

正交试验优化止咳平喘颗粒处方药材的乙醇提取工艺

殷明阳^{1,2}, 刘毅², 那溪元^{2,3}, 刘素香², 陈常青^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 优选止咳平喘颗粒处方药材的提取工艺。方法 以麻黄碱、连翘酯苷 A 提取率为指标, 以乙醇体积分数、乙醇倍量、提取时间、提取次数为因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对提取工艺进行优选。结果 最佳提取工艺条件为 65%乙醇, 回流提取 2 次, 每次 8 倍量, 每次 1 h。结论 优选的止咳平喘颗粒处方药材提取工艺条件合理、可行。

关键词: 止咳平喘颗粒; 麻黄碱; 连翘酯苷 A; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)10-1208-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.10.006

Optimization of extraction process on Zhike Pingchuang Granula prescription by orthogonal test

YIN Ming-yang^{1,2}, LIU Yi², NA Xi-yuan^{2,3}, LIU Su-xiang², CHEN Chang-qing²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To optimize extraction process on Zhike Pingchuang Granula prescription by orthogonal test. **Methods** With extracting rates of ephedrine and forsythoside A as indexes, meanwhile ethanol concentration, amount of solvent, extraction duration, and extraction times as investigation factors, conditions for extraction process were optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test. **Results** The optimum extraction process conditions were as follows: eight volumes of 60% ethanol and reflux extracting for two times with 1 h for each time. **Conclusion** The optimized extraction technology is reasonable and feasible for Zhike Pingchuang Granula prescription.

Key words: Zhike Pingchuang Granula; ephedrine; forsythoside A; extraction process; orthogonal test

止咳平喘颗粒为医院临床经验方, 由麻黄、地龙、前胡、连翘等中药组成, 具有宣肺平喘、止咳通络的功效, 在治疗小儿过敏性咳嗽方面疗效较好。根据该方的临床适应症及临床需求, 以及各药味主要成分的理化性质及药理作用, 表明该方的主要有效成分均具有醇溶性^[1-2]。本研究以麻黄碱、连翘酯苷 A 提取率为指标, 采用正交试验优选了止咳平喘颗粒处方的最佳提取工艺参数。

1 仪器与材料

安捷伦 1100 系列高效液相色谱仪; AB204-N 型电子分析天平 (Mettler Toledo 公司)。

盐酸麻黄碱对照品 (质量分数 99.7%, 批号 171241-201007) 由中国食品药品检定研究院提供; 连翘酯苷 A 对照品 (批号 79916-77-1, 质量分数 > 98%) 购自成都普兰特生物科技有限公司; 实验用药材均购自安国市同羲中药饮片有限公司, 经天津药物研究院张铁军研究员鉴定, 符合《中国药典》2010 年版一部的规定; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 盐酸麻黄碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250

收稿日期: 2015-08-26

作者简介: 殷明阳 (1989—), 女, 吉林人, 硕士研究生, 研究方向为中药新药开发。Tel: 15822127576 E-mail: ymyxfyy@126.com

*通信作者 陈常青, 男, 研究员。Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjpr.com

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.1%磷酸水溶液 (4 : 96) (每 100 毫升加入三乙胺 0.2 mL); 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 体积流量: 1.0 mL/min; 理论板数按盐酸麻黄碱峰计算应不低于 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 称取盐酸麻黄碱对照品适量, 加甲醇溶解制成 0.04 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取提取液 15 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 取缺麻黄的其他药材的提取液, 同“供试品溶液的制备”方法制成阴性样品溶液。

2.1.5 专属性试验 精密量取盐酸麻黄碱对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录液相色谱图, 见图 1。在此色谱条件下盐酸麻黄碱与其他组分能达到基线分离, 且阴性样品在对照品相应位置上无吸收峰出现。

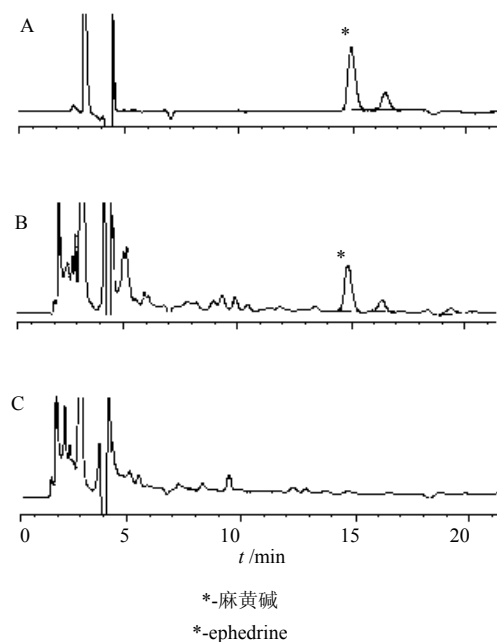


图 1 对照品 (A)、样品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A), samples (B), and negative sample (C)

