

正交试验优选膝可保方中白芍和秦皮的提取工艺

冷静, 徐冲, 郭小红, 刘霞, 孙全, 杨敏*
(重庆市中医院, 重庆 400021)

摘要:目的 优选膝可保方中白芍和秦皮的提取工艺。方法 以芍药苷、秦皮甲素、秦皮乙素的含量为评价指标, 以加水量、煎煮时间、煎煮次数为影响因素, 正交试验优选提取工艺。结果 最佳条件为加水量10倍, 煎煮3次, 每次1h, 芍药苷的提取率为90.52%, 秦皮甲素和秦皮乙素的总提取率为80.17%。结论 该方法稳定可行, 可用于提取膝可保方中的白芍和秦皮。

关键词: 膝可保方; 白芍; 秦皮; 芍药苷; 秦皮甲素; 秦皮乙素; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)10-2163-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.013

Optimization of the extraction of *Paeoniae Lactiflorae Radix* and *Fraxini Cortex* from Xikebao Decoction by orthogonal test

LENG Jing, XU Chong, GUO Xiao-hong, LIU Xia, SUN Quan, YANG Min*

(Chongqing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the extraction of *Paeoniae Lactiflorae Radix* and *Fraxini Cortex* from Xikebao Decoction (for the management of knee osteoarthritis). **METHODS** With the contents of paeoniflorin, aesculin and aesculetin as evaluation indices, and water consumption, decoction time and decoction times as influencing factors, the extraction was optimized by orthogonal test. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be ten times for water consumption, three times for decocting frequency, and 1 h for each time. The extraction rate of paeoniflorin was 90.52%, and the total extraction rate of aesculin and aesculetin was 80.17%. **CONCLUSION**

This stable and feasible method can be used for extracting *Paeonia lactiflora Radix* and *Fraxini Cortex* from Xikebao Decoction.

KEY WORDS: Xikebao Decoction; *Paeonia lactiflora Radix*; *Fraxini Cortex*; paeoniflorin; aesculin; aesculetin; extraction; orthogonal test

膝可保方由白芍、秦皮、龙血竭3味中药组成, 具有养血柔筋、清热利湿、活血止痛之功效, 临床用于湿热痹阻型膝痹病(膝关节骨性关节炎), 症见膝关节肿痛或压痛、关节僵硬、活动障碍、麻木重着、得冷则舒、渴不欲饮、小便黄赤、舌质红或有瘀斑、苔黄腻、脉滑濡数^[1-2]。该方以汤剂形式在我院临床应用十余年, 疗效确切, 拟将其开发为新制剂, 以更好地适应患者需求。本实

验以芍药苷、秦皮甲素、秦皮乙素的含量为评价指标, 采用正交试验优选提取工艺, 为研发质量稳定可控的相关制剂提供实验依据^[3]。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 配置 G1312C 型二元泵、G1314F 型紫外检测器(美国 Agilent 公司); ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm ×

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 重庆市科技攻关计划项目(cstc2010AB5068); 重庆市科技集成示范项目(cstc2013jcsf10012); 重庆市科技研发基地能力提升项目(cstc2015pt-kjyfsf0019)

作者简介: 冷静(1979—), 女, 博士, 副主任中药师, 从事中药制剂与医院药学研究。Tel: 13667684034, E-mail: ljengjing@sina.com

*通信作者: 杨敏(1969—), 男, 主任中药师, 从事中药炮制制剂研究及药事管理工作。Tel: (023) 67063732, E-mail: cqyangmin@126.com

150 mm, 5 μm); AE-200 型、XA205DU 型电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ3200E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); LD-50G-D 型超纯水处理器 (重庆利迪实验仪器设备有限公司); SL-100 型高速多功能粉碎机 (浙江省永康市松青五金厂)。

1.2 材料 芍药苷 (批号 110736-200934)、秦皮甲素 (批号 110740-200104)、秦皮乙素 (批号 110741-200506) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。白芍、秦皮饮片均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司 (批号分别为 1112118、1203168), 经重庆市中医院药剂科杨敏主任中药师鉴定为正品。甲醇、乙腈为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含有量的测定^[4]

