

正交试验优选糖郁舒颗粒提取工艺

方芳¹, 宋英^{2*}, 李圆圆¹, 刘彩艳¹

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] **目的:** 优选糖郁舒颗粒的提取工艺。**方法:** 以盐酸小檗碱、二苯乙烯苷提取量和干膏收率的综合评分为指标, 选择加水量、提取时间和提取次数为考察因素, 通过正交试验优选糖郁舒颗粒的提取工艺。采用 HPLC 测定盐酸小檗碱、二苯乙烯苷含量。**结果:** 提取次数对水提取效果具有显著性影响, 而加水量和提取时间均无显著性影响。优选的黄连提取工艺为加 10 倍量水提取 3 次, 每次 1 h; 处方中其余饮片与黄连药渣加 8 倍量水提取 3 次, 每次 1.5 h; 盐酸小檗碱、二苯乙烯苷平均提取量分别为 48.40, 5.032 mg·g⁻¹。**结论:** 优选的提取方法稳定可行, 适用于糖郁舒颗粒的工业生产。

[关键词] 糖郁舒颗粒; 正交试验; 高效液相色谱法; 盐酸小檗碱; 二苯乙烯苷; 干膏得率

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0024-04

[doi] 10.11653/syfy2014030024

Optimization of Extraction Technology for Tangyushu Granules by Orthogonal Test

FANG Fang¹, SONG Ying^{2*}, LI Yuan-yuan¹, LIU Cai-yan¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Tangyushu granules. **Method:** With composite score of dry extract rate and extraction amounts of berberine hydrochloride and 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (stilbene glycoside) as index, orthogonal test was adopted to optimize water extraction technology of Tangyushu granules by taking the amount of water, extraction time and times as factors. Contents of berberine hydrochloride and stilbene glycoside were determined by HPLC. **Result:** Extraction times had significant influence on water extraction effect, but the amount of water and extraction time had not significant influence. Optimum extraction technology of Coptidis Rhizoma from Tangyushu granules was as follows: extracted three times with ten times the amount of water, one hour each time; Dregs of Coptidis Rhizoma and others pieces in the prescription were extracted three times with eight times the amount of water, one and a half hours each times; Average extracting amounts of stilbene glycoside and berberine hydrochloride were 48.40, 5.032 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** This optimized extraction process was stable and feasible, which could be extended to industrial production of Tangyushu granules.

[Key words] Tangyushu granules; orthogonal test; HPLC; berberine hydrochloride; stilbene glycoside; yield of dry extract

糖郁舒颗粒为我院杨东东主任医师根据中医药理论及长期临床经验积累的验方, 由黄连、酸枣仁、

首乌藤等 11 味药组成, 主要用于治疗痰热上扰的抑郁、焦虑、失眠、眩晕等症及糖尿病并发症。原方以

[收稿日期] 20130625(007)

[基金项目] 四川省科技厅支撑计划项目(2012SZ0188); 成都中医药大学附属医院院基金项目(2012-PP-24)

[第一作者] 方芳, 硕士, 从事中药新制剂研究, Tel:18782185217, E-mail:zyxfangfang@163.com

[通讯作者] * 宋英, 主任药师, 从事中药炮制与制剂研究, Tel:028-87783735, E-mail:806380106@qq.com

汤剂形式服药,疗效确切,但存在不易贮存、服用量大、携带不便等问题,故拟将其改制成颗粒剂。根据处方药物的主要药效成分及预试验结果,拟订该制剂的提取工艺路线为黄连单独水提,首乌藤等其余10味药与黄连药渣混合水提,分别以盐酸小檗碱、二苯乙炔苷提取量及干膏收率为综合评价指标,采用正交试验优选糖郁舒颗粒的提取工艺,为该颗粒剂的后期研究奠定基础。

1 材料

HP1100型高效液相色谱仪(美国惠普公司),BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司)。盐酸小檗碱、二苯乙炔苷对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为110713-200911,110844-201109,纯度分别为86.8%,94.7%),黄连等饮片(均购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学附属医院盛蓉副主任药师鉴定,均符合2010年版《中国药典》一部相关项下规定),乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

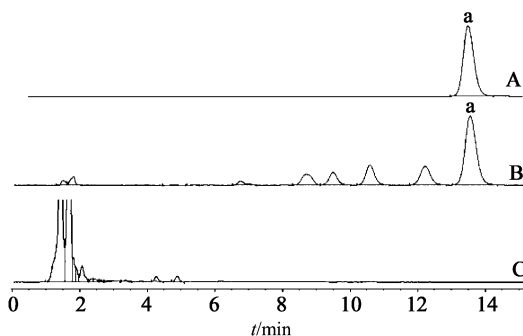
2 方法与结果

2.1 盐酸小檗碱的含量测定

2.1.1 色谱条件 依利特 Hypersil BDS C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m),流动相乙腈-0.05 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(50:50)(每100 mL中加十二烷基硫酸钠0.4 g,再以磷酸调节pH 4.0)-水(93:7),检测波长345 nm,柱温30 $^{\circ}$ C,流速1.0 mL·min⁻¹。理论板数按盐酸小檗碱峰计算不低于5 000,见图1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取盐酸小檗碱对照品9.35 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精密量取样品溶液2 mL



