

# 正交试验优选黄芪桂枝五物汤的水提取工艺

陈永祥<sup>1\*</sup>, 孙耀志<sup>2</sup>, 高松<sup>2</sup>, 郭水柱<sup>2</sup>, 陈洪英<sup>2</sup>

(1. 河南中医学院药学院, 郑州 450008; 2. 河南宛西制药股份有限公司, 河南 南阳 473000)

**[摘要]** 目的: 优选黄芪桂枝五物汤的提取工艺。方法: 用高效液相色谱法分别测定黄芪甲苷、芍药苷。以黄芪甲苷、芍药苷和干浸膏的含量为考察指标, 通过正交试验法优选最佳提取工艺。结果: 优选得到的工艺为药材加 10 倍水量浸泡 0.5 h、煎煮 3 次、每次煎煮 1.5 h。结论: 最佳提取工艺稳定可行, 可作为黄芪桂枝五物汤的提取工艺。

**[关键词]** 黄芪桂枝五物汤; 正交试验; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0056-04

## Optimization of Extraction Process of Huangqi Guizhi Wuwutang by Orthogonal Design

CHEN Yong-xiang<sup>1\*</sup>, SUN Yao-zhi<sup>2</sup>, GAO Song<sup>2</sup>, GUO Shui-zhu<sup>2</sup>, CHEN Hong-ying<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;  
2. Henan Wanxi Pharmaceutical Co. Ltd., Nanyang 473000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction technology of Huangqi Guizhi Wuwutang. **Method:** The content of astragaloside and paeoniflori were determined by HPLC. The optimum extraction condition was investigated by orthogonal design; the content of astragaloside, paeoniflorin and the ratio of dry extraction were regarded as the detection index. **Result:** The optimum extraction was as follows: soaking in ten times amount of water for half an hour, extracting three times, every time for one and a half hour. **Conclusion:** The optimum technology was stable and feasible for the extraction of Huangqi Guizhi Wuwutang.

**[Key words]** Huangqi Guizhi Wuwutang; orthogonal design; extraction technology

黄芪桂枝五物汤是《金匮要略》中治疗痹症的名方, 由黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣 5 味中药组成, 具有益气温阳、温经散寒、通痹止痛的功效, 主要用于治疗血痹虚劳之证<sup>[1]</sup>。现代常用于中风后遗症、血栓闭塞性脉管炎和颈椎病等疾病的治疗<sup>[2]</sup>。黄芪中含有黄芪甲苷、榲皮素、异鼠李素、鼠李果素等, 具有抗血小板聚集作用, 对血小板聚集具有明显的解聚作用<sup>[3]</sup>。白芍含量较多的是芍药苷, 具有解热镇痛、抗炎、免疫调节、抑制血小板聚集、抗血栓形成<sup>[4]</sup>等作用。本实验采用正交设计法, 以黄芪甲苷、芍药苷、干浸膏的含量为指标, 对黄芪桂枝五物汤的水提取工艺进行了研究。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, AS10200A 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司), SB-1000 型旋转蒸发仪(上海爱郎仪器有限公司), CP224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

黄芪甲苷、芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110781-200613, 110736-200423), 甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯, 水为纯化水, 正丁醇、氨水等试剂均为分析纯。黄芪、白芍、桂枝、干姜、大枣由河南省宛西制药股份有限公司提供, 经笔者鉴定符合《中国药典》2010 年版一部的规定。

