

制川乌白芍合煎微波提取工艺研究

郝伟伟, 郑琴*, 朱根华, 陆浩伟, 王粟若, 杨明

江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 优选微波法提取制川乌配伍白芍中有效成分乌头总生物碱和芍药苷的工艺条件。方法 采用单因素结合正交设计法, 优选出 65%乙醇为提取溶媒, 进一步考察了微波功率、微波辐射时间、乙醇体积分数及料液比 4 个因素, 用紫外可见分光光度法测定乌头总生物碱, 采用 HPLC 法测定芍药苷, 并以其量及浸膏得率作为评价指标。结果 以 65%乙醇为提取溶媒, 在微波功率 800 W, 微波辐射时间为 0.5 h, 固液比为 1:10 时乌头总生物碱和芍药苷的提取量最高且浸膏得率最低。结论 微波提取时间短, 有效成分提取率高, 此方法是一种有发展潜力的工艺。

关键词: 川乌; 白芍; 微波提取; 正交设计; 总生物碱; 芍药苷

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0069-05

Optimization of microwave-assistant extraction technology for decoction of *Aconiti Radix Cocta* coupled with *Paeoniae Radix Alba*

HAO Wei-wei, ZHENG Qin, ZHU Gen-hua, LU Hao-wei, WANG Su-jun, YANG Ming

Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To optimize the microwave extraction (ME) technology for extraction of total aconitum alkaloids and paeoniflorin in co-decoction of *Aconiti Radix Cocta* coupled with *Paeoniae Radix Alba*. **Methods** Orthogonal test with single factor, as well as ME method was used, 65% ethanol was optimized as extraction solvent, the effects of four factors, such as the microwave power, the radiation time, the solvent consumption, and ethanol concentration in microwave extraction process were investigated. The contents of total aconitum alkaloids were determined by UV-visible spectrophotometry and the paeoniflorin by HPLC by taking the contents and extract yield as evaluation indexes. **Results** The optimum conditions of extraction were as follows: 65% ethanol as extracting solvent, the microwave power was 800 W, the radiation time was 0.5 h, the proportion of raw material to solvent was 1:10. In the condition, the highest extracting content and lowest extract yield of total aconitum alkaloids and paeoniflorin could be obtained. **Conclusion** The optimized microwave extraction technology could be a potential way with the shorter time and higher extract yield and ME methods is better than the conventional extraction methods.

Key words: *Aconiti Radix Cocta*; *Paeoniae Radix Alba*; microwave extraction; orthogonal design; total alkaloids; paeoniflorin

制川乌与白芍在临床应用中是常用的传统药对, 最早见于汉代张仲景《金匱要略》的乌头汤^[1]。《中医方剂大辞典》统计, 发现 208 例川乌与白芍配伍的方剂^[2], 大多是用于风湿病关节疼痛、中风麻木疼痛、跌打损伤疼痛等证^[3]。制川乌与白芍均具有镇痛、抗炎作用, 两药配伍, 属寒热药性相反的配伍, 有增效减毒的作用^[4-5]。川乌发挥药效的主要成分为其所含的生物碱类物质。现代药理学实验表明, 乌头总生物碱具有抗炎、镇痛作用, 但有较强

的心脏毒性; 白芍中主要化学成分芍药苷, 具有镇痛、抗炎、解痉及较强的免疫调节等作用。

微波提取技术具有快速、溶剂用量少、提取率高、成本低、质量好等许多优点, 是天然产物提取中一种非常有发展潜力的新型技术^[6-8]。目前研究较多的是针对单味药材的微波提取^[9], 而在中药复方中的应用研究较少。本实验以乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率为指标, 采用紫外可见分光光度法、高效液相色谱法进行测定, 采用正交设计优化工艺,

收稿日期: 2010-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81060347); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ08333)

作者简介: 郝伟伟 (1983-), 男, 山西长治人, 助教, 硕士在读, 从事中药新型给药系统研究。Tel: (0791)7118658 E-mail: 02zyhww@163.com

