

超声辅助萃取六味地黄丸中没食子酸工艺优化

周大学¹, 骆小方², 任邦春³, 潘峰¹ (1.陆军军医大学生物医学分析测试中心, 重庆市细胞组学重点实验室, 重庆 400038; 2.重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401121; 3.重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400010)

摘要 采用超声辅助萃取法从六味地黄丸中提取没食子酸, 考察溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)、超声温度、超声时间和超声功率对六味地黄丸中没食子酸提取率的影响, 通过单因素试验和正交试验研究六味地黄丸中没食子酸超声辅助萃取法的最佳工艺条件。结果表明, 六味地黄丸中没食子酸的最佳工艺条件为溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)2:8、超声温度40℃、超声时间30 min、超声功率180 W。没食子酸在1.6~19.2 μg/mL线性关系良好($R^2=0.999$), 平均加标回收率为99.3%, 相对标准偏差(RSD)为2.5%($n=3$)。超声辅助萃取法与浸渍提取法相比, 提取没食子酸含量增加了17.14%~23.62%。

关键词 超声辅助萃取; 六味地黄丸; 没食子酸; 工艺优化; 高效液相色谱

中图分类号 R 284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)12-0190-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.12.049



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction Process of Gallic Acid from Liuwei Dihuang Pills

ZHOU Da-xue¹, LUO Xiao-fang², REN Bang-chun³ et al (1. Biomedical Analysis Center, Army Medical University, Chongqing Key Laboratory of Cytology, Chongqing 400038; 2. Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401121; 3. The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Abstract Ultrasound-assisted extraction method was used to extract gallic acid from Liuwei Dihuang Pills, and the effects of solvent ratio (methanol:0.1% acetic acid), ultrasonic temperature, ultrasonic time and ultrasonic power on the extraction rate of gallic acid in Liuwei Dihuang Pills were investigated. The optimal technological conditions of gallic acid in Liuwei Dihuang Pills were studied by single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimal process conditions for the ultrasonic-assisted extraction of gallic acid in Liuwei Dihuang Pills were as follows: solvent ratio 2:8, ultrasonic temperature 40℃, ultrasonic time 30 min and the ultrasonic power 180 W. Gallic acid had a good linear relationship in the range of 1.6~19.2 μg/mL ($R^2=0.999$), the average recovery rate was 99.3%, and the relative standard deviation (RSD) was 2.5% ($n=3$). Compared with the impregnation method, the content of gallic acid extracted by ultrasonic assisted extraction increased by 17.14%~23.62%.

Key words Ultrasonic-assisted extraction method; Liuwei Dihuang Pills; Gallic acid; Process optimization; HPLC

六味地黄丸由北宋名医钱乙所创, 主要成分为熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、茯苓、泽泻6味中药, 主要用于阴液亏损引发的各种病症, 如头晕耳鸣、腰膝酸软、盗汗遗精、骨蒸潮热和消渴(糖尿病)等。没食子酸为山茱萸中的有机酸, 具有抗菌、抗病毒和抑制淋巴细胞转化的作用^[1], 还可以通过抑制内皮NO的生成诱导血管内皮依赖性收缩和松弛^[2]。

没食子酸的提取方法主要有索氏提取法^[3]、回流法^[4]、超声法^[5]、离子萃取法^[6]、浸渍法^[7]、酸水解法^[8]、碱水解法^[9]、发酵法^[10]、酶法^[11]等。其中, 索氏提取法、回流法、浸渍法时间较长; 离子萃取法温度较高, 对产物活性不好; 酸水解法、碱水解法、发酵法、酶法工序复杂, 不利于操作。因此研究超声辅助萃取法, 通过超声波增大分子运动速度和穿透力, 促进提取物溶解, 加速提取进程。笔者通过单因素试验和正交试验研究溶剂比例、超声温度、超声时间和超声功率对没食子酸提取量的影响, 以期研究六味地黄丸中没食子酸提取的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters e2695 高效液相色谱仪(美国, Waters公司); KQ-250E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); MSU 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 其余试剂均为分析纯; 超纯水由 Millipore 纯水仪(美国 Millipore 公司)制备; 没食子酸($C_7H_6O_5$)对照品(中国医药(集团)上海化学试剂公司); 六味地黄丸样品(太极集团重庆桐君阁药厂有限公司)。

1.3 溶液制备

1.3.1 对照品溶液制备。精密称取没食子酸对照品10.0 mg, 置于25 mL容量瓶中, 用流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 得到400 μg/mL的标准液, 用移液枪分别吸取此标准液0.1、0.3、0.6、0.9、1.2 mL, 置于25 mL容量瓶中, 加流动相至刻度, 得到浓度为1.6、4.8、9.6、14.4、19.2 μg/mL的标准系列。

