

3.2 评价指标选择 丁香与生姜富含挥发油,其中丁香油是前者有效成分,也是其温里作用的主要物质,具有治疗食管炎、健脾胃、减缓胃排空等作用^[8];生姜油具有刺激胃黏膜、促进血液循环、振奋胃功能等作用,是后者有效成分。没食子酸是丁香柿蒂颗粒君药柿蒂与丁香的共有成分,也是前者涩性和活性物质之一^[9-10];人参作为使药,在该方中也有举足轻重的作用^[11],人参皂苷 Re、Rb₁是其活性成分。并且,干膏率对该方提取工艺也有较大影响。另外,生姜活性成分姜辣素的性质不稳定,同时本实验发现提取液中人参中 Rg₁ 含量较低,故不对两者进行检测。

参考文献:

[1] 王宏伟. 丁香柿蒂汤[J]. 开卷有益: 求医问药, 2016(3): 52.
[2] 闻 彬. 丁香柿蒂汤、穴位注射联合多潘立酮治疗肿瘤致顽固性呃逆随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 54(11): 120-121.

[3] 张晓敏, 肖 健, 杜倩楠. 丁香柿蒂汤治疗肿瘤致顽固性呃逆的临床效果[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2015, 22(11): 1397-1398.
[4] 林 渊, 周良良, 吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 264-266.
[5] 胡洪波, 钱长苏. 丁香柿蒂在呃逆中的应用[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(1): 84.
[6] 周海燕, 付超美, 杨 明, 等. 中药复方配方颗粒研制的共性技术[J]. 中医药学刊, 2006, 24(5): 812-813.
[7] 张碧玉, 邱宝玉, 黄南龙. 重视中药汤剂的煎煮方法[J]. 海峡药学, 2014, 26(1): 39-42.
[8] 朱金段, 袁德俊, 林新颖. 丁香的药理研究现状及临床应用[J]. 中国药物经济学, 2013(1): 32-35.
[9] 林俊芝, 张定堃, 段 渠, 等. 中药涩味的形成原理及掩蔽技术的研究概况[J]. 中草药, 2014, 45(18): 2716-2721.
[10] 黄文平, 黄陆强, 宋永贵, 等. 不同产地柿蒂药材中没食子酸含量的比较[J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(3): 58-59, 62.
[11] 谢金东, 涂春香, 陈继承, 等. 丁香柿蒂汤及其拆方对小鼠离体小肠收缩活动的影响[J]. 福建中医学院学报, 2010, 20(4): 36-37.

葛根复方挥发油和水溶性成分提取工艺的优化

周 晶¹, 李 玲¹, 王 冰¹, 张 彤^{1*}, 袁秀荣^{1*}, 刘素嫒²

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003)

摘要: 目的 优化葛根复方挥发油和水溶性成分提取工艺。方法 以浸泡时间、提取时间、加水量为影响因素, 综合评分(藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚含量, 葛根素、阿魏酸转移率, 干膏得率)为评价指标, 正交试验优化提取工艺。结果 最佳条件为浸泡时间 30 min, 提取 2 次, 每次加入 10 倍量水, 第 1 次提取 5 h 以收集挥发油, 第 2 次提取 1 h 以收集水溶性成分, 藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚含量分别为 0.806、1.111、1.635 mg/g, 葛根素、阿魏酸转移率分别为 61.62%、73.38%, 干膏得率为 34.42%。结论 该方法稳定可行, 可用于提取葛根复方挥发油和水溶性成分。

关键词: 葛根复方; 挥发油; 水溶性成分; 提取; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-4528(2017)03-0517-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-4528.2017.03.015

Optimization of extraction for volatile oils and water-soluble constituents in Compound Gegen Decoction

收稿日期: 2016-05-10

基金项目: 国家自然科学基金(81270901); 上海市教委基金(Y11304ZY)

作者简介: 周 晶(1991—), 女, 硕士生, 从事中药新药研究。Tel: (021) 51322685, E-mail: zj54603007@163.com

* 通信作者: 张 彤, 男, 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, 女, 博士, 研究员, 从事中药新药开发研究。Tel: (021) 51322044, E-mail: yuany@189.cn

ZHOU Jing¹, LI Ling¹, WANG Bing¹, ZHANG Tong^{1*}, YUAN Xiu-rong^{1*}, LIU Su-huan²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. The First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, China)

