

清补平衡膏提取工艺的优化

陈国宝¹, 宋桂萍¹, 龚伟¹, 柳佳¹, 张彦南²

(1. 南京中医药大学江阴附属医院, 江苏 江阴 214400; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要: 目的 优化清补平衡膏的提取工艺。方法 HPLC法测定没食子酸、5-羟甲基糠醛、芍药苷含量, 并以其为评价指标。在单因素试验基础上, 正交试验优选提取工艺。结果 最佳条件为加8倍量水, 浸泡时间1 h, 煎煮2次, 每次90 min, 没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含量分别为212.4、7 340.52、247.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。结论 该方法合理可行, 可为清补平衡膏的生产及其质量标准的建立提供依据。

关键词: 清补平衡膏; 提取工艺; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 芍药苷; HPLC; 单因素试验; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1716-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.012

Optimization of the extraction process for Qingbu Pingheng Thick Oral Paste

CHEN Guo-bao¹, SONG Gui-ping¹, GONG Wei¹, LIU Jia¹, ZHANG Yan-nan²

(1. Jiangyin Hospital Affiliated of Chinese Medicine, Wuxi 214400, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction process of Qingbu Pingheng Thick Oral Paste (a tonic). **METHODS** The contents of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural and paeoniflorin, as the indices for evaluation, were determined by HPLC. On the basis of single factor test, orthogonal test was applied to optimizing the extraction process. **RESULTS** The best conditions were found to be at 8 times of water consumption, 1 h for soak time, and twice extraction frequency (90 min each time). The contents of so obtained gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural and paeoniflorin were 212.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7 340.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 247.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. **CONCLUSION**

This method can be a reasonable and practicable basis for the production of Qingbu Pingheng Thick Oral Paste and its quality control.

KEY WORDS: Qingbu Pingheng Thick Oral Paste; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; paeoniflorin; HPLC; single factor test; orthogonal test

清补平衡膏源自江阴市中医院江苏省名老中药专家袁士良工作室, 袁老主张清补兼施, 以求气血阴阳平衡之辩证理念。从他历年开具的膏方处方中挑选出具有代表性者进行研究, 拟名为清补平衡膏方, 该方由黄连、姜半夏、茯苓、炙黄芪、防风等43味药组成, 具有理气化痰, 清胆和胃, 健脾益气, 补肾益精之功能, 主治胆胃不和、脾胃虚弱、气血不足、肾虚精亏等症。

目前, 膏方的使用人群以及适应范围越来越广, 但关于其质量控制的研究报道较少^[1-3]。由于清补平衡膏组方复杂、药味众多, 为更好地控

制其质量和疗效, 本实验以没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷为指标性成分, 分别考察煎煮次数、浸泡时间、煎煮时间、加水量对膏方中主要成分含量的影响, 并通过正交试验优选出最佳提取工艺, 为该膏方质量标准的制定提供理论依据。

1 仪器与试剂

LC-20AB 高效液相色谱仪 (配置 SPD-M20A 检测器, 日本岛津公司); BP211D 电子分析天平; 超声清洗器 (巴克超声波科技有限公司); 离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司)。

收稿日期: 2015-12-02

基金项目: 无锡市卫生局科研计划项目 (ML201207)

作者简介: 陈国宝 (1967—), 男, 副教授, 主任中药师, 从事中药制剂与质量标准研究。Tel: 13901528020, E-mail: cgbjy@sina.com

清补平衡膏(批号 20150305、20150325、20150429)。没食子酸(批号 110831-201204)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-201509)、芍药苷(批号 110736-201438)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

2 含有量测定方法的建立

2.1 色谱条件 Hibar ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱(0~9 min, 5%~9% A; 9~14 min, 9%~15% A; 14~32 min, 15%~17% A; 32~35 min, 17%~5% A);体积流量 1 mL/min;检测波长 230 nm;柱温 35 °C;进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、5-羟甲基糠醛、芍药苷对照品适量,置于同一量瓶中,甲醇溶解定容,制得 672.75、537.9、884.61 μg/mL 对照品溶液。

