

正交试验法优化参芪解郁处方提取工艺*

曲 森, 唐启盛^{2**}

(北京中医药大学第三附属医院 北京 100029)

摘 要:目的:优化参芪解郁处方的提取工艺。方法:用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)法测定参芪解郁方传统汤剂以及颗粒剂中橙皮苷的含量,以煎煮时间、煎煮次数和加水量为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定最佳提取条件。结果:参芪解郁方传统汤剂中橙皮苷含量显著高于颗粒剂中橙皮苷含量;汤剂中对橙皮苷提取量影响顺序为煎煮次数>煎煮时间>加水量,其中煎煮次数有显著性差异;参芪解郁方最佳煎煮条件为煎煮3次,煎煮0.5小时,加水量7倍。结论:参芪解郁方高效液相分析方法为该方的定量方法;优选的参芪解郁方煎煮工艺稳定,提取率高。

关键词:参芪解郁方 橙皮苷 高效液相色谱法 正交试验 提取工艺

doi:10.11842/wst.2018.06.014 中图分类号:R284.2 文献标识码:A

参芪解郁方是由北京中医药大学第三附属医院唐启盛教授临床治疗产后抑郁症(postpartum depression, PPD)的经验方,由黄芪、党参、陈皮等组成,具有补益心脾,颐脑醒神的功效^[1]。

PPD作为一种严重影响母婴身心健康的精神情绪障碍性疾病,近年来发病率逐年升高,已成为临床中的常见病、多发病。PPD起病隐匿,发病率高,常共病焦虑或其他精神障碍性疾病,再次妊娠的复发率高达50%,严重者可出现伤婴或自杀行为,给家庭和社会造成严重的影响。现已证实PPD发病与机体神经、生殖、内分泌、免疫系统相关,因其确切生物学发病机制仍不甚明确,故为本病的防治带来较大困难。

目前,用于临床治疗本病的常用西药包括抗抑郁药、镇静催眠药和抗焦虑药等,这些药物虽各有其优势,但存在服药后影响产妇哺乳及药物可通过乳汁对婴儿产生不良影响等诸多问题,使得绝大多数患者和家属不愿接受治疗。

由于该方不影响产妇哺乳的独特优势,对PPD的

治疗发挥重要作用。

前期临床研究已表明^[2-4],参芪解郁方可显著改善PPD患者的爱丁堡产后抑郁量表(Edinburgh Postnatal Depression Scale, EPDS)评分和中医证候评分,显著降低血清孕酮水平,提升血清雌二醇水平,有效缓解抑郁症状,且起效快、副作用小,疗效持久稳定。本实验将对参芪解郁方的分析方法以及煎煮工艺进行探索,筛选出参芪解郁处方的最佳提取工艺,为进一步优化制备工艺提供参考。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

Waters e 2695 高效液相色谱仪(包括 Waters e 2695 分离单元、四元泵、自动进样器、Waters 2998 二极管阵列检测器、Waters ELSD 2424 蒸发光散射检测器、Empower3 色谱工作站,美国 Waters 公司);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:100W,频率:40kHz);AB-135S 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);DIT-DX 型数显

收稿日期:2018-05-01

修回日期:2018-06-03

* 中医药管理局脑病科重点专科建设项目,负责人:孙文军;北京中医药大学中央高校基本科研业务费专项资金(2016-JYB-JSMS-061):参芪解郁方调控母婴分离产后抑郁大鼠 5-羟色胺的药效物质基础研究,负责人:曲森。