KEY WORDS: Compound Gegen Decoction; volatile oils; water-soluble constituents; extraction; orthogonal test

葛根复方由葛根、当归、桂枝、细辛组成,用于治疗糖尿病并发症中的周围神经病变,具有活血化瘀,疏经通脉功效,方中当归、桂枝、细辛均含有挥发油,具有镇痛、抗炎等功效,是主要的活性成分^[1-2];葛根中的葛根素可治疗糖尿病^[3],当归中的阿魏酸具有镇痛作用^[4]。针对其有效成分为挥发油与水溶性成分的特点,本实验以处方中藁本内酯、甲基丁香酚、桂皮醛、葛根素和阿魏酸为指标成分,采用正交试验进行提取工艺优化。

1 材料

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、141129,经上海中医药大学高级实验师李俊松鉴定,符合2015版《中国药典》一部要求。葛根素、阿魏酸、桂皮醛、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)。甲醇、乙腈为色谱纯(安徽时联特种溶剂股份有限公司);其他试剂均为分析纯;水为纯净水(杭州娃哈哈百立食品有限公司)。Agilent 1200 series 高效液相色谱仪,配置VWD检测器、四元恒流泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱(美国安捷伦公司);ZNHV-II电热套(巩义市予华仪器有限责任公司);BS124S电子天平(德国赛多利斯公司);RE52旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂);DHG-9053A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电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

2 方法与结果

2.1 提取工艺 按照3倍处方称取葛根、当归、桂枝、细辛药材,第一次提取时水蒸气蒸馏收集挥发油,无水乙醇定容,对其进行含有量测定。蒸馏后的水溶液与第二次水提液合并,减压浓缩至0.2 g生药/mL,进行含有量测定。

2.2 藁本内酯含有量测定

2.2.1 色谱条件^[5] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 甲醇-水

(70:30);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 330 nm;柱温 35 °C。理论塔板数按藁本内酯计,应不低于5 000。

2.2.2 对照品贮备液制备 精密称取藁本内酯对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.738 mg该成分的溶液,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取挥发油适量,无水乙醇定容至25 mL。再取200 μL,无水乙醇定容至10 mL,即得。

2.2.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除当归以外的其他药材,按“2.1”项下方法提取,按“2.2.3”项下方法制备,即得。

2.2.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性对照溶液适量,注入色谱仪,在“2.2.1”项色谱条件下分析,结果见图1,可知阴性对照溶液在藁

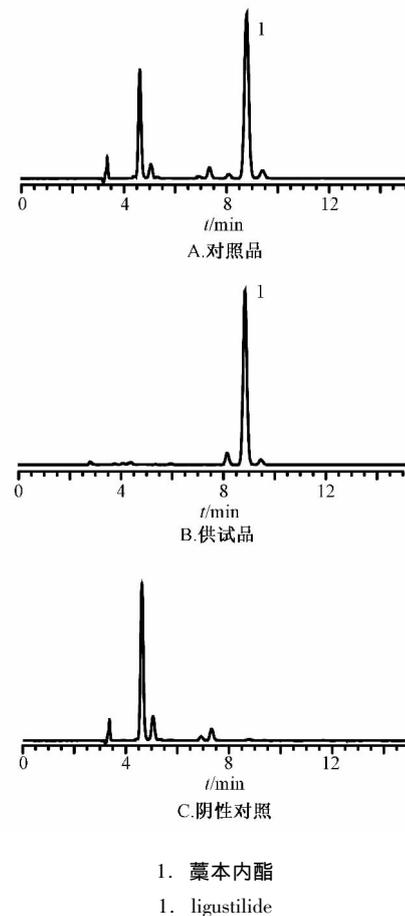


图1 藁本内酯 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for ligustilide

本内酯色谱峰保留时间处无吸收,表明处方中其他药味无干扰。

2.2.6 线性关系考察 以“2.2.2”项下对照品贮备液为母液,制备 369.0、147.6、73.80、29.52、14.76、7.380 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入色谱仪。以溶液质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 12.377X - 11.648$ ($r = 0.9990$),表明藁本内酯在 7.380 ~ 369.0 μg 范围内线性关系良好。