1.3.2 样品溶液制备。准确称取样品1.0 g于100 mL具塞三角瓶中, 加入溶剂50 mL(流动相), 在温度40℃、超声功率180 W的条件下超声30 min, 用流动相补足减失的重量, 摇匀, 过0.45 μm滤膜, 即得样品待测液。

1.4 色谱条件 色谱柱为 SunFire C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm), 流动相为甲醇-0.1%乙酸溶液(2:8, V/V), 流速为1 mL/min, 检测波长为273 nm, 理论塔板数以没食子酸计算, 不低于4 000。

1.5 单因素试验和正交试验 以单因素试验优化没食子酸的提取条件, 并根据L₉(3⁴)正交试验(表1)和极差分析考察溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)、超声温度、超声时间和超声功率对没食子酸提取量的影响。

2 结果与分析

2.1 单因素试验 准确称取同一批样品1.0 g, 分别研究溶

基金项目 重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0009); 重庆市教育委员会资助项目(KJ1601115)。

作者简介 周大学(1987—), 男, 重庆人, 实验师, 硕士, 从事色谱和质谱的检测技术研究。

收稿日期 2020-11-05

剂比例(甲醇:0.1%乙酸)、超声温度、超声时间和超声功率对六味地黄丸中没食子酸提取量的影响,结果见表2。

表1 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	A(甲醇: 0.1%乙酸 Methanol: 0.1% acetic acid)	B(超声温度 Ultrasonic temperature /°C)	C(超声时间 Ultrasonic time /min)	D(超声功率 Ultrasonic power /W)
1	2:8	30	10	140
2	4:6	40	20	160
3	6:4	50	30	180

表2 单因素试验结果

Table 2 Results of single factor experiment

因素 Factor	水平 Level	没食子酸含量 Gallic acid content//mg/g
甲醇:0.1%乙酸 Methanol:0.1% acetic acid	2:8	1.104 9
	4:6	0.941 0
	6:4	0.792 9
	8:2	0.753 6
超声温度 Ultrasonic temperature//°C	30	0.795 8
	40	0.925 9
	50	0.873 1
超声时间 Ultrasonic time//min	60	0.837 8
	10	0.862 1
	20	0.915 9
超声功率 Ultrasonic power//W	30	0.896 9
	40	0.893 4
	120	0.827 2
	140	0.851 9
	160	1.095 0
	180	1.064 9

2.2 正交试验 在单因素试验基础上,根据 $L_9(3^4)$ 正交试验考察溶剂比例(A)、超声温度(B)、超声时间(C)、超声功率(D)这4个因素对没食子酸提取量的影响,结果见表3。从表3可以看出,影响没食子酸提取效果大小的主次因素为 $A>B>C>D$,正交试验确定的最优组合条件为 $A_1B_2C_3D_3$,即溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)2:8、超声温度40℃、超声时间30 min、超声功率180 W。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系。精密吸取对照品溶液,在波长273 nm处测定峰面积。以对照品溶液浓度为横坐标(X)、峰面积为纵

表3 正交试验结果

Table 3 Results of orthogonal experiment

试验号 Test No.	A	B	C	D	没食子酸含量 Gallic acid content//mg/g
1	1	1	1	1	0.852 1
2	1	2	2	2	1.085 3
3	1	3	3	3	1.103 3
4	2	1	2	3	0.891 3
5	2	2	3	1	0.989 1
6	2	3	1	2	0.928 7
7	3	1	3	2	0.799 4
8	3	2	1	3	0.821 5
9	3	3	2	1	0.856 2
k_1	1.014	0.848	0.867	0.899	
k_2	0.936	0.965	0.944	0.938	
k_3	0.826	0.963	0.964	0.939	
R	0.188	0.117	0.097	0.040	

坐标(Y)绘制标准曲线,求得回归方程为 $Y=59\ 751X+31\ 715$ ($R^2=0.999$),结果表明没食子酸浓度在1.6~19.2 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系(图1)。

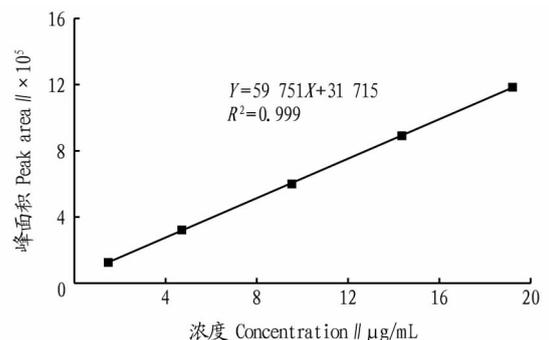


图1 没食子酸含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of gallic acid

2.3.2 重复性试验。准确称取同一批样品1.0 g,共5份,按“1.3.2”的方法处理样品,按“1.4”色谱条件测定没食子酸的含量,结果分别为0.973 6、1.012 9、0.985 2、1.038 6、0.995 7 mg/g, RSD为2.5%,说明该方法重复性好。