### 2 方法与结果

**2.1 正交试验设计** 该制剂采用水煎提, 以黄芪甲苷、芍药苷、干浸膏的含量为指标对浸泡时间、加水量、煎煮时间、煎煮次数 4 个因素进行考察, 根据预试结果采用正交表安排试验, 见表 1, 2。

**[收稿日期]** 2011-08-16

**[通讯作者]** \* 陈永祥, 硕士研究生, 从事中药新药研究, E-mail: chen Yongxiang-2005@163.com

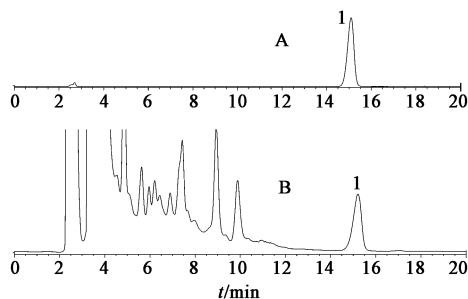
表1 黄芪桂枝五物汤提取工艺因素水平

水平	A 浸泡时间	B 加水量	C 煎煮	D 煎煮
	/h	倍数	时间/h	次数
1	0	6	1	1
2	0.5	8	1.5	2
3	1	10	2	3

**2.2 正交试验提取液的制备** 取全方药材,平行称取9份,每份57 g,按表2安排进行提取,提取液用滤布过滤,80℃减压浓缩并定容至500 mL,即得提取液。

### 2.3 黄芪甲苷含量测定

**2.3.1 色谱条件** Extend-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(32:68),Alltech 蒸发光散射检测器,漂移温度100℃,载气流速2.7 L·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL,流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温35℃。见图1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 黄芪甲苷

图1 黄芪桂枝五物汤水提液黄芪甲苷 HPLC

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芪甲苷对照品2.55 mg,置于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得对照品溶液。

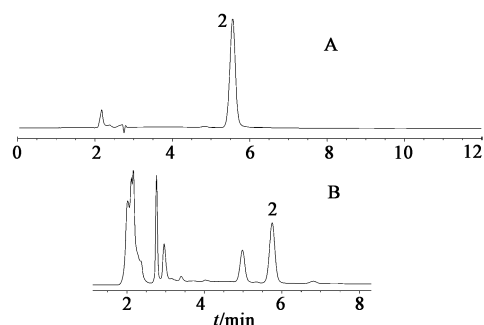
**2.3.3 供试品溶液的制备** 取正交试验提取液200 mL,减压浓缩至约30 mL,用50,50,40,40 mL水饱和和正丁醇萃取4次,合并正丁醇提取液,氨试液洗涤3次,每次40 mL。弃去氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解,并定容至5 mL,摇匀,即得供试品溶液。

### 2.4 芍药苷含量测定

**2.4.1 色谱条件** Extend-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL,柱温室温,检测波长230 nm。见图2。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 精密称取芍药苷对照品0.87 mg,置于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 精密吸取提取液20



A. 对照品;B. 供试品;C. 芍药苷

图2 黄芪桂枝五物汤水提液芍药苷 HPLC

mL,置蒸发皿中,加入硅藻土4 g,水浴蒸干,定量转移至100 mL具塞锥形瓶中,加甲醇50 mL,超声30 min,滤过,取续滤液25 mL,水浴蒸干,定量转移至5 mL量瓶,加甲醇至刻度,即得供试品溶液。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 线性关系考察** 精密称取干燥恒重的黄芪甲苷、芍药苷5.0 mg,以甲醇溶解并定容于5 mL量瓶中,用0.45 μm的微孔滤膜滤过。分别吸取对照品溶液1,3,5,7,9 μL,按上述色谱条件进行测定。黄芪甲苷以峰面积的积分值常用对数为纵坐标(Y)、进样量常用对数为横坐标(X),芍药苷峰面积为纵坐标(Y)、质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线。结果表明,黄芪甲苷、芍药苷在1~9 μg线性关系良好,回归方程分别为 $Y = 1.5018X + 2.8723$  ( $r = 0.9999$ ); $Y = 8137.4X - 78.993$  ( $r = 0.9998$ )。

**2.5.2 专属性** 按供试品溶液的制备项下方法,分别制备不含黄芪和白芍的阴性对照溶液,按照色谱条件项下方法进样测定。结果在与黄芪甲苷和芍药苷对照品色谱相应位置上阴性与对照品无干扰,表明本方法具有较好的专属性。

**2.5.3 精密度试验** 吸取对照品溶液10 μL重复进样6次,测定峰面积,黄芪甲苷和芍药苷面积RSD为1.28%,1.75%

**2.5.4 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液10 μL,分别于0,2,4,6,8,12,24 h进行测定,结果黄芪甲苷、芍药苷的峰面积无显著变化,RSD为1.36%,1.71%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.5.5 加样回收率试验** 精密吸取6份已知黄芪甲苷、芍药苷含量的样品,分别加入黄芪甲苷、芍药苷对照品溶液2.0 mL,按照供试品溶液制备方法同法处理,进样测定,计算加样回收率。黄芪甲苷平均回收率为99.6%,RSD 1.75%,芍药苷平均回收率为98.2%,RSD 1.95%。

