

膝悦颗粒提取及纯化工艺优选

夏华玲*, 杜志谦

(河南省正骨研究院, 河南 洛阳 471002)

[摘要] **目的:** 优选膝悦颗粒的提取及纯化工艺。**方法:** 采用 HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量, 流动相乙腈-水(35:65); 采用 HPLC 测定龙胆苦苷含量, 流动相甲醇-水(27:73), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 271 nm。以黄芪甲苷和龙胆苦苷含量的综合评分为指标, 选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素, 采用正交试验优选膝悦颗粒的提取工艺; 以黄芪甲苷、龙胆苦苷含量及出膏率为评价指标, 通过单因素试验筛选膝悦颗粒的纯化工艺。**结果:** 最佳提取工艺为加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h; 黄芪甲苷、龙胆苦苷质量分别为 4.34, 43.7 mg。采用醇沉法, 使含醇量达 50%; 黄芪甲苷 21.30 mg(保留率 85.61%), 龙胆苦苷 216.32 mg(保留率 97.74%), 出膏率 22.13%。**结论:** 优选的提取及纯化工艺稳定可行, 为膝悦颗粒的工业化生产提供参考。

[关键词] 膝悦颗粒; 黄芪甲苷; 龙胆苦苷; 醇沉法; 超滤法

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0009-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210009

Optimization of Extraction and Purification Process for Xiyue Granules

XIA Hua-ling*, DU Zhi-qian

(Orthopedic Research Institute of Henan Province, Luoyang 471002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction and purification procedures of Xiyue granules. **Method:** HPLC-ELSD was employed to determine the content of astragaloside IV with mobile phase of acetonitrile-water (35:65). HPLC was adopted to determine the content of gentiopicroside by taking methanol-water (27:73) as mobile phase, flow rate was $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and detection wavelength was 271 nm. Taking composite score of contents of astragaloside IV and gentiopicroside as index, effects of the amount of water, extracting time and times on extraction process was optimized by orthogonal design. Single factor tests were adopted to optimize purification procedure with dry extract rate and contents of astragaloside IV and gentiopicroside as indexes. **Result:** The best extraction process was as follows: extracted 3 times with 10 times the amount of water for 1.0 h each time; contents of astragaloside IV and gentiopicroside were 4.34, 43.7 mg, respectively. Optimum purification process was ethanol precipitation which contained 50% alcohol; contents of astragaloside IV and gentiopicroside, dry extract rate were 21.30 mg, 216.32 mg and 22.13%. **Conclusion:** Optimized extraction and purification processes are stable and reliable, they can provide references for industrial production of Xiyue granules.

[Key words] Xiyue granules; astragaloside IV; gentiopicroside; alcohol precipitation; ultrafiltration

膝悦颗粒是根据平乐郭氏正骨传人郭维淮先生经验方研发的中药新药, 由黄芪、秦艽、姜黄、柴胡、续断、当归、牡丹皮、桑寄生等 11 味中药组成, 具有益气活血、通利关节、化湿消肿之功效^[1-2]。该方以

汤剂形式在临床应用多年, 疗效显著, 但存在携带不便、储存困难等问题, 故拟将其改制成颗粒剂。根据临床实践及方中化学成分的特性, 选择黄芪甲苷和龙胆苦苷为指标成分, 采用正交试验优选膝悦颗粒

[收稿日期] 20140328(012)

[基金项目] 河南省公益类科研院所预研项目(09YY0067)

[通讯作者] * 夏华玲, 副研究员, 从事中药新药研究, Tel: 0379-63546658, E-mail: xiahualing9399@163.com

的水提工艺,并通过比较超滤法和醇沉法以筛选其纯化工艺,为该制剂的临床应用及推广提供参考。

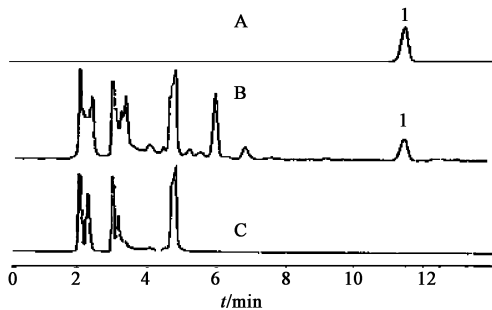
1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),XS 205 DU 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。黄芪、秦艽等 11 味中药均购自洛阳康鑫中药饮片有限公司,经河南省正骨研究院杜志谦研究员鉴定,均符合《中国药典》2010 年版一部各项下相关规定。龙胆苦苷、黄芪甲苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110770-200409,110781-200613),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Kromasil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水(35:65),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,ELSD 检测器,雾化器温度 80 ℃,蒸发器温度 100 ℃,载气流速 1.5 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。理论板数按黄芪甲苷峰计算不低于 4 000,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 黄芪甲苷