2.3.3 加标回收率试验。精密称取已知含量的同一批样品1.0 g,共3份,分别加入0.2 mg没食子酸对照品,按“1.3.2”的方法处理样品,按“1.4”色谱条件测定。由表4可知,没食子酸回收率为94.5%~104.1%,回收率较高,可用于六味地黄丸中没食子酸含量的测定。

表4 回收率试验结果(n=3)

Table 4 Results of recovery test (n=3)

编号 No.	没食子酸含量 Gallic acid content//mg/g	加入量 Added amount//mg	测得量 Measured amount//mg	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	RSD %
1	0.983 4	0.2	1.191 6	104.1	99.3	2.5
2	1.041 0	0.2	1.239 5	99.3		
3	1.060 3	0.2	1.249 3	94.5		

2.4 六味地黄丸中没食子酸含量测定 从表5可以看出,不同厂家六味地黄丸中没食子酸含量不同,超声辅助萃取3个厂家药品中的没食子酸含量为0.938 4~1.082 7 mg/g,与浸渍提取法相比,超声辅助萃取法提取的没食子酸含量高出

17.14%~23.62%。

3 结论

采用超声辅助萃取法提取六味地黄丸中的没食子酸,通
(下转第201页)

表 2 回收率、精密度和 RSD

Table 2 Recovery, precision and RSD

加标浓度 Standard conce- ntration//ng/mL	回收率 Recovery rate//%	RSD %
1.0	92.5	5.2
2.0	95.4	7.1
5.0	94.9	7.3

法重现性强、准确性高、回收率高,能够满足日常检测的要求。

2.5 实际样品检测 利用已建立的方法进行草鱼体内地西洋残留量的测定。试验表明,在一次鱼类药物残留大排查中,200 个抽查样品中有 7 个草鱼样品检出地西洋,最高的残留量为 20.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,该方法能够准确测定水产品中地西洋残留量。

3 结论

本研究采用分散固相萃取技术,通过对质谱、色谱、提取溶剂、净化条件的优化,结合 UPLC-MS/MS 技术,建立了水产品中地西洋快速定量分析方法。分散固相萃取能够降低样品基质效应的影响。通过质谱的全扫描模式下的精确质量母离子作为定量离子,更适合样品中目标化合物的快速筛查。经实际样品检测确证,该方法快速、准确、灵敏,满足水产品中地西洋的检测分析。

参考文献

- [1] 邹叔聘,王朝阳,刘博,等.地西洋对胶质瘤术后睡眠障碍患者神经内分泌免疫因子表达水平的影响[J].中国医师杂志,2018,20(11):1692-1694.
- [2] WOODCOCK B G, KOSTEV K, SHIN J Y. Benzodiazepine prescribing in the elderly in Germany and Korea: A comparison of two observational studies[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2017, 55(6):480-482.
- [3] 彭莉蓉,杨世民,杨敏.2008~2010 年二类精神药品应用分析[J].西北药学杂志,2001,26(6):471-473.
- [4] 王立友,李娜,王芳,等.长期应用地西洋对豚鼠耳蜗微音器电位的影响[J].西北药学杂志,2016,31(4):386-388.
- [5] 李积东,韵海霞,车胜荣.镇静催眠药研究新进展[J].西北药学杂志,