**2.6 正交试验分析** 按照正交试验安排,分别测定 9 份供试品溶液中黄芪甲苷、芍药苷的含量和干膏率。照 2010 年版《中国药典》一部附录 XA 浸出物测定法,精密吸取提取液 10 mL,置干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干后,105 ℃ 干燥 3 h,取出,置干燥器内冷却 30 min,精密称重,计算干膏率。分别进行直观分析和方差分析,结果见表 2 和表 3。

表 2 黄芪桂枝五物汤水提取正交试验安排

No.	A	B	C	D	黄芪甲苷	芍药苷	干膏率
					/mg·g <sup>-1</sup>	/mg·g <sup>-1</sup>	/%
1	1	1	1	1	0.42	17.16	20.51
2	1	2	2	2	0.52	16.62	26.50
3	1	3	3	3	0.86	19.60	30.46
4	2	1	2	3	0.95	24.45	24.67
5	2	2	3	1	0.51	18.54	21.62
6	2	3	1	2	0.80	21.89	27.29
7	3	1	3	2	0.53	22.38	27.51
8	3	2	1	3	0.72	21.25	29.47
9	3	3	2	1	0.62	20.91	23.61
黄芪甲苷							
K <sub>1</sub>	0.601	0.634	0.648	0.519			
K <sub>2</sub>	0.754	0.585	0.696	0.617			
K <sub>3</sub>	0.623	0.759	0.633	0.841			
R <sub>1</sub>	0.153	0.174	0.063	0.322			
芍药苷							
K <sub>1</sub>	17.796	21.332	20.101	18.871			
K <sub>2</sub>	21.625	18.805	20.662	20.298			
K <sub>3</sub>	28.724	20.800	20.174	21.768			
R <sub>2</sub>	10.928	2.527	0.561	2.897			
干膏率							
K <sub>1</sub>	25.823	24.230	25.757	21.913			
K <sub>2</sub>	24.527	25.863	24.927	27.100			
K <sub>3</sub>	26.863	27.120	26.530	28.200			
R <sub>3</sub>	2.336	2.890	1.603	6.287			

以黄芪甲苷的含量为考察指标,极差显示,各因素作用主次为 D > B > A > C; 方差分析结果表明 D 因素的影响有显著性意义 (P < 0.05); 优选水平组合 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。

以芍药苷的含量为考察指标,极差显示,各因素作用主次为 A > D > B > C; 方差分析结果表明 A, B, D 各因素的影响均有显著性意义 (P < 0.05); 优选水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>。以干膏率为考察指标,极差显示,各因素作用主次为 D > B > A > C; 方差分析结果表明 A, B, C, D 各因素的影响均无显著性意义; 优选水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。综合以上分析,确定最佳提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即药材浸泡 0.5 h、加 10 倍水量、每次煎煮 1.5 h、煎煮 3 次。

**2.7 最佳提取工艺的验证试验** 取全方药材 3 份,按优选的提取工艺条件提取,测定黄芪甲苷、芍药

苷、干浸膏,结果见表 4。结果表明优选出的工艺条件稳定、合理、可行。

表 3 黄芪桂枝五物汤水提取正交试验方差分析

指标	方差来源	SS	f	MS	F	P
黄芪甲苷	A	0.041	2	0.020	6.426	
	B	0.048	2	0.024	7.571	
	C(误差)	0.006	2	0.003	1.000	
	D	0.163	2	0.082	25.688	< 0.05
芍药苷	A	28.520	2	14.260	51.121	< 0.05
	B	10.652	2	5.326	19.094	< 0.05
	C(误差)	0.558	2	0.279	1.000	
	D	12.587	2	6.294	22.562	< 0.05
干膏率	A	8.223	2	4.112	2.132	
	B	12.600	2	6.300	3.266	
	C(误差)	3.858	2	1.929	1.000	
	D	67.634	2	33.817	17.533	

注: F<sub>0.05</sub>(2,2) = 19.00, F<sub>0.01</sub>(2,2) = 99.00; 因各项中因素 C 离均差平方和最小,将其作为误差项处理。

表 4 最佳工艺验证试验

No.	黄芪甲苷	芍药苷	干膏率
	/mg·g <sup>-1</sup>	/mg·g <sup>-1</sup>	/%
1	0.868 1	22.262 5	28.226 7
2	0.852 2	22.756 6	28.9326
3	0.878 9	22.562 1	28.3971
RSD/%	1.55	1.10	1.29

### 3 讨论

本方中桂枝和生姜 2 味药含有挥发油,黄芪桂枝五物汤的提取工艺分为挥发油提取和水提取两部分,即先用水蒸气蒸馏法提取桂枝和生姜挥发油,其余药材与桂枝、生姜药渣合并进行水提。本试验为水提取工艺研究。

