

文章编号: (2009)04-0299-06

正交试验法优选咽舒宁颗粒剂的提取工艺

罗友华^{1,2}, 程刚¹, 李成付², 杨辉², 黄亦琦²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 厦门市医药研究所, 福建 厦门 361003)

摘要:目的 优选咽舒宁颗粒剂的最佳提取工艺。方法 以提取液中表告依春和哈巴俄苷含量、干膏得率为指标, 用正交试验法, 优选提取工艺条件。结果 最佳提取工艺为: 加8倍药材质量的水, 提取3次, 每次1h。结论 此提取工艺合理可行, 适合工业化生产。

关键词: 药剂学; 提取工艺; 正交试验法; 咽舒宁颗粒剂; 表告依春; 哈巴俄苷

中图分类号: R94 **文献标志码:** A

咽舒宁复方是黄亦琦主任医师临床应用多年的验方, 由板蓝根 (*Radix Isatidis*)、玄参 (*Radix Scrophulariae*)、桔梗 (*Radix Platycodonis*)、甘草 (*Radix et Rhizoma Glycyrrhizae*) 等组成, 能清热解毒、利咽化痰、生津润喉, 治疗急慢性咽喉炎和扁桃体炎疗效显著。为方便患者服用, 将该复方开发为能保持汤剂特点的现代中药颗粒剂, 本文作者对咽舒宁颗粒剂的水提取工艺进行了优选研究。

方中板蓝根为十字花科植物菘蓝 (*Isatis indigotica* Fort.) 的干燥根, 能清热解毒、凉血利咽, 为君药; 玄参为玄参科植物玄参 (*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.) 的干燥根, 能凉血滋阴、泻火解毒, 为臣药。现代研究表明: 表告依春 (epigoitrin) 为板蓝根抗病毒的 代表性有效成分之一, 是反映板蓝根药材及其制剂质量的一个重要指标^[1-2], 哈巴俄苷 (harpagoside) 是玄参有效成分中环烯醚萜苷类的主要成分之一, 具有抗炎、抗乙肝病毒等作用^[3-4]。因此, 本文作者以提取液中表告依春和哈巴俄苷含量、干膏得率为考察指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表, 综合考察提取次数、加水倍数、提取时间等因素对咽舒宁颗粒剂提取效果的影响, 优选出咽舒宁颗粒剂的提取工艺条件。

1 仪器与试药

HPLC 仪(美国 Waters 公司, 配 1525 泵、2487 紫外检测器、Breeze 色谱工作站), SY5200DH 型超声波清洗器(上海声源超声波仪器有限公司), BP-211D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司, 十万分之一)。

板蓝根、玄参、桔梗、甘草等药材(厦门鹭燕制药有限公司, 经鉴定符合 2005 年版《中华人民共和国药典》规定), 表告依春 (111753-200601)、哈巴俄苷 (111730-200604) (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用), 甲醇、乙腈(美国 Tedia 公司, 均为色谱纯), 冰醋酸(汕头市西陇化工厂有限公司)、磷酸(汕头市西陇化工厂有限公司)、三乙胺(国药集团化学试剂有限公司)(均为分析纯), 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 水提取液样品的制备

选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验, 以提取次数 (*A*)、加水倍数 (*B*)、提取时间 (*C*) 为考察因素, 进行 3 因素 3 水平的正交试验, 因素水平见表 1, *D* 为空白列。按咽舒宁颗粒剂的处方比例, 分别称取 1 日剂量的药材 9 份, 按表 2 条件加水煮沸提取, 药液经 75 μm 筛过滤, 即得 1-9 号提取液样品。

收稿日期: 2009-03-30.

基金项目: 厦门市科技局资助项目(Z20084038).

作者简介: 罗友华(1971-), 男(汉族), 福建上杭人, 硕士研究生, 副主任药师, 主要从事中药药剂学研究. Tel. 0592-2050262, E-mail youhualuo@sohu.com.