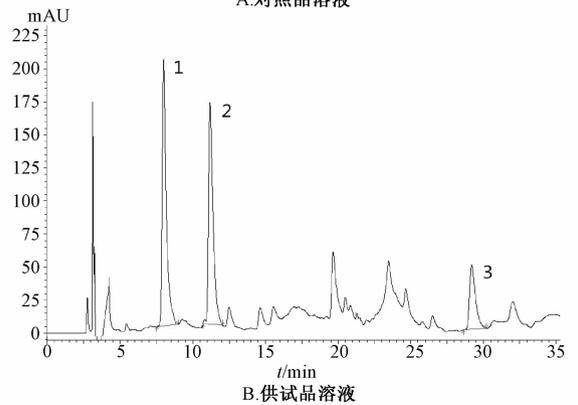
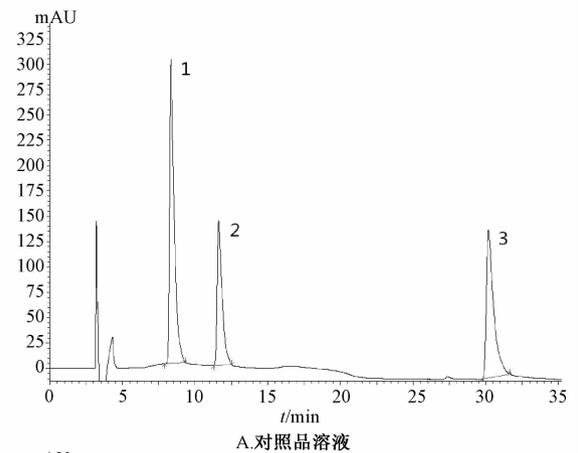
2.3 供试品溶液的制备 将膏方浓缩液混匀,精密称取 3.0 g,置于离心管中,加入 3 mL 水混匀后,再加入 6 mL 乙酸乙酯萃取,充分摇匀后离心,取上清液,重复 3 次,合并萃取液,置于蒸发皿中挥干,甲醇溶解残渣,定容至 5 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密移取“2.2”项下对照品溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 mL,置于 5 个 5 mL 量瓶中,甲醇稀释定容,在“2.1”项色谱条件下测定。以对照品质量浓度(μg/mL)为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)绘制标准曲线,得回归方程为没食子酸 $y = 18\ 336x + 265\ 159$ ($r = 0.999\ 4$),在 13.45~672.75 μg/mL 范围内线性关系良好;5-羟甲基糠醛 $y = 12\ 348x + 79\ 535$ ($r = 0.999\ 8$),在 10.76~537.9 μg/mL 范围内线性关系良好;芍药苷 $y = 11\ 307x + 53\ 943$ ($r = 0.999\ 8$) 在 17.69~884.61 μg/mL 范围内线性关系良好。色谱图见图 1。

3 单因素考察

3.1 煎煮次数

3.1.1 煎煮方法 考虑到紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参为膏方的细料药,须在收膏时另行兑入,不在煎煮方法的考察范围内,故精密称取除上述细料药外的处方量药材 3 份,每份 730 g,按表 1 方法煎煮,提取液趁热滤过,合并,浓缩,定容至 700 mL。



1. 没食子酸 2. 5-羟甲基糠醛 3. 芍药苷

1. gallic acid 2. 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde 3. paeoniflorin

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

编号	煎煮次数/次	加水量/倍	浸泡时间/min	煎煮时间/min
1	1	10	60	60
2	2	10	60	60
3	3	10	60	60

3.1.2 得膏率和相对密度 精密称取上述浓缩液各 50 mL(相当于 52.14 g 原药材),置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105 °C 干燥 3 h 至恒重,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算得膏率^[4],公式为得膏率 = (干浸膏质量/52.14) × 100%

