

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.06.010

脉络舒通丸挥发油提取工艺优选*

杜昊忱^{1,2}, 刘侃¹, 袁晓梅^{1,2}, 张微^{1,2}, 关永霞^{1,2}, 张贵民^{2,3,Δ}

(1. 鲁南厚普制药有限公司, 山东 临沂 276006; 2. 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006; 3. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276006)

摘要:目的 优选脉络舒通丸挥发油的最佳提取工艺。方法 以挥发油提取量、绿原酸提取率为考察指标,以加水量、浸泡时间和提取时间为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法筛选最佳提取工艺;采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,并采用气相色谱串联质谱法确定其中主要成分及相对百分含量;采用高效液相色谱法测定绿原酸含量,计算绿原酸提取率。结果 最佳提取工艺为加10倍量水,不浸泡,提取挥发油6 h,所得挥发油量大于2 mL,绿原酸提取率大于24.4%。鉴定出挥发油中15个主要化合物成分(相对含量>0.7%),占挥发油总量的76.96%。挥发油中成分多为单萜、倍半萜等萜类化合物,含量最高的为Z-藁本内酯,其次为苍术素和 α -蒎烯。相对含量>1%的化合物有10种,主要来源于当归和苍术药材。结论 优选的提取工艺稳定可行,效率高,可用于脉络舒通丸挥发油的提取,且挥发油中主要成分来源于制剂中的当归、苍术两味药材。

关键词:脉络舒通丸;挥发油;水蒸气蒸馏法;绿原酸;正交试验;气相色谱串联质谱法

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)06-0038-05

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from Mailuo Shutong Pills

DU Haochen^{1,2}, LIU Kan¹, YUAN Xiaomei^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, GUAN Yongxia^{1,2}, ZHANG Guimin^{2,3}

(1. Lunan Houpu Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi, Shandong, China 276006; 2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Linyi, Shandong, China 276006; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi, Shandong, China 276006)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of volatile oil from Mailuo Shutong Pills. **Methods** The extraction process was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with taking the extraction amount of volatile oil and the extraction rate of chlorogenic acid as the indexes and the water addition amount, soaking time and extraction time as the factors. The volatile oil was extracted by steam distillation, the main components, relative and content their percentages were determined by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS). **Results** The optimal extraction process was as follows: adding 10 times amount of water without soaking, extracting the volatile oil for 6 h, the amount of volatile oil obtained by this process was more than 2 mL, and the extraction rate of chlorogenic acid was more than 24.4%. Fifteen main components (relative content > 0.7%) in the volatile oil were identified, accounting for 76.96% of the total volatile oil. Most of the components in the volatile oil were terpenoids such as monoterpenes and sesquiterpenes, among which the highest content was Z-ligustilide, followed by atracylodin and α -pinene. There were nine components with relative content > 1%, mainly from Angelicae Sinensis Radix and Atractylodis Rhizoma. **Conclusion** The optimal extraction process is stable, feasible and efficient, which can be used to extract the volatile oil of Mailuo Shutong Pills, and the main components of the volatile oil come from Angelicae Sinensis Radix and Atractylodis Rhizoma in the preparation.

Key words: Mailuo Shutong Pills; volatile oil; steam distillation; chlorogenic acid; orthogonal test; GC-MS

脉络舒通丸主要由黄芪、金银花、黄柏、苍术、薏苡仁、玄参、当归、白芍、甘草、水蛭、蜈蚣、全蝎12味药材组方,有清热解毒、化瘀通络、祛湿消肿功效,用于治疗湿热瘀阻脉络所致血栓性浅静脉炎,以及非急性期深静脉血栓形成所致下肢肿胀、疼痛、肤色暗红或伴有条索状物^[1]。临床研究表明,脉络舒通丸治疗血小板减少症、急性下肢静脉血栓、湿热壅滞型混合痔术后水肿等有显著疗效^[2-5]。水蒸气蒸馏法是中药挥发油提取的常用方法,简单易操作,可避免有机溶剂污染,绿色环保,

