

连参颗粒的提取工艺优选

徐文杰*, 陈雪婷, 施之琪, 李智勇, 王洛临
(广东省中医药工程技术研究院, 广州 510095)

[摘要] **目的:** 优选连参颗粒的提取工艺条件, 为该制剂的开发提供参考。**方法:** 以挥发油得率为指标, 采用单因素试验考察提取时间、浸泡时间、加水量对当归、辛夷、肉桂中挥发油提取工艺的影响; 采用 UV 测定总生物碱含量, 检测波长 350 nm; 运用 HPLC 测定盐酸小檗碱含量, 流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (50:50), 检测波长 345 nm。以总生物碱、盐酸小檗碱含量及干膏率的综合评分为指标, 采用 L₉(3⁴) 正交试验考察加水量、提取时间、提取次数对连参颗粒水提取工艺的影响。**结果:** 挥发油提取工艺为加 8 倍量水浸泡 1.0 h, 利用水蒸气蒸馏提取 5.0 h; 最佳水提工艺为加 8 倍量水提取 3 次, 每次 1.0 h; 干膏率、总生物碱及盐酸小檗碱提取量分别为 25.91%、512.34 mg、130.81 mg。**结论:** 该提取工艺稳定可行, 适用于连参颗粒的工业化生产。

[关键词] 挥发油; 总生物碱; 盐酸小檗碱; 连参颗粒

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0038-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010038

Optimization of Extraction Technology of Lianshen Granules XU Wen-jie*, CHEN Xue-ting, SHI Zhi-qi, LI Zhi-yong, WANG Luo-lin (Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine Manufacturing Technology, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Lianshen granules, in order to provide a reference for development of this preparation. **Method:** With yield of volatile oil as index, single factor tests were adopted to investigate effects of the amount of water, soaking time and distillation time on extraction technology of volatile oil in Angelicae Sinensis Radix, Cinnamomi Cortex and Magnoliae Flos. UV was adopted to determine the content of total alkaloids with detection wavelength of 350 nm. The content of berberine hydrochloride was determined by HPLC, which used acetonitrile-0.05 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (50:50) as mobile phase, detection wavelength was 345 nm. With contents of berberine hydrochloride and total alkaloids, yield of dry extract as comprehensive evaluation index, effects of the amount of water, extraction time and times on water extraction technology of Lianshen granules was investigated by orthogonal test. **Result:** Optimum extraction technology of volatile oil was as following: soaked one hour with eight times the amount of water, then distilled five hours. Optimum water extraction technology conditions were as follows: boiled herbs with eight times the amount of water for thrice, one hour for each time. Dry extract yield was 25.91%, extraction amounts of total alkaloids and berberine hydrochloride were 512.34, 130.81 mg, respectively. **Conclusion:** Optimized extraction technology is simple, stable and feasible, which is suitable for industrial production of Lianshen granules.

[Key words] volatile oil; total alkaloids; berberine hydrochloride; Lianshen granules

连参颗粒源于广东省第二中医院临床医师的经验方, 由黄连、太子参、白芍、甘草、当归、肉桂和辛夷共 7 味药组成, 具有清泄湿热、通窍泄浊、活血通络、调和气血的功效。原方以汤剂内服用于临床, 疗效较好, 但汤剂煎煮、携带、使用不方便, 结合预试验中

出膏率和膏粉性质等考察, 欲将其制备成胶囊剂、片剂、颗粒剂等口服固体制剂, 但由于本方日服剂量较大, 故最终选择了载药量大的颗粒剂。连参颗粒具有体积小、稳定性好、服用和携带方便等特点, 适合病人长期服用, 可以满足临床生产需要。通过查阅

文献资料^[1-13],确定能体现连参颗粒功能主治及药理作用的主要有效成分存在于挥发油及水提液中,故本实验以挥发油得率为指标考察当归、肉桂和辛夷等药材的提取工艺;以盐酸小檗碱、总生物碱含量和干膏率为综合评价指标,采用正交试验优选全方药材的水提工艺,为该制剂的大生产提供参考。

1 材料

1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),UV 2550型紫外分光光度计(日本岛津株式会社),XS-205DU型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),DZF-6050型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),TC-15型套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂),DC-1500型喷雾干燥机(上海达程设备有限公司),GK-70型干式造粒机(江苏瑰宝制药机械厂)。