*通讯作者 郑琴 Tel: (0791)7119010 E-mail: zhengqin912006@163.com

将微波提取法用于制川乌中乌头总生物碱及白芍中芍药苷的提取,通过比较传统提取与微波提取工艺对有效成分溶出的影响,探讨微波技术在中药复方提取工艺中的应用。

1 仪器与试剂

HWC-3LA 型微波提取设备(广州兴兴微波能设备有限公司),Agilent 1200 液相色谱仪(美国),包括:四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、G1314B VWD 紫外检测器,UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),Sartorius BS124S 电子分析天平,KQ-250VDB 型双频数显超声机(昆山市超声仪器有限公司)。

制川乌药材购自江油恒源药业集团有限公司,产地为四川,批号 20080930;白芍药材购自江西抚州黄庆仁大药房,产地浙江,批号 20080925,经本校中药鉴定教研室鉴定分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥母根炮制品和毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根。乌头碱(批号 110720-200410)、芍药苷(批号 110736-200629)对照品购自中国药品生物制品检定所。乙腈(色谱纯),双蒸水(自制),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 乌头总生物碱的测定方法^[10]

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取乌头碱对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加 0.01 mol/L 盐酸溶解,并添加至刻度,摇匀,即得 0.149 mg/mL 的乌头碱对照品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密量取 0、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mL 乌头碱对照品溶液,分别置分液漏斗中,各依次加入 0.01 mol/L 盐酸溶液 2.00、1.75、1.50、1.25、1.00、0.50、0 mL,各精密加醋酸-醋酸钠缓冲液 10 mL,溴甲酚绿液 2 mL,氯仿 10 mL,振摇 3 min,静置,分取氯仿液,照分光光度法在 416 nm 波长处测定吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,得回归方程 $A = 0.6678C + 0.115$, $R^2 = 0.9997$,结果表明总生物碱在 0.037~0.298 mg 呈良好的线性关系。

2.1.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取制川乌、白芍药材粉末,加 10 倍量溶剂,进行微波提取,提取液离心滤过,精密吸取 10 mL,低温蒸干,用蒸馏水溶解残渣,加氨试液调节 pH 值 10~11,用氯仿萃取 4 次,每次 10 mL,合并氯仿液,蒸干,

残渣加 0.01 mol/L 盐酸溶液,分次溶解,并转入 25 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 样品测定 精密量取供试品溶液与空白对照溶液各 2 mL,分别置分液漏斗中,照“2.1.2”项下方法,自“各精密加醋酸-醋酸钠缓冲液 10 mL”起,依法测定吸光度,计算,即得。计算乌头总生物碱提取率(乌头总生物碱提取率=提取液中乌头总生物碱的质量/制川乌和白芍的生药材总量)。

2.2 芍药苷的测定^[11-12]

2.2.1 色谱条件 Hypersil ODS 2 C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 流动相:乙腈-0.1%磷酸水(15:85);柱温:30 °C;检测波长:230 nm,体积流量:1.0 mL/min。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取芍药苷对照品适量,用甲醇溶解,配制 40.80 μg/mL 芍药苷对照品母液。分别准确吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 母液,置 1 mL 棕色量瓶中,用 50%甲醇溶液定容至刻度,制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液。取上述对照品溶液,分别进样 10 μL 分析。以芍药苷的质量浓度为横坐标,平均峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 25.924X - 3.2414$, $R^2 = 0.9992$,结果表明芍药苷在 0.408~40.8 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 按处方比例称取制川乌、白芍药材粉末,加 10 倍量溶剂,进行微波提取,提取液离心,离心液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得到滤液,精密吸取滤液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,即得。

2.2.4 测定 精密吸取供试品溶液,注入液相色谱仪,测定峰面积,按标准曲线方程计算芍药苷的质量浓度。同时计算芍药苷提取率(芍药苷提取率=提取液中芍药苷的质量/制川乌和白芍的生药材总量)。