适合工业化大生产^[6-8]。控制挥发油的质量(稳定均一)是其发挥疗效的关键^[9]。挥发油出油率不仅受药材饮片外观性状、成分种类及主要成分含量影响,更受液料比、浸泡时间、提取时间等提取工艺因素影响^[10-12]。故本研究中采用水蒸气蒸馏法提取药材中当归、白芍、玄参、金银花、苍术5味挥发性成分,采用正交试验法优选其最佳提取工艺,并采用气相色谱串联质谱(GC-MS)法对挥发油进行化学成分分析和鉴定,为中药挥发油的开发及其质量标准的建立提供参考。现报道如下。

*基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项[2018ZX09201010];山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目[2020CXGC010505];山东省临沂市自主创新重大专项[2019ZDZX001];山东省临沂市兰山区科技创新发展计划专项[临兰科字[2026]28号]。

第一作者:杜昊忱,男,硕士研究生,高级工程师,研究方向为中药新药研发与质量控制,(电子信箱)duhaochen1002@163.com。

Δ通信作者:张贵民,男,硕士研究生,研究员,研究方向为新药研发与转化,(电子信箱)lunanzhangguimin@163.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo TRACE 1310 - IQS型气相色谱质谱仪(赛默飞世尔科技公司);XS204型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);Agilent - G9 - UV型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);JY - 15型超声波清洗机(鼎泰生化科技设备制造有限公司)。

1.2 试药

白芍药材(安徽人民中药饮片有限公司,批号为190601),苍术药材(安国市宇通药材有限公司,批号为190626),当归药材(山东民瑞中药饮片有限公司,批号为5191003),玄参药材(陇西千金药材有限公司,批号为W006 - 1908059),金银花药材(山东民瑞中药饮片有限公司,批号为5190810),均经中药制药共性技术国家重点实验室范建伟高级工程师鉴定为正品;绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110753 - 201716,含量为96.8%);高效液相色谱用试剂均为色谱纯,分析用试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 挥发油测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Thermo HP - 5 MS石英毛细管色谱柱(30.0 m × 0.25 mm, 1.0 μm);程序升温:初始温度为60℃并保持3 min,以4℃/min的速率升至200℃并保持5 min,以10℃/min的速率升至280℃;进样口温度:280℃;分流比:20:1;进样量:0.5 μL;载气:氦气(≥99.999%);流速:1.0 mL/min。

2.1.2 质谱条件

电子轰击(EI)离子源,电子能源70 eV,传输线温度为280℃,离子源温度为230℃,四极杆温度为150℃;全扫描检测方式,扫描范围为40~650 amu。

2.1.3 检测方法

按脉络舒通丸0.4倍处方量称取苍术、当归、白芍各166.8 g,玄参、金银花各333.2 g,置圆底烧瓶中,加水适量,浸泡,连接挥发油测定器与回流冷凝管,置电热套中加热至沸腾,并保持微沸,收集挥发油,测定挥发油提取量,并对挥发油气相色谱 - 质谱图中15种主要成分(相对含量>0.7%)进行鉴别。结果见图1和表1。

2.2 绿原酸提取率

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax - C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈 - 0.4%磷酸溶液(10:90, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

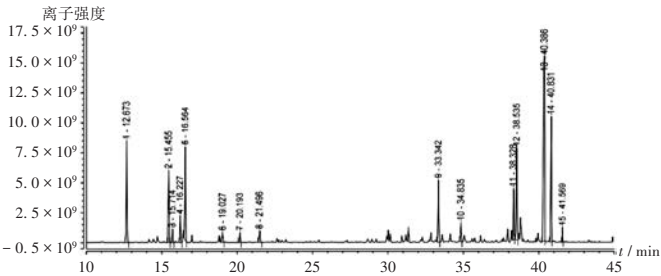


图1 脉络疏通丸挥发油气相色谱 - 质谱图

Fig. 1 GS - MS chrotagrams of volatile oil in Mailuo Shutong Pills

表1 脉络疏通丸挥发油化学成分气相色谱 - 质谱分析结果

Tab. 1 Analysis results of chemical components of volatile oil in Mailuo Shutong Pills by GS - MS