2.1.1 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (14 : 86); 检测波长 230 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 3.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 制得 0.06 mg/mL 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取按正交试验设计所得的干膏粉 0.5 g, 置于 50 mL 具塞三角瓶中, 加稀乙醇 35 mL, 超声 (240 W、45 kHz) 30 min, 放冷, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液 0.4、0.8、1.0、2.0、4.0 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻度, 取 10 μL 注入液相色谱仪, 在“2.1.1”项色谱条件下试验。以芍药苷进样量 (mg) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 1\,057.31X + 34.77$ ($r = 0.999\,4$), 表明芍药苷在 0.060 6 ~ 1.515 0 mg 范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 精密吸取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 测得芍药苷峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.32%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取同一份样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 测得芍药苷含有量 RSD ($n = 6$) 为 0.49%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得芍药苷峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.47%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的浸膏粉适量, 共 9 份, 精密加入对照品适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下测定, 测得芍药苷平均回收率为 99.59%, RSD ($n = 9$) 为 0.95%。

2.2 秦皮甲素与秦皮乙素总含有量的测定^[4]

2.2.1 色谱条件 ZORBAX SB- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液 (8 : 92); 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 334 nm。色谱图见图 2。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取秦皮甲素、秦皮乙素对照品适量, 加甲醇制成含秦皮甲素 0.247 2 mg/mL、秦皮乙素 0.151 8 mg/mL 的混合溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取按正交试验设计所得的干膏粉 1 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤

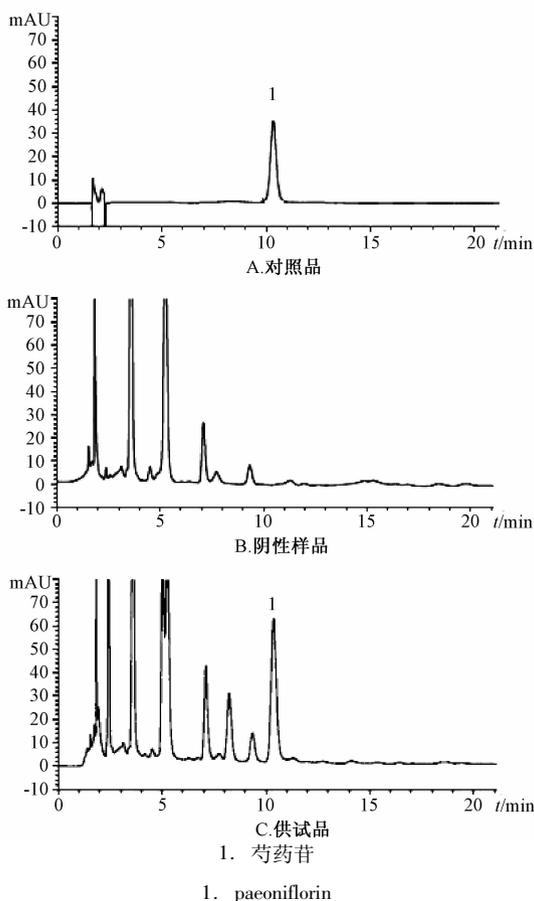


图 1 芍药苷 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for paeoniflorin

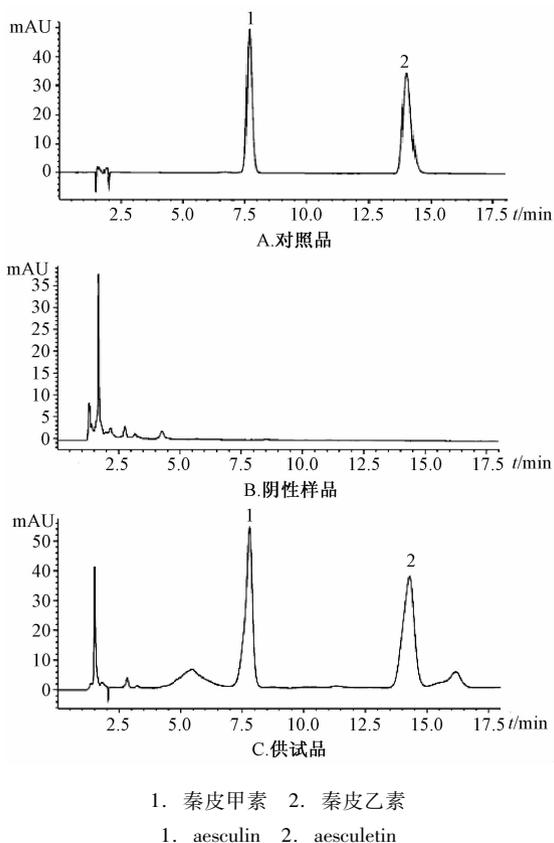


图2 秦皮甲素、秦皮乙素 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms for aesculin and aesculetin

