

丁香柿蒂颗粒提取工艺的优化

刘荫贞¹, 刘冲¹, 林伟雄², 乐智勇³, 梁生旺^{1*}

[1. 广东药科大学国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点研究室, 广东高校中药质量工程技术研究中心, 广东广州 510006; 2. 广东药科大学, 广东广州 510006; 3. 康美(北京)药物研究院有限公司, 北京 102629]

摘要: 目的 优化丁香柿蒂颗粒提取工艺。方法 以浸泡时间、加水量、提取时间为影响因素, 丁香、生姜挥发油得率为评价指标, 正交试验优化挥发油水蒸气蒸馏法提取工艺; 以提取次数、提取时间、加水量为影响因素, 没食子酸含量, 人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量, 干膏率为评价指标, 正交试验优化丁香柿蒂颗粒水提工艺。结果 挥发油最优提取工艺为不浸泡, 加4倍量水, 提取时间4 h, 挥发油得率8.35%; 丁香柿蒂颗粒最优提取工艺为加12倍量水提取3次, 每次30 min, 没食子酸含量3.72 mg/g, 人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量3.59 mg/g, 干膏率23.73%。结论 该方法稳定可行, 可用于提取丁香柿蒂颗粒。

关键词: 丁香柿蒂颗粒; 挥发油; 水蒸气蒸馏; 水提; 正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0513-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.014

Optimization of extraction for Dingxiang Shidi Granules

LIU Yin-zhen¹, LIU Chong¹, LIN Wei-xiong², LE Zhi-yong³, LIANG Sheng-wang^{1*}

[1. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Traditional Chinese Medicine Digital Quality Evaluation, Guangdong Pharmaceutical University; Research Center for Traditional Chinese Medicine Quality Engineering Technology in Guangdong Universities, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Kangmei (Beijing) Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Beijing 102629, China]

KEY WORDS: Dingxiang Shidi Granules; volatile oils; steam distillation-extraction; aqueous extraction; orthogonal test

丁香柿蒂汤为经典方剂, 源于明代《症因脉治》, 由丁香、柿蒂、生姜、人参组成, 具有温中益气、降逆止呃的功效^[1]。大量临床实验证明, 该方可有效减轻呃逆症状, 促进患者转归, 避免复发, 具有推广价值^[2-3], 但其作为汤剂, 存在使用携带不便、剂量大、不易保存、药材利用率低等不足, 故本实验拟将其研制成颗粒剂, 以扩大适宜人群, 并便于携带和贮存^[4]。查阅文献发现, 体现该方主要作用的有效成分存在于挥发油与水提液中^[5], 故采用正交试验, 以挥发油得率为评价指标, 考察丁香、生姜挥发油水蒸气蒸馏工艺; 以没

食子酸含量, 人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量, 干膏率为评价指标, 优化丁香柿蒂颗粒水提工艺, 为该制剂质量评价体系的建立提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置二元恒流泵、在线脱气机、DAD 检测器(美国 Agilent 公司); XP6、XPX205 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ-250E 型超声波清洗器(500 W、40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); HWS28 型电热恒温水浴锅、PHG-9145A 型鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); TC-15 型套

收稿日期: 2016-11-07

基金项目: 广东省战略性新兴产业区域集聚发展试点蛋白类生物药及植(介)人器械领域项目(2014)

作者简介: 刘荫贞(1990—), 女, 硕士生, 研究方向为中药质量控制。Tel: 18311080115, E-mail: 549685481@qq.com

*通信作者: 梁生旺(1954—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制。Tel: (020) 39352172, E-mail: swliang371@

式恒温器（新华医疗器械厂）；Arium 611DI 型超纯水仪（德国 Sartorius 公司）；

1.2 试药 人参、柿蒂、丁香、生姜均购自康美药业股份有限公司，按 2015 版《中国药典》标准鉴定为正品。人参皂苷 Re、Rb₁，没食子酸（中国食品药品检定研究院，批号分别为 110704-201424、110754-201525、110831-201204）。甲醇为色谱纯（美国 J. T. Baker 公司）；乙腈为色谱纯（美国 Thermo Fisher 公司）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 总提取工艺 丁香柿蒂颗粒是以丁香柿蒂汤为处方制备而成的现代复方配方颗粒制剂，其以传统中医药理论为基础，以水为溶剂进行复方合煎^[6]。因此，本实验先采用水蒸气蒸馏法提取丁香、生姜挥发油，然后将药渣与人参、柿蒂一起进行水提实验。