黄连、白芍、太子参等药材均购自广东省药材公司中药饮片厂,经广东省中医药工程技术研究院中药制剂研究室王洛临主任中药师检定,均符合2010年版《中国药典》一部药材项下有关规定;盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号111687-200502),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取工艺单因素试验考察

2.1.1 提取时间 处方中当归、肉桂、辛夷按2010年版《中国药典》一部附录XD挥发油测定法甲法操作提取挥发油,药渣再与其余药材进行回流提取。当归、肉桂等药材粉碎成粗颗粒,辛夷保留饮片形式。按处方比例称取药材共3份,每份216g,加6倍量水浸泡1.0h,利用水蒸气蒸馏法提取挥发油,每隔1.0h记录挥发油体积($n=3$),结果提取1,2,3,4,5,6,7h后挥发油平均得率分别为0.36%,0.44%,0.49%,0.53%,0.59%,0.59%,0.59%,故选择提取5h为宜。

2.1.2 浸泡时间 按处方比例称取药材共4份,每份216g,加6倍量水分别浸泡0,0.5,1.0,2.0h,利用水蒸气蒸馏法提取5.0h,记录挥发油体积,计算挥发油得率分别为0.46%,0.54%,0.59%,0.60%,故确定浸泡1.0h。

2.1.3 加水量 按处方比例称取药材3份,每份216g,分别加6,8,10倍量水浸泡1.0h,利用水蒸气蒸馏法提取5.0h,记录挥发油体积,计算挥发油得率分别为0.59%,0.67%,0.65%,故确定加水量8倍。

2.1.4 验证试验 按处方比例称取药材3份,每份

216g,按上述优选的工艺条件进行验证试验,记录挥发油体积,计算挥发油得率分别为0.65%,0.67%,0.65%,说明优选的工艺条件稳定可行。

2.2 总生物碱的含量测定

2.2.1 溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品12.03mg置50mL量瓶,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至刻度,摇匀,得 $0.2406\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液;精密吸取储备液2mL置25mL量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至刻度,摇匀,得 $19.248\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。精密吸取同一提取液5mL置25mL量瓶中,精密加入甲醇-盐酸(100:1)混合液20mL,超声处理(220W,50kHz,下同)30min,取出,放冷,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液1.0mL置25mL量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至刻度,摇匀,得供试品溶液。按处方比例称取药材(缺黄连),加12倍量水浸泡1.0h,提取3次,每次1.5h,合并滤液,浓缩至500mL,其余操作步骤同供试品溶液的制备,即得阴性样品溶液。

2.2.2 检测波长的选择 以甲醇-盐酸(100:1)混合液为空白,分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液在200~500nm扫描,确定最大吸收波长350nm。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0mL,分别置于10mL量瓶中,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至刻度,得系列对照品溶液。以甲醇-盐酸(100:1)混合液为空白,于350nm处测定吸光度(A),质量浓度(C)对 A 进行线性回归,得回归方程 $A = 0.064C + 0.019$ ($r = 0.9996$),线性范围 $1.9248 \sim 11.5488\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 精密度试验 取同一份供试品溶液,按2.2.3项下方法连续测定6次,计算 A 的RSD 1.3%,表明仪器精密性良好。

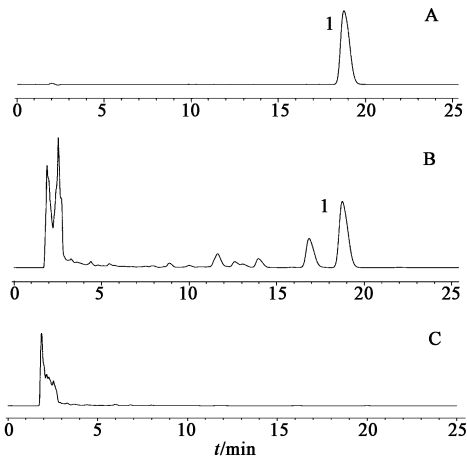
2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,6,8,12,24h按2.2.3项下方法测定 A ,计算RSD 1.9%,表明供试品溶液室温放置24h内稳定。

