

参芪降糖颗粒提取工艺的优化及定性鉴别

侯彦婕¹, 林建翠², 花卉¹, 范晓阳¹, 司瑞花³, 贾世艳³, 赵琳儒², 刘光珍^{4*}

(1. 山西省中医药研究院, 太原 030024; 2. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 太原 030024;
3. 山西中医药大学 基础医学院, 太原 030024; 4. 山西省中医院, 太原 030024)

摘要: 目的 优化参芪降糖颗粒的提取工艺, 初步建立其薄层色谱的鉴别方法。**方法** 采用水煎煮法对参芪降糖颗粒进行提取, 以干浸膏得率为评定指标, 通过正交试验设计对煎煮时间、煎煮次数和加水量进行考察, 优选参芪降糖颗粒的提取工艺, 采用薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)对参芪降糖颗粒中的黄芪、葛根、丹参进行 TLC 定性鉴别。**结果** 最佳提取工艺为处方药材加 10 倍水, 提取 2 次, 每次 1.5 h。TLC 图斑点清晰、重现性好、阴性无干扰。**结论** 参芪降糖颗粒提取工艺合理、可行, 薄层鉴别方法简单可靠, 为其开发利用提供科学依据。

关键词: 参芪降糖颗粒; 工艺优化; 薄层色谱法; 定性鉴别

Optimization of extraction process and qualitative identification of ginseng-milkvetch declining sugar granule

HOU Yan-Jie¹, LIN Jian-Cui², HUA Hui¹, FAN Xiao-Yang¹, SI Rui-Hua³, JIA Shi-Yan³,
ZHAO Lin-Ru², LIU Guang-Zhen^{4*}

(1. Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China; 2. College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China; 3. Basic Medical School, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China; 4. Shanxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Taiyuan 030024, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of ginseng-milkvetch declining sugar granule and to establish its thin layer chromatography(TLC) identification method. **Methods** Ginseng-milkvetch declining sugar granule was extracted by water decoction, and the yield of dry extract was used as the evaluation index. The decocting time, decocting times and the amount of water added were investigated by orthogonal design. The extraction process of ginseng-milkvetch declining sugar granule was optimized by orthogonal experimental design. The *Astragalus membranaceus*, *Pueraria lobata* and *Salvia miltiorrhiza* in ginseng-milkvetch declining sugar granule were qualitatively identified by thin layer chromatography. **Results** The best extraction technology was prescription herbs with 10 times water, extraction two times, 1.5 h each time. The spots of thin layer chromatography were clear, reproducible and negative without interference. **Conclusion** The extraction process of ginseng-milkvetch declining sugar granule is reasonable and feasible, and the TLC identification method is simple and reliable, which provides a scientific basis for its development and utilization.

KEY WORDS: ginseng-milkvetch declining sugar granule; process optimization; thin layer chromatography; qualitative identification

*通信作者: 刘光珍, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为中西医结合治疗慢性肾脏病的研究。E-mail: gzh4668933@126.com

*Corresponding author: LIU Guang-Zhen, Master, Professor, Shanxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Taiyuan 030024, China. E-mail: gzh4668933@126.com

0 引言

黄芪(*Astragalus membranaceus*)为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根^[1],首载于《神农本草经》^[2],具有补气升阳,益卫固表等功效,是我国最古老的补气中药材之一^[3]。葛根(*Pueraria lobata*)是我国传统中药材,为野葛的根经干制后得到^[4]。《本草纲目》中记载葛根主治“热毒下血,酒醉不醒,疔子初起,心热吐血”等^[5]。丹参(*Salvia miltiorrhiza*),其有效成分为丹参酮、丹参素、丹酚酸等,具有扩张血管、抗动脉粥样硬化、保护心肌、抗血栓、改善微循环等多种药理作用^[6]。参芪降糖颗粒由黄芪、葛根、丹参等9味中药组成,具有降血糖的作用。其中黄芪、葛根、丹参为药食同源药材,对人体健康具有很大益处,为确定合理的提取工艺,本研究以出膏率作为考察指标,选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,各3个水平,按照 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,选取最佳水提工艺,并用薄层色谱法对黄芪\丹参\葛根进行定性鉴别,以期有效控制保健产品的质量^[7]及制定合理标准提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

