

二丁颗粒的水提醇沉工艺研究

张石宇¹, 宋信莉^{2*}, 刘文², 汤瑾¹, 石洪州¹

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵州贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院, 贵州贵阳 550002)

摘要 [目的] 通过水提醇沉法的正交试验优化中药复方制剂二丁颗粒的制备工艺。[方法] 采用药典中的水煎煮法制备中药液, 采用醇沉法进行精制, 以秦皮乙素的含量和出膏率为评价指标, 通过正交试验对浓缩浓度、乙醇浓度、静置时间 3 个因素进行优化。[结果] 影响精制结果的因素为浓缩浓度和乙醇浓度, 由于静置时间没有显著差异, 又从降低成本及节省时间等方面综合考虑, 确定最佳工艺条件为: 浸膏浓缩浓度为 2 g/mL, 乙醇浓度为 80%, 静置时间为 18 h。[结论] 试验结果为二丁颗粒的剂型改良提供了理论依据。

关键词 秦皮乙素; 水提醇沉法; 正交试验; 高效液相色谱法

中图分类号 S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0003-03

Water Extract-alcohol Precipitation Process of Dibutyl Particles

ZHANG Shi-yu¹, SONG Xin-li^{2*}, LIU Wen² et al (1. Guizhou Province Hospital of TCM, Guiyang, Guizhou 550002; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang, Guizhou 550002)

Abstract [Objective] The water extract-alcohol precipitation process of dibutyl particles were optimized by orthogonal test. [Method] The pharmacopoeia water decoction prepared in solution and alcohol sinking method were adopted to improve the refined. Taking content and extract rate of phenanthrene as the evaluation index, the concentrated sulfate, ethanol concentration and incubation time of alcohol sinking method were optimized by orthogonal test. [Result] The influencing factors of refining the results were enrichment concentration and ethanol concentration. Because there was no significant difference between incubation time, considering cost and save time, the best process conditions were as followed: the extract concentration was 2 g/mL, the ethanol concentration was 80%, and the incubation time was 18 hours. [Conclusion] The results provide reference for 2 d particles reform.

Key words Phenanthrene; Aqueous alcohol sinking method; Orthogonal experiment; High performance liquid chromatography

二丁颗粒是由紫花地丁、蒲公英、板蓝根、半边莲 4 味药材制成的中药复方制剂, 成品性状为棕褐色颗粒; 味甜、微苦或味微甜、微苦(无蔗糖)^[1]; 具清热解毒、利湿退黄的功能, 临床用于热疗病毒、湿热黄疸、外感风热、咽喉肿痛等的治疗^[2-3]。二丁颗粒收载于《中国药典》2015 版 I 部。随着二丁颗粒应用范围的不断扩大, 人们对其工艺进行研究十分必要。目前, 学者们对二丁颗粒的纯化工艺研究较少, 在制备工艺方面, 用水煎煮后直接浓缩加辅料制成颗粒, 使得服用量较大。二丁颗粒主要测定方中紫花地丁中秦皮乙素的含量, 笔者以此作为方中的质量控制标准, 采用水提醇沉方法对二丁颗粒进行了准备, 并通过正交试验对二丁颗粒的制备工艺条件进行了优化, 旨在为二丁颗粒的剂型改良提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂。 WAT-GZ050926CWJ 型 WATERS 高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司); Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm, 5 μm); SK8210HP 型超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); DZF-6210 真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); AE240 微量分析天平(上海梅特勒仪器有限公司); YP10002 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司)。甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20130410); 乙醇(重庆川东化工有限公司, 批号: 20121001); 95% 乙醇(重庆川东化工有限公司, 批号: 20130410); 乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20130406); 哇哈哈

纯净水。

1.1.2 药材。 紫花地丁(中国亳州市京皖中药饮片厂, 批号: 皖 20150145)、蒲公英(安徽泰源中药饮片有限公司, 批号: 皖 20160272)、板蓝根(中国亳州市京皖中药饮片厂, 批号: 皖 20100145)、半边莲(中国亳州市京皖中药饮片厂, 批号: 皖 20150145)、秦皮乙素(中国药品生物制品检定所, 批号: 110741-200506)。根据文献^[4] 高效液相色谱法测定紫花地丁中秦皮乙素的含量, 对紫花地丁进行含量测定, 得出安徽亳州的紫花地丁符合药典标准。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备。