从芍药苷提取的正交试验结果来看,浸泡时间对芍药苷的提取有显著的影响。因此,对黄芪桂枝五物汤进行提取之前有必要用水浸泡药材,也符合中药汤剂传统制备方法。

本试验通过正交试验优选出最佳提取工艺稳定,可靠,简便,为黄芪桂枝五物汤制剂的生产和临床应用提供了试验依据。

### [参考文献]

- [1] 黄仰模. 金匱要略讲义 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 71.
- [2] 李飞. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 728.
- [3] 吴发宝, 陈希元. 黄芪药理作用研究综述 [J]. 中药材, 2004, 27(3): 233.
- [4] 刘鹰翔, 马玉卓. 白芍的化学成分与药理研究进展 [J]. 中草药, 1995, 28(8): 437.

[责任编辑 全燕]

· 化学与分析 ·

## 毛细管电泳法测定延胡索中 2 种生物碱含量 电泳条件优化研究

邹薇<sup>1</sup>, 张鹤<sup>2</sup>, 孟宪生<sup>1\*</sup>, 包永睿<sup>1</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽阳市食品药品检验所, 辽宁 辽阳 111000)

**[摘要]** 目的: 优化毛细管电泳同时测定延胡索中延胡索乙素和原阿片碱含量的电泳条件, 建立其含量测定方法。方法: 采用单因素法, 对影响缓冲溶液的组成、浓度、pH, 分离电压, 进样时间进行多水平优选。利用优化后的电泳条件同时测定延胡索中延胡索乙素和原阿片碱。结果: 以 60 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠 (磷酸调 pH 6.0)-甲醇 (5% THF) (体积比为 65:35) 为运行缓冲液, 运行电压为 17 kV, 进样电压为 40 kPa, 进样时间为 3 s, 温度为 20 ℃, 检测波长为 283 nm 的电泳条件为最佳优化条件, 在 20 min 内达到完全分离。结论: 确定了毛细管电泳法测定延胡索中两种生物碱含量电泳条件, 该法简便、准确、可靠, 为毛细管电泳法测定药材含量提供了一定的方法学依据, 为延胡索药材的质量控制提供参考。

**[关键词]** 毛细管电泳; 电泳条件; 延胡索; 延胡索乙素; 原阿片碱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0059-04

## Research Based on Capillary Electrophoresis Method to Determine the Content of Two Alkaloids in Corydalis Rhizoma

ZOU Wei<sup>1</sup>, ZHANG He<sup>2</sup>, MENG Xian-sheng<sup>1\*</sup>, BAO Yong-rui<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoyang Institute for Food and Drug Control, Liaoyang 111000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the electrophoresis condition of determining the content of tetrahydropalmatine and protopine in Corydalis Rhizoma simultaneously by the method of capillary electrophoresis, and to establish the determination method. **Method:** Single factor method was used to optimize the composition, concentration, pH value, separation voltage and injection time that can influence the buffer solution. And the optimized electrophoresis condition was used to detect the contents of tetrahydropalmatine and protopine simultaneously. **Result:** The buffer solution was 60 mmol·L<sup>-1</sup> of sodium dihydrogen phosphate (pH 7)-methanol (5% THF) (65:35). The running voltage was set at 17 kV and the voltage of sample injection was at 40 kPa. The time of sample injection was 3 s with temperature of 20 ℃ and detection wavelength of 283 nm. With the optimized condition the complete separation can adopte within 20 min. **Conclusion:** The electrophoresis condition of determining the two content in Corydalis Rhizoma was established, that is a simple, accurate and reliable method, which provides the basis of determining content with capillary electrophoresis method and also provides a reference for the quality control of Corydalis Rhizoma.

**[Key words]** capillary electrophoresis; electrophoresis condition; Corydalis Rhizoma; tetrahydropalmatine; protopine

**[收稿日期]** 20110423(003)

**[基金项目]** 国家“十一五”重大新药创制科技重大项目(20102x09401-304-201)

**[第一作者]** 邹薇, 硕士研究生, Tel:0411-87406496, 15140394048, E-mail:664789708@qq.com

**[通讯作者]** \* 孟宪生, 博士后, 教授, 从事中药组分配伍、代射组学及药品质量分析研究, Tel:0411-87406496, E-mail:mxsvvv@126.com