ZF1-IIN 多功能紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);XR-I 显色加热器(武汉药科新技术开发公司);HH-2 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司);DFT 200 克万能粉碎机(西安比朗生物科技有限公司)。

1.2 材料与试剂

黄芪、丹参、葛根等(山西省中医院中药房);甲醇、无水乙醇、乙酸、甲酸、正丁醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);环己烷、甲苯(分析纯,天津市申泰化学试剂有限公司);氨水(分析纯,西陇科学股份有限公司);硫酸、盐酸(分析纯,成都市科龙化工试剂厂)丙酮(分析纯,北京化工厂);黄芪甲苷标准品(批号:20180418,中国药品生物制品检定所);葛根素标准品(批号:20160916,中国药品生物制品检定所)。

1.3 试验方法

1.3.1 正交试验设计

根据相关文献^[8-10],选定煎煮时间、煎煮次数和加水量3因素,每个因素取3个水平。按 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行正交试验,确定最优提取工艺,水煎煮因素水平见表1。

根据因素水平,按处方量称取黄芪、葛根、丹参各10g,其部分按处方量加入,共计97g。按 $L_9(3^4)$ 正交表方案安排试验,水煎液滤过、合并、浓缩,滤液浓缩至相对密度为1.10~1.20的清膏,60℃以下干燥,即得干膏。将干膏取出称定质量,计算出膏率。

表1 水煎煮的因素水平表
Table 1 Factor level table of water decoction

水平	加水量(A)/倍	提取时间(B)/h	提取次数(C)/次	空白(D)
1	6	1	1	1
2	8	1.5	2	2
3	10	2	3	3

1.3.2 参芪降糖颗粒 TLC 定性鉴别研究

(1)黄芪的鉴别

取本品干膏10g(10.08g),研钵研碎,将其放于三角瓶中,然后加入50mL甲醇,水浴锅加热回流1h后,冷却至室内温度,离心,收集上清液,水浴锅80℃蒸干,加水20mL使溶解,用水饱和的正丁醇萃取2次,每次20mL,合并正丁醇萃取液,再用氨试液洗涤,洗涤2次,每次20mL,收集正丁醇液,蒸干,最后残渣加1mL甲醇使溶解,作为供试品溶液^[11]。再取缺黄芪的阴性样品5.97g,加甲醇50mL,同法制成阴性样品溶液。再取黄芪对照药材3g(3.12g),加30mL甲醇,后续制备方法同供试品。另取黄芪甲苷对照品,以甲醇作为溶剂,配制成浓度为2mg/mL的溶液,作为对照品溶液。分别各吸取5μL的供试品、对照药材、对照品、阴性样品溶液,点于同一个自制的硅胶G薄层板上(5cm×20cm),以水-甲醇-二氯甲烷(1:3.5:6.5, V:V:V)4℃下放置的下层溶液为展开系统,展开,自然晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105℃加热至斑点显色明显,分别在日光和紫外光灯(365nm)下检视。

(2)葛根的鉴别

取本品干膏2g,研钵研碎,置于锥形瓶中,加入甲醇25mL,超声30min,离心,收集上清液,水浴锅蒸干,加5mL甲醇使溶解,作为供试品溶液。再取缺葛根的阴性样品1.58g,同法制成阴性样品溶液。另取葛根对照药材0.8g,制备方法同供试品。再取葛根素对照品,加甲醇制成每1mL含1mg的溶液,作为对照品溶液,照薄层色谱法(通则0502)试验,吸取上述3种溶液各2μL,分别点于同一硅胶G薄层板上(10cm×20cm),以甲醇-水-二氯甲烷(10:1:28, V:V:V)为展开系统,展开至一定的高度,取出,自然晾干,在紫外光(365nm)下检视。

(3)丹参的鉴别

取本品干膏3g,研钵研碎,置于锥形瓶中,加甲醇40mL,超声波超声处理30min,离心,收集上清液并蒸干,残渣加20mL水使溶解,再次过滤,收集滤液并用稀盐酸调PH为2,乙酸乙酯提取2次(20,20),将乙酸乙酯液合并,水浴锅蒸干,残渣加无水乙醇2mL溶解,作为供试品溶液。另取丹参对照药材10g,加去离子水煎煮2次,每次100mL,合并煎液。浓缩,烘箱75℃烘干,称取烘干后的粉末1g,超声处理30min,玻璃漏斗过滤,滤液蒸干,残渣加去离子水20mL使溶解,滤过,滤液用乙酸乙酯萃取