Table 1 The factors and levels

Level	Factor		
	Times (A)	Multiple (B)	t/h(C)
1	1	8	1
2	2	10	1.5
3	3	12	2

2.2 水提取液样品中表告依春含量的测定

2.2.1 色谱条件

Symmetry-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-磷酸-三乙胺(体积比为 14.0:85.3:0.6:0.1), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 245 nm, 进样量: 10 μL, 柱温: 室温^[2]。

2.2.2 溶液的制备

对照品溶液的制备: 精密称取表告依春对照品 2.48 mg, 置于 25 mL 的量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 99.20 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

供试品溶液的制备: 分别将 1-9 号提取液样品, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得各供试品溶液。

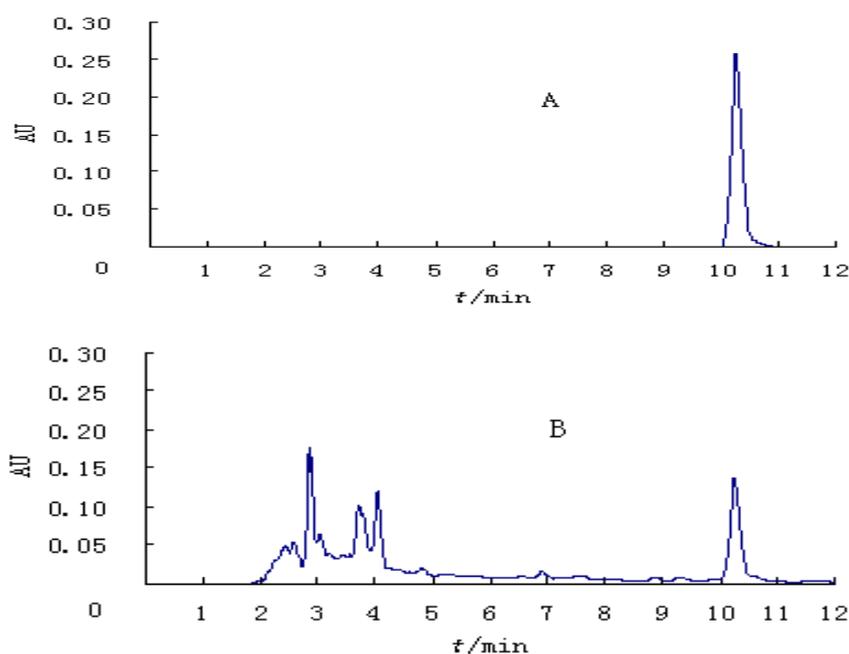
阴性对照溶液的制备: 取不含板蓝根的咽舒宁复方按正交试验表第 9 号条件进行水提取, 药液经 75 μm 筛过滤, 再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得阴性对照溶液。

2.2.3 标准曲线的制备

精密吸取质量浓度为 99.20 mg·L⁻¹ 的表告依春对照品溶液 0.166、0.209、0.250、0.500、1.250、2.500 mL, 分别置于 10 mL 的量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 1.65、2.07、2.48、4.96、12.40、24.80 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 按“2.2.1”条色谱条件进行测定, 以峰面积(A)对对照品质量浓度(ρ)进行回归, 计算回归方程得: $A=1.583 2\rho\times 10^5+1.181 9\times 10^4$, $r=0.999 8$ 。说明表告依春在 0.016 5-0.248 0 μg 内与峰面积成良好的线性关系。

2.2.4 溶液中表告依春含量的测定

分别精密吸取供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.2.1”条色谱条件进行测定, 根据标准曲线方程计算供试品中表告依春的含量, 结果见表 2。对照品、供试品和阴性对照溶液色谱图见图 1。



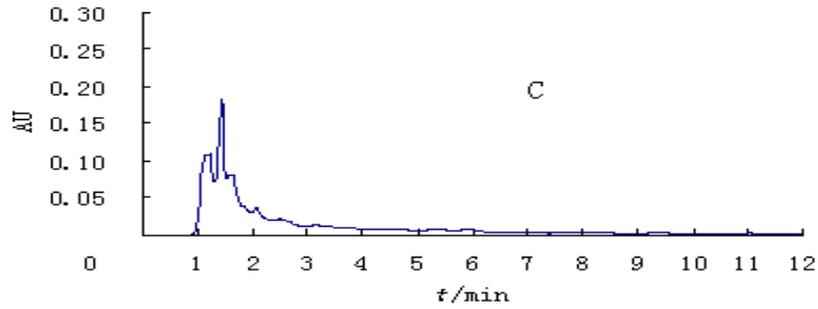


Fig. 1 HPLC spectras of epigoitrin standard (A), test sample (B) and negative sample (C)