液，即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mL，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，精密吸取 5 μ L。以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归，得秦皮甲素回归方程 $Y = 1\,929.6X + 27.343$ ($r = 0.999\,5$)，在 0.123 6 ~ 0.865 2 μ g 范围内线性关系良好；秦皮乙素回归方程 $Y = 3\,587.3X + 7.2$ ($r = 0.999\,5$)，在 0.075 9 ~ 0.531 3 μ g 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液，重复进样 6 次，测得秦皮甲素峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.48%，秦皮乙素为 0.60%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一份样品，平行制备 6 份供试品溶液，测得秦皮甲素含有量 RSD ($n = 6$) 为 1.44%，秦皮乙素为 1.84%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液，于 0、

2、4、8、12、24 h 进样，测得秦皮甲素峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.81%，秦皮乙素为 0.38%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的浸膏粉适量，共 9 份，精密加入含有量不同的混合对照品溶液，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定，测得秦皮甲素、秦皮乙素平均回收率分别为 97.85%、97.91%，RSD ($n = 9$) 分别为 1.91%、1.94%。

2.3 提取工艺条件的优选

2.3.1 药材吸水率测定 按处方比例称取白芍和秦皮饮片共 100 g，加入 5 倍量水浸泡，直至药材浸透，滤出未被吸收的水分，测得药材的吸水率为 100%。

2.3.2 正交试验 由于秦皮和白芍的有效成分以水溶性为主，故采用水煎煮提取法。预试验发现，加水量、煎煮时间、煎煮次数为主要影响因素，每个因素设计 3 个水平，具体见表 1。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	A 加水量/倍	B 煎煮时间/h	C 煎煮次数/次
1	6	0.5	1
2	10	1.0	2
3	12	1.5	3

再按处方比例称取秦皮和白芍饮片，按 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行水煎煮提取，合并提取液，滤过，减压浓缩，55 $^{\circ}$ C 真空干燥箱中干燥，称定质量，计算浸膏得率，测定提取物中芍药苷、秦皮甲素、秦皮乙素的含有量，并以其为评价指标。采用加权综合评分优选最佳提取工艺，以 DPS 软件对加权分析的结果进行方差分析，综合评分 = (芍药苷含有量/最大含有量) \times 0.5 + (秦皮甲素、秦皮乙素总含有量/最大总含有量) \times 0.5。结果见表 2，方差分析见表 3。

由此可知，因素 C 有极显著性差异 ($P < 0.01$)，因素 A、B 有显著性差异 ($P < 0.05$)。均值及方差分析结果显示， $C_3 > C_2 > C_1$ 、 $A_3 \approx A_2 > A_1$ 、 $B_3 > B_2 > B_1$ ，故因素 C 选最大水平，即水平 3，而因素 A 选水平 2，并比较因素 B 的水平 2、3。综上所述，选择 $A_2B_3C_3$ 和 $A_2B_2C_3$ 进行试验，以确定最终提取工艺。

表2 正交试验结果

Tab. 2 Results of orthogonal tests

试验号	A	B	C	D	浸膏得率/%	芍药苷/(mg·g ⁻¹)	秦皮甲素 + 秦皮乙素/(mg·g ⁻¹)	综合评分
1	1	1	1	1	9.47	38.54	31.24	47.45
2	1	2	2	2	15.53	39.66	28.46	75.57
3	1	3	3	3	16.70	39.02	36.66	91.42
4	2	1	2	3	15.10	38.23	35.71	80.74
5	2	2	3	1	19.43	39.16	31.60	98.75
6	2	3	1	2	14.40	43.61	30.53	76.16
7	3	1	3	2	19.20	36.30	31.80	94.26
8	3	2	1	3	14.13	39.74	30.33	70.93
9	3	3	2	1	19.17	35.40	32.86	94.58
I _j	214.44	222.45	194.54	240.78				
II _j	255.65	245.25	250.89	245.99				
III _j	259.77	262.16	284.43	243.09				
R	15.11	13.24	29.96	1.74				

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均差	F值	P值
A	418.89	2	209.45	92.20	0.012
B	264.74	2	132.37	58.27	0.017
C	1375.61	2	687.80	302.77	0.003
D(误差)	4.54	2	2.27	—	—