** 通讯作者:唐启盛,博士,教授/主任医师,主要研究方向:中医药防治脑病的基础与临床研究。

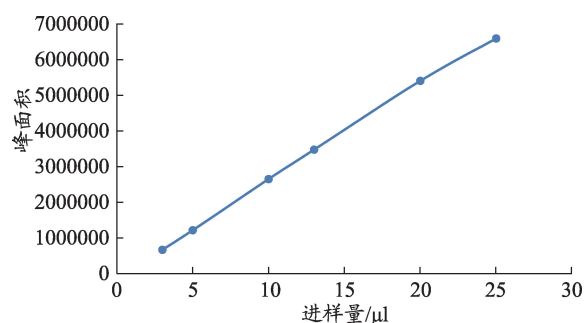


图1 对照品标准曲线

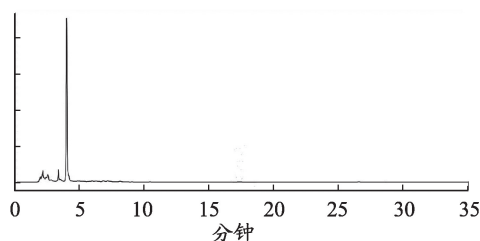


图2 阴性样品1色谱图

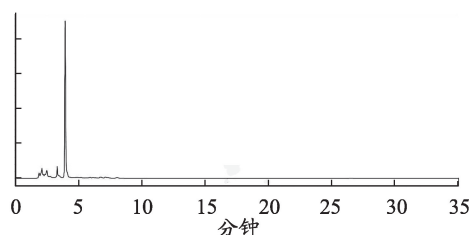


图3 阴性样品2色谱图

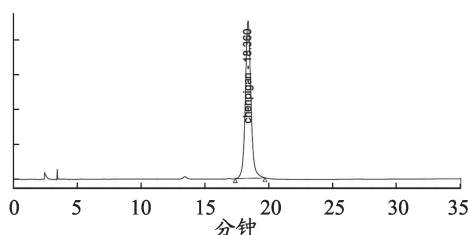


图4 橙皮苷对照品色谱图

恒温电热套(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试药

饮片药材、颗粒剂均购自北京中医药大学第三附属医院,黄芪(批号:16017001)、党参(批号:16020641)、炒酸枣仁(批号:16019351)、酒萸肉(批号:16017841)、郁金(批号:16017841)、陈皮(批号:16018201)、佛手(批号:16013901)、当归(批号:16020081),经北京中医药大学中药鉴定教研室鉴定,药材均为2015版《中国药典》的收载品种,经检验均符合2015版《中国药典》含量测定项下要求。橙皮苷对

照品(货号:ST01300120MG)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司,纯度>98%。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Diamonisl C18柱(250 nm×4.6 nm, 5 μm),流动相为乙腈-水(20:80),检测波长为283 nm,柱温25℃,流速为1.0 mL·min⁻¹,进样量为10 μL。理论塔板数按橙皮苷峰计算应>2000。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取橙皮苷标准品4.15 mg置于25 mL量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度线,混匀,得0.166 mg·mL⁻¹对照品溶液,配置好的对照品溶液用密封膜封好后,置于4℃冰箱中冷藏,备用。

2.3 样品溶液的制备

2.3.1 陈皮药材供试品溶液的制备

称取陈皮10 g,置50 mL量瓶中,加入50 mL甲醇,称定重量,超声处理(功率:100 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液用0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3.2 参芪解郁方传统汤剂供试品溶液的制备

称取黄芪20 g,党参12 g,炒枣仁15 g,山萸肉15 g,郁金15 g,陈皮10 g,佛手10 g,当归10 g,加10倍量水(约1070 mL)煎煮2次,每次微沸1小时,合并煎液,浓缩,用300目尼龙纱布过滤,定容至1000 mL,摇匀,取上清液得溶液,过滤,取续滤液用0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3.3 复方颗粒供试品溶液的制备

取适量颗粒剂,研成细粉,精密称取10 g,置50 mL量瓶中,加入50 mL甲醇,称定重量,超声处理(功率:100 W,频率:40 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液用0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3.4 阴性样品的制备

按传统汤剂的制备方法不加入陈皮,制得阴性样品1;按传统汤剂的制备方法不加入陈皮、佛手制得阴性样品2。

2.4 系统适应性试验

橙皮苷对照品溶液,陈皮药材、传统汤剂、颗粒剂供试品溶液各进样10 μL,按2.1项下色谱条件进行测定。结果表明,系统适应性良好。

表1 橙皮苷对照品精密度实验峰面积与保留时间

指标	对照品 1	对照品 2	对照品 3	对照品 4	对照品 5	对照品 6	RSD/%
峰面积	2654502	2532601	2667434	2655138	2665138	2701454	0.90/%
保留时间/min	18.11	18.141	18.194	18.199	18.239	18.319	0.41/%

表2 参芪解郁方传统汤剂供试品稳定性实验峰面积与保留时间

时间/h	0	2	4	6	8	12	RSD/%
峰面积	3345416	3358063	3386326	3358362	3370503	3347862	0.45/%
保留时间/min	18.443	18.475	18.384	18.32	18.348	18.383	0.31/%

表3 参芪解郁方传统汤剂供试品重复性实验峰面积与保留时间

指标	供试品 1	供试品 2	供试品 3	供试品 4	供试品 5	供试品 6	RSD/%
峰面积	3345416	3398713	3397802	3358063	3346488	3355206	0.73/%
保留时间/min	18.443	18.475	18.487	18.507	18.538	18.542	0.21/%