- 2001,16(5):231-232.
- [6] 李林艳,徐建.苯二氮类药物依赖及其防治[J].药物不良反应杂志,2012,14(4):228-231.
- [7] O' BRIEN C P. Benzodiazepine use, abuse, and dependence [J]. J Clin Psychiatry, 2005, 66(S2):28-33.
- [8] 宿书芳,孙立臻,薛霞,等.通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中地西洋[J].色谱,2020,38(7):791-797.
- [9] 李晋成,刘欢,吴立冬,等.动物体内麻醉剂残留检测技术研究进展[J].食品科学,2014,35(5):251-256.
- [10] 刘长琳,何力,陈四清,等.鱼类麻醉剂研究综述[J].渔业现代化,2007,34(5):21-25.
- [11] 吕海燕,王群,刘欢,等.鱼用麻醉剂安全性研究进展[J].中国渔业质量与标准,2013,3(2):24-28.
- [12] KE C L, LIU Q, LI L, et al. Residual levels and risk assessment of eugenol and its isomers in fish from China markets [J]. Aquaculture, 2018, 484:338-342.
- [13] 王守英,孔聪,杨光昕,等.上海市售水产品地西洋及去甲地西洋残留调查分析[J].农产品质量与安全,2020(3):31-35,67.
- [14] 汪丽萍,李翔,孙英,等.气相色谱/质谱法测定猪肉中 4 种苯二氮类镇静剂残留[J].分析化学,2005,33(7):951-954.
- [15] 李文海,蔺大伟,孙红雷,等.ASE-GC/MS 法检测血液中的常见镇静安眠类药物[J].中国法医学杂志,2014,29(5):451-454.
- [16] 王占良,张建丽,张亦农.气相色谱-质谱联用法检测保健品中 8 种安眠镇静类药物[J].质谱学报,2009,30(5):282-286.
- [17] BOTREL B M C, ABREU D C P, SACZK A A, et al. Residual determination of anesthetic menthol in fishes by SDME/GC-MS [J]. Food Chem, 2017, 229:674-679.
- [18] 徐硕,金鹏飞,广咏梅,等.HPLC 法检测中成药及保健品中非法添加的 10 种镇静催眠类药物[J].西北药学杂志,2019,34(2):181-185.
- [19] 郭志磊,范捷,于洋.固相萃取-高效液相色谱法同时测定人血浆中地西洋、咪达唑仑及其代谢产物的浓度和临床应用[J].中国医院药学杂志,2016,36(10):825-829.
- [20] 禚开智,梁振纲,陈文慧,等.QuEChERS 提取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 5 种麻醉剂的残留量[J].理化检验(化学分册),2018,54(12):1405-1409.
- [21] 倪峰飞,顾华,冯永巍,等.UPLC-MS/MS 同时测定水产品中 4 种丁香酚类麻醉剂残留量[J].质谱学报,2018,39(4):451-458.
- [22] 张倩勉.HPLC-MS 法测定猪肉中地西洋等 5 种禁用药物的残留量[J].安徽农业科学,2016,44(25):71-75.
- [23] 冯楠,路勇,姜洁,等.QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法快速筛查食品中 73 种有毒有害物质[J].食品科学,2013,34(16):214-220.
- [24] 黄丽英,邹圆,陆强,等.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 4 种内外源性孕激素[J].食品科学,2018,39(16):295-300.

(上接第 191 页)

表 5 六味地黄丸中没食子酸含量

Table 5 Gallic acid content in Liuwei Dihuang Pills mg/g

编号 No.	超声辅助萃取法 Ultrasonic assisted extraction method	浸渍提取法 Impregnation method
厂家 1 Manufacturer 1	1.082 7	0.924 2
厂家 2 Manufacturer 2	0.993 6	0.803 8
厂家 3 Manufacturer 3	0.938 4	0.773 5

过单因素试验,分别研究溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)、超声温度、超声时间和超声功率对没食子酸提取量的影响,根据单因素试验结果设计 $L_9(3^4)$ 的正交试验。分析正交试验数据,确定影响没食子酸提取量的因素顺序为溶剂比例>超声温度>超声时间>超声功率,最优组合为 $A_1B_2C_3D_3$,即溶剂比例(甲醇:0.1%乙酸)2:8、超声温度 40 $^{\circ}\text{C}$ 、超声时间 30 min、超声功率 180 W。超声辅助萃取法与浸渍提取法相比,六味地黄丸中没食子酸提取量增加了 17.14%~23.62%。

参考文献

- [1] 陈玉武,薛慧.制黄肉免疫活性成分的化学研究[J].中日友好医院学报,1992,6(S1):231-234.
- [2] SANAE F, MIYAIICHI Y, HAYASHI H. Endothelium-dependent contraction of rat thoracic aorta induced by gallic acid [J]. Phytother Res, 2003, 17(2):187-189.
- [3] 邓秀霞,李琴,王留留.山茱萸果核中没食子酸的提取及检测方法[J].农业机械,2011(32):137-140.
- [4] 刘丽艳.分心木中没食子酸的提取工艺研究[J].广东化工,2018,45(2):42-43.
- [5] 柯发敏,侯杰荣,余昕,等.赶黄草中没食子酸的提取方法比较研究[J].食品研究与开发,2016,37(7):75-77.
- [6] 吴春燕,芒果叶中没食子酸的提取研究[J].化工技术与开发,2012,41(10):20-22.
- [7] 刘忠英,高展,罗赛,等.普洱茶没食子酸的提取分离工艺研究[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(4):47-52.
- [8] 陈方平,金淳,魏加球.倍花酸水解法制工业没食子酸[J].林产化学与工业,1989,9(1):34-41.
- [9] 陈茜文,谷文众,王贵武.倍花酸浸提液水解制备没食子酸的工艺[J].中南林业科技大学学报,2008,28(5):132-135.
- [10] 王蔚文,李务强.没食子酸发酵新工艺(简报)[J].林化科技通讯,1986(3):15-17.
- [11] 杨顺楷,杨亚力.酶法转化五倍子单宁酸生产没食子酸[J].精细与专用化学品,2005,13(5):12-13,15.