2.3.3 验证试验 按处方比例称取药材3份,以A₂B₃C₃和A₂B₂C₃平行试验3次,测定浸膏中芍药

苷、秦皮甲素、秦皮乙素含有量,计算浸膏得率、指标性成分转移率,结果见表4。由表可知,两种提取工艺无明显差异,考虑实际生产过程中的能耗及成本方面,最终确定提取工艺为A₂B₂C₃,即加水量10倍,煎煮3次,每次1h,该条件下试验结果稳定,综合评分较高,与正交试验最佳条件A₂B₃C₃所得结果一致。

表4 验证试验结果

Tab. 4 Results of verification tests

指标	A ₂ B ₃ C ₃			A ₂ B ₂ C ₃		
	1	2	3	1	2	3
浸膏量得率/%	21.53	21.72	21.24	20.16	19.83	20.37
芍药苷/(mg·g ⁻¹)	33.52	32.96	33.95	35.70	35.78	34.86
秦皮甲素 + 秦皮乙素/(mg·g ⁻¹)	28.87	28.85	29.55	32.09	32.07	31.15
芍药苷转移率/%	90.79	90.06	90.72	90.51	89.26	89.31
秦皮甲素 + 秦皮乙素总转移率/%	79.70	80.34	80.48	82.92	81.54	81.34
综合评分		98.75			98.24	

3 讨论

膝可保方来源于临床经验方,原方以汤剂形式应用,秦皮、白芍以水煎煮,龙血竭冲服,对湿热痹阻型膝痹病的疗效确切,安全可靠,值得进一步开发为新制剂。方中白芍的主要有效成分为白芍总皂苷,如芍药苷^[5-6];秦皮主要有效成分为香豆素^[7-8],如秦皮甲素、秦皮乙素,均是水溶性成分,故以水为溶剂进行提取。方中龙血竭用量较少,其活性成分是黄酮类成分^[9-11],临床以水煎液冲服,故将其粉碎后直接加入水提取物中再制剂成型,故未考虑该药材的提取。

中药复方以中医药理论为指导,体现了中医整体辨证论治的特点,膝可保方提取液中主要含白芍及秦皮的多种有效成分,故在优化提取工艺时应充

分考虑多成分评价。本实验运用正交试验,以芍药苷、秦皮甲素、秦皮乙素的含有量为检测指标进行评价,较单一成分指标更能体现复方的整体性和有效性^[12]。本实验参考《中国药典》2010年版中以上3种成分含有量的测定方法进行研究,发现该方法简便快速,基线基本分离,阴性无干扰,可作为膝可保方中白芍和秦皮提取工艺过程的质量控制指标,所得的最佳提取工艺为加水量10倍,提取3次,每次1h,芍药苷提取率为90.52%,秦皮甲素和秦皮乙素为80.17%,浸膏收率为20.12%,提取效果理想。

参考文献:

[1] 田丰玮,李建军,周熙.膝可保胶囊治疗膝骨性关节炎

- 临床观察[J]. 中国中医急症, 2015, 24(3): 423-425.
- [2] 田丰玮, 杨 敏, 成建国, 等. 一种治疗骨性关节炎的中药及其口服制剂: 中国, ZL2012 10033944X [P]. 2013-10-30.
- [3] 范林乾, 刘 晓, 蔡 皓, 等. 中药汤剂现代研究中常用的实验设计方法 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27 (20): 3105-3107.
- [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: 96-97, 254-255.
- [5] 陈四平, 张 浩, 李相坤, 等. 中药白芍的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25(3): 293-296.
- [6] 高小荣, 田庚元. 白芍化学成分研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(6): 416-418.
- [7] 汪国松, 杨亚滨, 李 幡, 等. 秦皮的研究进展 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(3): 108-109.
- [8] 魏秀丽, 杨春华, 梁敬钰. 中药秦皮的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 228-230.
- [9] 文东旭. 龙血竭的研究进展 [J]. 中草药, 2001, 32(11): 1053-1054.
- [10] 郑庆安, 陈江波, 张颖君. 著名民间药物血竭的化学成分与生理活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17 (Suppl): 84-95.
- [11] 申秀民, 王竹红, 陈 程. 广西血竭化学成分的研究 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 728-730.
- [12] 翟永松, 尚雅文, 龚慕辛, 等. 星点设计效应面法优选糖肾宁颗粒乙醇提取工艺的研究 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 99-104.