2.1.6 线性关系考察 精密称取 10.35 mg 盐酸麻黄碱对照品, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取盐酸麻黄碱对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 置 10 mL 量瓶中,

加甲醇稀释至刻度。分别精密吸取上述溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积值。以峰面积为纵坐标, 进样质量为横坐标, 按最小二乘法进行线性回归, 得回归方程 $Y=1\ 986\ X-2.808$, $r=1.000\ 0$ 。结果表明盐酸麻黄碱在 0.083 2~1.664 0 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.7 精密度试验 精密吸取 0.104 8 mg/mL 盐酸麻黄碱对照品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 分别连续测定 6 次, 记录峰面积, 结果盐酸麻黄碱峰面积的 RSD 值为 0.29%。

2.1.8 稳定性试验 取供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL, 测定峰面积, 结果表明, 盐酸麻黄碱峰面积的 RSD 值为 1.68%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 取处方药材 6 份, 50%甲醇提取, 得到提取液, 制备供试品溶液, 进样测定。结果盐酸麻黄碱的平均质量分数为 0.87 mg/g, RSD 值为 1.53%。

2.1.10 回收率试验 精密称取盐酸麻黄碱对照品 10.40 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得 0.416 mg/mL 对照品储备液。精密称取处方药材适量, 平行 9 份, 分别加入盐酸麻黄碱对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL, 各 3 份, 加 50%甲醇提取, 得到提取液, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 结果盐酸麻黄碱平均回收率为 113.52%, RSD 值为 3.26%。

2.1.11 处方中盐酸麻黄碱的测定 取处方量药材适量, 制备供试品溶液, 进样测定, 采用外标法计算得盐酸麻黄碱平均质量分数为 1.84 mg/g。

2.2 连翘酯苷 A 的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 - 0.05%磷酸水溶液 (34 : 66); 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 体积流量: 1.0 mL/min。理论板数按连翘酯苷 A 峰计算应不低于 5 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取连翘酯苷 A 对照品适量, 加甲醇溶解制成 0.04 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取醇提取液 15 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇至刻度, 密塞, 摇匀, 再精密量取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇稀释至刻度, 密塞, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 取缺连翘的其他药材

的提取液，同“供试品溶液的制备”方法制成阴性样品溶液。

2.2.5 专属性试验 精密量取连翘酯苷 A 对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪，记录液相色谱图，见图 2。在此色谱条件下连翘酯苷 A 与其他组分能达到基线分离，且阴性样品在对照品相应位置上无吸收峰出现。

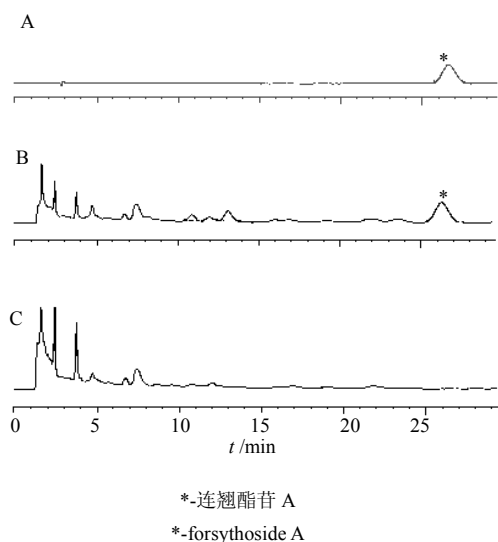


图 2 连翘酯苷 A 对照品 (A)、样品 (B)、和阴性对照 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of forsythoside A reference substance (A), sample (B), and negative sample (C)

2.2.6 线性关系考察 精密称取 12.28 mg 连翘酯苷 A 对照品，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀。精密吸取连翘酯苷 A 对照品溶液各 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度。分别精密吸取上述溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪，测定峰面积值。以峰面积为纵坐标，进样质量为横坐标，按最小二乘法进行线性回归，得回归方程 $Y=1\ 771\ X-12.73$ ， $r=0.999\ 5$ 。结果表明连翘酯苷 A 在 0.098 6~2.464 0 μ g 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.7 精密度试验 精密吸取 0.416 0 mg/mL 连翘酯苷 A 对照品溶液 10 μ L，注入液相色谱仪，分别连续测定 6 次，记录峰面积，结果连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值为 0.25%。

