

· 论 著 ·

愈肠颗粒的提取工艺研究

邵雪庆^{1,2}, 唐晓萌¹, 杨 盟¹, 卞 俊², 刘继勇¹ (1. 第二军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433; 2. 解放军 411 医院药械科, 上海 200081)

[摘要] **目的** 研究医院制剂愈肠颗粒的最优提取工艺。**方法** 以愈肠颗粒中的有效成分小檗碱、白术内酯 I 的含量和浸膏得率为评价指标, 采用正交试验法优选愈肠颗粒的最佳提取工艺。**结果** 通过正交试验的直观分析、方差分析及验证性实验, 优选出其最佳提取工艺条件为: 处方量药材加 10 倍量水提取; 提取 2 次, 每次 1 h; 提取液的醇沉浓度为 70%。**结论** 该工艺操作简单方便、稳定可行, 可用作愈肠颗粒的优化提取方法。

[关键词] 医院制剂; 愈肠颗粒; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R944.27; R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)01-0046-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.009

Extraction process optimization for Yuchang granules by orthogonal experiment

SHAO Xueqing^{1,2}, TANG Xiaomeng¹, YANG Meng¹, BIAN Jun², LIU Jiyong¹ (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Drug and Equipment Section, No. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the extraction process of Yuchang granules. **Methods** The extraction process was optimized by orthogonal experiment based on the content of berberine, atractylodes lactone I and the extraction yield. **Results** Through the visual analysis of orthogonal experiment, the analysis of variance and the verification experiments, the optimum extraction process was obtained as follows: extracting 1 h for twice with 10 times water of medicinal herbs and the 70% ethanol depositing concentration. **Conclusion** This process is consistent and feasible. It is a simple and convenient method to extract Yuchang granules.

[Key words] pharmacy preparation; Yuchang granules; orthogonal experiment; extraction process

愈肠颗粒为第二军医大学附属长海医院治疗慢性结肠炎的特色制剂, 该方系根据慢性结肠炎“脾气虚弱, 湿蕴化热, 气血淤滞”的中医核心病机^[1], 选择白术、黄连、防风、乌梅等四味中药配伍组方, 达到健脾益气、清热燥湿、疏肝止泻之功效。愈肠颗粒在临床应用 20 余年, 治疗效果显著, 安全性好, 且价格低廉, 深受患者欢迎。为了对愈肠颗粒进行规范化的新药开发研究, 本研究在保留愈肠颗粒原处方水提醇沉工艺的基础上, 提取采用正交试验设计法^[2], 以愈肠颗粒中的有效成分白术内酯 I、小檗碱的含量及浸膏得率为考察指标, 对提取时间、溶媒用量、醇

沉浓度、提取次数等因素进行考察^[3], 以优化提取工艺参数, 提高愈肠颗粒的提取效率。

1 仪器和试剂

LC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津制作所); MV-2201 紫外分光光度仪(日本岛津制作所); TC-15 套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂); 旋转蒸发仪(巩义市英峪予华仪器厂); R201D 恒温水浴锅(上海大研仪器有限公司); 数显式电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂); 循环水式多用真空泵 SHB-III A (上海豫康科教仪器设备有限公司); 101A-2 型干燥箱(上海实验仪器总厂); AG285 十万分之一电子分析天平(瑞士 MettlerToledo 公司); SB100D 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL-16B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

小檗碱对照品(纯度 > 99.8%, 批号: 110713-201212, 中国食品药品检定研究院); 白术内酯 I 对

[基金项目] 上海市科委科技支撑项目(16401901900); 上海市人才发展基金(201658); 天然药物活性组分与药效国家重点实验室开放课题(SKLNMF201612)

[作者简介] 邵雪庆, 药师, 在职硕士研究生, Email: 13052199821@163.com

[通讯作者] 刘继勇, 博士, 副主任药师, 研究方向: 药物新型给药系统, Email: liujiyong999@126.com

照品(纯度>99.9%,批号:111975-201501,中国食品药品检定研究院)。防风(批号:2016081207,上海德华国药制品有限公司);黄连(批号:2016080901,上海华鹰药业有限公司);制乌梅(批号:2016103104,上海德华国药制品有限公司);白术(批号:1702137,上海雷允上中药饮片)。甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司);其他试剂均为分析纯;水为双蒸水。