2.3 浸膏得率的测定

精密量取提取液 10 mL,置已干燥恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105 °C 干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率。

$$\text{浸膏得率} = WV / (10W_0) \times 100\%$$

W 为 10 mL 药液的浸膏质量, V 为提取液的体积, W_0 为药材质量

2.4 制川乌白芍合煎的微波提取工艺

2.4.1 提取溶媒的考察 按处方比例称取制川乌、白芍粗粉药材 4 份,每份约 100 g,分别加 8 倍量蒸

馏水、65%乙醇、pH 2~3 蒸馏水、pH 2~3 的 65%乙醇，浸泡 1 h，微波提取 0.5 h，微波输出功率为 800 W，提取 1 次，提取液滤过，浓缩至一定体积。取适量的提取液对乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率进行测定，结果见表 1。结果表明：提取溶媒是影响有效成分的溶出及浸膏得率的重要因素，乙醇的提取效率优于水的提取效率，因为一定体积分数的乙醇，渗透能力比水强，乙醇使原生药材的细胞组织内部产生的渗透压大于水产生的渗透压，高压加快了目标成分溶出过程。随着提取溶媒 pH 值的降低，制川乌中的有效成分溶出增加，芍药苷的溶出基本保持不变，因为制川乌中的有效成分为生物碱，随着提取溶媒的 pH 值的降低，有效成分转变成盐的形式，增加了脂溶性成分在水中或乙醇中的溶解度。因为中药复方成分复杂，其理化性质千差万别，浸膏得率呈现不规律性变化。实验结果表明酸醇提取的浸膏得率是乙醇提取的近 2 倍，但有效成分的提取率与乙醇提取的差别不大，确定最佳的提取溶媒为 65%乙醇。

表 1 提取溶媒的优选

Table 1 Extraction solvent optimized

溶媒	乌头总生物碱 提取率/(mg·g ⁻¹)	芍药苷 提取率/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%
水 (pH 7)	1.51	0.21	27.17
水 (pH 2~3)	1.39	0.20	24.44
65%乙醇 (pH 2~3)	2.62	0.56	34.73
65%乙醇 (pH 7)	2.51	0.53	18.44

2.4.2 药材浸泡时间对有效成分的溶出及浸膏得率的影响 按处方比例称取制川乌、白芍药材粗粉 3 份，每份约 100 g，加 10 倍量 65%乙醇，分别浸泡 0.5、1、2 h，微波提取 0.5 h，微波辐射功率为 800 W，提取 1 次，提取液过滤，浓缩至一定体积，取适量，对乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率进行测定，结果见表 2。结果表明：有效成分的溶出及浸膏得率随浸泡时间的增加而增加，这是因为通过浸泡的方法提高了原生药材粗粉中的含醇量，在微波辐射下，原生药材的细胞组织内部产生局部的高温、高压，压迫了药材的细胞组织，加快了目标成分由组织向溶剂中的传递过程。由此可见，室温下延长浸泡时间对提高有效成分的溶出是有利的，同时浸泡过久，浸膏得率越高，制剂成型越困难，所以采用药材浸泡 1 h。

表 2 浸泡时间对有效成分及浸膏得率的影响

Table 2 Effect of soaking time on active components and extract yield

浸泡时间/h	乌头总生物碱 提取率/(mg·g ⁻¹)	芍药苷 提取率/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%
0.5	2.38	0.54	18.83
1	2.69	0.66	19.27
2	2.75	0.70	19.45

2.4.3 药材粉碎度对有效成分溶出及浸膏得率的影响 按处方比例称取制川乌、白芍药材粗粉、中粉、细粉各 1 份，每份约 100 g，加 10 倍量 65%乙醇，浸泡 1 h，进行微波提取 0.5 h，微波辐射功率为 800 W，提取 1 次，提取液滤过，浓缩至一定体积，分别对乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率进行测定，结果见表 3。可见随着药材粒度变小，乌头总生物碱、芍药苷溶出及浸膏得率都会有所提高，对于 1 次提取而言，药材的粒度是影响有效成分提取及浸膏得率的重要因素，主要是由于粒度变小，比表面积增大，植物细胞、组织受破坏程度较大，从而利于有效成分的扩散。结果表明中粉和细粉提取差别不大，所以确定药材的粉碎度为中粉。

表 3 药材粉碎度对有效成分和浸膏得率的影响

Table 3 Effect of medicinal grinding degrees on active components and extract yield

粉碎度	乌头总生物碱 提取率/(mg·g ⁻¹)	芍药苷 提取率/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%
粗粉	2.71	0.65	19.24
中粉	2.94	0.79	19.35
细粉	3.03	0.81	20.08