2.2 挥发油提取工艺优化

2.2.1 试验设计 根据预试验结果，以浸泡时间（A）、加水量（B）、提取时间（C）为影响因素，每个因素取 3 个水平，采用 L₉(3⁴) 正交表试验，因素水平见表 1。

表 1 因素水平（挥发油提取）

Tab. 1 Factors and levels (extraction for volatile oils)

水平	因素		
	A 浸泡时间/h	B 加水量/倍	C 提取时间/h
1	2	2	2
2	3	4	3
3	4	6	4

2.2.2 试验结果与分析 称取生姜和丁香各 24 g，按照 L₉(3⁴) 正交表的试验条件提取挥发油，当蒸馏至其不再增加时，打开塞子，将油收集至量筒，乳化部分用无水硫酸钠进行破乳，静置一段时间，合并挥发油，读取总挥发油量，计算得率，公式为得率 = [挥发油提取量 (mL) / 药材量 (g)] × 100%。结果见表 2，方差分析见表 3。

由表 2 可知，各因素的影响程度依次为 C > B > A。由表 3 可知，加水量（B）和提取时间（C）对提取工艺有显著性影响（P < 0.05），而浸泡时间（A）无显著性影响（P > 0.05）。综合考虑生产周期、成本等方面，最终选择最优工艺为 A₁B₂C₃，即不浸泡，加 4 倍量水，提取时间 4 h。

2.2.3 验证试验 称取丁香和生姜各 24 g，共 3 份，按照上述最优工艺进行验证试验，结果见表

4，可知该方法稳定可行。

表 2 试验设计与结果（挥发油提取）

Tab. 2 Design and results of tests(extraction for volatile oils)

试验号	因素				出油量/挥发油得率/	
	A	B	C	D(误差)	mL	%
1	1	1	1	1	3.30	6.88
2	1	2	2	2	3.85	8.02
3	1	3	3	3	3.75	7.81
4	2	1	2	3	3.76	7.83
5	2	2	3	1	4.11	8.56
6	2	3	1	2	3.28	6.83
7	3	1	3	2	3.91	8.15
8	3	2	1	3	3.66	7.63
9	3	3	2	1	3.75	7.81
K ₁	7.570	7.620	7.113	7.750		
K ₂	7.740	8.070	7.887	7.667		
K ₃	7.860	7.483	8.173	7.757		
R	0.293	0.587	1.060	0.090		

表 3 方差分析（挥发油提取）

Tab. 3 Analysis of variance (extraction for volatile oils)

来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	0.130	2	8.667	19	>0.05
B	0.565	2	37.667	19	<0.05
C	1.804	2	120.267	19	<0.05
D(误差)	0.01	2	1	—	—

表 4 验证试验结果（挥发油提取）

Tab. 4 Results of validation tests(extraction for volatile oils)

试验号	出油量/mL	挥发油得率/%
1	4.01	8.35
2	4.03	8.40
3	4.05	8.44
平均值	4.03	8.40

2.3 丁香柿蒂颗粒提取工艺优化

2.3.1 试验设计 在单因素试验基础上，称取 4 倍处方量丁香等药材，以提取次数（A）、提取时间（B）、加水量（C）为影响因素，没食子酸，人参皂苷 Re、Rb₁ 总含有量，干膏率为评价指标，采用 L₉(3⁴) 正交表试验。因素水平见表 5。

表 5 因素水平（丁香柿蒂颗粒提取）

Tab. 5 Factors and levels (extraction for Dingxiang Shidi Granules)

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 提取时间/min	C 加水量/倍
1	1	30	8
2	2	60	10
3	3	90	12

2.3.2 没食子酸，人参皂苷 Re、Rb₁ 总含有量测定

2.3.2.1 色谱条件 没食子酸: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 0.05% 磷酸甲醇 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 90% ~ 93% B); 检测波长 271 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。理论塔板数以没食子酸峰计, 应不低于 5 000。

人参皂苷 Re、Rb₁: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 乙腈 (A) -水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 35 min, 81% B; 35 ~ 65 min, 81% ~ 72% B; 65 ~ 95 min, 72% B); 检测波长 203 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 20 °C; 进样量 10 μL。理论塔板数以人参皂苷 Re 峰计, 应不低于 5 000。