2 方法和结果

2.1 提取工艺条件与考察方案

以愈肠颗粒处方药材提取浸膏中白术内酯 I、小檗碱的含量及浸膏得率作为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计表,考察溶媒用量、提取时间、提取次数、醇沉浓度等因素^[4],优选出最佳的提取工艺。因素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

水平	A 因素 (溶媒用量,倍)	B 因素 (提取时间, t/h)	C 因素 (提取次数,次)	D 因素 (醇沉浓度,%)
1	6	1.0	1	60
2	8	1.5	2	70
3	10	2.0	3	80

2.2 浸膏得率的测定

按处方量平行称取 9 份处方药材,每份 360 g,根据正交试验设计安排表(表 2)进行试验。提取液经水提醇沉处理,滤液回收乙醇,得到相对密度为 1:(1.25~1.30)(50~60 °C)的稠膏,再把稠膏置于烘箱中干燥至恒重,干燥温度为 60 °C,得到提取物干浸膏。按公式[干浸膏得率=(W_1/W)×100%]计算干浸膏得率^[5]。其中, W_1 是提取液的干浸膏质量; W 是每份药材的质量。

2.3 浸膏中白术内酯 I、小檗碱的含量测定

2.3.1 色谱条件

白术内酯 I 色谱柱:Hypersil BDS C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.3%三乙胺溶液(用磷酸调至 pH=3)(75:25);流速:1.0 ml/min;柱温:25 °C;检测波长:265 nm;进样量:20 μ l^[6]。

小檗碱色谱柱:Hypersil BDS C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.3%三乙胺溶液(用磷酸调至 pH=3)(40:60);流速:1.0 ml/min;柱温:25 °C;检测波长:265 nm;进样量:20 μ l^[7]。

2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取白术内酯 I 对照品和小檗碱对照品各 5.0 mg,均用甲醇稀释定容至 50 ml,得到白术内酯 I (100 μ g/ml)和小檗碱(100 μ g/ml)对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备

①白术内酯 I:精密量取制备的浸膏 4 ml 置于 10 ml 容量瓶中,加入甲醇 4 ml,超声提取 30 min,加甲醇定容至刻度,摇匀,3 500 r/min 离心 10 min,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。②小檗碱:精密量取制备的浸膏 0.2 ml 置于 20 ml 容量瓶中,加入甲醇 12 ml,超声提取 30 min,加甲醇定容至刻度,摇匀。移取 1 ml 置 10 ml 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.4 标准曲线与线性范围

取对照品储备液,制得系列浓度均为 0.02、0.05、0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μ g/ml 的白术内酯 I 和小檗碱对照品溶液。分别精密吸取 20 μ l 上述对照品溶液注入高效液相色谱仪,按“2.3.1”项下色谱条件测定,并以浓度对峰面积积分值进行线性回归,得线性方程 $Y_{\text{白术内酯 I}} = 93\,392 X + 10\,623 (r=0.999\,9, n=9)$ 。 $Y_{\text{小檗碱}} = 92\,198 X - 8\,440.6 (r=0.999\,9, n=9)$ 。结果表明白术内酯 I、小檗碱均在 0.02~100 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度试验

按色谱条件用低、中、高 3 种浓度(白术内酯 I、小檗碱浓度均为 1.0、10、50 μ g/ml)的对照品溶液进行测定,每种溶液在同 1 d 内测定 6 次,并连续测定 3 d,记录峰面积,计算得白术内酯 I 低、中、高浓度的日内 RSD 分别为 0.70%、0.76% 和 1.70% ($n=6$),日间 RSD 分别为 0.63%、1.14% 和 1.43% ($n=6$);盐酸小檗碱低、中、高浓度的日内 RSD 分别为 0.42%、0.71% 和 1.75% ($n=6$),日间 RSD 分别为 0.62%、1.09% 和 1.46% ($n=6$)。

2.3.6 稳定性试验

取同一批样品溶液,按色谱条件分别于 2、4、6、8、10 h 测定其峰面积,算得白术内酯 I 的 RSD 为 2.86%,小檗碱的 RSD 为 1.47%。表明处理后的样品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.7 重复性试验

取浓度为 10 μ g/ml 的白术内酯 I 和浓度为 10 μ g/ml 的小檗碱对照品溶液,按色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,并计算 RSD 值。白术内酯 I 的 RSD 值为 2.80%,小檗碱的 RSD 值为 1.40%,表明该方法的重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验

