

秦艽中栝楼酸提取工艺优化和含量测定方法建立

丁金有, 余红*, 龚平双

(上饶市检验检测认证院, 上饶 334000)

摘要: **目的** 通过建立秦艽中栝楼酸提取工艺和含量测定方法, 优选秦艽的炮制工艺。**方法** 本研究采用超声辅助法提取秦艽中的栝楼酸, 并通过 HPLC-ELSD 的方法测定 4 种炮制秦艽饮片种栝楼酸的含量。**结果** 超声提取秦艽中栝楼酸的最佳工艺条件为: 乙醇体积分数 75%、超声时间为 45 min、料液比为 1:10、超声温度为 30°C 时, 栝楼酸的得率最高为 3.40 mg/g。**结论** 建立的栝楼酸提取工艺和含量测定方法重复性好、稳定可靠, 可为优选秦艽饮片的炮制工艺提供参考。

关键词: 秦艽; 栝楼酸; 超声提取法; 正交试验; 含量测定

Optimization of extraction process and establishment of content determination method for roburic acid in *Gentiana macrophylla*

DING Jin-You, YU Hong*, GONG Ping-Shuang

(Shangrao Inspection and Testing Certification Institute, Shangrao 334000, China)

ABSTRACT: Objective To establish an extraction process and content determination method for quercetin in *Gentiana macrophylla*, and optimize the processing technology of *Gentiana macrophylla*. **Methods** This study used ultrasound assisted extraction to extract quercetin from *Gentiana macrophylla*, and determined the content of quercetin in four processed *Gentiana macrophylla* decoction pieces by HPLC-ELSD. **Results** The optimal process conditions for ultrasonic extraction of quercetin from *Gentiana macrophylla* are: ethanol volume fraction of 75%, ultrasonic time of 45 minutes, solid-liquid ratio of 1:10, and ultrasonic temperature of 30°C. The highest yield of quercetin is 3.40 mg/g. **Conclusion** The established extraction process and content determination method for quercetin galls have good repeatability, stability, and reliability, which can provide reference for optimizing the processing technology of *Gentiana macrophylla* decoction pieces.

KEY WORDS: *Gentiana macrophylla*; roburic acid; ultrasound extraction method; orthogonal test; content determination

0 引言

秦艽为龙胆科植物秦艽 (*Gentiana macrophylla* Pall.)、麻花秦艽 (*Gentiana straminea* Maxim.)、粗茎秦艽 (*Gentiana*

crassicaulis Duthie ex Burk.) 或小秦艽 (*Gentiana dahurica* Fisch.) 的干燥根^[1]。秦艽最先记载于《神农本草经》，被列为中品，为祛风湿清热之首药，风药中之润剂。中医使用秦艽根入药，功能与主治为祛风湿，清湿热，止痹痛，退虚热^[1]。常用于治疗

基金项目：江西省药品监督管理局科研项目（2022JS21）

Fund: Scientific Research Project of Jiangxi Provincial Drug Administration (2022JS21)

*通信作者：余红，副主任药师，研究方向为药物分析。E-mail: 925299174@qq.com

*Corresponding author: YU Hong, Deputy Chief Pharmacist, Shangrao Inspection and Testing Certification Institute, Shangrao 334000, China. E-mail: 925299174@qq.com

风湿痹痛, 中风半身不遂, 筋脉拘挛, 骨节酸痛, 湿热黄疸, 骨蒸潮热, 小儿疳积发热^[1]。

秦艽含有多种活性成分, 具有抗炎症、抗氧化等作用, 是中医临床高频使用药物^[2-6], 栝瘿酸是秦艽中专属成分。本文采用 HPLC-ELSD 法测定栝瘿酸含量, 对其提取方法进行考察, 通过单因素考察提取溶剂和提取方法, 再以料液比、提取时间和提取次数为因数水平, 以浸出物、栝瘿酸含量指标综合评价, 采用正交试验法优选栝瘿酸的最佳提取方案, 并通过方法考察建立栝瘿酸的 HPLC-ELSD 测定方法, 最后通过对比不同炮制方法的秦艽进行验证。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 有限公司)、Agilent Technologies ELSD 检测器 (美国 Agilent 有限公司)、Sartorius BSA124S 电子天平 (德国 Sartorius)、赛多利斯 MSE125P-ICE-DU 型电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司北京)。