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; a. 盐酸小檗碱

图1 糖郁舒颗粒中黄连水提液 HPLC

置于10 mL量瓶中,加盐酸-甲醇(1:100)混合液溶解至刻度,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性样品溶液制备 按处方比例称取除黄连的其他饮片,煎煮,滤过,定容,得提取液,按2.1.3项下方法制备,即得。

2.1.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液0.5, 1, 2, 5, 10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,混匀,得系列对照品溶液。分别精密吸取各对照品溶液5 μ L,按2.1.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 2\,154.9X + 1.465$ ($r = 1.000$),表明盐酸小檗碱在0.010 11 ~ 2.022 5 μ g与峰面积呈良好线性关系。

2.2 黄连水提工艺优选^[1-3] 在预试验基础上,选取加水量、提取时间及提取次数为考察因素,以盐酸小檗碱提取量(Y)和干膏收率(X)的综合评分为指标,综合评分 = $(X_i/X_{max}) \times 30 + (Y_i/Y_{max}) \times 70$ ($i = 1 \sim 9$),称取黄连饮片9份,每份20 g,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。

表1 糖郁舒颗粒中黄连水提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /min	C 提取数 /次	D(空白)	干膏收率 /%	盐酸小檗碱提取量 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	5	30	1	1	12.76	23.39	51.25
2	5	60	2	2	18.48	37.05	78.92
3	5	90	3	3	21.31	42.21	90.24
4	10	30	2	3	18.27	36.40	77.68
5	10	60	3	1	22.18	44.87	95.31
6	10	90	1	2	15.49	31.70	67.10
7	15	30	3	2	21.10	43.63	92.06
8	15	60	1	3	16.60	32.57	69.84
9	15	90	2	1	22.92	47.39	100
K_1	220.41	220.99	188.19	246.56			
K_2	240.09	244.07	256.60	238.08			
K_3	261.90	257.34	277.61	237.76			
R	13.83	12.12	29.81	2.93			

表 2 黄连水提工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	287.16	2	17.29	>0.05
B	225.57	2	13.58	>0.05
C	1 457.48	2	87.75	<0.05
D(误差)	16.61	2		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

由直观分析可知,各因素对提取效果的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 对提取效果的影响具有显著性影响,A,B 因素则无显著性影响。综合生产实际考虑,确定黄连水提工艺条件为 $A_2B_2C_3$,即加 10 倍量水提取 3 次,每次 1 h。取黄连饮片 3 份,每份 60 g,按优选的工艺条件进行验证试验,结果盐酸小檗碱提取量分别为 49.09, 48.59, 47.53 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,干膏收率分别为 22.30%, 22.16%, 22.20%,表明该工艺稳定可行。

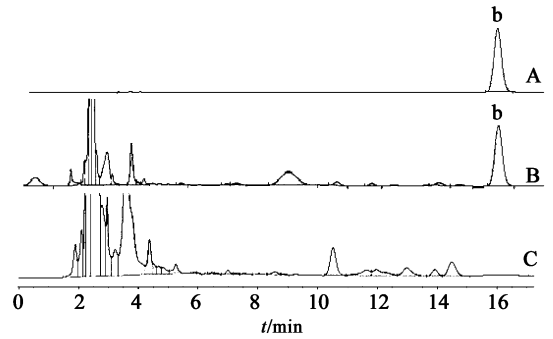
2.3 二苯乙烯苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (18:82), 检测波长 320 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。理论板数按二苯乙烯苷计算不低于 2 000, 见图 2。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取二苯乙烯苷对照品 1.25 mg, 置 25 mL 量瓶, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.3 供试品溶液制备 精密量取样品溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 加稀乙醇至刻度, 摇匀, 经

