

本文引用:邓桂明,何海,葛金文,肖小芹,陈镇,张志国,吴萍,戴冰,欧阳林旗,肖望重,向彪.连苓解毒颗粒提取工艺研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(2):157-159.

连苓解毒颗粒提取工艺研究

邓桂明^{1,2},何海¹,葛金文^{2*},肖小芹²,陈镇¹,张志国¹,吴萍¹,戴冰¹,欧阳林旗¹,肖望重¹,向彪¹
(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;2.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙410208)

[摘要] 目的 优选连苓解毒颗粒的最佳提取工艺。方法 以盐酸小檗碱及黄芩苷的转移率为考察指标,结合单因素及正交试验法,对连苓解毒颗粒的提取工艺进行优化。结果 优选出连苓解毒颗粒的最佳提取工艺为:药材用60%乙醇浸泡1.0 h,回流提取2次,第一次1.5 h,料液比1:10(g:mL),第二次1 h,料液比1:8(g:mL)。结论 优选的提取工艺稳定、可行,为连苓解毒颗粒的生产制备提供实验依据。

[关键词] 连苓解毒颗粒;正交试验;提取工艺;盐酸小檗碱;黄芩苷

[中图分类号]R283.6 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.02.011

Study on the Extraction Process of Lianqin Jiedu Granule

DENG Guiming^{1,2}, HE Hai¹, GE Jinwen^{2*}, XIAO Xiaoqin², CHEN Zhen¹, ZHANG Zhiguo¹, WU Ping¹, DAI Bing¹,
OUYANG Linqi¹, XIAO Wangzhong¹, XIANG Biao¹

(1.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of
Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the extraction technology of Lianqin Jiedu granules. **Methods** The transfer rate of berberine hydrochloride and baicalin rate as indexes, combined with single factor and orthogonal test method, the extraction process of Lianqin Jiedu granule was optimized. **Results** The optimal extraction process was 60% ethanol immersion 1.0 h, reflux extraction 2 times, the first time 1.5 h, 1:10 (g:mL), second time 1 h, 1:8 (g:mL). **Conclusion** The optimized extraction technology is stable and feasible, provide experimental basis for industrial production of Lianqin Jiedu granules.

[Keywords] Lianqin Jiedu granule; orthogonal test; extraction process; berberine; baicalin

连苓解毒颗粒原方为湖南中医药大学第一附属医院耳鼻喉科协定制剂处方。由黄连、黄芩、黄芩等组成,具有清热解毒,扶正培本之功效,用于鼻炎、咽炎、鼻咽癌及EB病毒阳性的鼻咽癌高危人群的抗病毒治疗。本实验根据方中各药味的化学成分及药理作用,以盐酸小檗碱及黄芩苷的转移率为考察指标,结合单因素及正交试验法,优选最佳的提取工艺,为连苓解毒颗粒的研发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

盐酸小檗碱、黄芩苷对照品(批号分别为110713-201009、100715-201002,供含量测定用,中国药品生物制品检定所),制备连苓解毒颗粒所用药材经湖南中医药大学第一附属医院张志国教授鉴定为正品,水为蒸馏水,流动相用色谱纯试剂,其余所用试剂均为分析纯。

[收稿日期]2015-11-30

[基金项目]湖南省科技厅博士后基金项目(2014RS4013);2014年湖南省人力资源和社会保障厅博士后研究人员日常经费资助项目;张志国全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教教育[2016])。

[作者简介]邓桂明,女,在站博士后,副主任药师,硕士研究生导师,研究方向:药物新剂型与新技术研究。

[通讯作者]*葛金文,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail: 40831556@qq.com。

1.2 仪器

Agilent1100 系列高效液相色谱仪 (DAD 检测器, Agilent1100 工作站); Adventurer TM SOPYJ-020 万分之一电子分析天平 (奥豪斯国际贸易上海有限公司); KQ-600 型超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); DHG-9076A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); LH-1 型电热恒温真空干燥箱 (上海医疗器械七厂); SHB-III 型循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备^[1] 取已定容连苓解毒颗粒处方的醇提液, 摇匀, 精密量取 25 mL, 置蒸发皿中蒸干, 放冷, 加 60% 的乙醇 50 mL, 溶解, 摇匀, 滤过, 精密量取 2 mL 续滤液, 置 5 mL 量瓶中, 加 60% 的乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备^[1] 分别精密称取减压干燥至恒重的盐酸小檗碱对照品、黄芩苷对照品适量, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 得质量浓度分别为 0.09 mg/mL、0.048 mg/mL 的混合对照品溶液。