编号	保留时间(min)	化合物	相对百分含量($\bar{X} \pm s, \%$)
1	12.673	α -蒎烯	7.94 ± 0.46
2	15.455	α -水芹烯	5.57 ± 0.43
3	15.714	3-蒎烯	0.91 ± 0.07
4	16.277	1-甲基-3-(1-甲基乙基)苯	1.75 ± 0.09
5	16.564	β -罗勒烯	6.76 ± 0.51
6	19.027	芳樟醇	0.74 ± 0.05
7	20.193	2,6-二甲基-2,4,6-辛三烯	0.71 ± 0.04
8	21.496	5-戊基环己-1,3-二烯	0.84 ± 0.06
9	33.342	芹子烯	4.74 ± 0.30
10	34.835	β -榄香烯	1.40 ± 0.10
11	38.328	β -桉叶油醇	3.68 ± 0.33
12	38.535	苍术酮	7.08 ± 0.39
13	40.386	Z-蒙本内酯	25.84 ± 2.46
14	40.831	苍术素	8.28 ± 0.52
15	41.569	E-蒙本内酯	0.72 ± 0.05

2.2.2 溶液制备

取绿原酸对照品25 mg,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,加50%甲醇制成质量浓度为250 μg/mL的溶液,即得对照品贮备液;精密吸取10 mL,置50 mL棕色容量瓶中,加50%甲醇稀释并定容,摇匀,即得对照品溶液。取2.1.3项下提取挥发油残液1 mL,置50 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,密塞,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别取2.2.2项下对照品溶液、供试品溶液各10 μL,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按绿原酸峰计不低于15 000,分离度均大于2。详见图2。

线性关系考察:精密移取2.2.2项下对照品贮备液0, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50, 10.00 mL,分别置25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得质量浓度为0, 10.00, 25.00, 50.00, 75.00, 100.0 μg/mL的系列标准

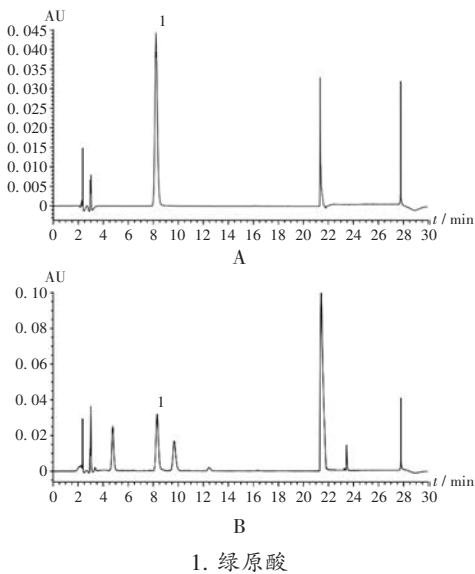


图 2 高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid

A. Reference solution B. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

溶液。按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积(A)为纵坐标、绿原酸质量浓度(C, $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $A = 16.778\,52\,C + 8.329\,96$ ($r = 0.999\,9, n = 6$)。结果表明,绿原酸质量浓度在 $0 \sim 100.00\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定:精密吸取对照品溶液适量,分别以稀释至信噪比(S/N)为 1:3 和 1:10 时的质量浓度为检测限和定量限,结果两者分别为 $0.035\,59\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.118\,6\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

精密度试验:取同一对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 3.02% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,室温下分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 2.85% ($n = 7$),表明供试品溶液在室温下放置 48 h 内稳定。

重复性试验:取同一供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 3.22% ($n = 6$),表明方法的重复性良好。

加样回收试验:分别取已知绿原酸含量的提取液 6 份,分别按低、中、高浓度比例加入绿原酸对照品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.2.4 测定方法

量取挥发油提取残液,测定绿原酸含量,计算绿原酸提取率。绿原酸提取率(%) = [提取残液中绿原酸含

表 2 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.746	0.60	1.364 1	103.02	102.93	3.25
0.746	0.60	1.380 8	105.80		
0.746	0.75	1.528 8	104.37		
0.746	0.75	1.472 7	96.89		
0.746	0.90	1.662 1	101.79		
0.746	0.90	1.697 6	105.73		