2.3 水提取液样品中哈巴俄苷含量的测定

2.3.1 色谱条件

Nova-Pak-C₁₈ 色谱柱(3.9 mm×250 mm, 4 μm), 流动相:乙腈-体积分数为1%的醋酸溶液二元梯度洗脱:0~2.0 min, 乙腈体积分数为20%, 体积分数为1%的醋酸溶液体积分数为80%; 2.1~22.0 min, 乙腈体积分数为20%→50%, 体积分数为1%的醋酸溶液体积分数为80%→50%, 流速:1.0 mL·min⁻¹, 检测波长:278 nm, 进样量:10 μL, 柱温:室温^[5]。

2.3.2 溶液的制备

对照品溶液的制备:精密称取哈巴俄苷对照品 2.20 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加体积分数为30%的甲醇溶液制成 88.0 mg·L⁻¹的对照品溶液。

供试品溶液的制备:分别将 1-9 号样品提取液, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得各供试品溶液。

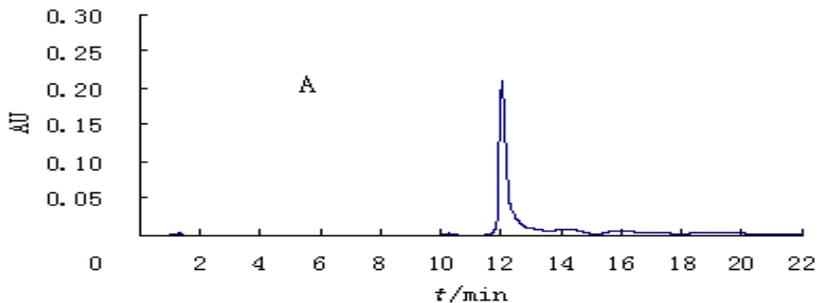
阴性对照溶液的制备:取不含玄参的咽舒宁复方按正交试验表第 9 号条件进行水提取, 药液经 75 μm 筛过滤, 再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得阴性对照溶液。

2.3.3 标准曲线的制备

精密吸取质量浓度为 88.0 mg·L⁻¹的哈巴俄苷对照品溶液 0.5、1.0、2.0、2.5、3.3、5.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用体积分数为 30%的甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 4.40、8.80、17.60、22.00、29.04、44.00 mg·L⁻¹的对照品溶液, 按“2.3.1”条色谱条件进行测定, 以峰面积(A)对对照品质量浓度(ρ)进行回归, 计算回归方程得: $A = 7.750 2 \rho \times 10^4 + 1.454 8 \times 10^4$, $r = 0.999 9$ 。说明哈巴俄苷在 0.044-0.440 μg 内与峰面积成良好的线性关系。

2.3.4 溶液中哈巴俄苷含量的测定

分别精密吸取供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 按“2.3.1”条色谱条件进行测定, 根据标准曲线方程计算供试品中哈巴俄苷的含量, 结果见表 2。对照品、供试品和阴性对照色谱图见图 2。



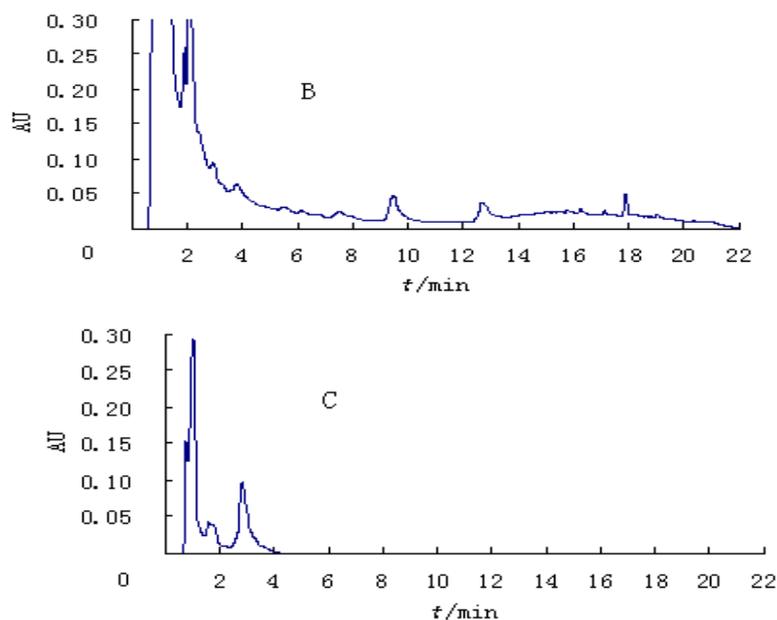


Fig. 2 HPLC spectras of harpagoside standard (A), test sample (B) and negative sample (C)

