

镇癫开窍颗粒提取工艺研究

张瑞堂^{1,2}, 金永新², 张红梅², 马肖², 何彩虹², 康玉龙²(1.西北民族大学, 兰州 730000; 2.甘肃省第二人民医院, 兰州 730000)

摘要: 目的 确定镇癫开窍颗粒的最佳提取工艺。方法 应用 HPLC 同时测定龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷的含量, 并以含量测定的综合评分为考察指标, 采用正交试验法 L₉(3⁴) 优选提取工艺条件。结果 对提取工艺的影响因素从大到小依次为提取次数、提取时间、乙醇浓度、加入溶媒量, 最适工艺条件为 8 倍量的 80% 乙醇, 浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 60 min。结论 该工艺稳定、可行。

关键词: 镇癫开窍颗粒; 龙胆苦苷; 芍药苷; 黄芩苷; 提取工艺; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)05-0660-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.009

引用本文: 张瑞堂, 金永新, 张红梅, 等. 镇癫开窍颗粒提取工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 660-664.

Study on Extraction Process of Zhendian Kaiqiao Granules

ZHANG Ruitang^{1,2}, JING Yongxin², ZHANG Hongmei², MA Xiao², HE Caihong², KANG Yulong²(1.Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730000, China; 2.Gansu Province of Second People's Hospital, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimum the extraction procedure of Zhendian Kaiqiao granules. **METHODS** Gentiopicrosin, paeoniflorin and baicalin were determined by HPLC, the extraction ratio of the content of gentiopicrosin, paeoniflorin and baicalin were used as index. The optimum condition of the extraction were study by the orthogonal L₉(3⁴). **RESULTS** The influencing effects of factors were as follows: D>B>A>C (A: alcohol concentration; B: bextraction time; C: the amount of vehicle; D: extraction times). The optimize extraction condition were as follows: 8 times of 80% alcohol, soaking 30 min, reflux 60 min, extract 3 times. **CONCLUSION** The optimum extraction procedure is stable and practical.

KEY WORDS: Zhendian Kaiqiao granules; gentiopicrosin; paeoniflorin; baicalin; extract technology; HPLC

镇癫开窍颗粒处方来源于甘肃省第二人民医院(甘肃省精神卫生中心)中医科, 系由龙胆、芍药、黄芩、石膏、生地、大黄、酸枣仁、龙骨、牡蛎、珍珠母、石决明、琥珀、细辛、茯苓、甘草 15 味中药组成, 是治疗癫狂症的经验方。方中龙胆为君药, 芍药、黄芩为臣药。据相关文献报道, 龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷分别为龙胆草、芍药、黄芩中主要有效成分^[1-3], 具有治疗痛-抑郁综合症、抗炎、保肝利胆、清热燥湿、泻火解毒、神经保护等功能^[3-8]。为了方便患者挈带, 服用方便, 本实验对其进行提取工艺优选, 拟将汤剂开发为颗粒剂。笔者将处方中的龙胆、芍药、黄芩、石膏等全部处方药材以处方量混合后, 以不同浓度的乙醇为溶媒, 以龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷测定的含量综合评分为考察指标, 通过正交试验优

选镇癫开窍颗粒的提取工艺, 为批量生产提供科学依据, 为研制出使用方便、价格低廉、疗效确切的医院制剂打好基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(岛津); SPD-M20A 型二极管阵列检测器(DAD); TU-1221 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); ALC-210.4 型万分之一电子天平(德国赛多利斯公司); JY2002 型百分之一电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); RE52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); SHZ-D(III)型循环水式真空泵(天津华鑫仪器厂)。

1.2 试剂

龙胆、芍药、黄芩等处方饮片均购于兰州安

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项项目(31920150095)

