苷、阿魏酸含量为指标, 选取浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数、加水量及浓缩量为考察因素, 采用正交试验法优选补阳还五汤的水煎煮工艺。结果: 最佳水煎煮工艺为浸泡 30 min, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 30 min。结论: 优选的水煎煮工艺稳定可行, 可应用于补阳还五汤的大生产。

**[关键词]** 补阳还五汤; 黄芪甲苷; 阿魏酸; 水煎煮工艺; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0025-04

## Optimization of Water Boiling Technology of Buyang Huanwu Decoction by Orthogonal Test

WANG Yi-ran<sup>1</sup>, ZHANG Xing<sup>2</sup>, MAO Chun-qin<sup>2</sup>, LU Tu-lin<sup>2\*</sup>

(1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China;

2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize water boiling process of Buyang Huanwu decoction. **Method:** With the content of astragaloside and ferulic acid as indexes, orthogonal test was used to optimized water boiling technology of Buyang Huanwu decoction with soaking time, boiling time, boiling times and concentrated volume as factors. **Result:** The best water decoction technology was: soaked 30 min with 10 folds water, boiled 2 times with 30 min per time. **Conclusion:** Optimized technology was reasonable, feasible and reproducible, it could be applied in mass production of Buyang Huanwu decoction.

**[Key words]** Buyang Huanwu decoction; astragaloside; ferulic acid; water boiling process; orthogonal test

补阳还五汤出自《医林改错》下卷, 由生黄芪、当归尾、赤芍、川芎、桃仁、地龙、红花组成, 具有补气活血、化瘀通络之功效, 主要用于治疗半身不遂、遗尿不禁等气虚血瘀证, 是临床治疗老年中风症常用经验方剂<sup>[1]</sup>。中药汤剂是中药的传统剂型之一, 其影响疗效的物质基础主要是煎出的有效成分。2010 年版《中国药典》中黄芪、当归的含量测定项下分别以黄芪甲苷、阿魏酸为指标, 用 HPLC 测定其含

量<sup>[2]</sup>。本方以黄芪为君药, 其主要有效成分为黄芪甲苷, 当归为臣药, 其主要有效成分为阿魏酸。黄芪甲苷具有抗心肌缺血、抗血小板聚集、清除自由基等药理作用<sup>[3]</sup>, 阿魏酸是当归发挥其药理作用的重要物质基础。因此本试验综合各方面因素, 选择黄芪甲苷、阿魏酸为考察指标, 运用正交试验设计优选补阳还五汤的水提取工艺, 为制订一套针对不同煎煮要求复方汤剂的规范化煎煮工艺提供参考, 指导临床合理、有效用药。

### 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Alltech 3300 ELSD 检测器(美国奥泰科技有限公司), FA1104 型电子天平(上海精科天平厂)。

黄芪甲苷、阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110781-200613, 0773-9708), 黄

**[收稿日期]** 20120704019

**[基金项目]** 国家中医药行业科研专项(201007010)

**[第一作者]** 王弋然, 本科, 副主任中药药师, 从事中药制剂及质量研究, Tel: 025-85811835, E-mail: ltl209@yahoo.cn

**[通讯作者]** \* 陆兔林, 教授, 从事中药新药研发及药效物质基础研究, E-mail: ltl209@yahoo.cn

芪、当归、赤芍等饮片均购于南京海昌中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 正交试验设计** 采用  $L_8(2^7)$  正交表进行正交设计,对浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数、加水量及浓缩量进行考察。以黄芪甲苷、阿魏酸为考察指标<sup>[4-11]</sup>,因素水平见表 1。按处方配比取黄芪、当归、赤芍等饮片共 8 份,每份 143 g,按正交表安排进行提取,提取液过滤,减压浓缩成稠膏,备用。

表 1 补阳还五汤水煎煮工艺优选正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间 /min	B 加水量 /倍	C 煎煮时间 /min	D 煎煮数 /次	E 浓缩量 /mL
1	30	8	30	1	300
2	60	10	60	2	400