量(mg/mL) $\times$ 提取残液体积(mL)] / [药材中绿原酸含量(mg/g) $\times$ 药材质量(g)] $\times 100\%$ 。

2.3 正交试验优化

2.3.1 试验设计

参考 2020 年版《中国药典(一部)》中脉络疏通丸项下方法,分别以浸泡时间(因素 A)、加水量(因素 B)、提取时间(因素 C)为考察因素,以挥发油提取量、绿原酸提取率为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选当归、白芍、玄参、金银花、苍术 5 味药材的挥发油提取工艺。因素水平见表 3。

表 3 因素水平表

Tab. 3 The factor levels

水平	因素 A(h)	因素 B(倍)	因素 C(h)
1	0	6	5
2	1.5	8	6
3	3.0	10	7

2.3.2 试验结果

正交试验结果见表 4,方差分析结果见表 5 和表 6。由表 4 和表 5 可见,因素 A、因素 B、因素 C 对挥发油的提取量均无显著影响($P > 0.05$),各因素对挥发油提取的影响强度为 $C > B > A$,最佳工艺条件为 A_1 (或 A_2 或 A_3) B_3C_3 。由表 4 和表 6 可见,因素 A、因素 B、因素 C 对绿原酸提取率均无显著影响($P > 0.05$),各因素对绿原酸提取率的影响强度为 $B > A > C$,最佳工艺条件为 $A_1B_3C_1$ 。综合考虑,最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2$,即不浸泡,加 10 倍量水,提取 6 h。

2.3.3 验证试验

按正交试验所得最佳提取工艺,重复提取挥发油 3 次,测量挥发油提取量,计算绿原酸提取率。结果见表 7。可见,在最佳提取工艺条件下,挥发油提取量及绿原酸提取率均稳定,表明优选的提取工艺可靠。

3 讨论

挥发油是许多中药材的有效成分,除有解热、抗菌、抗炎等功效外,还可改善心血管功能、提高机体免疫力、调血脂等^[13]。目前,艳山姜、高良姜、当归、川芎、肉桂等中药挥发油治疗心血管系统疾病受到了广泛关

表4 $L_9(3^4)$ 正交试验结果($n=9$)
Tab. 4 Results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test ($n=9$)

序号	因素				挥发油 提取量(mL)	绿原酸 提取率(%)
	A(h)	B(倍)	C(h)	D(误差)		
1	1	1	1	1	1.7	17.77
2	1	2	2	2	2.0	20.65
3	1	3	3	3	2.1	24.28
4	2	1	3	3	1.9	15.74
5	2	2	1	1	2.1	19.25
6	2	3	2	2	1.8	23.37
7	3	1	2	2	2.0	13.06
8	3	2	3	3	1.7	19.65
9	3	3	1	1	2.1	22.28
K_1	1.933	1.867	1.733	1.967		
K_2	1.933	1.933	2.000	1.933		
K_3	1.933	2.000	2.067	1.900		
R	0	0.133	0.334	0.067		
K_1'	20.900	15.523	20.263	19.767		
K_2'	19.453	19.85	19.557	19.027		
K_3'	18.330	23.310	18.863	19.890		
R'	2.570	7.787	1.400	0.863		

表5 挥发油方差分析结果
Tab. 5 ANOVA results of volatile oil

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	0.000	2	0.000	0.000	>0.05
B	0.027	2	0.014	0.489	>0.05
C	0.187	2	0.094	3.385	>0.05
D	0.220	8	0.110		

注: $F_{0.05}(2,8)=4.460$,表6同。

Note: $F_{0.05}(2,8)=4.460$ (for Tab. 5-6).