①白术内酯 I:精密量取 1 ml 白术内酯样品溶液 3 份于 5 ml EP 管中,并分别加入浓度为 1、5、10 μg/ml 的白术内酯 I 的对照品溶液 1 ml,配成低、中、高 3 种不同浓度的加样待测样品溶液。②小檗碱:精密量取 1 ml 小檗碱样品溶液 3 份于 5 ml EP 管中,分别加入浓度为 5、10、20 μg/ml 的小檗碱对照品溶液 1 ml,配成低、中、高 3 种不同浓度的加样待测样品溶液。按色谱条件进样测定,分别计算白术内酯 I 和小檗碱的加样回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收率的测定结果(n=3)

成分	浓度	样品含量 (m/μg)	加入对照品量 (m/μg)	测定量 (m/μg)	加样回收率 (%)	RSD (%)
白术内酯 I	低	0.031 5	0.010	0.041	98.77	0.18
	中	0.031 5	0.050	0.081	98.95	2.86
	高	0.031 5	0.100	0.133	101.11	0.19
小檗碱	低	0.136 0	0.050	0.188	104.66	1.95
	中	0.136 0	0.100	0.238	102.28	1.48
	高	0.136 0	0.200	0.327	95.41	0.69

2.3.9 样品含量测定

取正交试验各组的供试品溶液,按色谱条件分别测定,记录峰面积,计算各供试品溶液中白术内酯 I 和小檗碱的浓度。

2.4 正交试验分析

依据所得的白术内酯 I 和小檗碱的浸膏得率和含量,按公式[综合评分=(白术内酯 I 含量/最高白术内酯 I 含量)×40%+(小檗碱含量/最高小檗碱含量)×40%+(浸膏得膏率/最高浸膏得膏率)×20%],计算综合评分^[8]。使用正交设计软件助手 II v3.1,结果见表 3。

由表 3 可以得出,各因素对综合评分的影响依次是 C>A>D>B,优化的提取工艺是 A₃B₁C₃D₂。由表 4 方差分析可知,各考察因素对综合评分无显著影响(P>0.05)。考虑到节约资源、提高效率、减少成本,确定最优提取工艺是 A₃B₁C₂D₂,即采用药材质量 10 倍量的水,提取 2 次,每次 1 h,醇沉浓度为 70%。

2.5 验证试验

按上述正交试验处方量称取药材 3 份,按照确

表 3 正交试验分析表

试验号	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D	小檗碱含量 (mg/g)	白术内酯 I 含量 (μg/g)	浸膏得率 (%)	综合评分
1	1	1	1	1	17.924	3.414	27.60	0.571
2	1	2	2	2	23.335	3.604	34.65	0.691
3	1	3	3	3	25.708	4.832	30.45	0.769
4	2	1	2	3	21.405	5.462	35.05	0.768
5	2	2	3	1	20.518	5.266	32.05	0.730
6	2	3	1	2	18.773	4.086	32.95	0.647
7	3	1	3	2	29.328	7.326	37.75	0.992
8	3	2	1	3	26.376	4.920	31.15	0.787
9	3	3	2	1	23.665	3.099	39.35	0.692
K ₁	0.677	0.777	0.668	0.664	$T = \sum_{i=1}^n x_i \quad CT = \frac{T^2}{n}$ $S = \frac{1}{3}(K_1^2 + K_2^2 + K_3^2) - CT$			
K ₂	0.715	0.736	0.717	0.777				
K ₃	0.824	0.703	0.830	0.775				
R	0.147	0.074	0.162	0.113				

表 4 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	P 值
A	0.035	2	1.284	4.46	>0.05
B	0.008	2	0.294	4.46	>0.05
C	0.041	2	1.505	4.46	>0.05
D	0.025	2	0.917	4.46	>0.05
误差	0.110	8			

定的最优提取工艺 A₃B₁C₂D₂ 进行验证试验,即加入处方药材 10 倍量的水,提取 2 次,每次 1 h,提取液合并浓缩,加乙醇,醇沉浓度为 70%,4 ℃ 醇沉 24 h,过滤,滤液回收乙醇,得浸膏,倒入干燥蒸发皿中,再于烘箱(60 ℃)中干燥,直至恒重,得干浸膏。按照“2.3”项下测定浸膏中白术内酯 I、小檗碱的含量,结果见表 5。从验证试验结果分析,该提取工艺的提取效率相对较高,利于节省成本。