图 1 膝悦颗粒提取液中黄芪甲苷 HPLC

2.1.2 溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成 0.5 g·L⁻¹的对照品溶液。按处方比例称取 2 倍处方量药材共 166 g,加 10 倍量水提取 3 次,每次 1 h,合并水提液,减压浓缩至 100 mL,精密量取 20 mL,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 40 mL,合并正丁醇液,用氨试液洗涤 2 次,每次 40 mL,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得供试品溶液。取缺黄芪的处方药材适量,同法制备阴性对照溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密称取黄芪甲苷对照品 15.60 mg,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得贮备液。精密吸取该贮备液适量,稀释得 0.78,0.624,0.468,0.312,0.156 g·L⁻¹的系

列对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度的对数为横坐标,以峰面积的对数为纵坐标,得回归方程 $Y = 1.5478X - 1.205$ ($R^2 = 0.9998$),线性范围 1.56 ~ 7.80 μg。

2.1.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后 0,1,2,4,8 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 5 次,计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 0.98%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一提取液 5 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果黄芪甲苷平均质量浓度 0.124 g·L⁻¹,RSD 1.4%,表明本方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密量取已知黄芪甲苷质量(2.473 8 mg)的提取液 20 mL,共 6 份,各加入黄芪甲苷对照品溶液 2.0,2.0,3.0,3.0,4.0,4.0 mL,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,见表 1,表明该方法回收率良好。

表 1 膝悦颗粒提取液中黄芪甲苷加样回收率试验

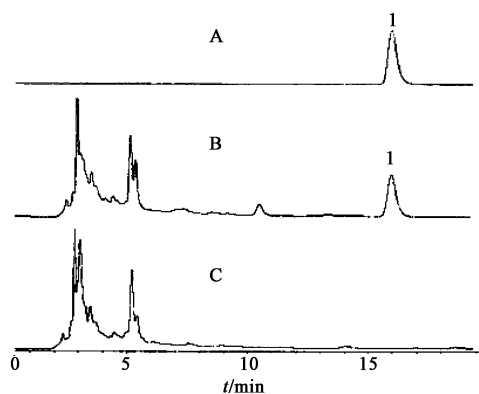
加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1.087 6	3.549 8	98.93		
1.087 6	3.551 6	99.10		
1.631 4	4.080 2	98.47		
1.631 4	4.078 4	98.36	98.66	0.64
2.175 2	4.597 9	97.65		
2.175 2	4.636 6	99.43		

注:样品中量均为 2.473 8 g。

2.2 龙胆苦苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 Kromasil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(27:73),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 271 nm,进样量 10 μL。理论板数按龙胆苦苷峰计算不低于 3 000,见图 2。

2.2.2 溶液的制备 精密称取龙胆苦苷对照品适量,加甲醇制成 0.5 g·L⁻¹的对照品溶液。精密量取 2.1.2 项下浓缩液 20 mL,蒸干,残渣加流动相溶解并转移至 25 mL 量瓶中,定容,摇匀,滤过,精密移取续滤液 3 mL 至 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得供试品溶液。取缺秦艽的处方药材适量,同法制备阴性样品溶液。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 龙胆苦苷

图2 膝悦颗粒提取液中龙胆苦苷 HPLC

2.2.3 线性关系考察 精密称取龙胆苦苷对照品 20 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得储备液。稀释得 304.0, 152.0, 76.0, 30.4, 15.2, 7.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.2.1 项下方法测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 14.575X - 2.983$ ($R^2 = 1$),线性范围 0.076 ~ 3.04 μg 。

2.2.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后 0, 1, 2, 4, 8 h 按 2.2.1 项下方法测定,计算龙胆苦苷峰面积的 RSD 1.6%,表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按 2.2.1 项下方法重复进样 5 次,计算龙胆苦苷峰面积的 RSD 0.71%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一提取液 5 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下方法测定,计算龙胆苦苷平均质量浓度 0.617 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 1.4%,表明本方法重复性良好。

2.2.7 加样回收试验 精密量取已知龙胆苦苷质量 (18.5136 mg) 的提取液 30 mL,共 6 份,分别精密加入龙胆苦苷对照品 1.520, 1.520, 2.280, 2.280, 3.040, 3.040 mg,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下方法测定,计算回收率平均值 98.73%, RSD 1.6%,表明本法准确可靠。

2.3 提取工艺优选 以黄芪甲苷 (Y_1) 和龙胆苦苷 (Y_2) 质量的综合评分为指标,综合评分 = $(Y_1 \times 10 + Y_2) / 2$ 。选取加水量、提取时间、提取次数为考察因素,按处方比例称取药材共 9 份,每份 166 g,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化水提工艺条件,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

由直观分析可知,各因素对膝悦颗粒水提工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 具

表2 膝悦颗粒水提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次	D (空白)	黄芪甲苷/mg	龙胆苦苷/mg	综合评分
1	6	1.0	1	1	0.77	9.7	8.7
2	6	1.5	2	2	2.19	28.2	25.1
3	6	2.0	3	3	4.41	31.1	37.6
4	8	1.0	2	3	2.47	18.5	21.6
5	8	1.5	3	1	4.05	35.2	37.8
6	8	2.0	1	2	1.19	19.0	15.4
7	10	1.0	3	2	3.50	45.9	40.4
8	10	1.5	1	3	2.12	23.2	22.2
9	10	2.0	2	1	3.59	44.8	40.3
K_1	23.8	23.6	15.4	28.9			
K_2	24.9	28.4	29.0	27.0			
K_3	34.3	31.1	38.6	27.1			
R	10.5	7.5	23.2	1.9			