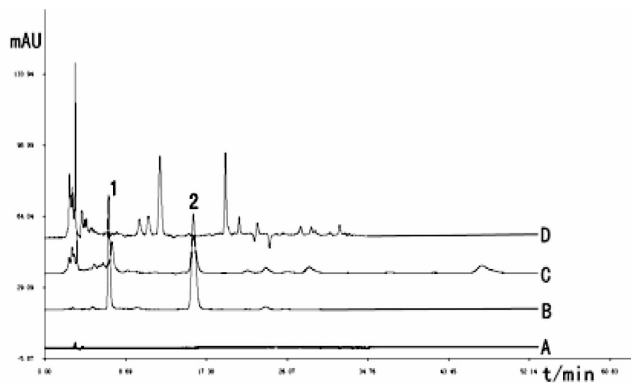
2.2 色谱条件

2.2.1 分析条件 色谱柱: KromasilC₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (48:52); 检测波长分别为 280 nm, 345 nm; 流速 1 mL/min; 柱温 30 ℃。

2.2.2 系统适用性试验 将空白溶液、混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试品溶液依次进样 10 μL, 见图 1, 结果表明空白溶液及阴性供试品溶液无干扰, 混合对照品溶液及供试品溶液中各组分峰分离完全; 理论塔板数按盐酸小檗碱和黄芩苷计均在 4 000 以上。

2.3 方法学观察

2.3.1 线性范围 分别精密吸取上述混合对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 10 μL, 注入色谱仪, 记录色谱峰图, 以峰面积为 y 轴, 进样量为 x 轴作回归方程, 得盐酸小檗碱回归方程为: $Y=665.16X+8.0265$, $r=0.9999$, 黄芩苷回归方程为: $Y=1014.0X-10.911$, $r=0.9993$; 结果表明: 盐酸小檗碱、



A: 空白样品; B: 混合对照品; C 供试品; D 阴性样品
1: 盐酸小檗碱; 2: 黄芩苷

图 1 连苓解毒颗粒 HPLC 图

黄芩苷进样量分别在 0.018~0.18 μg、0.0096 μg~0.096 μg 时, 峰面积和进样量呈现良好的线性关系。

2.3.2 精密性试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL, 按照“2.2”项下色谱条件, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 2.02%、1.76%, 表明仪器精密性良好。

2.3.3 稳定性试验 分别于 0、2、4、6、8、24 h 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 注入色谱仪, 记录峰面积。盐酸小檗碱、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 2.07%、2.63%。表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批次药材, 精密称定, 平分 6 份, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件测得盐酸小檗碱、黄芩苷含量的 RSD 分别为 1.39%、1.86%, 表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密量取 6 份各供试液 1.0 mL, 精密加入混合对照品溶液 1.0 mL, 摇匀, 吸取 10 μL 注入色谱仪。计算盐酸小檗碱、黄芩苷平均回收率为 102.37%、96.72%, RSD 为 1.01%、1.04%。

2.4 实验结果

2.4.1 提取方法的观察 按处方量称取五味药材粗粉 (90 g), 用 60% 乙醇浸泡 1.0 h 后超声提取两次, 第一次 1.5h, 料液比 1:10 (g:mL), 第二次 1.0 h, 料液比 1:8 (g:mL)。同理, 选择 60% 乙醇为提取溶媒, 回流提取 2 次, 第一次 1.5h, 料液比 1:10 (g:mL), 第二次 1.0 h, 料液比 1:8 (g:mL), 按“2.1”项下方法制备供试品溶液并测定盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率, 比较回流法和超声法的提取效果, 见表 1。

结果表明: 回流法提取的盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率比超声法提取的均要高, 提取方法以回流法较佳。

表1 提取方法考察

提取方法	盐酸小檗碱转移率(%)	黄芩苷转移率(%)
回流提取	79.26	72.11
超声提取	14.26	22.32

2.4.2 提取溶剂的考察 取药材粗粉 81 g,分别以蒸馏水,60%乙醇,按“2.4.1”所述回流提取方法提取2次,分别测定盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率,见表2。