表5 验证试验结果

试验号	小檗碱含量 (mg/g)	白术内酯 I 含量 (μ g/g)	干浸膏得率 (%)
1	24.330	4.93	40.30
2	23.746	4.82	39.70
3	24.229	4.80	39.20
RSD (%)	1.290	1.37	1.39

3 讨论

为了保持愈肠颗粒的临床疗效和适应医院制剂规模化生产的要求,本研究保留了原水提醇沉工艺对方剂进行提取,但对提取时间、醇沉浓度、溶媒用量、提取次数等因素进行考察,以优化愈肠颗粒的提取工艺参数,提高提取效率。

由正交试验结果直观分析,得出的提取工艺为 $A_3B_1C_3D_2$,即用处方药材量 8 倍量的水提取 3 次,提取时间为每次 1 h,醇沉浓度为 70%。由方差分析可知,各考察因素对综合评分无显著影响 ($P > 0.05$),考虑到节约资源、提高效率、减少成本,确定最优提取工艺是 $A_3B_1C_2D_2$,即用药材质量 10 倍的水,提取 2 次,每次 1 h,醇沉浓度为 70%。验证试验结果表明,优化的提取工艺提取效率较高。

愈肠颗粒原质量控制标准采用的是薄层色谱法定性鉴别,无定量质控标准。方中以白术为君药,以健脾益气、除湿止泻,缓解本病脾气虚弱的根本病机;伍用具有清热燥湿、厚肠止利的黄连为臣药,以清化肠中湿热,消除致使本病牵延难愈的主要病理因素;伍用防风为佐药,一取其性味辛香,辛能散肝郁,香能醒脾胃,二取其升散之性,使脾气升而浊阴降,三取其“风能胜湿”,具有燥湿止泄之功。乌梅味酸、涩,性平,入肝、脾、肺、大肠经。为清凉收涩之品,具有抗菌、抗过敏,止泄止痢之效,用为使药,也

具有增强免疫的功能。诸药合用,共奏健脾益气、清热燥湿、疏肝止泻之功。因此,本研究建立愈肠颗粒中白术内酯 I、小檗碱等有效成分的 HPLC 含量测定方法,把白术内酯 I、小檗碱含量作为考察指标;考虑到颗粒剂的剂型特点,把浸膏得率也设为考察指标,设定各指标的权重系数。由于 3 个指标数值相差大,单位也不同,需要换算成相同单位,所以采用综合评分方式考察。

【参考文献】

- [1] 杨帝顺,顾清,马晓娟,等.用 RP-HPLC 法测定愈肠颗粒中小檗碱和异白茅苷的含量[J].药学服务与研究,2014,14(6):447-450.
- [2] 顾清,舒薇,杨帝顺,等.正交试验法优选愈肠颗粒的提取工艺[J].药学服务与研究,2013,13(6):463-466.
- [3] 杨庆珍,郑司浩,黄林芳.小檗碱提取方法和药理活性研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(5):519-525.
- [4] 梁志远,甘秀海,吴坤,等.正交试验优选白术中白术内酯 I 和白术内酯 III 提取工艺[J].中成药,2015,37(6):1356-1360.
- [5] 周青青,汪凯莎,陆宽,等.猪苓微粉浸膏提取工艺条件优化[J].西南农业学报,2016,29(6):1404-1407.
- [6] 桂元,薛承斌,詹继东,等.HPLC 法测定参苓健体粉中去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸、白术内酯 III 和白术内酯 I [J].现代药物与临床,2016,31(9):1331-1334.
- [7] 郝乘仪,郭淑英,冯波,等.RP-HPLC 法同时测定芎菊上清丸中绿原酸、盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J].药物分析杂志,2014,(1):193-197.
- [8] 刘瑞江,张业旺,闻崇炜,等.正交试验设计和分析方法研究[J].实验技术与管理,2010,27(9):52-55.
- [9] 贾成友,李微,张传辉,等.基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J].中草药,2016,47(6):917-922.

[收稿日期] 2017-09-20 [修回日期] 2017-11-06

[本文编辑] 李睿旻