作者简介: 张瑞堂, 男, 硕士, 主管药师 Tel: 13609339828

E-mail: bnm1258@163.com

泰堂中药饮片有限公司,经甘肃省第二人民医院药剂科陈煜娟主任中药师鉴定:龙胆(产地:云南)为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.的根炮制品;芍药(产地:安徽)为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的根炮制品;黄芩(产地:甘肃)为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi.的根炮制品。试验所用饮片经药剂科药品检验室检验均符合中国药典 2015 年版(一部)项下相关规定。

龙胆苦苷对照品(批号:110736-200731,供含量测定用,含量以 97.9%计算)、芍药苷(批号:110736-201438,供含量测定用)、黄芩苷(批号:120955-201309,供含量测定用)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯;水为纯化水;乙醇、磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件^[9] 色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);预柱:Shimadzu Shim-pack C₁₈(10 mm×4.6 mm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~14 min, 30%→50% A; 14~20 min, 50%→60% A; 20~25 min, 60%→70% A; 25~40 min, 70%→80% A);流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:230 nm(芍药苷)、270 nm(龙胆苦苷)、280 nm(黄芩苷);柱温为室温;进样量:20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取龙胆苦苷对照品(含量以 97.9%计算)5.11 mg、芍药苷 5.34 mg、黄芩苷 6.01 mg,用乙腈-0.1%磷酸(70:30)混合液溶解,定容于 10 mL 量瓶中,制得浓度分别为 0.511, 0.534, 0.601 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取粉碎过筛(一

号筛)后的龙胆、芍药、黄芩等处方饮片粉末,按处方比列混匀,置 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入提取工艺下的一定浓度的乙醇量,浸泡 30 min,按提取工艺提取次数提取,过滤,合并滤液,精密量取续滤液 25 mL,水浴蒸干,10 mL 纯化水溶解后转移至 25 mL 分液漏斗中,加入石油醚萃取 3 次,每次 5 mL,收集水层;水层加入乙酸乙酯萃取 3 次,每次 5 mL,收集水层;水层用水饱和后的正丁醇萃取 3 次,每次 5 mL,收集 3 次萃取液,蒸干,残渣用乙腈-0.1%磷酸(70:30)混合液溶解,定容于 5 mL 量瓶,0.45 μm 滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按处方精密称取分别缺龙胆、芍药、黄芩的其他药材,并按“2.1.3”项下方法,分别制得缺龙胆阴性对照溶液、缺芍药阴性对照溶液、缺黄芩阴性对照溶液。

2.2 方法学试验

2.2.1 专属性试验 吸取对照品溶液、供试品溶液以及阴性对照溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件分析,记录色谱图见图 1。结果表明处方中其他成分对被测成分无干扰,方法专属性较好,各成分分离度均>2.0,理论板数以龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷计算均≥3 000。

2.2.2 标准曲线的绘制 分别精密吸取对照品溶液 200, 400, 500, 600, 700, 800, 900 μL,用乙腈-0.1%磷酸(70:30)混合液定容至 1 mL,依次吸取上述对照品溶液和“2.1.2”项下对照品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷回归方程见表 1,结果表明在线性范围内具有良好线性。

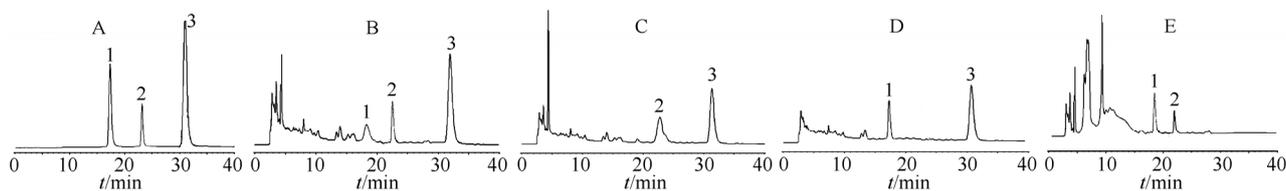


图 1 HPLC 图

A-对照品; B-样品; C-龙胆阴性对照; D-芍药阴性对照; E-黄芩阴性对照; 1-龙胆苦苷; 2-芍药苷; 3-黄芩苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; C-negative control of *Gentiana Radix et Rhizoma*; D-negative control of *Paeoniae Radix Alba*; E-negative control of *Scutellariae Radix*; 1-gentiopicrosin; 2-paeoniflorin; 3-baicalin.