1.2 试药

栝瘿酸对照品为中国食品药品检定研究院提供, 批号: 111864-201603, 含量以 100%。

甲醇 (4 L/瓶, 国药集团化学试剂有限公司)、乙腈 (4 L/瓶, 国药集团化学试剂有限公司) 均为色谱级, 其余试剂均为分析纯。超纯水自制。秦艽饮片试样: 36 批秦艽饮片 (购买), 生产单位: 江西信键药业有限公司; 产地: 甘肃。鉴定人员: 盛晓静, 九江市检验检测中心, 副主任中药师; 陈雪华, 江西信键药业有限公司, 执业中药师。

1.3 色谱条件

采用 ThermoScientifica BetasilTM-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-水 (6:40) 为流动相; 流速为 1.0 mL/min; 柱温 30°C; 用 Agilent Technologies ELSD 检测器 (美国 Agilent 有限公司) 检测。

1.4 溶液的制备

1.4.1 栝瘿酸标准溶液储备液的制备

精密称取栝瘿酸对照品 14.51 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得栝瘿酸标准溶液储备液。

1.4.2 标准曲线溶液制备

精密量取栝瘿酸标准溶液储备液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.5 mL 分别置于 6 个 5 mL 量瓶中, 摇匀, 即得标准曲线各浓度溶液。

1.4.3 供试品溶液的制备

称取本品细粉 (过五号筛) 2.5 g, 置于 150 mL 锥形瓶中, 加 75% 乙醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 (功率 360 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 75% 乙醇补足缺失的质量,

摇匀, 过滤, 作为供试品溶液。

1.5 试验方法

1.5.1 线性关系考察

精密量取栝瘿酸标准溶液储备液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.5 mL 分别置于 6 个 5 mL 量瓶中, 摇匀, 即得标准曲线各浓度溶液。分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪, 按“1.3”项下的色谱条件测定。以质量浓度 (μg/mL) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归分析, 结果显示栝瘿酸的线性回归方程 $Y=378.62X+2.5359$, 线性范围 72.55~725.5 μg/mL, 相关系数 $r^2=0.9995$, 栝瘿酸在浓度范围内与其峰面积呈现良好的线性关系。(栝瘿酸对照品和样品典型液相图谱见图 1~2)。

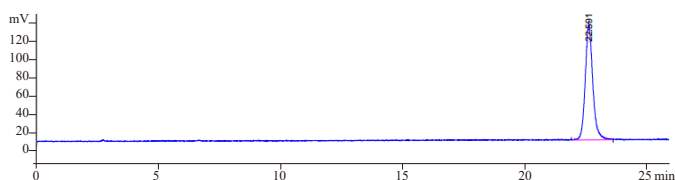


图1 栝瘿酸对照品液相图谱

Fig.1 Liquid phase chromatogram of reference substance of roburic acid

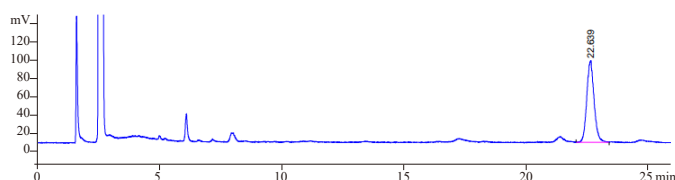


图2 秦艽样品中液相图谱

Fig.2 Liquid phase chromatogram of *Gentiana macrophylla* samples

1.5.2 重复性试验

精密称取本品细粉 (过五号筛) 2.5 g (批号: 2302035, 炒小秦艽), 六份, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液。按“1.3”项下的色谱条件测定, 测得平均含量为 3.40 mg/g, RSD 为 0.3%, 表明该方法重复性良好。