## 2.2 阿魏酸的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 采用依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.085% 磷酸(13:87),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 ℃,进样量 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取阿魏酸对照品 5.02 mg,置 5 mL 棕色量瓶中,加 70% 甲醇定容,精密量取上述对照品溶液适量,制成 20 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密量取浓缩好的补阳还五汤样品适量(约为当归饮片量的 1/12),置具塞锥形瓶中,水浴蒸干,精密加入甲醇 15 mL,密塞,称定质量,超声提取 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失质量,摇匀,静置,取上清液滤过,取续滤液,即得。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取 0.02 g·L<sup>-1</sup> 阿魏酸对照品溶液 0.06,0.12,0.24,0.48,0.96,1 mL,分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列阿魏酸对照品溶液。分别吸取上述各对照品溶液 10 μL,进样,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积均值为纵坐标,进样质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 62\ 339X + 20.443$  ( $r = 0.999\ 8$ ),表明阿魏酸在 12~20 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好线性关系。

**2.2.5 样品测定** 分别精密吸取供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,每个样品平行进样 2 次,以外标两点法计算,测定各样品中阿魏酸的含量。

## 2.3 黄芪甲苷含量测定

**2.3.1 色谱条件** 采用 2.2.1 项下色谱柱,流动相乙腈-水(32:68),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,漂移管温度 48 ℃,载气流速 2.0 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 0.5 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 精密量取浓缩好的补阳还五汤样品适量(约为黄芪饮片质量 1/30),用水饱和正丁醇振摇提取 4 次,每次 20 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤 2 次,每次 20 mL,弃去氨液,取正丁醇液蒸干,残渣加水 5 mL 使溶解,放冷,过 D101 型大孔吸附树脂柱(内径 1.5 cm,柱高 12 cm),用水 50 mL 洗脱,弃去水液,用 40% 乙醇 30 mL 洗脱,弃去洗脱液,继用 70% 乙醇 80 mL 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

**2.3.4 线性关系考察** 分别精密吸取 0.5 g·L<sup>-1</sup> 的黄芪甲苷对照品溶液 5,10,15,20,25 μL 进样,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积对数为纵坐标,进样量对数为横坐标,得回归方程  $Y = 1.625\ 2X + 0.176\ 5$  ( $r = 0.999\ 5$ ),表明黄芪甲苷进样量在 2.5~12.5 μg 呈良好线性。

**2.3.5 样品测定** 分别精密吸取供试品溶液 20 μL,注入液相色谱仪,每个样品平行进样 2 次,以外标两点法计算,测定各样品中黄芪甲苷含量。

**2.4 正交试验** 试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3,4。

由以上结果可知,A 因素对黄芪甲苷含量具有极显著性影响,其他因素对试验结果未见明显影响。结合实际应用中病人口服剂量、降低成本、节约时间等因素,最终确定最佳水煎煮工艺为饮片浸泡 30 min,加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 30 min。

**2.5 验证试验** 按处方比例取补阳还五汤处方饮片各 3 份,按优选的水煎煮工艺进行水煎煮,合并水提液,浓缩至浸膏,取样测定,结果阿魏酸质量分数分别为 0.024%,0.023%,0.023%;黄芪甲苷质量分数分别为 0.046 6%,0.046 7%,0.046 9%;浸出物得率依次为 30.18%,28.75%,28.60%。说明该工艺稳定、可行。

## 3 讨论

该方饮片种类多,单付方剂质量较大,经单因素试验考察发现,加 6 倍量水不能完全浸泡饮片;加 8,10,12 倍量水分别煎煮,10 倍与 12 倍得出结果无明显差异,结合浓缩损失等因素,选择 8,10 倍 2 个