表 1 线性关系考察表

Tab. 1 Investigation of linear relationship

成分	回归方程	线性范围/ μg	r
龙胆苦苷	$y=1.25\times 10^5x-4.95\times 10^3$	2.044~10.220	0.999 6
芍药苷	$y=5.56\times 10^5x-9.83\times 10^5$	2.136~10.680	0.999 2
黄芩苷	$y=7.69\times 10^5x-1.64\times 10^5$	2.404~12.020	0.999 8

2.2.3 仪器精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下制备的龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷浓度分别为 0.358, 0.374, 0.421 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 20 μL , 重复进样 5 次, 测得龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷浓度的 RSD 分别为 1.89%, 2.03%, 2.10%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 分别精密吸取 20 μL 供试品溶液于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 h 注入高效液相色谱仪, 依法测得浓度, 计算龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷浓度的 RSD 分别为 2.56%, 2.89%, 2.74%, 表明供试品溶液在 36 h 内具有良好的稳定性。

2.2.5 重复性试验 按处方比列精密称取各味药共 5 份, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液, 依法测得含量, 计算龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷的 RSD 分别为 2.42%, 2.50%, 2.78%, 表明方法重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 按处方量的 1/10 称取 6 份粉碎过筛(一号筛)的龙胆、芍药、黄芩等药材粉末, 混匀, 分别加入用 70%乙醇重新配制的 0.223 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 龙胆苦苷、0.118 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芍药苷、0.911 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芩苷对照品溶液 1 mL, 70%乙醇补足固液比(1:8)的量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 结果见表 2。

2.3 镇癫开窍颗粒提取工艺优化结果

2.3.1 镇癫开窍颗粒提取工艺试验设计 根据单因素试验结果, 以影响提取工艺的主要因素乙醇浓度、提取时间、加入溶媒量、提取次数为考察因素, 以测得的君药龙胆中的龙胆苦苷、臣药芍药中的芍药苷以及臣药黄芩中的黄芩苷的含量为评价指标, 采用综合评分法优选提取工艺, 按照中药君臣佐使的原则设定龙胆苦苷的权重系数为 0.4, 芍药苷和黄芩苷权重系数均为 0.3。每个因素选择 3 个水平, 按正交试验设计表, 进行 $L_9(3^4)$

正交试验优化提取工艺, 正交试验因素水平见表 3(综合评分=龙胆苦苷含量 \times 40%+芍药苷含量 \times 30%+黄芩苷含量 \times 30%), 正交试验结果见表 4。

表 2 加样回收率试验($n=6$)

Tab. 2 Results of recovery test($n=6$)

成分	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
龙胆苦苷	0.235	0.223	0.449	96.05	96.94	1.96
	0.226	0.223	0.439	95.65		
	0.216	0.223	0.438	99.60		
	0.204	0.223	0.424	98.61		
	0.232	0.223	0.449	97.17		
	0.211	0.223	0.422	94.53		
芍药苷	0.129	0.118	0.249	101.78	101.47	2.15
	0.117	0.118	0.238	103.14		
	0.111	0.118	0.231	102.20		
	0.120	0.118	0.235	97.20		
	0.119	0.118	0.241	102.97		
	0.112	0.118	0.232	101.53		
黄芩苷	0.911	0.911	1.782	95.68	98.19	2.47
	0.893	0.911	1.814	101.12		
	0.930	0.911	1.829	98.70		
	0.928	0.911	1.793	94.87		
	0.904	0.911	1.813	99.84		
	0.908	0.911	1.809	98.96		