提取 2 次(20, 20), 收集上层的乙酸乙酯液并合并, 水浴锅蒸干, 残渣加无水乙醇 2 mL 溶解, 作为对照品溶液, 同供试品溶液的制备方法制备缺丹参的阴性样品溶液, 吸取供试品溶液, 对照药材溶液, 阴性样品溶液各 10 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上(10 cm \times 20 cm), 以甲苯-二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(4:6:8:1:4, V:V:V:V:V)为展开系统, 展开至一定的长度, 取出, 自然晾干, 喷以 5%三氯化铁乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。

2 结果与分析

2.1 正交试验结果

根据直观分析(表 2)和方差分析(表 3)结果, B 因素水平变化对试验结果影响较小, A 和 C 因素水平变化对试验结果有显著影响, 确定水煎煮法提取最佳工艺是 $A_3B_2C_2D_1$, 即水煎药材加即 10 倍量水, 提取 2 次, 每次 1.5 h。为验证正交设计试验的结果, 在最优条件下, 3 次平行验证试验出膏率为 39.8%。

表 2 水煎煮法提取工艺正交试验结果
Table 2 Results of orthogonal test on extraction process of water decoction

实验	加水量 A/倍	提取时间 B/h	提取次数 C/次	空白 D	出膏率 /%
1	6	1	1	1	17.35
2	6	1.5	2	2	31.74
3	6	2	3	3	27.7
4	8	1	2	3	31.91
5	8	1.5	3	1	39
6	8	2	1	2	22.16
7	10	1	3	2	32.8
8	10	1.5	1	3	23.14
9	10	2	2	1	37.59
K_1	25.597	27.353	20.883	31.313	
K_2	31.023	31.293	33.747	28.900	$C>A>B>D$
K_3	31.177	29.150	33.167	27.583	$A_3B_2C_2D_1$
R	5.580	3.940	12.864	3.730	

2.2 参芪降糖颗粒 TLC 定性鉴别研究结果

2.2.1 黄芪的鉴别结果

分别在日光和紫外光灯(365 nm)下检视, 结果如图 1~2 所示, 供试品色谱中, 可见相同颜色的斑点与对照药

材色谱^[12-15], 对照品色谱的斑点相对应, 且位置相同。

表 3 方差分析表
Table 3 Anova analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
加水量 A/倍	60.609	2	0.454	5.140	\square
提取时间 B/h	23.345	2	0.175	5.140	
提取次数 C/次	316.682	2	2.371	5.140	\square
误差	400.64	6	0.161		

注: $F_{0.05}(2,6)=5.14$, $F_{0.01}(2,6)=10.92$; \square 代表有显著性影响。

2.2.2 葛根的鉴别结果

在紫外光(365 nm)下检视, 结果见图 3, 供试品色谱中, 可见相同颜色的斑点与对照药材色谱的斑点相对应, 且位置相同, 阴性无干扰。

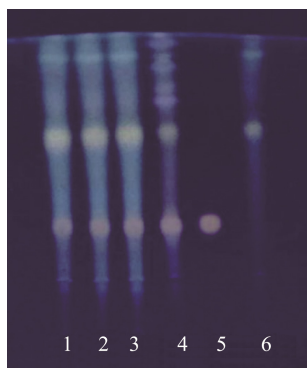
2.2.3 丹参的鉴别结果

在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 结果见图 4, 供试品色谱中, 可见相同颜色的斑点与对照药材色谱的斑点相对应, 且位置相同, 阴性无干扰。