相对密度的测定方法参照《中国药典》2010 年版(一部)附录 VII A 相对密度测定法中的比重瓶法^{[4][41]},结果见表 2。

3.1.3 含有量测定

3.1.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

3.1.3.2 供试品溶液的制备 精密量取以上浓缩液 3 mL,置于 15 mL 离心管中,加入 3 mL 水混匀

表2 煎煮次数对得膏率及相对密度的影响

Tab. 2 Effects of decocting times on yield and relative density

编号	煎煮次数/次	得膏率/%	相对密度
1	1	15.25	1.086 0
2	2	29.79	1.142 6
3	3	29.22	1.147 9

后,再加入6 mL 乙酸乙酯萃取,摇匀后离心,取上清液,重复3次,合并萃取液,置于蒸发皿中挥干,甲醇溶解残渣,定容至5 mL 量瓶中,0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

3.1.3.3 方法 在“2.1”项色谱条件下测定各样品中没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量,每份重复3次。由于没食子酸和芍药苷存在于本处方多种药材中,含有量相对较高;5-羟甲基糠醛是糖类的降解产物,为煎煮过程中产生的新成分,可能具有一定毒性^[5-7],故设定三者所占权重系数分别为0.4、0.2、0.4。综合评分计算公式分别为:没食子酸=没食子酸实际提取量/没食子酸最大提取量×0.4×100;5-羟甲基糠醛=5-羟甲基糠醛实际提取量/5-羟甲基糠醛最大提取量×0.2×100;芍药苷=芍药苷实际提取量/芍药苷最大提取量×0.4×100,结果见表3。

表3 煎煮次数对各成分含有量的影响

Tab. 3 Effects of decocting times on the contents of various constituents

煎煮次数/次	没食子酸/(mg·mL ⁻¹)	5-羟甲基糠醛/(mg·mL ⁻¹)	芍药苷/(mg·mL ⁻¹)	综合评分
1	129.085	132.018	88.373	56.32
2	263.709	204.741	138.716	96.27
3	248.362	218.136	147.989	97.67

由表可知,煎煮2次时,浓缩液中各成分含有量明显升高;煎煮3次时,得膏率和没食子酸含有量反而下降,而5-羟甲基糠醛和芍药苷变化不大。综合考虑加水量、煎煮时间以及能源、经济等因素,选择煎煮2次。

3.2 浸泡时间

3.2.1 煎煮方法 精密称取除紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参外的处方量药材7份,每份730 g,按表4方法煎煮,提取液趁热滤过,合并,浓缩,定容至700 mL,精密称定质量,得浓缩液总质量。

3.2.2 得膏率和相对密度 精密称取上述各浓缩液适量,置于干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃下干燥3 h至恒重,置干燥器中冷却30 min,

表4 因素水平

Tab. 4 Factors and levels

编号	浸泡时间/h	加水量/倍	煎煮次数/次	煎煮时间/min
1	1	10	2	60
2	2	10	2	60
3	4	10	2	60
4	6	10	2	60
5	8	10	2	60
6	10	10	2	60
7	12	10	2	60

迅速精密称定质量,计算得膏率,公式为得膏率=(干浸膏质量/取样量)×(浓缩液总质量/730)×100%。

相对密度的测定方法参照《中国药典》2010年版(一部)附录VII A 相对密度测定法中的比重瓶法,结果见表5。

表5 浸泡时间对得膏率及相对密度的影响

Tab. 5 Effects of soak time on yield and relative density

编号	浸泡时间/h	得膏率/%	相对密度
1	1	28.59	1.141 8
2	2	28.53	1.143 0
3	4	30.56	1.152 6
4	6	28.26	1.142 4
5	8	29.55	1.148 2
6	10	25.82	1.131 9
7	12	27.36	1.144 4