表 3 因素水平表

Tab. 3 Factors and levels

水平	因素			
	A	B	C	D
	乙醇浓度/%	提取时间/min	加入溶媒量/倍	提取次数/次
1	70	30	6	1
2	80	60	8	2
3	90	90	10	3

根据正交试验结果, 分别计算龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷的含量, 依含量的综合评分进行分析。从综合评分的极差 R 值可以看出各因素的影响大小依次为 D(提取次数)、B(提取时间)、A(乙醇浓度)、C(加入溶媒量)。综合各因素的 K 值, 得出理论最佳提取工艺条件为 $A_2B_3C_2D_3$, 既 8 倍量的 80%乙醇, 浸泡 30 min, 提取 3 次, 每次 60 min。根据表 5 方差分析结果表明, D(提取次数)具有极显著性差异, B(提取时间)具有显著性差异, A(乙醇浓度)与 C(加入溶媒量)无显著性差异。

表4 正交试验结果($n=3$)Tab. 4 Results of orthogonal experiment ($n=3$)

试验号	A	B	C	D	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$			综合评分
					龙胆苦苷	芍药苷	黄芩苷	
1	1	1	1	1	13.628	5.107	71.237	28.354
2	1	2	2	2	17.523	12.813	86.411	36.776
3	1	3	3	3	20.798	13.628	92.399	40.127
4	2	1	2	3	24.152	13.211	83.144	38.567
5	2	2	3	1	22.357	9.738	63.825	31.012
6	2	3	1	2	23.381	13.359	86.402	39.281
7	3	1	3	2	21.838	12.391	78.356	35.959
8	3	2	1	3	24.471	13.302	82.334	38.479
9	3	3	2	1	20.194	10.481	70.415	32.346
K_1	105.258	102.881	106.114	91.712				
K_2	108.860	106.267	107.690	112.016				
K_3	106.785	111.754	107.098	117.173				
R	3.602	8.873	0.984	25.461				

表5 方差分析表

Tab. 5 Analysis of variance

变异来源	SS	df	MS	F	P
A	2.179	2	1.089	5.158	>0.10
B	13.368	2	6.684	31.648	<0.05
C(误差)	0.422	2	0.211	1.000	
D	120.792	2	60.396	285.965	<0.01

注: $F_{0.1(2,2)}=9.00$; $F_{0.05(2,2)}=19.00$; $F_{0.01(2,2)}=99.00$ 。Note: $F_{0.1(2,2)}=9.00$; $F_{0.05(2,2)}=19.00$; $F_{0.01(2,2)}=99.00$ 。

2.3.2 提取工艺验证试验结果 按处方称取粉碎过筛(一号筛)的龙胆、芍药、黄芩等药材粉末共5份,按正交试验确定的最优条件进行提取,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,吸取供试品溶液各20 μL 注入高效液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件测得龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷的含量。验证结果表明该工艺可行,可用于工业生产。结果见表6。

表6 验证试验结果($n=5$)Tab. 6 Results of verification test($n=5$)

成分	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$					均值/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
	24.532	23.982	24.385	24.435	24.286		
龙胆苦苷	24.532	23.982	24.385	24.435	24.286	24.524	1.104
芍药苷	13.238	13.482	13.647	13.171	13.240	13.356	1.508
黄芩苷	90.380	92.461	91.568	90.427	92.044	91.376	1.031

3 讨论

3.1 单因素试验溶媒的选择

在单因素筛选中比较了不同浓度的乙醇(20%, 40%, 60%, 80%, 100%)、水为溶媒对龙

胆苦苷、芍药苷、黄芩苷提取率的影响,发现提取率影响因素依次为100%乙醇 \approx 80%乙醇 $>$ 60%乙醇 $>$ 40%乙醇 $>$ 20%乙醇 $>$ 水,随着乙醇浓度的升高,各成分提取率依次升高,乙醇浓度达到80%后,提取率基本不变,故最终选择乙醇为溶媒,70%, 80%, 90%乙醇为考察因素。