1.2.1.1 对照品溶液的制备。 取秦皮乙素对照品适量, 精密称定, 加入甲醇制成浓度为 306 μg/mL 的溶液, 即得对照品溶液。

1.2.1.2 二丁颗粒浸膏粉的制备。 取紫花地丁、半边莲、蒲公英、板蓝根各 25 g, 加水煎煮 2 次, 第 1 次 2.0 h, 第 2 次 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 浓缩, 减压干燥, 直至恒重即得干浸膏, 将干浸膏粉研过 100 目筛, 即得浸膏粉。

1.2.1.3 供试品溶液的制备。 取“1.2.1.2”浸膏粉 0.14 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 称定质量, 超声处理(频率 50 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

1.2.1.4 阴性对照品溶液的制备。 按照“1.2.1.2”方法制备缺紫花地丁的浸膏粉, 取 0.14 g, 再按“1.2.1.3”方法制备阴性对照品溶液。

1.2.2 色谱条件。 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(25: 75: 0.375); 检测波长为 353 nm; 柱温为 25 °C; 流速 1.0 mL/min;

作者简介 张石宇(1987—), 女, 贵州遵义人, 药师, 硕士, 从事中药新技术与新制剂研究。* 通讯作者, 副教授, 硕士, 从事中药新技术与新制剂研究。

收稿日期 2017-09-08

进样量10 μL 。理论塔板数以秦皮乙素计不低于3 000。

1.2.3 方法学考察。

1.2.3.1 标准曲线的绘制。分别精密吸取“1.2.1.1”对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL置于10 mL容量瓶中,用甲醇定容,取10 μL 注入液相色谱仪,按“1.2.2”色谱条件进行测定,以峰面积(y)为纵坐标、对照品溶液浓度(x)为横坐标绘制标准曲线。

1.2.3.2 精密度试验。精密吸取10 μL 同一浓度(30.60 mg/mL)的秦皮乙素对照品溶液,注入高效液相色谱仪中测定峰面积,重复进样6次,按照“1.2.2”色谱条件进行分析。

1.2.3.3 稳定性试验。精密吸取10 mL供试品溶液,室温下放置,分别于0、2、4、6、8、10、12 h各取10 μL 注入高效液相色谱仪中测定峰面积。

1.2.3.4 重复性试验。按“1.2.1.3”方法制备6批样品溶液,分别进样,测定峰面积。

1.2.3.5 阴性试验。分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照液各10 μL 进行高效液相色谱分析。

1.2.3.6 加样回收率试验。采用加样回收法,精密称取二丁颗粒干浸膏粉约0.08 g(相当于164 μg 秦皮乙素)6份,分别精密加入0.54 mL标准品溶液,浓度为306 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (相当于165.24 μg 秦皮乙素标准品),加入25 mL甲醇,称重,超声处理(频率50 kHz)30 min,放冷,补足损失的质量,滤过,制备得6份供试品溶液,各吸取供试品溶液10 μL 注入色谱仪中测定。

1.2.4 二丁颗粒的纯化工艺研究。

1.2.4.1 未精制前二丁颗粒的含量测定。按“1.2.1.2”的方法平行制备3份浸膏粉,再按“1.2.1.3”的方法制备得供试品溶液。分别取10 μL 供试品与对照品注入液相色谱仪,按“1.2.2”色谱条件测定秦皮乙素含量。同时按“1.2.1.2”的方法平行制备3份浸膏粉,测定浸膏率。

1.2.4.2 纯化工艺的正交试验。采用正交法优选秦皮乙素含量高时的醇沉条件,设置3因素3水平正交考察,以秦皮乙素的含量为评价指标,对二丁颗粒纯化工艺进行探讨。因素与水平见表1。

表1 二丁颗粒纯化工艺考察因素与水平

Table 1 Factors and level for affecting the purification process of dibutyl particles

水平 Level	浸膏浓缩浓度(A) Concentrated concentration of extract g/mL	乙醇浓度(B) Ethanol concentration %	静置时间(C) Standing time//h	空白(D) Blank
1	1.0	60	18	
2	1.5	70	24	
3	2.0	80	30	

1.2.4.3 二丁颗粒的精制。以样品溶液中秦皮乙素含量和出膏率的综合值作为评价指标进行综合分析,用水提醇沉法对中药复方二丁颗粒进行精制。二丁颗粒纯化浸膏粉的制备:取紫花地丁、半边莲、蒲公英、板蓝根各12.5 g,加水煎煮