3 结论与讨论

本研究在对黄芪的薄层鉴别方法进行考察时, 原标准中以甲醇-三氯甲烷-水(7:13:2, V:V:V)4 $^{\circ}$ C 下静置的下层溶液为展开系统。由于三氯甲烷为明确的致癌物, 将三氯甲烷替换为二氯甲烷, 同样能达到较好的分离效果; 另外在黄芪的薄层鉴别试验中要求展开剂分层, 若分层不彻底则会造成溶剂前沿弯曲, 各斑点间的分离度较差, 故展开剂的分层要彻底。在葛根的 TLC 定性鉴别研究中, 样品处理方法简便, 省时, 结果准确; 用甲醇-水-二氯甲烷(10:1:28, V:V:V)为展开剂, 一次展开即可获得良好的分离效果。在丹参的 TLC 定性鉴别研究中, 展开剂分别选用了二氯甲烷-丙酮-甲酸(8:4:1.5, V:V:V)、乙酸乙酯-甲酸-水(14:1:1, V:V:V)、二氯甲烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸-甲醇(6:4:8:4:1, V:V:V:V:V)。结果表明, 以二氯甲烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸-甲醇(6:4:8:4:1, V:V:V:V:V)为展开剂显色后主斑点更清晰, 各斑点间的分离度较佳。

综上所述, 采用 TLC 定性鉴别参芪降糖颗粒中的葛根、黄芪和丹参药材, 所得斑点清晰, 分离度良好, 专属性强, 阴性样品无干扰, 重复性好, 方法简便易行, 可作为该产品质量控制的方法^[16-19]。本研究通过正交试验, 优化参芪降糖颗粒提取工艺, 通过 TLC 法对黄芪、丹参、葛根 3 味中药进行定性鉴别, 专属性强, 重新性较好, 初步建立该颗粒剂的质量标准, 为后续试验研究提供参考。



注: 1~3: 黄芪供试品溶液; 4: 黄芪药材对照溶液; 5: 黄芪甲苷对照品溶液; 6 阴性样品溶液。

图 1 黄芪的 TLC 鉴别(365 nm)

Fig.1 TLC identification of *Astragalus membranaceus* (365 nm)

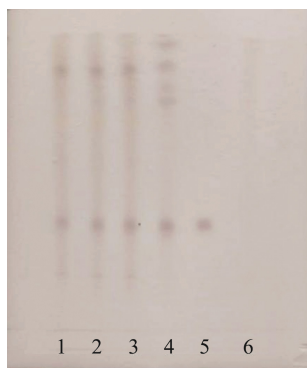
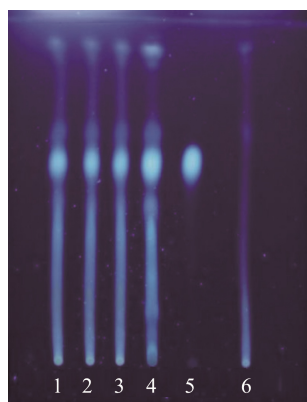


图 2 黄芪的 TLC 鉴别(日光)

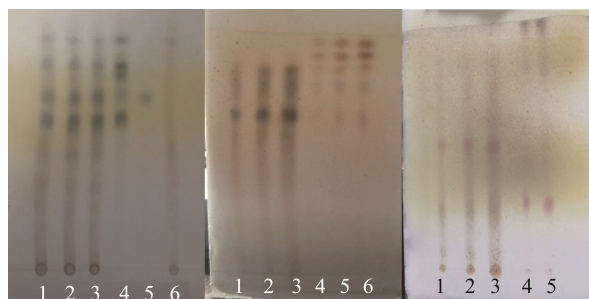
Fig.2 TLC identification of *Astragalus membranaceus* (daylight)