2.4.4 提取次数对有效成分及浸膏得率的影响 按处方比例分别称取制川乌、白芍药材中粉共两份各 100 g，加 10 倍量的 65%乙醇，浸泡 1 h，微波提取 0.5 h，微波辐射功率为 800 W，分别提取 1、2 次，提取液滤过，浓缩至一定体积，分别取适量，对乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率进行测定，结果见表 4。结果表明提取次数不是影响有效成分溶出及浸膏得率的重要因素，提取 1 次有效成分的溶出与 2 次差别不大，因此确定微波提取的次数为 1 次。

2.4.5 正交试验优化最佳的微波提取工艺 按比例称取定量的制川乌、白芍中粉药材，浸泡时间为 1 h，按照 L₉(3⁴)正交试验设计，每份样品提取 1 次，对微波辐射功率 (A)、提取时间 (B)、溶媒体积分数 (C)、物料比 (D) 4 个因素，每个因素 3 个水平进

表 4 提取次数对有效成分和浸膏得率的影响

Table 4 Effect of various extracting times on active components and extract yield

提取次数/次	乌头总生物碱	芍药苷	浸膏得率/%
	提取率/(mg·g ⁻¹)	提取率/(mg·g ⁻¹)	
1	2.97	0.77	19.33
2	3.01	0.81	19.52

行考察, 因素水平表见表 5。根据综合评分结合实际情况确定最佳的提取工艺。实验结果见表 6。为在统一标准下加权评分, 3 项指标最佳的最高分值分别定为 40 分、40 分和 20 分, 最差的定为 0 分, 规定乌头总生物碱提取率最好的 8 号试验 3.45 为 40 分, 最差的 1 号试验 2.27 为 0 分, 每降低 1 则减去 33.90 分; 同法推出芍药苷提取率降低 1 则减去 210.52 分, 浸膏得率每增加 1%, 则减去 4.07 分, 故总评分为 $[40-33.9 \times (3.45-Y_1)] + [40-210.52 \times (0.85-Y_2)] + 4.07 \times (21.38-Y_3)$ 。最后将 3 个指标

表 5 因素水平

Table 5 Factors and levels

水平	因素			
	A/W	B/min	C/%	D
1	600	20	55	1:6
2	700	30	65	1:8
3	800	40	75	1:10

分值之和作为该试验的分值。

直观分析表明影响综合评分的主要因素顺序为: $C > A > B > D$, 由此得出的提取工艺为: $A_3B_3C_2D_3$ 。方差分析可见对综合评分影响各因素不存在显著性差异, 考虑到处方中含有长时间遇热不稳定易分解的芍药苷, 为保证芍药苷的提取率, 同时结合将来生产工艺的成本, 故将提取时间 B_3 调整为 B_2 , 综上所述确定提取工艺为: $A_3B_2C_2D_3$, 即最佳提取功率为 800 W, 提取时间为 0.5 h, 提取溶媒 65%乙醇, 固液比例为 1:10。

表 6 正交试验设计表及结果

Table 6 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	Y ₁ 总生物碱	Y ₂ 芍药苷	Y ₃ 浸膏收率	综合评分
1	1	1	1	1	2.27	0.67	19.60	9.36
2	1	2	2	2	2.96	0.85	19.53	70.93
3	1	3	3	3	3.07	0.83	17.12	80.26
4	2	1	2	3	3.00	0.72	21.22	38.03
5	2	2	3	1	2.48	0.66	16.47	27.12
6	2	3	1	2	2.74	0.70	20.63	27.41
7	3	1	3	2	3.40	0.66	16.76	57.12
8	3	2	1	3	3.45	0.71	21.38	50.53
9	3	3	2	1	3.21	0.79	16.96	77.24
K ₁	160.511	104.511	87.300	113.721				
K ₂	92.559	148.581	186.201	155.460				
K ₃	184.890	184.911	164.499	168.819				
R	92.311	80.400	98.901	55.098				