表2 补阳还五汤水煎煮工艺优选正交试验安排

%

No.	A	B	C	D	E	F	G	阿魏酸 质量分数	黄芪甲苷 质量分数
1	1	1	1	1	1	1	1	0.022	0.042
2	1	1	1	2	2	2	2	0.021	0.046
3	1	2	2	1	1	2	2	0.020	0.044
4	1	2	2	2	2	1	1	0.012	0.046
5	2	1	2	1	2	1	2	0.015	0.051
6	2	1	2	2	1	2	1	0.016	0.050
7	2	2	1	1	2	2	1	0.010	0.049
8	2	2	1	1	2	2	1	0.017	0.052
阿魏酸									
$K_1$	0.075	0.074	0.070	0.067	0.075	0.066	0.059		
$K_2$	0.058	0.059	0.062	0.066	0.058	0.066	0.073		
R	0.017	0.015	0.008	0.001	0.017	0.001	0.014		
黄芪甲苷									
$K_1$	0.178	0.189	0.189	0.186	0.188	0.191	0.187		
$K_2$	0.202	0.191	0.191	0.194	0.192	0.189	0.193		
R	0.024	0.002	0.002	0.008	0.004	0.002	0.006		

表3 阿魏酸质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	$3.54 \times 10^{-5}$	1	$3.54 \times 10^{-5}$	4.16	
B	$2.76 \times 10^{-5}$	1	$2.76 \times 10^{-5}$	3.25	
E	$3.44 \times 10^{-5}$	1	$3.44 \times 10^{-5}$	4.05	
C + D + F +	$3.40 \times 10^{-5}$	4	$0.85 \times 10^{-5}$		
G(误差)					

注: $F_{0.05}(1,4) = 7.71, F_{0.01}(1,4) = 21.2$ 。

表4 黄芪甲苷质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	$72 \times 10^{-6}$	1	$72 \times 10^{-6}$	45	<0.01
D	$8.0 \times 10^{-6}$	1	$8.0 \times 10^{-6}$	5	
B + C + E + F +	$8.0 \times 10^{-6}$	5	$1.6 \times 10^{-6}$		
G(误差)					

注: $F_{0.05}(1,5) = 6.61, F_{0.01}(1,5) = 16.26$ 。

水平进行正交试验。

该方为活血化瘀的代表方剂之一,主要治疗老年中风。本试验将黄芪中黄芪甲苷及当归、川芎中阿魏酸的含量作为考察指标,在煎煮过程中,煎煮时间为关键因素。通过预试验发现,阿魏酸随煎煮时间延长,含量逐渐降低,煎煮30 min时含量最高,而黄芪甲苷含量随煎煮时间延长,含量增加速率递减,煎煮60,75 min没有明显差异,综合以上因素,选择煎煮30,60 min 2个水平进行正交试验。

该方单付剂量较大,煎煮所得滤液合并后需要浓缩成口服剂量,本试验首次考察了浓缩量对方剂有效成分含量的影响。根据多家中医院及中药房煎药室调研,人的口服剂量约为100~200 mL/次,一

日2次。考察了浓缩到200,300,400,500 mL时汤剂有效成分含量,结果发现浓缩到200 mL时,由于受热时间过长等原因,有效成分含量明显降低,浓缩到500,400 mL有效成分含量无显著性变化,但浓缩到500 mL,人的每日服用剂量较大,不易为病人接受,所以选择300,400 mL 2个水平。

#### [参考文献]

- [1] 王先敏,纪宁.补阳还五汤的现代研究及临床应用概况[J].新疆中医药,2001,19(3):80.
- [2] 中国药典.一部[S].2010:249.
- [3] 于世增,王永红.补阳还五汤对血小板聚集性的影响[J].中成药研究,1983,15(8):31.
- [4] 董正华.从经方谈汤液的煎煮[J].陕西中医函授,1998,17(3):6.
- [5] 贺广华.中药的剂量与煎煮[J].职业与健康,1997,13(2):57.
- [6] 汪鸣凤,唐祥荣.浸泡时间对泻白散煎煮质量的研究[J].湖南中医杂志,1997,13(1):42.
- [7] 张建玲,贺祝英,吴红梅.正交试验优选心衰宁合剂水提工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):30.
- [8] 王竹兰.《伤寒论》汤剂煎煮法与汤剂制备规范化研究[D].北京:北京中医药大学,2010.
- [9] 陈永祥,孙耀志,高松,等.正交试验优选黄芪桂枝五物汤的水提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(2):56.
- [10] 李前进.简论中药汤剂的煎煮原则及注意事项[J].中医药导报,2010,16(7):120.
- [11] 张丹,颜学伟,王刚,等.正交试验优选盐制续断炮制工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):27.