2.3.2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 加 30% 甲醇制成含 26 μg/mL 没食子酸的对照品溶液, 加甲醇制成含人参皂苷 Re 200 μg/mL、人参皂苷 Rb₁ 270 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2.3 供试品溶液制备 精密吸取水提液 1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀, 过滤, 即得没食子酸供试品溶液。再精密吸取水提液 20 mL, 水饱和正丁醇萃取 4 次, 每次 25 mL, 收集上层液, 用氨试液洗涤 2 次 (25、20 mL), 合并上层液, 置于蒸发皿中, 水浴蒸干, 甲醇溶解残渣, 转移至 5 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得人参皂苷 Re、Rb₁ 供试品溶液。

2.3.2.4 阴性对照溶液制备 按照处方量称取缺丁香和柿蒂的药材共 36 g, 生姜加 4 倍量水提取 4 h, 过滤, 滤渣和人参、柿蒂合并, 加 12 倍量水提取 3 次, 每次 30 min, 合并滤液, 即得缺没食子酸阴性提取液。再按照处方量称取缺人参的药材共 84 g, 丁香和生姜加 4 倍量水提取 4 h, 过滤, 滤渣和柿蒂合并, 加 12 倍量水提取 3 次, 每次 30 min, 合并滤液, 即得缺人参皂苷 Re、Rb₁ 阴性提取液。按“2.3.2.3”项下方法, 制备相应阴性对照溶液。

2.3.2.5 专属性试验 吸取上述供试品、对照品、阴性对照溶液适量, 在“2.3.2.1”项色谱条件下测定, 结果见图 1~2。由图可知, 对照品色谱峰与其他成分的分度良好, 阴性无干扰。

2.3.2.6 线性关系考察 以峰面积平均值为纵坐标 (Y), 对照品溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得到没食子酸, 人参皂苷 Re、Rb₁ 回归方程分别为 $Y = 27\ 539X - 20.89$ ($R^2 = 0.999\ 8$)、

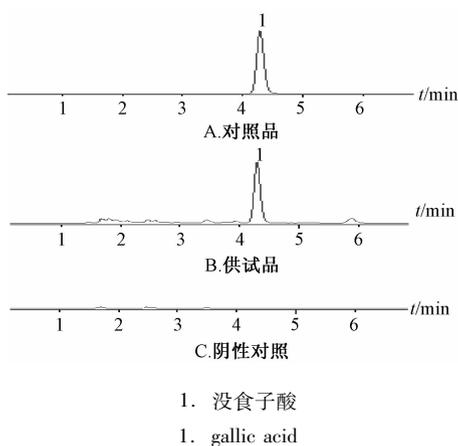


图 1 没食子酸 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for gallic acid

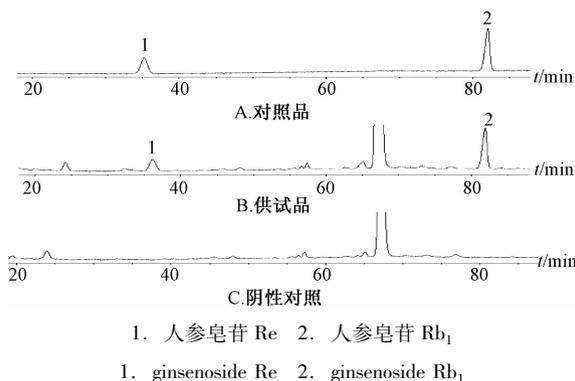


图 2 人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb₁ HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms for ginsenoside Re and ginsenoside Rb₁

$Y = 3\ 626X - 3.763$ ($R^2 = 1$)、 $Y = 3\ 118X - 5.7$ ($R^2 = 1$), 分别在 0.004 ~ 0.209、0.031 ~ 0.769、0.065 ~ 1.620 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.2.7 精密密度、稳定性试验 按照 2015 版《中国药典》通则 9101 要求试验, 测得没食子酸在精密密度试验中的 RSD ($n = 6$) 为 0.12%, 稳定性试验中为 0.30% (12 h 内); 人参皂苷 Re、Rb₁ 在精密密度试验中的 RSD 分别为 0.88%、1.10%, 稳定性试验中分别为 0.88%、1.10% (25 h 内), 表明仪器精密密度良好, 2 种供试品溶液分别在 12、25 h 内稳定性良好。

2.3.2.8 重复性试验 取同一提取液 6 份, 按“2.3.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.2.1”项色谱条件下测定, 测得没食子酸峰面积 RSD ($n = 6$) 为 0.49%, 人参皂苷 Re 为 1.18%, 人参皂苷 Rb₁ 为 1.83%, 表明该方法重复性良好。