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线的绘制

取适量以上制得橙皮苷对照品溶液,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,分别以3 μL 、5 μL 、10 μL 、13 μL 、20 μL 、25 μL 进样,按2.1项下色谱条件测定,记录色谱图。以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,得到橙皮苷回归方程 $Y = 271767X - 112090$,线性相关系数 $R^2 = 0.9992$,表明橙皮苷在0.041–0.413 μg 范围内线性关系良好。

2.5.2 专属性实验

精密吸取橙皮苷对照品溶液、阴性样品1、阴性样品2,按2.1项下色谱条件进样测定,检测两个阴性样品和对照品对应的色谱峰,结果阴性样品1、阴性样品2均没有与对照品相同的色谱峰,表明该方法专属性良好。

2.5.3 精密度实验

精密吸取橙皮苷对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积值、保留时间,结果如下表所示,表明仪器精密度良好。

2.5.4 稳定性实验

精密吸取参芪解郁方传统汤剂供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h,按2.1项下色谱条件进样,记录峰面积值、保留时间,实验结果如下表所示,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.5.5 重复性实验

精密称取同一批参芪解郁方饮片,按2.3.2项下方法制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积值、保留时间,结果如下图所示,表明该方法重复性良好。

表4 参芪解郁方传统汤剂中橙皮苷含量测定的加样回收率实验

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
橙皮苷	0.930	0.930	1.839	97.68	98.13	0.95
	0.930	0.930	1.830	96.73		
	0.930	0.930	1.853	99.24		
	0.930	0.930	1.847	98.63		
	0.930	0.930	1.849	98.83		
	0.930	0.930	1.838	97.65		

2.5.6 加样回收率实验

精密量取已知含量的参芪解郁方传统汤剂供试品溶液3 mL,于10 mL容量瓶中,共6份,各加入新配置一定含量对照品溶液3 mL,定容,摇匀,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积值,计算回收率,结果见表4。

2.6 正交试验优化参芪解郁处方提取工艺

2.6.1 正交试验设计

参芪解郁方为基本方,以煎煮次数(A)、煎煮时间(B)、加水量(C)为考察因素,每个因素选3个水平,按正交表 $L_9(3^4)$ 的9个试验号进行煎煮,以橙皮苷提取量为指标,优选最佳煎煮的条件。因素水平见表5,正交试验结果见表6,方差分析结果见表7。

2.6.2 结果分析

由表5、表6、表7可知,各因素对橙皮苷含量的影响为 $A > B > C$,煎煮次数对提取工艺有显著性影响,其余两个因素影响并不显著。根据数据分析得到的结果,A因素要选择A3,可以使提取效果最大化,B、C因素影响较小,同时考虑对实际生产的影响,节水节能,节省时间,综合考虑以上因素,最终选择A3B1C1工艺,即煎煮次数:3次,煎煮时间0.5 h,水量:7倍。

表5 因素水平

水平	因素		
	A/次数	B/h	C/倍
1	1	0.5	7
2	2	1	10
3	3	2	12

表6 正交试验结果

试验号	因素			橙皮苷含量/ (mg·mL ⁻¹)
	A	B	C	
1	1	2	12	0.158
2	2	0.5	10	0.169
3	3	2	10	0.342
4	1	0.5	7	0.075
5	3	1	7	0.214
6	1	1	10	0.109
7	2	1	12	0.211
8	3	0.5	12	0.243
9	2	2	7	0.202
K1	0.114	0.162	0.164	
K2	0.194	0.178	0.207	
K3	0.266	0.234	0.204	
R	0.152	0.072	0.043	

表7 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	0.035	2	0.017	23.98	< 0.05
B	0.008603	2	0.004301	5.95	> 0.05
C	0.003508	2	0.001754	2.43	> 0.05
D(误差)	0.001446	2	0.0007231		
总计	0.048	8			

注: F_{0.05}(2,2)=19.00

2.6.3 验证试验

将参芪解郁方按上述正交试验所得到的最佳工艺(A₃B₁C₁)提取3批药材,按前述色谱条件检测,记录峰面积值,测定煎剂中橙皮苷含量如表8,结果表明此工艺稳定可靠,可性。

2.7 样品含量测定

分别按2.3项下方法制备陈皮药材、参芪解郁方传统汤剂、复方颗粒剂供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,结果如下表。