表2 提取溶剂考察

提取溶剂	盐酸小檗碱转移率(%)	黄芩苷转移率(%)
蒸馏水	52.82	57.51
60%乙醇	77.80	71.65

结果表明:60%乙醇提取盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率比蒸馏水提取均要高,且水提后得到的溶液黏度较大,含有较多的水溶性杂质,对后续的过滤和浓缩会产生一定的影响,故选择乙醇为提取溶剂。

2.4.3 提取次数的观察 在上述正交试验优选的工艺条件基础上,增加一次提取,考察提取次数对浸出效果的影响,按处方量称取五味药材粗粉(90 g),第一次 1.5 h,料液比 1:10(g:mL),第二次 1 h,料液比 1:8(g:mL),第三次 1h,料液比 1:8(g:mL),分别收集三次提取液,分别测定盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率,结果见表3。

结果表明:第三次提取得到盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率均小于三次提取总量的 10%,故选择提取两次合理。

表3 提取次数考察

提取次数	第一次	第二次	第三次	第三次占总量百分比(%)
盐酸小檗碱转移率(%)	76.60	8.66	0.22	0.26
黄芩苷转移率(%)	61.47	7.30	0.21	0.31

2.4.4 浸泡时间的观察 取药材粗粉 81g,60%乙醇分别浸泡 0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h后,按“2.4.1”所述回流提取方法提取2次,分别测定盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率,结果见表4。

表4 浸泡时间考察

浸泡时间(h)	盐酸小檗碱转移率(%)	黄芩苷转移率(%)
0.5	74.23	66.70
1.0	77.42	71.41
1.5	77.38	70.22
2.0	77.82	69.88

结果表明:延长浸泡时间对盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率的影响变化不大,结合生产,选择浸泡时间为 1.0 小时。

2.4.5 乙醇回流提取正交试验考察 根据单因素考察结果,为进一步优化提取工艺,选择乙醇浓度、乙醇用量、提取时间作为观察因素,以盐酸小檗碱、黄芩苷转移率为评价指标,进行综合评分^[2],用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。工艺因素水平见表5,正交设计与实验结果见表6,方差分析见表7。

表5 提取工艺因素水平表

因素水平	乙醇浓度 A(%)	乙醇用量 B(倍)	提取时间 C(h)
1	50	8;6	1.5;1.0
2	60	10;8	2.0;1.5
3	80	12;10	2.5;2.0

表6 正交设计与实验结果

试验号	因素				盐酸小檗碱转移率(%)	黄芩苷转移率(%)	综合评分
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	40.42	38.99	51.55
2	1	2	2	2	48.52	59.00	68.59
3	1	3	3	3	49.85	52.86	66.20
4	2	1	2	3	71.60	47.42	79.41
5	2	2	3	1	80.55	64.46	95.45
6	2	3	1	2	69.71	72.74	91.93
7	3	1	3	2	40.19	52.83	58.99
8	3	2	1	3	60.90	54.51	75.34
9	3	3	2	1	51.02	44.71	62.59
K1	186.34	189.95	218.82	209.59			
K2	266.79	239.38	210.59	219.51			
K3	196.92	220.72	220.64	220.95			
R	80.45	49.43	10.05	11.36			

$F_{0.01}(2,2)=9$ $F_{0.05}(2,2)=19$

表7 方差分析表

方差来源	离差平方和 SS	自由度	均方 MS	F	P
A	1 273.99	2	637.00	49.95	$P<0.05$
B	415.36	2	207.68	16.29	$P<0.05$
C	19.12	2	9.56	0.75	$P>0.05$
D	25.50	2	12.75		

正交设计与实验结果表明,直观分析极差可知,影响提取效果的因素顺序为 $A>B>C$,方差分析表表明,A、B因素差异有统计学意义($P<0.05$),且A、B因素各水平间差异也有统计学意义($P<0.05$),而C因素差异无统计学意义($P>0.05$),C因(下转第162页)