2.3 桂皮醛含有量测定

2.3.1 色谱条件^[6] DiamonsilTM Plus C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (28 : 72); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 290 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论塔板数按桂皮醛计,应不低于 3 000。

2.3.2 对照品贮备液制备 精密称取桂皮醛对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1.025 3 mg 该成分的溶液,摇匀,即得。

2.3.3 供试品溶液制备 取挥发油适量,无水乙醇定容至 25 mL。再取 200 μL ,无水乙醇定容至 10 mL,即得。

2.3.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除桂枝以外的其他药材,按“2.1”项下方法提取,按“2.3.3”项下方法制备,即得。

2.3.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性对照溶液适量,注入色谱仪,在“2.2.1”项色谱条件下分析,结果见图 2,可知阴性对照溶液在桂皮醛色谱峰保留时间处无吸收,表明处方中其他药味无干扰。

2.3.6 线性关系考察 以“2.3.2”项下对照品贮备液为母液,制备 205.06、102.35、51.265、20.506、10.253、5.126 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入色谱仪。以溶液质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 137.15X - 4.3846$ ($r = 0.9995$),表明桂皮醛在 5.126 5 ~ 205.06 μg 范围内线性关系良好。

2.4 甲基丁香酚含有量测定

2.4.1 色谱条件^[7] DiamonsilTM Plus C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.085% 磷酸 (37 : 63); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论塔板数按甲基丁香酚计,应不低于 3 000。

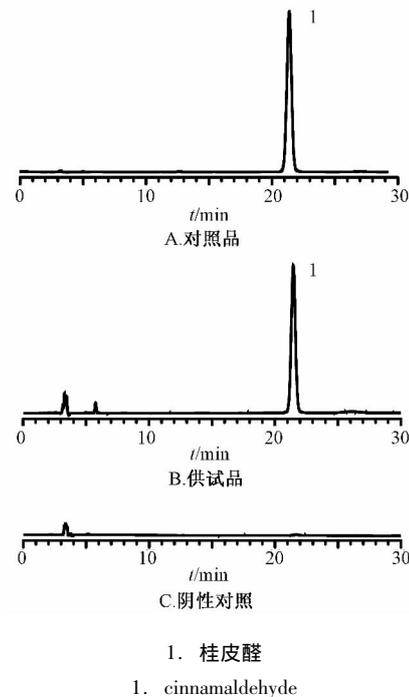


图 2 桂皮醛 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms for cinnamaldehyde

2.4.2 对照品贮备液制备 精密称取甲基丁香酚对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 11.582 mg 该成分的溶液,即得。

2.4.3 供试品溶液制备 取挥发油适量,无水乙醇定容至 25 mL。再取 200 μL ,无水乙醇定容至 10 mL,即得。

2.4.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除细辛以外的其他药材,按“2.1”项下方法提取,按“2.4.3”项下方法制备,即得。

2.4.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性对照溶液适量,注入色谱仪,在“2.2.1”项色谱条件下分析,结果见图 3,可知阴性对照溶液在甲基丁香酚色谱峰保留时间处无吸收,表明处方中其他药味无干扰。

2.4.6 线性关系考察 以“2.4.2”项下对照品贮备液为母液,制备 231.64、92.656、23.164、11.582、4.632 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液,分别吸取 10 μL 注入色谱仪。以溶液质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 10.57X - 43.943$ ($r = 0.9995$),表明甲基丁香酚在 4.632 8 ~ 231.64 μg 范围内线性关系良好。

2.5 葛根素含有量测定

2.5.1 色谱条件^[8] DiamonsilTM Plus C_{18} 色谱柱

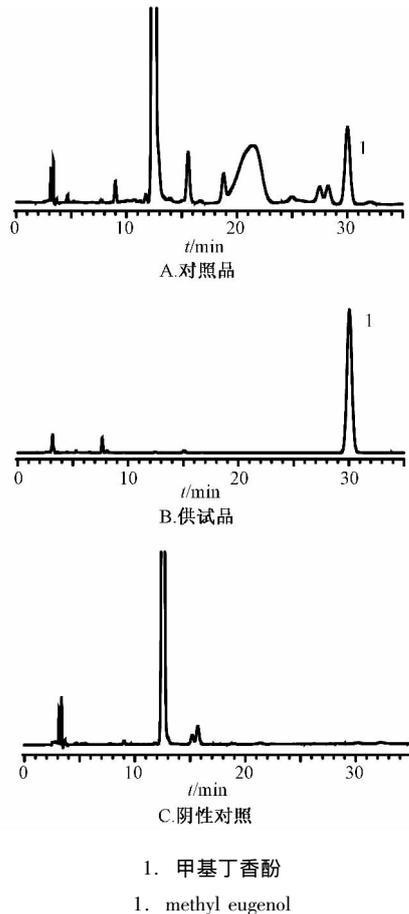


图3 甲基丁香酚 HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms for methyl eugenol