3.2.3 含有量测定

3.2.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

3.2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取浓缩液3 g,置于15 mL离心管中,加入3 mL水混匀,再加入6 mL 乙酸乙酯萃取,摇匀后离心,取上清液,重复3次,合并萃取液,置于蒸发皿中挥干,甲醇溶解残渣,定容至5 mL 量瓶中,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

3.2.3.3 方法 在“2.1”项色谱条件下测定各样品中没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量,每份重复3次,计算公式同“3.1.3.3”项,结果见表6。由表可知,随着浸泡时间延长,膏方中各成分的含有量有所增加,但到一定时间后增加程度缓慢。因此,选择1、4、8 h 作为浸泡时间的3个水平。

3.3 煎煮时间

3.3.1 煎煮方法 精密称取除紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参外的处方量药材4份,每份730 g,按表7方法煎煮,提取液趁热滤过,合并,浓缩,定容至700 mL,精密称定质量,得浓缩液总质量。

表6 浸泡时间对各成分含有量的影响

Tab. 6 Effects of soak time on the contents of various constituents

浸泡时间/h	没食子酸/ (mg·mL ⁻¹)	5-羟甲基糠醛/ (mg·mL ⁻¹)	芍药苷/ (mg·mL ⁻¹)	综合评分
1	230.339	415.347	135.911	87.73
2	243.016	222.749	146.329	82.90
4	266.787	357.353	153.94	94.81
6	243.182	213.022	140.647	81.07
8	219.263	295.171	155.942	85.17
10	188.162	344.119	154.164	82.43
12	213.838	202.237	163.776	81.80

表7 因素水平

Tab. 7 Factors and levels

编号	煎煮时间/min	浸泡时间/h	加水量/倍	煎煮次数/次
1	30	1	10	2
2	45	1	10	2
3	60	1	10	2
4	90	1	10	2

3.3.2 得膏率和相对密度 同“3.2.2”项，结果见表8。

表8 煎煮时间对得膏率及相对密度的影响

Tab. 8 Effects of decocting time on yield and relative density

编号	煎煮时间/min	得膏率/%	相对密度
1	30	23.33	1.1219
2	45	23.86	1.1061
3	60	24.62	1.1251
4	90	31.72	1.1573

3.3.3 含有量测定

3.3.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

3.3.3.2 供试品溶液的制备 同“3.2.3”项。

3.3.3.3 方法 在“2.1”项色谱条件下测定各样品中没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量，每份重复3次，计算公式同“3.1.3.3”项，结果见表9。

表9 煎煮时间对各成分含有量的影响

Tab. 9 Effects of decocting time on the contents of various constituents

煎煮时间/min	没食子酸/ (mg·mL ⁻¹)	5-羟甲基糠醛/ (mg·mL ⁻¹)	芍药苷/ (mg·mL ⁻¹)	综合评分
30	204.016	384.603	156.608	81.55
45	244.204	323.701	222.709	96.83
60	180.166	262.628	154.817	70.97
90	241.236	264.320	187.112	86.87

由图可知，煎煮45 min时，各成分含有量最高；煎煮时间延长，各成分含有量变化较大。因此，选择45、60、90 min作为煎煮时间的3个

水平。

3.4 加水量

3.4.1 煎煮方法 精密称取除紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参外的处方量药材5份，每份730 g，按表10方法煎煮，提取液趁热滤过，合并，浓缩，定容至700 mL，精密称定质量，得浓缩液总质量。

表10 因素水平

Tab. 10 Factors and levels

编号	加水量/倍	浸泡时间/min	煎煮次数/次	煎煮时间/min
1	8	60	2	60
2	10	60	2	60
3	12	60	2	60
4	14	60	2	60
5	16	60	2	60