状有改善,但每天饮水量仍在 2 000mL 以上,白天小便 10 次左右,夜晚仍有 5、6 次,月经仍未至,遂于上方加重黄芪用量至 30 g,另加桃仁 10 g,红花 10 g,又开 14 剂,企盼月经能至。2009 年 11 月 22 日三诊:多饮多尿症状有明显改善,每天饮水量在 1 000 mL 左右,小便次数也随之减少,但月经仍未来。病情已稳定,决定将西药用量减半,每天只服 1 片。上方未作更改,只将芡实用量增加至 30 g,再开 14 剂。2009 年 12 月 6 日四诊:病情稳定,西药用量虽减半但疗效未减,在征得患者同意后,决定将西药再次减半,每天服 1/2 片,中药开了 21 剂。因患者月事仍未见,遂将中药方减去桃仁、红花、丹参,加用中成药大黄蛰虫丸每次 6 g,bid,缓中补虚、活血通经,以观后效。2010 年 1 月 10 日五诊:病情依然稳定,饮水量与小便次数基本正常,余无不适。惟月经仍未来潮,细问之,患者并未服用中成药大黄蛰虫丸,因对配方中的 4 种虫类药有顾忌。鉴于消渴病情稳定向好,决

定将西药减少至最小量 1/4 片,汤药照前方再开 21 剂,并嘱其长期服用此方,或可改做丸药,或可改为颗粒剂,或可改为超微粉。月事留待以后再议。

按:本案属典型的消渴病下消证渴利候,渴尿并见,随饮随溲,病位在肾,肾虚气阴两伤。究其原因,并无明显的饮食因素及其他后天因素,只能责之于先天不足。方药以滋肾阴补肾气为主,参芪地黄汤合生脉散、水陆二仙丹加减。方中的太子参、麦冬,加上天冬、石斛,既可滋肾阴,又可兼补肺阴,达到金生水,滋其化源之效。这里强调的是,中医所说的消渴病,是以临床突出的症状为主要命名依据,只要“渴不止,小便多”并见,就可诊断为消渴病。因此现今的糖尿病、尿崩症等,均可属消渴病的范畴。亦有少数患者热盛肾燥,可能发生以渴为主,“引水而不小便也”,此属消渴病中的“渴病候”,有可能发生变症,如水肿、痰饮、眩晕、痈疽等。

(未完待续)

(本文编辑 李路丹)

(上接第 159 页)素各水平间差异也统计学意义($P > 0.05$),出于节省时间考虑,最终确定该复方的最佳提取工艺为 $A_2B_2C_1$,即最佳提取工艺条件为:五味药材用 60%的乙醇水溶液浸泡 1.0 h,回流提取 2 次,第一次 1.5 h,料液比 1:10(g:mL),第二次 1 h,料液比 1:8(g:mL)。

2.5 提取工艺的验证实验考察

根据提取工艺单因素实验与正交试验优选的最佳提取工艺条件,拟定工艺验证实验,平行提取三份,分别测定盐酸小檗碱、黄芩苷的转移率为 80.64% 和 77.47%,结果表明:该结果方法可取。

3 讨论

中药成分复杂、药效各异,组成复方并非药物简单相加,因此对复方中药一般采取复方提取^[3-4]。本实验在提取工艺设计前根据处方的功能、主治,通过文献资料的查阅,分析每味中药的有效成分与药理作用;结合提取原理与预试验结果,以君药黄连中盐酸小檗碱及臣药黄芩中黄芩苷的转移率为考察指标,通过单因素考察及正交试验,优选最佳的提取工艺^[5-6]。结果表明该

法简单、稳定、可靠,可作为连苓解毒颗粒提取工艺。

本试验结合单因素及正交试验法,对连苓解毒颗粒的提取工艺进行优化筛选,确认连苓解毒颗粒的最佳提取工艺条件为:60%乙醇浸泡 1.0 h,回流提取 2 次,第一次 1.5 h,料液比 1:10(g:mL),第二次 1 h,料液比 1:8(g:mL)。该工艺稳定,可行,为该制剂的研制提供了科学的实验依据。

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,2010.285.
- [2] 任爱农,高 燃,田耀洲.多指标综合评价法优选清清颗粒提取工艺[J].中成药,2008,30(7):1059-1062.
- [3] 于秀娟.扶正颗粒剂提取工艺的优化[J].医学信息,2012,25(12):165-166.
- [4] 张 霞,王 荣,杨建宏,等.正交试验法优选复方芸归颗粒提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):45-47.
- [5] 常占璞,刘桂花,高晓黎,等.复方必清片的提取工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(22):51-55.
- [6] 曾 明,吴国海,边佳明,等.舒通无糖颗粒制备工艺研究[J].中国医药导报,2012,9(24):121-123.

(本文编辑 李 杰)