表6 绿原酸提取率方差分析结果

Tab. 6 ANOVA results of the extraction rate of chlorogenic acid

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P
A	9.960	2	4.980	0.378	>0.05
B	91.324	2	45.662	3.461	>0.05
C	2.940	2	1.470	0.111	>0.05
D	105.530	8	13.191		

表7 提取工艺验证试验($n=3$)

Tab. 7 Validation test of the extraction process ($n=3$)

指标	1	2	3	$\bar{X} \pm s$
挥发油体积(mL)	2.30	2.10	2.20	2.20 ± 0.10
绿原酸提取率(%)	24.42	24.65	24.52	24.53 ± 0.12

注^[14]。目前挥发油的提取方法有蒸馏法、浸泡法、压榨法、溶剂法等传统方法,以及微波提取、超声提取等新技术^[15-16]。在微波、超声波、微波-超声波和常规加氢蒸馏法提取非洲三叶草挥发油、茉莉的技术中,微波超

声法提取率最高^[17-18]。实际生产中,水蒸气蒸馏法因简单、易操作、绿色环保而成为大生产中挥发油提取最常用方法,但所得挥发油成分往往较复杂^[19]。回瑞华等^[20]采用水蒸气蒸馏法提取6h后,川椒组分数和提取率下降,说明提取时间对挥发油提取效果有较大影响。

中药挥发油提取工艺是中药提取的重要步骤,对药物的疗效起关键作用。以往的研究中,多数仅关注挥发油提取率,而忽略了残液中的有效成分^[21]。本研究选用多指标综合评价挥发油提取工艺,并采用正交试验法优选出最佳提取工艺,可为大生产工艺优化提供参考。通过GC-MS法对提取的脉络疏通丸挥发油进行分析,鉴定出其中15种化合物,占挥发油总量的76.96%。挥发油中多数成分为单萜、倍半萜等萜类化合物,含量最高的为 Z -藁本内酯,其次为苍术素(8.28%)和 α -蒎烯(7.94%)。含量在1%以上的化合物有10种,查阅文献^[22-24],发现萜类化合物主要来源于当归和苍术。当归挥发油成分中 Z -藁本内酯含量最高,其次为 α -蒎烯、 β -罗勒烯,苍术挥发油成分中苍术素含量最高,其次为苍术酮、 α -水芹烯。其中,5-戊基环己-1,3-二烯是单味药材提取所得挥发油中未出现的成分,其可能是在长时间提取过程中,挥发性成分发生了合成、氧化或热分解等化学反应而形成的,该化合物形成过程和药理作用还需进一步研究。

综上所述,优选的提取工艺稳定可行、效率高,可为工业化大生产的改良及后续开发研究提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:1364-1365.

[2] 刘慧娜,王志浩,侯红军,等. 脉络疏通丸联合利伐沙班治疗脊柱术后低分子肝素诱导的血小板减少症1例[J]. 临床合理用药杂志,2020,13(35):179-180.

[3] 杜伟鹏,张现峰,马立人. 脉络疏通丸辅治急性期下肢肌间静脉血栓临床观察[J]. 实用中医药杂志,2021,37(2):260-262.

[4] 余文美,王建民. 基于血清IL-6、IFN- γ 观察脉络疏通丸治疗湿热壅滞型混合痔术后水肿的临床疗效[J]. 江西中医药大学学报,2019,31(1):34-36.

[5] 张志亮,李合华. 脉络疏通颗粒联合地奥司明片治疗下肢深静脉血栓的疗效观察[J]. 现代医药卫生,2018,34(15):2376-2378.

[6] 牛向伟,姜莉莉,周国忠,等. 活血润肠软胶囊挥发油的提取工艺优化及气相色谱质谱分析[J]. 中国药业,2020,29(19):30-32.

[7] 彭安堂,李佳佳,魏艳婷,等. 经典名方苓桂术甘汤中挥发油提取工艺优选[J]. 中国药业,2021,30(1):41-44.

[8] 高梅,潘久香,贾茹. 挥发油提取方法的研究进展[J]. 生命科学仪器,2012,10(5):3-7.

[9] 李聪,刘红宁,陈丽华,等. 加工技术对中药挥发油成分差异性分析[J]. 中国新药杂志,2021,30(6):520-527.