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	199.27	99.63	27.93	<0.05
B	87.26	43.63	12.23	>0.05
C	812.91	406.45	113.92	<0.01
D(误差)	7.14	3.57		

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.00$, $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

有极显著性影响,因素 A 影响显著,因素 B 则无显著性影响。从节约能源和提高生产效率角度考虑,将提取时间定为最小,确定最佳提取方案为 $A_3B_1C_3$,即药材加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h。按处方比例称取药材共 166 g,共 3 份,按优选的工艺条件进行提取,计算 20 mL 提取液中黄芪甲苷、龙胆苦苷质量平均值分别为 4.34, 43.7 mg, RSD 均为 1.8%,表明该方案切实可行。

2.4 纯化工艺优选

2.4.1 样品制备方法 按处方比例称取药材 664 g,加 10 倍量水煎煮 3 次,每次 1 h,合并水煎液,滤过,得初滤液,均分成 4 份。取初滤液 1 份,依次进行微滤 (45 $^{\circ}\text{C}$, 0.25 MPa)、超滤 (35 $^{\circ}\text{C}$, 0.5 MPa)、纳滤 (30 $^{\circ}\text{C}$, 1.6 MPa),得超滤液^[3-4]。取初滤液 2 份,浓缩至相对密度 1.08 (80 $^{\circ}\text{C}$),等分成 2 份,分别加入乙醇使含醇量分别为 50% 和 70%,充分搅拌,静置 24 h,取上清液,残渣加适量 50% 乙醇或 70% 乙醇使溶解,搅拌均匀,静置 12 h,取上清液,分别合并 2 次上清液,得醇沉液 1 和醇沉液 2。

2.4.2 评价指标及结果 黄芪甲苷和龙胆苦苷的保留率分别测定初滤液、超滤液、醇沉液 1、醇沉液 2 中黄芪甲苷和龙胆苦苷的含量,计算保留率,结果见表 4。分别精密移取初滤液、超滤液、醇沉液 1 和醇沉液 2 适量,水浴蒸干,105 ℃烘箱干燥 3 h,干燥器中冷却 30 min,称定质量,计算出膏率,结果见表 4。结果显示超滤法出膏率最低,黄芪甲苷、龙胆苦苷损失最大;而不同醇沉法所得指标成分保留率和出膏率均较高,且结果相近,从减少乙醇用量考虑,选择醇沉浓度 50%。

表 4 不同方法膝悦颗粒水提液的纯化效果比较

溶液	黄芪甲苷 /mg	龙胆苦苷 /mg	黄芪甲苷 保留率/%	龙胆苦苷 保留率/%	出膏率 /%
初滤液	24.88	252.69	-	-	28.64
超滤液	2.60	156.49	10.43	61.93	14.55
醇沉液 1	21.30	216.32	85.61	97.74	22.13
醇沉液 2	21.65	249.07	87.02	98.57	19.44

3 讨论

试验发现煎煮时间越长,龙胆苦苷含量反而呈现降低的趋势,这可能与龙胆苦苷的化学结构有关。龙胆苦苷为单萜类化合物,具有裂环环烯醚萜苷结构,易水解,水解生成的苷元为半缩醛结构,化学性质活泼,对热较敏感^[5]。提取过程中,部分龙胆苦苷结构发生改变,导致龙胆苦苷的转移率降低,故在生产过程中应严格控制提取时间。

超滤法是利用膜孔径大小,将相对分子量或分子体积大小不同的物质分离。不同纯化方法比较发现,超滤法不仅出膏率最低,黄芪甲苷、龙胆苦苷损失也最大。原因可能与滤膜表面滤渣堵塞,使小分子成分被截留在膜外,最终导致分离不彻底有关。在膝悦颗粒纯化工序优选时进行了药理试验考察,故醇沉只设置了常用浓度,而未采用正交试验。动物试验结果显示,50%醇沉浓度时抗炎、镇痛效果优于超滤法和 70%醇沉浓度,故选择水提液的醇沉浓度为 50%。

[参考文献]

[1] 杜志谦. 中医药治疗膝关节滑膜炎的研究进展[J]. 中医正骨, 2005, 17(9): 72.

[2] 王战朝, 杜志谦, 闫永昌, 等. 通经活利汤治疗膝关节滑膜炎的临床研究[J]. 中医正骨, 2012, 24(4): 26.

[3] 李淑莉, 刘振丽, 宋志前. 超滤法在中药制剂纯化工序中的应用研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(12): 898.

[4] 司娜, 刘文, 宋信莉, 等. 超滤膜技术纯化复方天麻钩藤饮工艺研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(1): 24.

[5] 陈雷. 龙胆苦苷衍生物合成及药理作用研究[D]. 西安: 西北大学, 2008: 7.

[6] 王彩君, 王智民, 王维皓, 等. 龙胆属植物中的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 2987.

[责任编辑 刘德文]

欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013 年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于 1995 年 10 月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,242 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。