3.2 最大吸收波长的选择

根据被测成分龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷最大吸收波长的不同,笔者运用紫外可见分光光度计,分别对对照品溶液进行扫描,发现龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷分别在273, 228, 280 nm有最大吸收,结合参考文献^[10-11]及中国药典2015版一部龙胆、白芍、黄芩含量测定项下的最大吸收波长,最终选择检测波长龙胆苦苷(270 nm)、芍药苷(230 nm)、黄芩苷(280 nm)对供试品溶液进行测定。

3.3 流动相考察

在探索测定龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷含量的高效液相色谱测定条件时,曾采用甲醇-磷酸^[12]、乙腈-磷酸^[13-14]、乙腈-甲酸^[15]为流动相,结果表明用乙腈-0.1%磷酸为流动相时,采用梯度洗脱法可使色谱柱易平衡、基线无波动、峰形对称、分离度可达到理想的效果。

3.4 正交试验考察

处方中龙胆、芍药、黄芩为君药,选择这3味药的有效成分龙胆苦苷、芍药苷、黄芩苷的含量为考察因素,采用正交试验进行多次重复实验,经方差分析得最优条件:8倍量的80%乙醇,浸泡

30 min, 提取 3 次, 每次 60 min。所得结果可靠可行, 该工艺可用于工业生产。

REFERENCES

- [1] 郭海凤, 朴惠顺. 龙胆苦苷提取工艺及药理作用研究进展 [J]. 延边大学学报, 2010, 33(1): 70-73.
- [2] YIN X, SUN P, WEN X S. Research on factors affecting about the content of paeoniflorin in Radix Paeoniae Alba [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2016, 18(2): 78-80.
- [3] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.
- [4] XIN W Y, SUN J K, HE G R, et al. Progress in pharmacological study and the underlying mechanism of baicalein and baicalin [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2013, 22 (6) : 647-653.
- [5] CHEN L, WANG H B, SUN X L, et al. Study on the analgesic and anti-inflammatory activities of gentiopicroside [J]. Nat Pod Res Dev(天然产物研究与开发). 2008, 20(5): 908-906.
- [6] 曾文雪, 宋小玲, 张尧, 等. 龙胆苦苷药理学活性及药动学研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(3): 69-71.
- [7] LI J J, WEN X P, XU L Y. Progress in studies on new formulation and bioavailability of baicalin [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(17): 2046-2051.
- [8] ZHENG S C, XIAO Y, OU Y B, et al. Research development on pharmacological of paeoniflorin [J]. Chin J Pharmacovigil(中国药物警戒), 2012, 9(2): 100-103.
- [9] ZHANG M, CHAI Y, REN A, et al. Simulaneous determination of ten constituents in Qingqing granule by quantitative analysis of multi-components by single-marker [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(3): 318-321.
- [10] WEI L, CHEN X H, WANG X H, et al. Determination of the contents of gentiopicroside of Radix Gentianae from different habitats [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2004, 21(2): 114-117.
- [11] MA X W, WEI H, LIU S X, et al. Determination of gentiopicroside, paeoniflorin, and salvianolic acid B in qianggan capsule by HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(6): 1125-1128.
- [12] HE JX, LAI XP, WEI G, et al. Content determination of chlorogenic acid, paeoniflorin and baicalin in Yinqiao Chaigui decoction [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(6): 48-50.
- [13] GUI SH, CHENG J, WANG L, et al. Determination of chlorogenic acid, paeoniflorin, and baicalin in yinqiao chaigui granules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33(7): 1175-1177.
- [14] SHI Y Q, KANG S H, WANG A J. Simultaneous determination of geniposide, paeoniflorin, baicalin and berberine hydrochloride in daoichi pills by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2013, 35(7): 1462-1464.
- [15] LIU J X, MENG F Y, ZHANG S H, et al. Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, and oroxylin-A in *Scutellaria baicalensis* by UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(10): 1477-1480.

收稿日期: 2017-09-13

(本文责编: 曹粤锋)