注: 1~3: 供试品溶液; 4: 葛根药材对照溶液; 5: 葛根素对照品溶液; 6: 阴性样品溶液。

图 3 葛根的 TLC 鉴别

Fig.3 TLC identification of *Pueraria lobata*



注: 1~3: 供试品溶液; 4: 丹参药材对照溶液; 5: 丹参素钠对照品溶液; 6: 阴性样品溶液。

图 4 丹参 TLC 鉴别

Fig.4 TLC identification of *Salvia miltiorrhiza*

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2015 edition [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] 朱仁愿, 邱国玉, 张彩霞, 等. 评定 ICP-MS 法测定黄芪中重金属含量的不确定度[J]. 西部中医药, 2017, 30(3): 32-35.
ZHU RY, QIU GY, ZHANG CX, et al. The uncertainty evaluation of determination of heavy metals in Huangqi by ICP-MS [J]. West J Tradit Chin Med, 2017, 30(3): 32-35.
- [3] 吴娇, 王聪. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2018, 35(9): 755-760.
WU J, WANG C. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus* [J]. Xinxiang Med Coll, 2018, 35(9): 755-760.
- [4] 高培国, 强辉, 凌鸣. 葛根素对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(2): 245-248.
GAO PG, QIANG H, LING M. Protective effect of puerarin on the injury of human vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide *in vitro* [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci), 2012, 33(2): 245-248.
- [5] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
Li SZ. Compendium of materia medica [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [6] 肖培根. 新编中药志(一)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
XIAO PG. Modern Chinese materia medica (I) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [7] 陈华良, 邓倩. 知柏龟苓胶囊工艺优选与质量评价[J]. 中国药业, 2013, 22(1): 4-6.
CHEN HL, DENG Q. Process optimization and quality evaluation of Zhibai Guiling capsule [J]. Chin Pharm Ind, 2013, 22(1): 4-6.
- [8] 杜正彩, 齐彪, 张明哲, 等. 正交设计结合药效学实验优选桂枝助眠胶囊提取工艺研究[J]. 中草药, 2019, 50(3): 618-625.
DU ZC, QI B, ZHANG MZ, et al. Study on extraction technology of Guizhi Jiumian capsule by orthogonal design combined with pharmacodynamics experiment [J]. Chin Herb Med, 50(3): 618-625.
- [9] 沈伟, 谢志东, 杨星, 等. 仙茅有效成分仙茅苷的提取工艺及分析方法研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(9): 2084-2087.
SHEN W, XIE ZD, YANG X, et al. Study on extraction process and

- analytical method of citronelloside [J]. *Shizhen Tradit Chin Med*, 2018, 29(9): 2084–2087.
- [10] 张春婷, 邱智东, 李博文, 等. 滋益颗粒的工艺研究及质量标准的建立[J]. *吉林中医药*, 2020, 40(2): 259–262, 266.
ZHANG CT, QIU ZD, LI BW, *et al.* A study on technology and establishment of quality standards for Ziyi granules [J]. *Jilin Tradit Chin Med*, 2020, 40(2): 259–262, 266.
- [11] 李翔, 黎春彤, 张晓娟, 等. 健骨颗粒的质量标准研究[J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(3): 303–306.
LI X, LI CT, ZHANG XJ, *et al.* A study on the quality standard of Jiangu granule [J]. *Chin Pract Drug Clin Med*, 2019, 22(3): 303–306.
- [12] 李鹏. 利胆颗粒质量标准研究[J]. *医药导报*, 2008, (2): 232–233.
LI P. Study on quality standard of Lidan granules [J]. *Med Bull*, 2008, (2): 232–233.
- [13] 张蓓, 罗旭明, 李默影, 等. 芪仙地花颗粒质量标准的研究[J]. *中成药*, 2019, 41(3): 521–525.
ZHANG B, LUO XM, LI MY, *et al.* A study on the quality standard of Qixian Dihua granules [J]. *Chin Patent Med*, 2019, 41(3): 521–525.
- [14] 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, 2015.
National Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: one* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [15] 陆超, 吴磊, 钱芳, 等. 胃瘤安合剂的质量标准研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(3): 396–399.
LU C, WU L, QIAN F, *et al.* Study on quality standard of gastroma an mixture [J]. *Chin Pharm*, 2015, 26(3): 396–399.
- [16] 赵锐, 张丽. 养脑宁心颗粒质量标准研究[J]. *世界中医药*, 2019, 14(7): 1658–1662.
ZHAO R, ZHANG L. A Study on quality standard of Yangnao Ningxin granule [J]. *World Chin Med*, 2019, 14(7): 1658–1662.
- [17] CHEN J, MONTANARI AM, WIDMER W. Two new polymethoxylated flavones a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed Dancy tangerine peel oil solids [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45(2): 364–368.
- [18] MONTANARI A, CHEN J, WIDMER W. Citrus flavonoids: A review of past biological activity against disease. Discovery of new flavonoids from Dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 439: 103–116.
- [19] CAO L, ZHAO GH, ZHAO J, *et al.* Optimization of extraction process for volatile oil from pericarpium citri reticulate viride by orthogonal design [J]. *Chem Bioeng*, 2007, 24(4): 58–60.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

侯彦婕, 硕士, 主要研究方向为方剂学。
E-mail: 2569930450@qq.com

刘光珍, 硕士, 主任医师, 主要研究方向为中西医结合治疗慢性肾脏病的研究。
E-mail: gzh4668933@126.com