(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.085% 磷酸 (25 : 75); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 30 °C。理论塔板数按葛根素计, 应不低于 4 000。

2.5.2 对照品贮备液制备 精密称取葛根素对照品适量, 加 30% 乙醇制成每 1 mL 含 0.989 38 mg 该成分溶液, 摇匀, 即得。

2.5.3 供试品溶液制备 取样品溶液适量, 过滤, 精密移取 0.1 mL, 25% 甲醇定容至 10 mL, 即得。

2.5.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除葛根以外的其他药材, 按“2.1”项下方法提取, 按“2.5.3”项下方法制备, 即得。

2.5.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性对照溶液适量, 注入色谱仪, 在“2.2.1”项色谱条件下分析, 结果见图 4, 可知阴性对照溶液在葛根素色谱峰保留时间处无吸收, 表明处方中其他药味无干扰。

2.5.6 线性关系考察 以“2.5.2”项下对照品贮备液为母液, 制备 538.62、215.448、53.862、

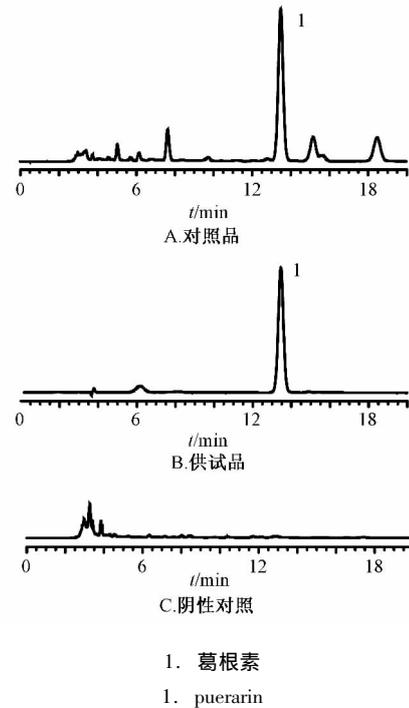


图4 葛根素 HPLC 色谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms for puerarin

21.544 8、10.772 4 μg/mL 对照品溶液, 分别吸取 10 μL 注入色谱仪。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 49.632X - 90.475$ ($r = 1$), 表明葛根素在 10.772 4 ~ 538.620 μg 范围内线性关系良好。

2.6 阿魏酸含量测定

2.6.1 色谱条件^[6] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.085% 磷酸 (10 : 90); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 316 nm; 柱温 35 °C。理论塔板数按阿魏酸计, 应不低于 5 000。

2.6.2 对照品贮备液制备 精密称取阿魏酸对照品适量, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含 0.738 mg 该成分溶液, 摇匀, 即得。

2.6.3 供试品溶液制备 取样品溶液适量, 过滤, 精密移取 1 mL, 10% 乙腈定容至 5 mL, 即得。

2.6.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除当归以外的其他药材, 按“2.1”项下方法提取, 按“2.6.3”项下方法制备, 即得。

2.6.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性对照溶液适量, 注入色谱仪, 在“2.2.1”项色谱条件下分析, 结果见图 5, 可知阴性对照溶液在阿魏酸色谱峰保留时间处无吸收, 表明处方中其他药味无干扰。