3 讨论

测定成分的选择:由于本方黄芪中黄芪甲苷、酸枣

表8 验证试验结果

指标	1	2	3	均值	RSD/%
浓度/(mg·mL ⁻¹)	0.255	0.257	0.248	0.253	1.90/%

表9 样品含量测定结果

检测成分	陈皮药材/(mg·g ⁻¹)	传统汤剂/(mg·g ⁻¹)	复方颗粒/(mg·g ⁻¹)
橙皮苷	10.58	1.34	0.41

仁中酸枣仁皂苷A、当归中阿魏酸的含量都比较低,不宜测量其含量。陈皮具有理气调中,健脾解郁的功效,与党参,黄芪同用,用于治疗肝郁气滞、心脾两虚所致的抑郁症,在组方中作用显著。且陈皮中橙皮苷含量较高,因此选为指标性成分,但由于陈皮和佛手都含有橙皮苷,尽管查阅2015版药典得知佛手中橙皮苷含量较低,专属性试验还是做了两组阴性对照(不含陈皮、不含陈皮和佛手),结果发现佛手对于此方法测定橙皮苷含量并没有影响。

提取溶剂的选择:橙皮苷在水中以及甲醇中溶解度均较小,但甲醇略大于水,因此选用甲醇作为对照品、陈皮药材的溶剂。水为传统汤剂的提取溶剂,与临床实际使用一致,使试验结果更具有现实意义。

流动相的选择:2015版药典选用的是甲醇-冰醋酸-水作为流动相,由于含有酸的流动相在使用过程中会对仪器,色谱柱造成损伤,操作较为繁琐,比较物质的极性后,选用了较为安全的乙腈-水作为流动相。

检测波长的选择:预实验还分析了在267 nm,269 nm,280 nm,283 nm橙皮苷色谱峰的强度,结果发现283 nm下检测最强,因此选定283 nm作为检测波长。

考虑到药材的浸泡时间会影响到提取的含量,因此9组药材几乎同时加水,同时提取,先大火加热,煮至沸腾开始计时,调至小火微沸,每个蒸馏瓶尽量保持微沸的程度一样,以减小试验误差。提取方法的选择还要考虑到提取成本的因素,包括溶剂的用量,能源的使用,人工的费用,所以在保证提取率的情况下,争取做到节能减排,绿色煎药。

虽然得出加水量、煎煮时间因素对本实验的影响因子较小,可能是由于设置的水平范围过窄,而且与橙皮苷在水中的溶解度也有着一定的关系,溶解度过小,导致浓度变化范围并不明显,日常生活经验中认为,煎煮的时间越长,提取出来的成分也多,然而并不是这样,煎煮时间过长,可能会导致一些有效成分发生挥发、氧化、水解、聚合等物理化学变化,从而影响药物的疗效,一些患者不按照医嘱的方法煎煮药物,也是中药

临床疗效参差不齐的重要原因。

一般药材的煎煮次数为两次,本实验研究发现,此方煎煮三次可以提取出更多的有效成分,且增加量较

多,有现实意义,打破了人们的思维定律,针对每一个方子,都应该有其规定的煎煮方法,希望中医药未来的发展可以更加规范化。

参考文献

- 1 杨歆科,唐启盛.论产后抑郁症“补虚祛瘀,颐脑醒神”治法.中华中医药杂志,2012,27(4):1131-1135.
- 2 王丹.补益心脾法治疗产后抑郁症的临床疗效评价研究.北京:北京中医药大学硕士学位论文,2012:29-34.
- 3 王丹,赵瑞珍,李小黎,等.补益心脾法对产后抑郁症患者中医证候积分以及雌、孕激素的影响.北京中医药大学学报,2015,38(11):772-775.
- 4 王丹,李小黎,赵瑞珍,等.参芪解郁方对产后抑郁症患者雌、孕激素及EPDS评分的影响.北京中医药,2016,35(1):29-32.

Optimization of Extraction Technology of Shen Qi Jie Yu Prescription with Orthogonal Test

Qu Miao, Tang Qisheng

(The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction technology of Shen Qi Jie Yu prescription. Methods: High performance liquid chromatography (HPLC) method was selected to determine the content of hesperidin of Shen Qi Jie Yu prescription of traditional Tang and granules. Decoction time, times and add water were used as the examining factors. $L_9(3^4)$ orthogonal test was used as the best condition of extraction. Results: The hesperidin content in traditional Tang of Shen Qi Jie Yu prescription was significantly higher than granules. The order of the effect of hesperidin content is decoction time> decoction times >add water. There is a significant difference in the number of boiling times. The best decoction condition of Shen Qi Jie Yu Prescription was 3 times for decoction, with 0.5 hours of decoction and 7 times of water addition. Conclusion: The high performance liquid chromatography of Shen Qi Jie Yu Prescription is the quantitative method and the preferred decoction technique of Shen Qi Jie Yu prescription is stable and reliable.

Keywords: Shen Qi Jie Yu prescription, hesperidin; HPLC, orthogonal test, extraction technology

(责任编辑:刘 宁 马雅静,责任译审:王 昭)