[责任编辑 全燕]

# 正交试验优选桂花籽中原花青素的提取工艺

邹登峰<sup>1</sup>, 叶妹<sup>1</sup>, 窦锡彬<sup>2\*</sup>, 邱玉婷<sup>1</sup>, 王非非<sup>1</sup>

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541004; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

**[摘要]** 目的: 优选桂花籽中原花青素的超声提取工艺。方法: 以原花青素得率为指标, 选取提取时间、提取温度、料液比、乙醇体积分数为考察因素, 在单因素试验基础上, 采用正交试验优选超声提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 8 倍量 50% 乙醇于 50 ℃ 提取 25 min。结论: 优选的提取工艺快速、简单, 为桂花籽的开发利用提供试验依据。

**[关键词]** 桂花籽; 原花青素; 正交试验

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0028-03

## Optimization of Extraction Technology for Procyanidins from Seed of *Osmanthus fragrans* by Orthogonal Test

ZOU Deng-feng<sup>1</sup>, YE Mei<sup>1</sup>, DOU Xi-bin<sup>2\*</sup>, QIU Yu-ting<sup>1</sup>, WANG Fei-fei<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;  
2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic extraction technology of procyanidins from seed of *Osmanthus fragrans*. **Method:** With yield of procyanidins as index, extraction time, extraction temperature, solid-liquid ratio and the concentration of ethanol were chosen as factors, based on single factor test, ultrasonic extraction technology was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology was: extracted 25 min with 8 times the amount of 50% ethanol at 50 ℃. **Conclusion:** This optimized extraction process was quick and simple, and it could provide experimental basis for development and utilization of seed of *O. fragrans*.

**[Key words]** seed of *Osmanthus fragrans*; procyanidins; orthogonal test

桂花籽为木犀科桂花树的成熟种子, 主产于广西等地, 具有散寒破结、化痰止咳、祛风湿等功效。桂花的根、茎、叶、花均有药用价值, 主要化学成分为原花青素、香豆素、黄酮等, 其中原花青素、黄酮是主要活性成分<sup>[1-2]</sup>。研究表明桂花籽中原花青素有较好的抗氧化功能, 且清除自由基的能力分别是 VE, VC 的 50, 20 倍, 同时具有高效抗氧化、抗衰老、抗肿瘤等生物活性<sup>[3]</sup>。本文旨在优选桂花籽中原花青

素的提取工艺, 为桂花籽的开发利用提供试验依据。

### 1 材料

AK-400A 型粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司), DLSB-10/30 型低温冷却循环泵(郑州长城科工贸有限公司), TGL-16C 型台式高速离心机(上海安亭公司), UV-2550 型紫外-可分光光度计(日本岛津), 桂花籽粉末(桂林市桂花树上采集, 经作者本人鉴定为正品, 阴干, 粉碎机粉碎), 原花青素对照品(纯度 ≥ 98%, 日本 Nakahara 科技有限公司提供), 香草醛[中国 ELISA(酶联免疫)代测公司], 试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液制备** 精确称取桂花粉末 2 g, 加入一定量乙醇, 超声提取一定时间, 超声功率 100 W, 提取 1 次, 过滤, 减压浓缩加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 离心 10 min (3 000 r·min<sup>-1</sup>), 吸取上清液,

**[收稿日期]** 20120624(004)

**[基金项目]** 广西中医药管理局中医药科技项目(GZKZ09-52); 桂林市科技局科学技术研究与开发项目(20120105-9)

**[第一作者]** 邹登峰, 硕士, 副教授, 从事天然药物的开发与研究, E-mail: zdf1226@163.com

**[通讯作者]** \* 窦锡彬, 硕士, 讲师, 从事中药在临床应用的研究, E-mail: 93215828@qq.com