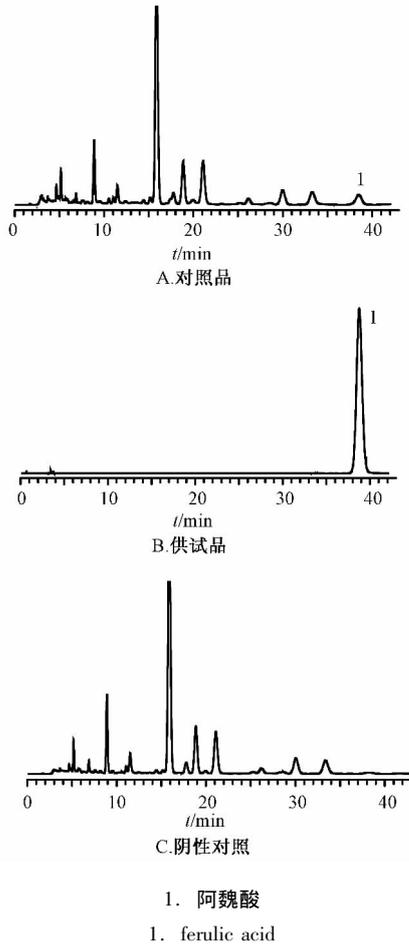


图5 阿魏酸 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms for ferulic acid

2.6.6 线性关系考察 以“2.6.2”项下对照品贮备液为母液，制备 102.2、10.22、8.176、5.11、3.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液，分别吸取 10 μL 注入色谱仪。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 58.153X - 72.864$ ($r = 0.9990$)，表明阿魏酸在 2.026 ~ 405.2 μg 范围内线性关系良好。

2.7 正交试验

2.7.1 试验设计 根据葛根复方中各指标性成分的特点，水提 2 次，第一次收集挥发油，过滤，收集滤液，药渣再加水提取，合并 2 次水提液。以浸泡时间 (A)、提取时间 (B)、加水量 (C) 为影响因素，选用 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验。因素水平见表 1，结果见表 2~3，方差分析见表 4。

直观分析结果显示，各因素的主次关系是 $C > B > A$ ，由于因素 A、B 的离均差平方和均小于误差项因素 D，故将一起并入误差项计算。方差分析显示，加水量 (C) 为显著性因素，选择 C_3 ；浸

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 浸泡时间/min	B 提取时间/h	C 加水量/倍
1	30	3 + 0.5	6 + 6
2	60	5 + 1	8 + 8
3	90	7 + 2	10 + 10

表 2 综合评分

Tab. 2 Comprehensive scores

试验号	藜本内酯/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	桂皮醛/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	甲基丁香酚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	葛根素转 移率/%	阿魏酸转 移率/%	干膏得 率/%	综合 评分
1	0.812	1.191	1.948	47.01	68.57	27.20	72.89
2	1.472	1.762	2.269	56.14	71.31	30.52	85.13
3	2.226	1.733	2.663	59.05	70.87	33.40	91.45
4	0.539	1.019	1.503	51.69	74.71	30.15	74.59
5	1.618	1.370	2.284	57.37	72.61	31.72	85.36
6	2.213	2.101	2.653	44.12	51.77	27.38	77.22
7	1.307	1.251	1.867	58.37	84.66	32.21	88.06
8	1.991	1.885	2.740	47.50	60.12	29.45	81.22
9	1.313	1.428	2.404	48.45	59.21	28.23	74.30

注：藜本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚含有量，以及干膏得率权重系数均为 0.1，葛根素转移率权重系数为 0.2，阿魏酸转移率权重系数为 0.4。综合评分 = (藜本内酯含有量 ÷ 最高含有量) × 0.1 × 100 + (桂皮醛含有量 ÷ 最高含有量) × 0.1 × 100 + (甲基丁香酚含有量 ÷ 最高含有量) × 0.1 × 100 + (干膏得率 ÷ 最高得率) × 0.1 × 100 + (葛根素转移率 ÷ 最高转移率) × 0.2 × 100 + (阿魏酸转移率 ÷ 最高转移率) × 0.4 × 100

表 3 试验设计和结果

Tab. 3 Design and results of tests

试验号	因素				综合评分
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	72.89
2	1	2	2	2	85.13
3	1	3	3	3	91.45
4	2	1	2	3	74.59
5	2	2	3	1	85.36
6	2	3	1	2	77.22
7	3	1	3	2	88.06
8	3	2	1	3	81.22
9	3	3	2	1	74.30
K_1	83.157	78.513	77.11	77.517	
K_2	79.057	83.903	78.007	83.47	
K_3	81.193	80.99	88.29	82.42	
R	4.1	5.39	11.18	5.953	