2.4 干膏得率的测定

分别精密吸取 1-9 号样品液 15 mL, 置已干燥至恒质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 烘箱中干燥 3 h, 移置干燥器中, 放置 30 min, 迅速精密称定质量, 计算各提取液样品的干膏得率, 结果见表 2。

Table 2 Results of the orthogonal test

No.	A	B	C	D	$W_{\text{epigoitrin content}} \times 10^{-3}/\%$	$W_{\text{harpagoside content}} \times 10^{-3}/\%$	$W_{\text{yield of dried extracts}}/\%$
1	1	1	1	1	4.98	1.92	26.39
2	1	2	2	2	6.15	2.02	32.12
3	1	3	3	3	8.06	1.55	36.94
4	2	1	2	3	8.35	5.11	42.18
5	2	2	3	1	7.73	6.24	50.67
6	2	3	1	2	14.78	4.58	46.64
7	3	1	3	2	22.40	7.95	50.42
8	3	2	1	3	19.63	7.56	46.64
9	3	3	2	1	21.28	9.77	52.64
$W_{\text{epigoitrin content}} \times 10^{-3}$							
K_1	6.40	11.91	13.13	11.33			
K_2	10.29	11.17	11.93	14.44			
K_3	21.10	14.71	12.73	12.01			
R	14.70	3.54	1.20	3.11			
$W_{\text{harpagoside content}} \times 10^{-3}$							
K_1	1.83	4.99	4.69	5.98			
K_2	5.31	5.27	5.63	4.85			
K_3	8.43	5.30	5.25	4.74			
R	6.60	0.31	0.94	1.24			
$W_{\text{yield of dried extracts}}$							
K_1	31.8267	39.6633	39.8900	43.2333			
K_2	46.4967	43.1533	42.3233	43.0700			
K_3	49.9000	45.4067	46.0100	41.9200			
R	18.0733	5.7434	6.12	1.3133			

2.5 结果分析

对实验结果采用《中国医学百科全书医学统计学软件包》(第三版)(PEMS3.1)进行统计分析。

由表2直观分析结果可见：以表告依春含量为指标，影响提取效果的因素顺序为： $A>B>C$ ，可推出最佳工艺应为 $A_3B_3C_1$ 。以哈巴俄苷含量为指标，影响提取效果的因素顺序为： $A>B>C$ ，可推出最佳工艺应为 $A_3B_2C_2$ 。以干膏得率为指标，影响提取效果的因素顺序为： $A>C>B$ ，可推出最佳工艺应为 $A_3B_3C_3$ 。

而根据表3方差分析结果表明：分别以表告依春含量、哈巴俄苷含量或干膏得率为指标时，提取次数对提取效果的影响均有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，而加水量、提取时间均无显著性差异($P>0.05$)。以表告依春和哈巴俄苷含量为主要指标，干膏得率为次要指标，初步确定最佳提取工艺为 $A_3B_2C_1$ 。为了节约生产成本，把无统计学差异的 B 因素确定为 B_1 。因此，最后确定咽舒宁颗粒剂的最佳水提取工艺条件为 $A_3B_1C_1$ ，即提取3次，每次加8倍药材质量的水，每次提取1h。

Table 3 Variance analysis results

Error source		SS	MS	F	P
$W_{\text{epigoitrin}}$ content $\times 10^{-3}$	A	0.3	0.2	21.6885	<0.05
	B	0.0	0.0	1.2996	>0.05
	C	0.0	0.0	0.1403	>0.05
	D	0.0	0.0		
$W_{\text{harpagoside}}$ content $\times 10^{-3}$	A	0.1	0.0	23.2459	<0.05
	B	0.0	0.0	0.0616	>0.05
	C	0.0	0.0	0.4836	>0.05
	D	0.0	0.0		
$W_{\text{yield of dried}}$ extracts	A	553.4370	276.7185	180.0367	<0.01
	B	50.2435	25.1217	16.3445	>0.05
	C	56.9670	28.4835	18.5318	>0.05
	D	3.0740	1.5370		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00, F_{0.01}(2, 2)=99.00, f=2$

2.6 最优提取工艺的验证

为进一步考察所优选提取工艺条件的可靠性及稳定性，按咽舒宁颗粒剂复方的处方量分别称取药材3份，按 $A_3B_1C_1$ 最优提取工艺进行验证试验，操作方法同前，结果见表4。