1.5.3 精密度试验

精密吸取栝瘿酸 (浓度为 290.2 μg/mL) 对照品溶液 10 μL, 依试验方法连续进样检测 6 次, 峰面积平均值为 1091.0, RSD ($n=6$) 为 3.0%, 表明仪器精密度良好。

1.5.4 回收率试验

取已知含量的本品供试品溶液 (批号: 2302035, 炒小秦艽, 含栝瘿酸 340 μg/mL), 精密吸取 4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 按含量的 80%、100%、120% 三种浓度分别加入对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL, 分别制备 3 份供试品, 共 9 份, 依试验方法试验, 计算回收率, 结果平均回收率 97.8% ($n=9$), 回收率良好, 适合本品的含量测定。

1.5.5 稳定性试验

取本品约 2.5 g (批号: 2302035, 炒小秦艽), 一份, 按“1.4.3”

项下方法制备供试品溶液。依次在 0、1、2、4、8、12、24 h 进样检测, 每次进样 10 μ L, 依法检测, 结果供试品溶液中栝蒌酸在 24 小时内峰面积 RSD 为 0.4%, 表明供试品溶液在制备后 24 小时内稳定。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

根据文献报道和预实验的结果^[7-11], 实验设置了 A 乙醇体积分数 (45%、60%、75%、90% 及 100%)、B 超声时间 (10、20、30、40、50 min)、C 液料比 (1:5、1:8、1:10、1:15、1:20 g/mL) 和 D 超声温度 (10、20、30、40、50 $^{\circ}$ C) 四个单因素, 设定超声温度 30 $^{\circ}$ C、提取时间 30 min、料液比 1:10 及乙醇体积分数 75%, 固定超声功率 360 W, 分别考察以上因素对秦艽栝蒌酸提取率的影响, 确定各因素的影响和适宜参数范围。

A 乙醇体积分数: 称取同一批供试品, 在液料比为 1:10, 30 $^{\circ}$ C, 提取 30 min, 按乙醇体积分数分别为 45%、60%、75%、90% 及 100% 实验得到栝蒌酸的得率, 结果显示随着乙醇体积分数的增加, 栝蒌酸的得率在增加, 在 75% 时候达到最大值, 随后乙醇体积分数增加, 提取率反而下降。

B 超声提取时间: 称取同一批供试品, 在液料比为 1:10, 30 $^{\circ}$ C, 75% 乙醇, 分别提取 10、20、30、40、50 min, 实验得到栝蒌酸的得率, 结果显示随着提取时间的增加栝蒌酸的提取率逐渐增加, 在 30 min 的时候最大, 而后随着时间的增加提取率反而降低, 可能由于长时间的超声对栝蒌酸的结构有破坏作用。

C 料液比: 称取同一批供试品, 用 75% 乙醇在 30 $^{\circ}$ C 时, 提取 30 min, 按液料比分别为 1:5、1:8、1:10、1:15、1:20 实验得到栝蒌酸的得率, 结果显示随着溶剂的增加提取率先增加后趋于平缓呈下降趋势, 在 1:10 的时候趋于饱和。

D 超声提取温度: 称取同一批供试品, 用液料比为 1:10 的 75% 乙醇, 提取 30 min, 超声提取温度分别 10、20、30、40、50 $^{\circ}$ C 时候得到栝蒌酸的得率, 结果显示随着温度的增加提取率先增加后呈下降趋势, 在温度为 30 $^{\circ}$ C 时候达到最大值, 而后呈下降趋势, 可能由于随着温度增加, 栝蒌酸的结构被破坏而导致提取率下降。结果见图 3。

本实验以栝蒌酸的提取率为指标, 分别考察单个因素对栝蒌酸提取率的影响, 初步确定每个因素中的较好水平。

2.2 正交优化实验设计及结果

在单个因素试验结果的基础上, 利用正交试验的方法设计实验, 选取 A、B、C 和 D 四个考察因素, 采用四因素三水平的正交试验分析方法, 以栝蒌酸得率为指标, 优选出秦艽中栝蒌酸的最佳提取工艺参数, 正交试验的因素水平和结果见表 1~2。

