

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

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）；ZNHW-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

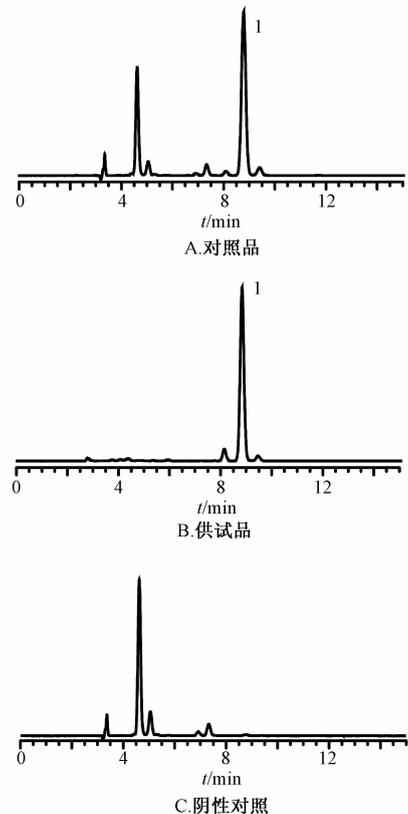
（70:30）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 330 nm；柱温 35 ℃。理论塔板数按藁本内酯计，应不低于5 000。

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



1. 藁本内酯
1. ligustilide

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] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 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。

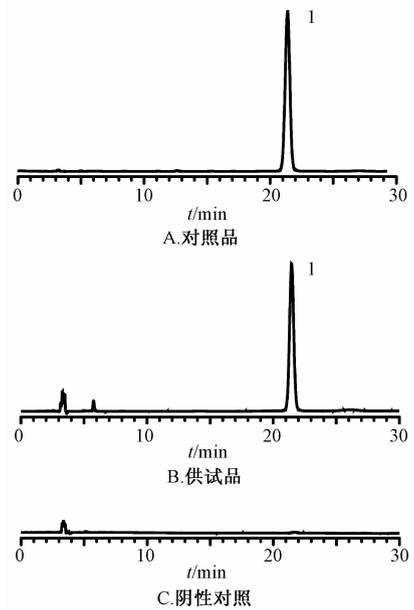
2.3.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除桂枝以外的其他药材,按“2.1”项下方法提取,按“2.3.3”项下方法制备,即得。

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] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 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。



1. 桂皮醛
1. cinnamaldehyde
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。

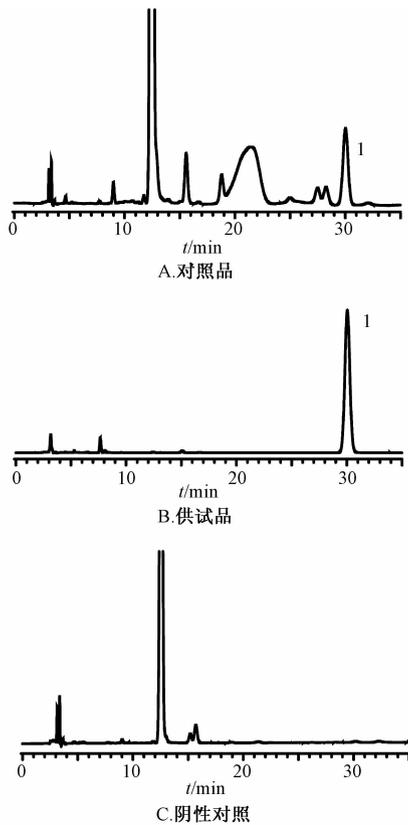
2.4.4 阴性对照溶液制备 按处方比例称取除细辛以外的其他药材,按“2.1”项下方法提取,按“2.4.3”项下方法制备,即得。

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] Diamonsil™ Plus C₁₈ 色谱柱



1. 甲基丁香酚
1. methyl eugenol

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。

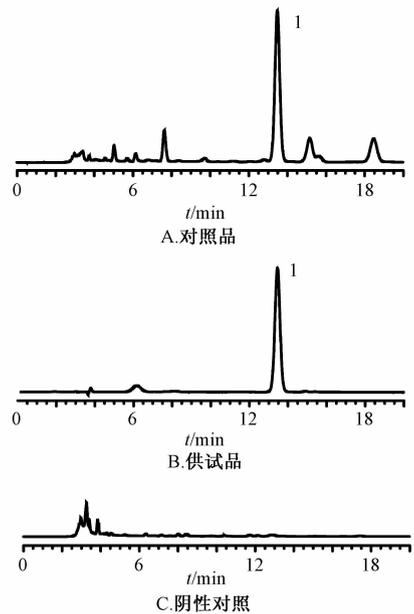
2.5.2 对照品贮备液制备 精密称取葛根素对照品适量, 加 30% 乙醇制成每 1 mL 含 0.989 38 mg 该成分溶液, 摇匀, 即得。

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、



1. 葛根素
1. puerarin

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。

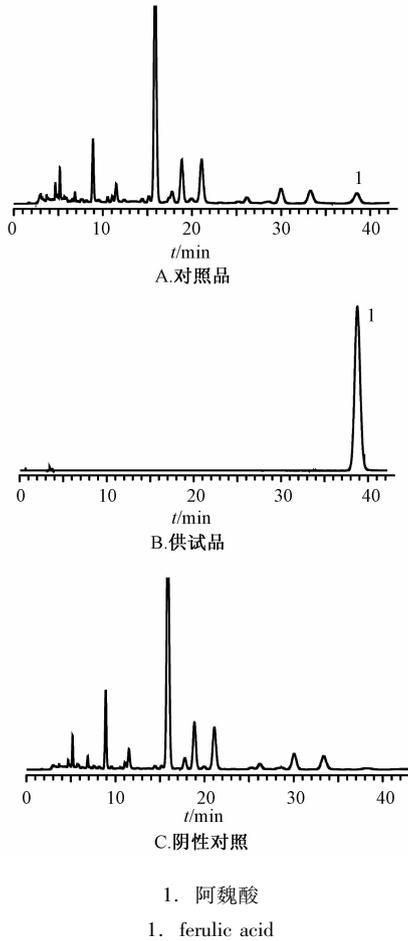


图5 阿魏酸 HPLC 色谱图

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 $A_1B_2C_3$ ，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] 易延遼, 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.