2.4.6 与传统提取方式的比较 取制川乌、白芍药材中粉, 分别加适量的 65%乙醇, 浸泡 1 h, 分别采用回流、超声、微波、渗漉提取, 收集各提取液, 滤过, 滤液浓缩至一定体积。超声、回流和微波提取时间为 0.5 h, 渗漉流速为 1 滴/s, 微波提取参数为优化的最优参数。对乌头总生物碱、芍药苷及浸膏得率进行测定, 比较不同提取方法提取效果。结果见表 7。结果表明, 在提取条件基本相同的情况下微波提取有效成分的溶出最大, 浸膏得率居中, 相比较而言, 微波提取的生产成本明显降低, 节省

了能源, 因此微波提取为较理想的提取方法。

3 讨论

在优选提取溶媒的基础上, 深入研究了微波提取溶剂体积分数、辐射时间、微波输出功率、液固比、浸泡时间及药材粒径和提取次数对制川乌中乌头总生物碱、白芍中芍药苷收率及浸膏得率的影响, 确定了最佳的提取工艺: 65%乙醇为提取溶剂, 按的液固比 10:1, 微波输出功率 800 W, 辐射 0.5 h, 提取 1 次得到乌头总生物碱、芍药苷的提取率及浸膏得率分别为 2.98 mg/g、0.71 mg/g、19.28%。

表7 不同提取方法的比较

Table 7 Comparison of different extraction methods

提取方法	乌头总生物碱 提取率/(mg·g ⁻¹)	芍药苷 提取率/(mg·g ⁻¹)	浸膏得率/%
乙醇回流	2.69	0.221	19.97
乙醇超声	2.72	0.237	15.31
微波提取	2.98	0.710	19.28
乙醇渗漉	2.31	0.231	16.94

微波提取法具有快速提取的优点,缩短了受热时间,对热、光不稳定成分的提取是十分有利的,克服了传统提取方法中药材细粉易凝聚、易焦化的弊病,具有选择性高、溶剂消耗量少、有效成分得率高等优点,此外与超临界等新型提取方法相比,它设备简单、易于操作、投资小、适用面广,因此微波提取技术在天然植物尤其是中药提取中有良好的应用前景。

微波提取应用于单味中药的提取报道较多,应用于复方制剂的较少。提取工艺的创新是实现中药复方制剂现代化的一个重要影响因素。针对中药复方多成分、多靶点、多途径整合作用的特点,如何将微波提取应用于中药复方制剂中,如何设计微波提取方案以及工业化提取设备的开发等仍然是有待研究的主要问题。

参考文献

[1] 秦林,彭欣.论寒热配伍在痹证治疗中的意义[J].

中国中药杂志,1999,24(2):112.

- [2] 李晋奇,王岚.川乌配伍白芍的现代临床应用与药理研究浅析[J].中医药学刊,2003,21(12):2013-2014.
- [3] 彭怀仁.中医方剂大辞典[M].北京:人民卫生出版社,1996.
- [4] 李晋奇,彭成.制川乌配伍白芍的增效作用及其作用机理[J].华西药学杂志,2007,22(2):144-148.
- [5] 秦林,彭欣,李晓丽,等.白芍与川乌配伍前后急性毒性实验研究[J].山东中医药大学学报,2000,24(6):453-455.
- [6] 张萍,廖正根,梁新丽,等.均匀设计优选舒胸片处方药材的微波辅助提取工艺的研究[J].中草药,2009,40(1):45-49.
- [7] 欧阳丽娜,李兰林,吴雪,等.正交设计优选竹节参总皂苷微波提取工艺的研究[J].中草药,2010,41(10):1639-1642.
- [8] 龚盛昭,程江,杨卓如.微波场协同提取芦丁[J].精细化工,2003,20(12):758-760.
- [9] 黄天辉,沈平孃,沈永嘉.微波辅助提取白芍的工艺研究[J].中草药,2006,37(6):878-880.
- [10] 王苏会.抗风湿颗粒的制备工艺及质量标准研究[D].北京:北京中医药大学,2005.
- [11] 李越峰,杨武亮,沈菲,等.高效液相色谱测定白芍中芍药苷的含量[J].时珍国医国药,2008,19(2):438-439.
- [12] 褚文静,张雪,王伟,等.HPLC法测定抗感胶囊中绿原酸、咖啡酸、芍药苷、木犀草苷和芦丁[J].中草药,2010,41(1):66-68.