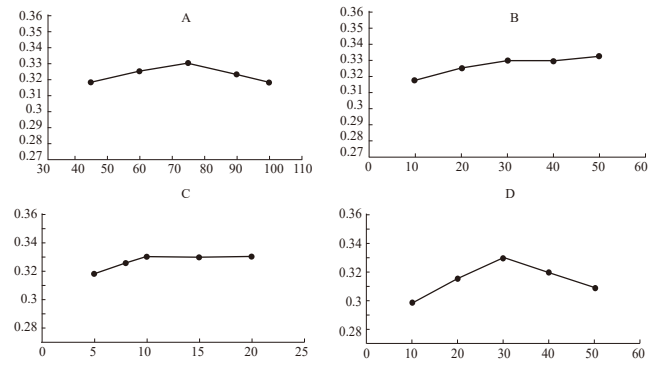


图 3 单因素实验

Fig.3 Single-factor experiment

表 1 因素水平表

Table 1 Factor level table

水平	A 乙醇体积分数 (%)	B 超声提取时间 (min)	C 料液比 (g/mL)	D 超声提取温度 ($^{\circ}$ C)
1	60	20	1:8	20
2	75	30	1:10	30
3	90	45	1:15	40

表 2 正交试验安排与结果

Table 2 Orthogonal experimental arrangement and results

试验号	A 乙醇体积分数 (%)	B 超声提取时间 (分钟)	C 料液比 (g/mL)	D 超声提取温度 ($^{\circ}$ C)	栝蒌酸含量 (mg/g)
1	1	1	1	1	2.93
2	1	2	2	2	3.18
3	1	3	3	3	3.15
4	2	1	2	3	3.18
5	2	2	3	1	3.40
6	2	3	1	2	3.29
7	3	1	3	2	2.95
8	3	2	1	3	3.09
9	3	3	2	1	3.18
K1	9.26	9.06	9.31	9.41	
K2	9.77	9.57	9.54	9.56	
K3	9.22	9.62	9.40	9.42	
R	0.55	0.56	0.23	0.15	

通过综合分析, 秦艽中栝蒌酸含量的影响程度大小为: B>A>C>D, 因此本实验优化出的最佳工艺条件为: 乙醇体积分数 75%、超声时间为 45 min、料液比为 1:10、超声温度为 30 $^{\circ}$ C。在此条件下秦艽中栝蒌酸的含量达到 3.40 mg/g, 高于传统的水提醇沉法提取率。

2.3 样品测定结果

取不同产地采集的秦艽、小秦艽、麻花秦艽药材和通过四种炮制加工的秦艽按照“1.4.3”项方法制备供试品溶液, 每批药材平行制备 3 份溶液在上述色谱条件下各进样 10 μ L 进行分