0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; b. 二苯乙烯苷

图 2 糖郁舒颗粒中首乌藤等药味水提液 HPLC

2.3.4 阴性样品溶液制备 按处方比例称取除首乌藤的其他饮片, 煎煮, 滤过, 定容, 得提溶液, 按 2.3.3 项下方法制备, 即得。

2.3.5 线性关系考察 分别精密量取二苯乙烯苷对照品溶液 0.5, 1, 3, 5, 15 μL , 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 3 069.5X - 4.837 (r = 0.999 9)$, 表明二苯乙烯苷在 0.023 68 ~ 0.710 3 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.4 首乌藤等药味水提工艺优选^[4-6] 在参考相关文献及预试验基础上, 选取加水量、提取时间及提取次数为考察因素, 以干膏收率和二苯乙烯苷提取量为综合评价指标, 权重系数分别为 30, 70, 按处方比例称取首乌藤等 10 味饮片共 9 份, 每份 94 g, 采用正交试验优选水提取工艺, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 3 糖郁舒颗粒中首乌藤等 10 味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)	干膏收率 /%	二苯乙烯苷提取量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	综合评分 /%
1	8	1	1	1	12.34	2.261	50.67
2	8	1.5	2	2	17.06	5.102	97.05
3	8	2	3	3	18.73	5.121	100
4	10	1	2	3	15.59	4.301	83.75
5	10	1.5	3	1	18.56	4.482	90.99
6	10	2	1	2	13.63	2.841	60.65
7	12	1	3	2	17.86	3.748	79.83
8	12	1.5	1	3	13.44	3.048	63.18
9	12	2	2	1	17.29	4.363	87.33
K_1	247.72	214.26	174.51	229.00			
K_2	235.40	251.23	268.14	237.54			
K_3	230.35	247.99	270.82	246.94			
R	5.79	12.32	32.10	5.98			

表4 首乌藤等10味水提工艺综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	53.26	4	0.50	>0.05
B	279.42	4	2.61	>0.05
C	2 005.57	4	18.75	<0.01
D(误差)	106.95	4		

注: $F_{0.05}(2,4) = 6.94$, $F_{0.01}(2,4) = 18.00$ 。

由直观分析可知,各因素对水提工艺的影响顺序为 $C > B > A$ 。方差分析表明 C 因素对提取效果具有极显著性影响, A, B 因素则均无显著性影响,确定最佳提取工艺为 $A_1B_2C_3$,即加 8 倍量水提取 3 次,每次 1.5 h。按处方比例称取首乌藤等 10 味饮片,各 3 份,每份 564 g,按优选的提取工艺进行验证试验,结果二苯乙烯苷提取量分别为 5.094, 4.874, 5.128 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,干膏收率分别为 18.64%, 18.46%, 18.71%,表明该工艺稳定可行。

3 讨论

黄连为方中君药,主要成分为小檗碱、黄连碱、巴马丁等多种生物碱,研究表明盐酸小檗碱可通过促进胰岛素 β 细胞的修复和增生,使胰岛素释放增加,通过抑制糖原异生及促进葡萄糖酵解而降低血糖^[7-8]。首乌藤养血安神、祛风通络,用于治疗失眠多梦,血虚身痛等症^[9],主要药效成分为二苯乙烯苷。故选择盐酸小檗碱、二苯乙烯苷提取量及干膏收率为评价指标。

预试验比较了全方水提和黄连单独水提的提取效果,结果表明全方水提时,盐酸小檗碱的提取率较低,约 30%;而相同条件下,黄连单独提取盐酸小檗碱时含量明显增加,提取率约 75%。通过黄连与方中其他药味的两两配伍试验,发现黄连分别与首乌藤、枳实等混合煎煮时,盐酸小檗碱含量较低。推测

可能是煎煮时其他药中鞣质、黄酮类等成分与盐酸小檗碱反应,产生沉淀,影响了盐酸小檗碱的提取率^[10],故确定该颗粒剂的提取工艺为黄连单独水提后,再与其余饮片混合提取。

[参考文献]

- [1] 刘峰,张振秋,赖静怡,等. HPLC 法测定黄连及炮制品中 4 种生物碱的含量[J]. 中成药, 2010, 32(11):1925.
- [2] 胡芳,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 测定岩黄连生物总碱中脱氢卡维丁、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):68.
- [3] 涂瑶生,江志强,孙冬梅,等. 黄连生物碱提取及纯化工艺研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(2):208.
- [4] 苏玮,郭群. 何首乌的现代药理研究概况[J]. 中草药, 1997, 28(2):119.
- [5] 王庆伟,刘雪英,胡玉珍,等. 正交实验优选强骨胶囊水提部分制备工艺[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(2):110.
- [6] 冯伟红,李曼玲. HPLC 法测定补肾腰痛颗粒中二苯乙烯苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(2):4.
- [7] 陈洪源,明智强,谢佳乐,等. 小檗碱降血糖机制的研究进展[J]. 食品与药品, 2008, 10(3):69.
- [8] 叶菲,申竹芳,谢明智. 中药黄连及其复方对实验动物血糖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(3):23.
- [9] 汲广全,杨娟,杨小生. 夜交藤改善睡眠活性成分研究[J]. 中成药, 2011, 33(3):514.
- [10] 孙启明. 几个黄连复方的沉淀反应[J]. 天津医药, 1977, 13(12):601.

[责任编辑 全燕]