2.2.6 重复性试验 精密吸取同一提取液5mL,共6份,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下方法测定 A ,计算RSD 1.2%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取已知含量的提取液6份,每份2.5mL,各精密加入盐酸小檗碱对照品2.7mg,加甲醇-盐酸(100:1)混合液定容至5mL,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.3项下方法测定 A ,计算平均回收率99.47%,RSD 1.9%。

2.3 盐酸小檗碱的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (50:50, 每 100 mL 加十二烷基硫酸钠 0.4 g, 再以磷酸调 pH 4.0), 检测波长 345 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。在该色谱条件下, 主色谱峰与相邻色谱峰的分度度 > 1.5, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 盐酸小檗碱

图 1 连参颗粒提取液 HPLC

Fig. 1 HPLC of Lianshen granules extract

2.3.2 溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 95.6 μg 的溶液, 摇匀, 得对照品溶液。精密吸取提取液 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇-盐酸 (100:1) 混合液 20 mL, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 用甲醇-盐酸 (100:1) 混合液定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。按处方比例称取药材 (缺黄连), 加 10 倍量水提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并滤液, 浓缩至 500 mL, 其余操作步骤同供试品溶液的制备, 得阴性样品溶液。

2.3.3 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL 注入高效液相色谱仪, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3\,764.1X + 11.739$ ($r = 0.999\,8$), 线性范围 0.095 6 ~ 0.956 μg。

2.3.4 精密度试验 取同一份供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 结果盐酸小檗碱峰面积的 RSD 0.7%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算峰面积的 RSD 1.4%, 表明供试品溶液室温放置 24 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一提取液, 按 2.3.2 项下

方法制成供试品溶液, 平行操作 6 份, 按 2.3.1 项下色谱条件测定峰面积, 计算 RSD 1.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密吸取已知含量的提取液 6 份, 每份 10 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各精密加入 95.6 mg·L⁻¹ 盐酸小檗碱对照品溶液 10 mL, 加甲醇-盐酸 (100:1) 混合液定容至刻度, 按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算平均回收率 99.25%, RSD 1.8%。

2.4 干膏率测定 精密吸取样品浓缩液 20 mL, 至已干燥至恒重的蒸发皿中, 100 °C 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 4 h, 置干燥器中冷却 0.5 h, 迅速称重, 照 2010 年版《中国药典》一部附录 IX G 干燥失重法测定, 计算干膏率。

2.5 水提工艺优选 黄连为方中君药, 盐酸小檗碱为其有效成分之一, 总生物碱为有效部位, 且二者的含量测定方法较成熟, 故选择盐酸小檗碱、总生物碱含量和干膏率的综合评分为指标, 权重系数分别为 0.3, 0.3, 0.4。称取处方量药材 188 g, 共 9 份, 采用 L₉(3⁴) 正交试验考察加水量、煎煮时间和煎煮次数对水提工艺的影响。利用 SPSS 17.0 统计软件对评分结果进行数据处理, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

由直观分析可知, 各因素影响提取效果的顺序为 C > A > B。方差分析表明因素 C 对提取效果具有显著性影响, 其他因素则均无显著性影响。综合生产周期、生产成本等条件考虑, 最终选择最佳工艺组合 A₁B₁C₃, 即加 8 倍量水提取 3 次, 每次 1.0 h。

2.6 验证试验 称取处方量药材 188 g, 按优选的水提工艺进行验证试验, 平行操作 3 份, 计算干膏率分别为 25.92%, 26.48%, 25.34%, 总生物碱提取量分别为 520.63, 495.22, 521.18 mg, 盐酸小檗碱提取量分别为 134.01, 122.53, 135.89 mg, 表明优选的工艺条件合理且重复性好。

3 讨论

方中药材含有挥发油^[1-3]、生物碱类^[3,4]、黄酮类^[3,5,6]、木脂素类^[7]、多糖类^[5,8-10]、皂苷类^[10-12]、有机酸类^[1]、微量元素等功效成分。连参颗粒原方为汤剂, 临床疗效良好, 现代研究表明当归、肉桂、辛夷中挥发油成分具有抗炎、抗病毒、抗变态反应、抗病原微生物等作用^[1-3]; 白芍水煎液具有抗炎、抗菌、镇痛等作用^[12]; 黄连水提液具有抗病毒、抗菌、抗炎与免疫调节、抗腹泻、抗溃疡等作用^[13], 甘草水提液及浸膏均具有免疫调节、抗病毒、抗心律失常等作