3.4.2 得膏率和相对密度 测定方法同“3.2.2”项，结果见表11。

表11 加水量对得膏率及相对密度的影响

Tab. 11 Effects of water volume on yield and relative density

编号	加水量/倍	得膏率/%	相对密度
1	8	25.46	1.12
2	10	25.85	1.13
3	12	25.92	1.13
4	14	27.67	1.14
5	16	27.21	1.14

3.4.3 含有量测定

3.4.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

3.4.3.2 供试品溶液的制备 同“3.2.3”项。

3.4.3.3 方法 在“2.1”项色谱条件下测定各样品中没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量，每份重复3次，计算公式同“3.1.3.3”项，结果见表12。

表12 加水量对各成分含有量的影响

Tab. 12 Effects of water volume on the contents of various constituents

加水量/倍	没食子酸/ (mg·mL ⁻¹)	5-羟甲基糠醛/ (mg·mL ⁻¹)	芍药苷/ (mg·mL ⁻¹)	综合评分
8	171.718	364.693	152.717	80.61
10	193.492	339.215	151.176	82.27
12	181.570	340.259	147.695	79.68
14	193.296	356.907	151.422	83.15
16	184.466	346.517	159.846	83.38

由表可知，加水量不同，膏方中各成分的含有量、得膏率、相对密度也不同，但变化不明显。考虑到药液浓缩时间，以及加14、16倍量水对综合评分影响不大，故选择8、10、14倍量水作为加水量的3个水平。

4 正交试验

4.1 试验设计 以浸泡时间、煎煮时间、加水量为考察因素，对清补平衡膏的提取条件进行优选，因素水平见表13。

表 13 因素水平

Tab. 13 Factors and levels

水平	A 浸泡时间/h	B 煎煮时间/min	C 加水量/倍
1	1	45	8
2	4	60	10
3	8	90	14

4.2 溶液的制备

4.2.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

4.2.2 供试品溶液的制备 精密称取除紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参外的处方量药材9份，每份730 g，按表13因素水平煎煮，提取液趁热滤过，合并，浓缩，定容至700 mL，精密称定质量，得浓缩液总质量。溶液处理方法同“3.2.3”项。

4.3 含有量测定 吸取对照品及供试品溶液各10 μL，注入HPLC色谱仪，以没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量为指标，在“2.1”项色谱条件下测定，考察浸泡时间、煎煮时间、加水量对提取率的影响，结果见表14~15。

由表14可知，各因素对膏方质量的影响程度为C>A>B>D，即影响程度依次为加水量、浸泡时间、煎煮时间。由表15可知，加水量（C）对膏方质量有显著性影响，而浸泡时间（A）和煎煮时间（B）对无显著性影响。

综上所述，最佳提取工艺组合为A₁B₃C₁，即加8倍量水，浸泡1 h，煎煮90 min。

表 14 正交试验结果

Tab. 14 Results of orthogonal tests

编号	A 浸泡时间/ h	B 煎煮时间/ min	C 加水量/ 倍	D 误差	综合 评分
1	1	1	1	1	91.24
2	1	2	2	2	86.55
3	1	3	3	3	97.51
4	2	1	2	3	75.29
5	2	2	3	1	88.69
6	2	3	1	2	95.25
7	3	1	3	2	82.72
8	3	2	1	3	84.76
9	3	3	2	1	81.54
K ₁	91.767	83.083	90.418	87.154	
K ₂	86.411	86.666	81.127	88.174	
K ₃	83.006	91.434	89.638	85.856	
R	8.761	8.351	9.291	2.318	

表 15 方差分析

Tab. 15 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
浸泡	117.045	2	14.464	19	—
煎煮	105.311	2	13.014	19	—
加水量	159.364	2	19.694	19	*
误差	8.09	2	—	—	—

注：F_{0.05}(2, 2) = 19.00

5 工艺验证

5.1 煎煮方法 精密称取除紫河车、阿胶、木糖醇、三七、龟甲胶和西洋参外的处方量药材3份，每份730 g，加8倍量水，浸泡1 h，煎煮2次，每次90 min，提取液趁热滤过，合并，浓缩，定容至700 mL，精密称定质量，得浓缩液总质量。