析记录色谱峰面积,以峰面积按外标法计算栲瘿酸成分的含量,结果见表3。

表3 样品中栲瘿酸成分的含量
Table 3 The content of quercetin in the sample

序号	批号	生产企业	栲瘿酸含量(mg/g)
1	2301078	清炒秦艽	1.39
2	2301079	清炒秦艽	0.85
3	2301080	清炒秦艽	1.14
4	2302003	麸炒秦艽	0.59
5	2302004	麸炒秦艽	0.49
6	2302005	麸炒秦艽	0.62
7	2302006	酒炒秦艽	1.10
8	2302007	酒炒秦艽	0.92
9	2302008	酒炒秦艽	0.98
10	2302009	浸润秦艽	1.52
11	2302010	浸润秦艽	1.51
12	2302011	浸润秦艽	1.51
13	2302012	浸润麻花秦艽	2.48
14	2302013	浸润麻花秦艽	2.48
15	2302014	浸润麻花秦艽	2.26
16	2302015	酒炒麻花秦艽	1.82
17	2302016	酒炒麻花秦艽	1.82
18	2302017	酒炒麻花秦艽	1.97
19	2302018	麸炒麻花秦艽	1.15
20	2302019	麸炒麻花秦艽	1.11
21	2302020	麸炒麻花秦艽	1.06
22	2302021	清炒麻花秦艽	2.36
23	2302022	清炒麻花秦艽	2.14
24	2302023	清炒麻花秦艽	2.14
25	2302024	浸润小秦艽	4.68
26	2302025	浸润小秦艽	4.93
27	2302026	浸润小秦艽	4.43
28	2302027	酒炒小秦艽	3.80
29	2302028	酒炒小秦艽	3.15
30	2302029	酒炒小秦艽	3.05
31	2302030	麸炒小秦艽	2.13
32	2302031	麸炒小秦艽	2.02
33	2302032	麸炒小秦艽	2.69
34	2302033	清炒小秦艽	4.36
35	2302034	清炒小秦艽	4.01
36	2302035	清炒小秦艽	4.42

3 讨论与结论

3.1 栲瘿酸的提取方式

样品分别用水饱和的正丁醇、70%甲醇、75%乙醇、乙酸乙酯进行提取溶剂的考察结果乙醇对栲瘿酸成分的提取效率最

高;经过对不同浓度乙醇提取效率的考察表明用75%乙醇提取时杂质较少分离度好。样品分别用超声波提取10、20、30、40、50 min结果表明40 min可将栲瘿酸成分提取完全。

通过综合分析,选出秦艽中栲瘿酸提取的最佳工艺条件为:乙醇体积分数75%、超声提取时间为45 min、料液比为1:10、超声提取温度为30℃。该提取工艺优于传统的水提醇沉法,本研究为秦艽饮片炮制方法的选择提供了参考。

3.2 结论

本实验结果表明在小秦艽中栲瘿酸含量最高,最高者可达4.93 mg/g。但经过麸炒和酒炒等方法炮制加工后栲瘿酸含量下降很多。清炒炮制后栲瘿酸含量略有下降。提示栲瘿酸对温度较为敏感,在炮制加工时需注意控制好炮制的温度。秦艽中的栲瘿酸在国内外尚无其药理活性研究报道。但其在小秦艽中含量较高,还有待进一步研究。

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: 中国医药科技出版社, 2020: 282.
- [2] 罗书萍, 张玉琴. 秦艽对脑缺血的保护作用及机制研究进展 [J]. 药物研究, 2022, 41(03): 180-182.
- [3] 杨飞霞, 王玉, 夏鹏飞, 等. 秦艽化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2718-2731.
- [4] 蔡秋生, 张志红, 高慧琴. 秦艽药理作用及临床应用研究进展 [J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(06): 55-58.
- [5] 杨文宁, 韩星, 杨海洋, 等. 基于多成分药物代谢的秦艽质控成分遴选研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1897-1902, 1907.
- [6] 聂继红, 张海英, 郭亭亭. 中药秦艽抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(12): 12-14.
- [7] 王丹丹, 卞理, 张雯, 等. 正交试验法改进大黄游离蒽醌提取方法的研究 [J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(02): 42-45.
- [8] 郑姜彬, 陈宝宝, 陈千良, 等. HPLC-ELSD法测定麻花秦艽中4种脂溶性成分的含量 [J]. 药物分析杂质, 2010, 30(05): 787-790.
- [9] 白莎, 倪健, 孔慧, 等. 秦艽的提取工艺研究 [J]. 中成药, 2005, 27(09): 1074-1075.
- [10] 覃新化, 陈娟, 李岩, 等. 正交试验法优选复方益肾利石颗粒的提取工艺 [J]. 中国医药导报, 2022, 19(01): 27-31.
- [11] 杜萌, 寇章妮, 李晓花. 秦艽多糖的超声提取工艺优化 [J]. 中外企业家, 2019, (36): 122.

作者简介

丁金有, 工程师, 研究方向为药物分析和实验室安全管理。
余红, 副主任药师, 研究方向为药物分析。