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	25.230	2	0.585	5.140	>0.05
B	43.673	2	1.012	5.140	>0.05
C	231.543	2	5.364	5.140	<0.05
误差(A+B+D)	129.490	6	—	—	—

泡时间 (A) 和提取时间 (B) 无显著性影响，故选择均值最大，即 A_1 和 B_2 。综上所述，最优提取

工艺为 A₁B₂C₃, 即加入 10 倍量水, 浸泡 30 min, 水蒸气蒸馏 5 h, 第二次水提 1 h。

2.7.2 验证试验 称取处方量各药材, 按最优提取工艺进行提取, 平行验证试验 3 批。结果, 藁本内酯、桂皮醛、甲基丁香酚含有量为别为 0.806 mg/g (RSD 1.29%)、1.111 mg/g (RSD 0.18%)、1.635 mg/g (RSD 1.46%), 葛根素、阿魏酸转移率分别为 61.62% (RSD 2.26%)、73.38% (RSD 1.48%), 干膏得率 34.42% (RSD 1.25%), 表明该工艺合理可行。

3 讨论

常规挥发油提取工艺仅考虑到挥发油的提取量^[9], 而忽视主要成分的提取效果, 故本实验结合药效中主要成分含有量来评价挥发油的提取效果。由于阿魏酸热稳定性较差^[10], 故需注意提取时间对其转移率的影响, 研究表明^[11-12], 5 h 内阿魏酸提取较完全, 而且对其破坏程度较小。在提取挥发油时, 需要长时间加热以保证其提取率, 而葛根复方中的当归既含有挥发油, 又含有阿魏酸, 故须权衡当归药材的煎煮时间, 以兼顾两者的提取。

传统提取过程中, 含有挥发油药材需进行水蒸气蒸馏, 在收集挥发油后, 再将药渣与其他药材合并, 与蒸馏液共同煎煮, 该方法下热不稳定成分易分解, 药效得不到保证。因此, 参考 2015 版《中国药典》中成方制剂及院内制剂的水煎提取方法, 本实验将葛根与其他药材同时进行水蒸气蒸馏, 可兼顾挥发油和水溶性成分提取工艺的优化。

综上所述, 本试验采用正交试验, 通过测定多

种有效成分含有量及干膏得率, 对葛根复方提取工艺进行优化, 该方法稳定可行, 可为其开发利用提供实验依据。

参考文献:

- [1] 王冰冰, 齐文, 王莉莉, 等. 三种细辛挥发油的化学成分、镇痛作用及急性毒性实验的比较研究(英文)[J]. 中国药学杂志, 2014, 23(7): 480-489.
- [2] 徐世军, 沈映君, 解宇环. 桂枝挥发油的抗炎作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(3): 186-189.
- [3] 吴伟, 朱章志, 李红, 等. 葛根素治疗早期 2 型糖尿病肾病的 Meta 分析[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1399-1406.
- [4] 杨瑜, 查仲玲, 朱蕙, 等. 当归提取物的镇痛作用[J]. 医药导报, 2002, 21(8): 481-482.
- [5] 杨艳, 易进海, 刘云华, 等. 一测多评法测定中成药中洋川芎内酯 A 和藁本内酯[J]. 中成药, 2015, 37(5): 1000-1004.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 133, 230, 276, 333.
- [7] 赵启苗, 王远志, 贾天柱. HPLC 测定长形肉豆蔻及其不同炮制品挥发油中甲基丁香酚、异甲基丁香酚及黄樟醚含量[J]. 中成药, 2009, 31(5): 801-802.
- [8] 杨跃龙. 通脉口服液液中阿魏酸和葛根素的含量测定[J]. 中南药学, 2007, 5(1): 31-33.
- [9] 雷林洁, 滕亮, 赵欣, 等. 多伞阿魏挥发油提取工艺及化学成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1251-1256.
- [10] 吕海涛, 王艳丽, 王英芹. 当归提取液中阿魏酸稳定性研究[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1555-1557.
- [11] 阎雪梅. 煎煮时间对当归中阿魏酸稳定性的影响[J]. 天津药学, 2005, 17(3): 21-37.
- [12] 易延达, 陈志良. 当归提取成分种类与提取工艺相关性的探究[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(4): 335-338.