5.2 得膏率和相对密度 测定方法同“3.2.2”项，结果见表16。

表 16 工艺验证结果

Tab. 16 Results of process verifications

煎煮次数/次	得膏率/%	相对密度	没食子酸/ (mg·mL ⁻¹)	5-羟甲基糠醛/ (mg·mL ⁻¹)	芍药苷/ (mg·mL ⁻¹)	综合评分
1	30.78	1.143 6	216.456	349.833	246.765	99.45
2	30.56	1.146 6	206.399	332.401	245.808	96.44
3	30.36	1.134 8	214.555	339.332	250.201	99.05
平均值	—	—	212.470	340.520	247.590	—
RSD/%	—	—	2.51	2.58	0.93	—

5.3 含有量测定

5.3.1 对照品溶液的制备 同“2.2”项。

5.3.2 供试品溶液的制备 同“3.2.3”项。

5.3.3 工艺验证 吸取对照品及供试品溶液各

10 μL，注入HPLC色谱仪，在“2.1”项色谱条件下测定没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含有量，每份重复3次，结果见表16。由表可知，采用与正交工艺同样的药材量，加8倍量水，浸泡

1 h, 煎煮2次, 每次90 min, 此时没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷含量较稳定, 表明该正交工艺可行。

6 讨论

清补平衡膏方药味众多, 组成比例整体偏少, 成分复杂, 含有量低, 因此选取没食子酸和芍药苷作为指标成分, 两者均存在于多种药材中, 含有量相对较高。5-羟甲基糠醛通常被认为是糖类的降解产物, 广泛存在于中药复方中, 是其煎煮过程中产生的新成分^[5], 其具有改善血液流变学的作用, 能促进家兔体内甘草酸的吸收^[8], 并且对小鼠CCl₄肝损伤模型和血管内皮细胞具有保护作用^[9], 但文献[6]报道该成分对人体横纹肌及内脏有损害, 具有神经毒性, 能与人体蛋白质结合产生积蓄中毒。世界各国均对食品中5-羟甲基糠醛的含有量作了限量规定^[7], Janzowski等^[10]建议每日允许摄入量在60 mg以下, 故有必要控制膏方中5-羟甲基糠醛的含有量。

本实验运用HPLC法对清补平衡膏方中的主要成分没食子酸、5-羟甲基糠醛和芍药苷进行了定量研究。通过单因素和正交试验, 优选最佳提取工艺为加8倍量水, 浸泡1 h, 煎煮2次, 每次90 min。经验证, 该工艺条件下3种成分的含由量分别为212.4、7 340.52、247.59 μg/mL, 表明该提取方法稳定可行, 可为制定清补平衡膏的工艺与质量标

准提供依据。

参考文献:

- [1] 刘丽容, 夏黎明. 浅谈膏方及其临床应用[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(7): 610-612.
- [2] 陈裴裴, 周 昕, 李益民. 膏方临床应用综述[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(3): 108-110.
- [3] 黄力君. 岭南健脾和胃膏方制作工艺及质量标准[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010; 附录62.
- [5] 傅紫琴, 王明艳, 蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 508-520.
- [6] Brustugun J, Tønnesen H H, Edge R, et al. Formation and reactivity of free radicals in 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde—the effect on isoprenaline photostability[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2005, 79(2): 109-119.
- [7] 郭天鑫. 5-羟甲基糠醛的检测方法及其在食品中产生研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [8] 耿 放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF)在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2005, 7(5): 52-57.
- [9] 丁 霞, 王明艳, 余宗亮, 等. 山茱萸中5-羟甲基糠醛的分离鉴定及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 392-196.
- [10] Janzowski C, Glaab V, Samimi E, et al. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione[J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(9): 801-809.