据表4结果显示：本文作者所优选的提取工艺稳定可行，适用于生产。

Table 4 Results of the verification test

No.	$W_{\text{epigoitrin}}$ content $\times 10^{-3}/\%$	$W_{\text{harpagoside}}$ content $\times 10^{-3}/\%$	$W_{\text{yield of dried}}$ extracts $/\%$
1	21.12	7.92	44.23
2	21.37	7.76	45.07
3	19.57	7.93	44.86
Average	20.69	7.87	44.72

3 讨论

a. 许多以板蓝根为原料的中成药如板蓝根颗粒剂、板蓝根注射液、板蓝根片、清开灵注射液、抗病毒口服液等，均以水提取板蓝根中的水溶性成分制成。由于板蓝根水提物的有效指标成分不清楚，文献研究^[1, 6]表明靛蓝、靛玉红不是板蓝根清热解毒或抗病毒的成分，表告依春是板蓝根抗流感病毒的主要有效成分之一。病毒感染在感染性咽炎的发病中起重要作用，据报道^[7]咽炎患者咽部病毒的检出率约为27%。因此本文作者采用板蓝根中具有抗病毒活性的表告依春作为咽舒宁颗粒剂复方优选指标之一。

b. 本文作者采用HPLC法测定咽舒宁颗粒剂水提液中有效指标成分表告依春和哈巴俄苷的含量，

结果显示,各水提液样品色谱图中,在与对照品色谱图中,均分别出现相同保留时间的色谱峰,而阴性对照色谱图均在其相应的保留时间上无干扰,且该方法线性关系良好(表告依春 $r = 0.9998$, 哈巴俄苷 $r = 0.9999$),表明这两种方法的专属性强,可用于咽舒宁颗粒剂水提取工艺优选中对表告依春和哈巴俄苷含量的比较测定。

c.在进行实验结果的方差分析时,曾按表告依春含量、哈巴俄苷含量和干膏得率的权重系数分别为0.3、0.3和0.4进行综合评分统计,结果也表明,提取次数对提取效果有非常显著性影响($P < 0.01$),而加水量、提取时间均无显著性影响($P > 0.05$)。但按文中以各指标分别统计的结果较明确,可以更直观地分析评价各指标对提取效果的单独影响程度。

d.用单一考察指标筛选中药提取工艺条件并不全面,单一指标的优劣并不能完全代表中药制剂整体质量的优劣。因此,本文作者在咽舒宁颗粒剂水提取工艺的优选实验中,采用了三指标评价法,以综合考察提取工艺的优劣,但因中药成分的复杂性,其效果尚需结合药效试验和临床观察进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐丽华, 黄芳, 陈婷, 等. 板蓝根中的抗病毒活性成分[J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 359-360.
- [2] 安益强, 贾晓斌, 袁海建, 等. HPLC 测定板蓝根药材及其制剂中表告依春的含量[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2074-2076.
- [3] 张建春, 朱建美. 玄参的化学成分与药理活性研究进展[J]. 山东医药工业, 2003, 22(1): 25-27.
- [4] 王建华, 谢丽华, 刘洪宇, 等. 玄参不同加工品中哈巴俄苷与肉桂酸的 HPLC 含量测定[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(6): 375-378.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 76-77.
- [6] 李楚源, 曾令杰. 板蓝根研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(3): 51-55.
- [7] 陈意振, 鲁莉萍, 邹波, 等. 应用 PCR 技术检测小儿呼吸道病原体的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 1997, 5(6): 44-45.

Optimization of the extraction technology of Yanshuning granules by orthogonal test method

LUO You-hua^{1,2}, CHENG Gang¹, LI Cheng-fu², YANG Hui², HUANG Yi-qi²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China ;

2. Xiamen Medical Institute, Xiamen 361003, China)

Abstract: Objective To optimize the extraction technology of Yanshuning (traditional Chinese medicine) granules. **Methods** Using the contents of epigoitrin and harpagoside in the extract solution and the yield of the dried extracts as the criteria, orthogonal test method was used to optimize the conditions for the extraction process. **Results** The optimal extraction process for Yanshuning granules was to add 8 times of water to the medicinal herbs, decoct for 3 times and 1 hour each time. **Conclusion** The extraction technology is reasonable, and can be used for industrial production.

Key words: pharmaceutics; extraction technology; orthogonal test method; Yanshuning granule; epigoitrin; harpagoside

(责任编辑 曹霞)