2次,第1次2.0 h,第2次1.5 h,合并煎液,滤过;取续滤液,根据精制试验正交表和因素水平表,浓缩,待浓缩液冷至室温,慢慢加入乙醇到浓缩液中,边加边搅拌,密封,于3~5 $^{\circ}\text{C}$ 静置冷藏,取出分离除去沉淀,滤液置于水浴锅上蒸发至干,减压干燥即得干浸膏,将干浸膏粉碎过100目筛,即得浸膏粉。供试品溶液的制备:取0.1 g纯化后的二丁颗粒浸膏粉,按“1.2.1.3”的方法制备,即得供试品溶液。对照品溶液的制备:按“1.2.1.1”的方法制备浓度为15.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。取上述所得样品各10 μL ,注入液相色谱仪,按“1.2.2”色谱条件测定秦皮乙素含量。

2 结果与分析

2.1 方法学的考察

2.1.1 标准曲线和线性范围。以峰面积(y)为纵坐标、对照品溶液浓度(x)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 34\ 752x - 17\ 057$, $r = 0.999\ 7$,表明对照品溶液浓度为6.12~30.60 mg/mL时线性关系良好。

2.1.2 精密度。重复进样6次,峰面积标准偏差均小于2.0%,相对标准偏差为0.67%,表明精密度良好。

2.1.3 稳定性。相对标准偏差为1.17%,小于3.00%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.1.4 重复性。相对标准偏差为1.41%,小于3.00%,表明试验重复性较好,方法可靠。

2.1.5 阴性试验。结果表明,在秦皮乙素的保留时间处无色谱峰,说明对测定无干扰。秦皮乙素对照品、二丁颗粒阴性对照品和二丁颗粒供试品的HPLC图谱分别见图1、2、3。

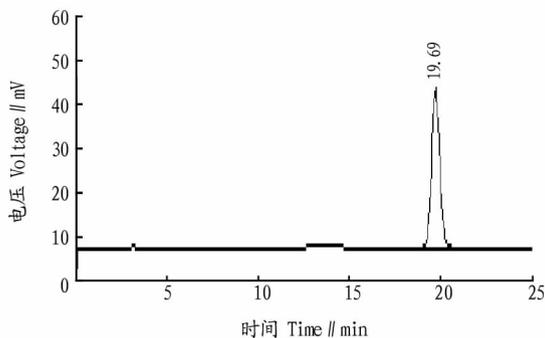


图1 秦皮乙素对照品的HPLC图谱

Fig.1 HPLC map for phenanthrene reference substance

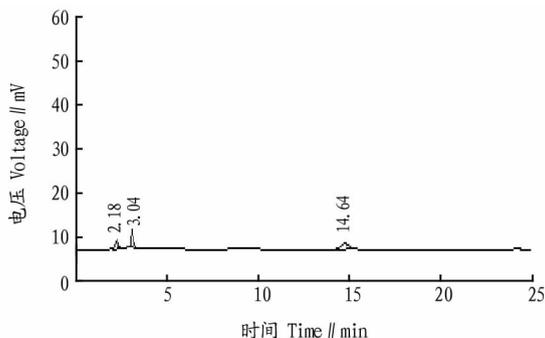


图2 二丁颗粒阴性对照品的HPLC图谱

Fig.2 HPLC map for dibutyl particles negative reference substance

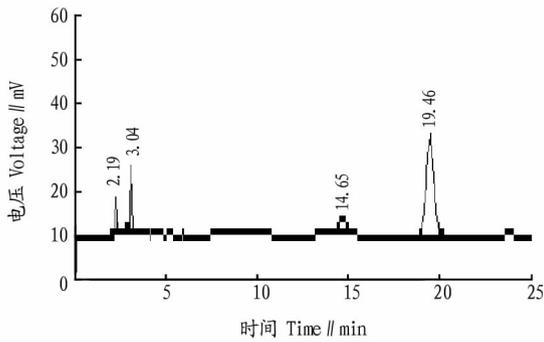


图3 二丁颗粒供试品的 HPLC 图谱

Fig.3 HPLC map for dibutyl particles granules for the test

2.1.6 加标回收率试验结果。由表 2 可知,平均回收率为 102.28%,相对标准偏差为 1.52%,表明该方法具有良好的

回收率。

2.2 二丁颗粒的纯化工艺研究

2.2.1 未精制前二丁颗粒的含量测定。由表 3 可知,未精制的二丁颗粒浸膏粉中秦皮乙素的含量为 2.049 mg/g,相对标准偏差为 2.40%。由表 4 可知,未精制的二丁颗粒的浸膏得率为 21.4009%,相对标准偏差为 0.68%。

2.2.2 纯化工艺的正交试验优化。由表 5 和方差分析结果可知,影响精制结果的因素为浓缩浓度(A)和乙醇浓度(B),当试验为 A_3B_3 时,即浸膏浓缩浓度为 2 g/mL、乙醇浓度为 80%时,秦皮乙素的平均含量最高,浸膏出膏率最低。由于 C 没有显著性差异,从降低成本及节约时间等综合考虑,最佳工艺条件定为 $A_3B_3C_1$,即浸膏浓缩浓度为 2 g/mL、乙醇浓度为 80%、静置时间为 18 h。