2.3.2.9 加样回收率试验 取同一提取液6份(取样量为重复性试验取样量的一半),加入等量对照品,按“2.3.2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.2.1”项色谱条件下测定,计算回收率。结果,没食子酸,人参皂苷 Re、Rb₁ 平均加样回收率分别 98.92%、95.31%、94.57%, RSD 分别为 0.76%、1.21%、2.24%。

2.3.3 干膏率测定 精密吸取提取液 20 mL,转移到干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃下

干燥 3 h,取出,置于干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算干膏率。

2.3.4 试验结果与分析 称取 4 倍处方量丁香等药材 9 份,丁香与生姜先加 4 倍量水提取 4 h,过滤,滤渣和人参、柿蒂合并,按照表 1 安排试验,得提取液 9 份,按“2.3.2”项下方法测定没食子酸含量,人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量,干膏率。结果见表 6,方差分析见表 7。

表 6 试验设计与结果(丁香柿蒂颗粒提取)

Tab. 6 Design and results of tests (extraction for Dingxiang Shidi Granules)

试验号	因素				没食子酸/ (mg·g ⁻¹)	人参皂苷 Re、Rb ₁ / (mg·g ⁻¹)	干膏率/%	综合评分
	A	B	C	D(误差)				
1	1	1	1	1	2.55	3.20	15.02	68.07
2	1	2	2	2	3.03	2.21	16.59	66.89
3	1	3	3	3	3.25	2.71	17.99	74.66
4	2	1	2	3	3.61	3.25	20.54	85.45
5	2	2	3	1	3.71	3.18	22.23	87.95
6	2	3	1	2	3.62	2.77	21.52	83.02
7	3	1	3	2	3.82	3.85	23.51	95.81
8	3	2	1	3	3.83	2.69	22.86	86.05
9	3	3	2	1	4.16	2.97	24.24	93.13
K ₁	69.91	83.13	79.08	83.10				
K ₂	85.52	80.36	81.84	81.93				
K ₃	91.67	83.62	86.18	79.50				
R	21.77	3.26	7.41	3.60				

注:由于没食子酸是君药丁香与柿蒂的共有成分和活性物质,而人参是使药,故设定没食子酸,人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量,干膏率的权重系数分别为 40%、30%、30%。综合评分 = [(没食子酸含量 ÷ 最高含量) × 40% + (人参皂苷 Re、Rb₁ 总含量 ÷ 最高总含量) × 30% + (干膏率 ÷ 最高干膏率 × 30%)] × 100%

表 7 方差分析(丁香柿蒂颗粒提取)

Tab. 7 Analysis of variance (extraction for Dingxiang Shidi Granules)

来源	离均差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	756.480	2	325.788	19	<0.05
B	19.092	2	8.222	19	>0.05
C	2.322	2	33.014	19	>0.05
D(误差)	2.32	2	1	—	—

由表 6 可知,各因素的影响程度依次为 A > C > B。由表 7 可知,提取次数(A)和加水量(C)对提取工艺有显著性影响(P < 0.05),而提取时间(B)无显著性影响(P > 0.05)。综合考虑生产周期、成本等方面,最终选择最优工艺为 A₃B₁C₃,即加 12 倍量水提取 3 次,每次 30 min。

2.3.5 验证试验 称取以上 4 味药材各 3 份,按照最优工艺进行验证试验,结果见表 8,可知该方法稳定可行。

表 8 验证试验结果(丁香柿蒂颗粒提取)

Tab. 8 Results of validation tests (extraction for Dingxiang Shidi Granules)

试验号	没食子酸/ (mg·g ⁻¹)	人参皂苷 Re、Rb ₁ / (mg·g ⁻¹)	干膏率/%
1	3.67	3.55	23.77
2	3.84	3.62	23.99
3	3.69	3.60	23.42
平均值	3.72	3.59	23.73

3 讨论

3.1 因素水平选择 挥发油提取单因素试验显示,随着加水量增加,其收率先增大后减小,这可能是挥发油与溶剂发生乳化,导致提取不完全有关。水提单因素试验显示,提取 3 次所得没食子酸,人参皂苷 Re、Rb₁ 含量比提取 2 次更多,结合中药复方传统煎煮习惯与文献[7],根据实验需要选择提取 3 次。另外,由于浸泡时间对指标成分含量的影响很小,故不将其作为正交试验考察因素。

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 含有量较低,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: 1001-1528(2017)03-0517-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.015

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(YY1304ZY)

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