表 1 连参颗粒水提工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of water extraction technology of Lianshen granules

No.	A 加水量/倍	B 提取时间/h	C 提取数/次	D(空白)	干膏率/%	盐酸小檗碱/mg	总生物碱/mg	综合评分
1	8	1	1	1	13.79	35.94	211.48	40.95
2	8	1.5	2	2	20.09	105.10	355.60	71.43
3	8	2	3	3	23.33	107.98	416.14	80.69
4	10	1	2	3	18.69	77.43	300.64	61.25
5	10	1.5	3	1	24.05	158.13	537.46	97.33
6	10	2	1	2	16.94	57.86	237.35	51.42
7	12	1	3	2	21.51	173.60	503.17	93.86
8	12	1.5	1	3	16.83	88.55	291.70	59.58
9	12	2	2	1	21.38	161.55	480.65	90.31

表 2 综合评分方差分析

Table 2 Variance analysis of composite score

方差来源	SS	MS	F	P
A	443.794	221.897	3.616	>0.05
B	196.877	98.439	1.604	>0.05
C	2 424.458	1 212.229	19.753	<0.05
D(误差)	122.739	61.370		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

用^[5],太子参水提液具有增强免疫、抗菌抗病毒^[10],与本颗粒剂的功用一致,故确定采用双提法方案。在挥发油提取过程中随药材饮片粉碎度的增加,提取效果越好,但粉末过细不易滤过。预试验对比了药材饮片、粗粉及颗粒的提取效果,发现粗粉较为适宜。总生物碱在 200 ~ 500 nm 扫描,结果显示盐酸小檗碱对照品溶液在 230,266,350,427 nm 处均有紫外吸收,结合供试品溶液和阴性样品溶液扫描结果,选择 350 nm 为总生物碱的检测波长,阴性样品在此波长下对总生物碱的含量测定无干扰。

黄连生物碱类成分在抗病毒、抗心律失常、增加冠状动脉血流量及降低血压等方面均具有较好作用^[14],且相关研究报道较为详尽,鉴于盐酸小檗碱是连参颗粒中君药——黄连的有效成分之一,而干膏率是评价水提工艺提取效率的传统指标,故选取总生物碱、盐酸小檗碱含量和干膏率为本制剂的评价指标。

[参考文献]

[1] 李曦,张丽宏,王晓晓,等. 当归化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材,2013,36(6):1023-1028.

[2] 梁晓艳,郭占京,罗佩卓,等. 肉桂的药理作用研究概况[J]. 现代医药卫生,2013,29(10):1501-1503.

[3] 罗会畏. 辛夷化学成分及药理活性研究[D]. 武汉:中南民族大学,2013.

[4] 刘芳,张浩,青琳森. 黄连 HPLC 数字化指纹图谱研究及 7 种生物碱含量测定[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3713-3719.

[5] 田庆来,官月平,张波,等. 甘草有效成分的药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(2):343-347.

[6] 古丽娜尔·夏依马尔旦. 黄连中总黄酮含量测定及提取工艺的研究[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2012,29(1):75-78.

[7] 马玉良,韩桂秋. 辛夷中木脂素成分的研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(2):102-105.

[8] 樊雪,李平,孟凡征,等. 近 5 年来当归多糖的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2013,29(5):150-151.

[9] 李莉,石俊英. 气相色谱-质谱联用分析肉桂多糖及脂类成分[J]. 中药材,2013,36(4):578-580.

[10] 程黎晖. 太子参化学成分、药理作用及临床应用研究近况[J]. 浙江中医杂志,2008,43(5):307-309.

[11] 陶伟伟,段金廛,杨念云,等. 乌拉尔甘草皂苷类成分研究[J]. 中草药,2013,44(12):1552-1557.

[12] 金英善,陈曼丽,陶俊. 芍药化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2013,27(4):745-750.

[13] 崔学军. 黄连及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师,2006,9(5):469-470.

[责任编辑 刘德文]