表 2 秦皮乙素加样回收率试验结果

Table 2 Test results of sample loading recovery of phenanthrene

浸膏量 Amount of extract//g	样品含量 Sample content// μg	加入量 Adding amount μg	标准品实测 Standard measurement// μg	回收率 Recovery rate//%	平均回收率 Average recovery rate//%	相对标准偏差 Relative standard deviation//%
0.080 8	165.76	165.24	172.24	104.24	102.28	1.52
0.080 6	165.35	165.24	164.90	99.79		
0.080 8	165.76	165.24	170.99	103.48		
0.080 2	164.53	165.24	168.22	101.80		
0.080 4	164.94	165.24	169.56	102.61		
0.080 6	165.35	165.24	168.15	101.76		

表 3 未精制的二丁颗粒浸膏粉中秦皮乙素的含量

Table 3 The content of phenanthrene in extracts of unrefined dibutyl particles

样品 Samples	取样量 Sampling volume//g	峰面积 Peak area	秦皮乙素含量 Content of Phenanthrene//mg/g	平均含量 Average content//mg/g	相对标准偏差 Relative standard deviation//%
1	0.141 5	430 793	2.095	2.049	2.40
2	0.140 2	406 888	1.997		
3	0.141 5	422 410	2.055		

表 4 未精制的二丁颗粒的浸膏得率

Table 4 The yield of unrefined dibutyl particles

样品 Samples	生药量 Amount of medicine//g	恒重后得干浸膏重 Constant weight after dry extract weight//g	出膏率 The amount of cream//%	平均出膏率 Average rate of cream//%	相对标准偏差 Relative standard deviation//%
1	100	21.495 6	21.495 6	21.400 9	0.68
2	100	21.233 2	21.233 2		
3	100	21.473 9	21.473 9		

表 5 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案与结果Table 5 $L_9(3^4)$ orthogonal experimental arrangements and results

试验号 Test No.	因素 Factors				秦皮乙素含量 Content of phenanthrene//mg/g	干膏率 Dry cream rate//%	综合值 Comprehensive value//%
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	3.009	17.11	0
2	1	2	2	2	3.436	15.68	18.5
3	1	3	3	3	3.936	13.56	43.8
4	2	1	2	3	3.380	16.23	12.7
5	2	2	3	1	3.954	12.90	49.7
6	2	3	1	2	4.936	11.13	80.4
7	3	1	3	2	4.011	12.40	54.8
8	3	2	1	3	3.660	9.66	72.5
9	3	3	2	1	4.290	8.75	89.8
r_1	20.767	22.500	50.967	46.500			
r_2	47.600	46.900	40.333	51.233			
r_3	72.367	71.333	49.433	43.000			
R	51.600	48.833	10.634	8.233			

墙面绿化中应用十分广泛。

(10) 旧世界温带分布属及其变型。共 53 属, 占温带分布属的 21.8%, 主要有丁香属 (*Syringa*)、萱草属 (*Heimerocalis*)、侧金盏花属 (*Adonis*) 等。

(11) 温带亚洲分布属。共 11 属, 占温带分布属的 4.5%, 主要有杏属 (*Armeniaca*)、锦鸡儿属 (*Caragana*)、马兰属 (*Kalimeris*) 等。

(12) 地中海区、西亚至中亚分布属及其变型。共 6 属, 占温带分布属的 2.5%, 有牻牛儿苗属 (*Erodium*)、甘草属 (*Glycyrrhiza*)、薰衣草属 (*Lavandula*) 等。

(13) 中亚东部分布。仅 1 属, 为沙蓬属 (*Agriophyllum*)。

(14) 东亚分布属及其变型。共 8 属, 占温带分布属的 3.3%, 其中中国 - 喜马拉雅 1 属, 中国 - 日本分布 12 属。既有观赏植物, 如锦带花属 (*Weigela*)、玉簪属 (*Hosta*) 等, 也有药用植物, 如黄檗属 (*Phellodendron*)、紫苏属 (*Perilla*) 等。

(15) 中国特有属。共 3 属, 分别为银杏属 (*Ginkgo*)、文冠果属 (*Xanthoceras*) 和槭叶草属 (*Mukdenia*)。

3 结论

通过对吉林农业大学校园内种子植物的调查以及种子植物区系的统计与分析, 该校园种子植物区系特征如下:

(1) 植物多样性较丰富, 共有种子植物 95 科, 358 属, 514 种, 2 亚种, 38 变种, 2 变型。与国内其他高校, 尤其是北方高校相比, 校园植物多样性丰富, 在全国高校中位于中上水平。

(2) 种子植物分布区类型多样, 包含中国种子植物区系分布型属的 15 个类型和 14 个变型。

(3) 属种系数相对较高, 为 62.92%, 说明生境较单一, 这与校园内人工栽培植物多密切相关。

(上接第 5 页)

3 结论与讨论

中药复方提取效果直接关系到产品的质量和疗效, 选择评价提取工艺优劣的评价指标是研究工作中的重要问题, 合理的提取工艺评价指标应该是提取的有效成分质和量的代表, 也是提取物临床作用性质和强度的代表^[5]。该研究中, 方法学考察是参照 2015 版药典一部中二丁颗粒的含量测定法所建立。结果表明, 秦皮乙素在浓度为 6.12 ~ 30.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时具有良好的线性关系, 相关系数 $r = 0.9997$; 平均回收率为 102.28%; 样品溶液在 12 h 内保持稳定, 相对标准偏差为 1.17%。该法稳定, 为二丁颗粒制备工艺优选提供了依据。

选择适宜密度的醇沉乙醇浓度和浸膏初始密度对醇沉的效果有重要影响, 若密度或浓度过高, 因水煮液中含有较

(4) 吉林农业大学种子植物区系具有鲜明的温带性质。科级水平上, 温带分布科占全部科数的 45.3%, 而热带分布科占全部科数的 52.8%, 热带分布成分高于温带分布成分; 但在属级水平上, 温带和热带分布属分别占全部属数的 67.9% 和 19.8%, 温带分布属占有绝对明显的优势。表明本区系以温带成分为主, 热带成分也较丰富, 主要来源于校园栽培植物。

(5) 在校园植物的绿化建设中, 丰富植物多样性, 合理进行园林植物配置, 改善校园生态环境, 需要考虑引种植物的适应能力, 使经济效益和生态效益互相协调。

参考文献

- [1] 吴征镒, 孙航, 周浙昆, 等. 中国种子植物区系地理[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [2] 车生泉, 王云, 林源祥, 等. 长春净月潭森林公园自然景观资源生态评价[J]. 上海农学院学报, 1999, 17(3): 189 - 194.
- [3] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志: 1 ~ 80 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [5] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴: 1 ~ 5 册[M]. 北京: 科学出版社, 1972.
- [6] 吴征镒, 周浙昆, 孙航, 等. 种子植物分布区类型及其起源和分化[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006.
- [7] 杨晓杰, 李宝才. 齐齐哈尔大学校园植物名录[J]. 高师理科学刊, 2006, 26(2): 74 - 77, 109.
- [8] 丁圣彦, 冯贵香, 李黎. 河南大学校园植物区系初步分析[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2002, 32(3): 51 - 54.
- [9] 朱亮, 付勋章, 柯文山, 等. 湖北大学校园种子植物区系初步分析[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2012, 34(2): 193 - 197.
- [10] 字发, 彭黎立, 张登萍, 等. 西南大学校园种子植物区系组成及特征分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2010, 35(3): 156 - 161.
- [11] 张永夏, 胡学强, 洪锐沙, 等. 深圳大学校园维管植物调查研究[J]. 生物学杂志, 2007, 24(4): 70 - 72, 76.
- [12] 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 等. 中国被子植物科属综论[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

多的糖类, 易包裹药液, 可造成有效成分损失; 若浓度或密度过低, 则药液量较大, 需消耗大量乙醇, 延长工序时间, 有效成分也易被破坏^[6]。该研究通过正交试验筛选出最佳的浓缩浓度、乙醇浓度和静止时间, 对二丁颗粒进行精制, 为后期二丁颗粒的制备工艺奠定了基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 435.
- [2] 贾红慧, 袁洁, 勾惊, 等. 二丁颗粒的抑菌抗炎和免疫调节作用[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(5): 453 - 456.
- [3] 葛林, 李艳. 二丁颗粒治疗急性咽喉炎肺胃实热证的疗效观察[J]. 陕西中医, 2010, 31(9): 1125 - 1126.
- [4] 陈胡兰, 汤沛然, 张梅, 等. 高效液相色谱法测定紫花地丁中秦皮乙素的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2007, 30(3): 57 - 60.
- [5] 谢秀琼. 对中药制剂工艺研究评价指标的浅见[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 197 - 198.
- [6] 包汝波, 崔正华, 宋宏骞. 养阴清肺片的水提醇沉工艺研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(11): 19 - 21.