2.2.8 稳定性试验 取供试品溶液，室温放置，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L，测定峰面积，结果表明，连翘酯苷 A 峰面积的 RSD 值为 0.76%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取处方药材 6 份，提取得到提取液，制备供试品溶液，进样测定。结果连翘酯苷 A 的平均质量分数为 0.49 mg/g，RSD 值为 1.71%。

2.2.10 回收率试验 精密称取连翘酯苷 A 对照品 12.32 mg，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，即得 0.492 8 mg/mL 对照品储备液。精密称取处方药材适量，平行 9 份，分别加入连翘酯苷 A 对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL，各 3 份，加入 50% 甲醇提取，得到提取液，制备供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果连翘酯苷 A 平均回收率为 109.02%，RSD 值为 1.28%。

2.2.11 处方中连翘酯苷 A 的测定 取处方量药材适量，制备供试品溶液，进样测定，采用外标法计算得连翘酯苷 A 平均质量分数为 0.85 mg/g。

2.3 干膏得率的测定

精密量取水提取液 10 mL，至已恒定质量的蒸发皿中水浴蒸干，按《中国药典》2010 版一部附录 IXG 干燥失重法测定，计算干膏得率。

2.4 因素水平的选择

经预试验选择加热回流提取方法，选取乙醇体积分数 (A)、乙醇倍量 (B)、提取时间 (C)、提取次数 (D) 为考察因素，因素水平设计见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|
| | A/% | B/倍 | C/h | D/次 |
| 1 | 55 | 4 | 0.5 | 1 |
| 2 | 65 | 6 | 1.0 | 2 |
| 3 | 75 | 8 | 1.5 | 3 |

2.5 试验方法

称取麻黄、地龙等处方量药材各 9 份，每份 120 g，按 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验，合并提取液，计算干膏得率、麻黄碱、连翘酯苷 A 提取率。正交试验设计和结果见表 2。

由极差分析可知，以麻黄碱提取率为指标，各因素影响程度顺序为：D>B>A>C，以连翘酯苷 A 提取率为指标，各因素影响程度顺序为：D>B>A>C。通过直观分析，结合干膏得率及工艺生产成本等因素的考虑，确定最佳工艺条件是 $A_2B_3C_2D_3$ ，即以各个饮片投料，加 65% 乙醇 8 倍量，回流提取 3 次，每次 1 h。

表2 正交试验安排和分析结果

Table 2 Arrangement and analysis of orthogonal test

| 试验号 | A | B | C | D | 提取率/% | | 干膏得率/% |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | | | | | 麻黄碱 | 连翘酯苷 A | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 46.38 | 25.76 | 10.01 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 70.51 | 67.51 | 18.72 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 91.99 | 70.99 | 25.14 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 90.09 | 53.89 | 21.26 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 62.73 | 57.76 | 13.84 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 90.46 | 63.09 | 20.10 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 79.50 | 49.50 | 17.24 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 83.30 | 50.67 | 19.05 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 69.95 | 44.98 | 14.54 |
| 麻黄碱提取率 | | | | | | | |
| k_1 | 69.63 | 71.99 | 73.38 | 59.69 | | | |
| k_2 | 81.09 | 72.18 | 76.85 | 80.16 | | | |
| k_3 | 77.58 | 84.13 | 78.07 | 88.46 | | | |
| R | 11.47 | 12.14 | 4.69 | 28.77 | | | |
| 连翘酯苷 A 提取率 | | | | | | | |
| k_1 | 56.76 | 43.05 | 46.51 | 42.83 | | | |
| k_2 | 58.25 | 58.65 | 55.46 | 60.03 | | | |
| k_3 | 48.38 | 59.69 | 59.42 | 58.52 | | | |
| R | 9.86 | 16.64 | 12.91 | 17.20 | | | |
| 干膏得率 | | | | | | | |
| k_1 | 17.96 | 16.17 | 16.39 | 12.80 | | | |
| k_2 | 18.40 | 17.20 | 18.17 | 18.69 | | | |
| k_3 | 16.94 | 19.93 | 18.74 | 21.82 | | | |
| R | 1.46 | 3.76 | 2.35 | 9.02 | | | |

2.6 验证试验

为了进一步确定最佳工艺的合理可行，在确定的最佳提取工艺条件下，提取制备3份样品，依法测定，见表3。结果麻黄碱平均提取率为87.7%，连翘酯苷A平均提取率为69.8%，干膏平均得率为22.7%，与正交试验表中的最优结果相似，说明确定的提取工艺合理可行。

表3 验证试验结果

Table 3 Results of verified test

| 批次 | 麻黄碱提取率/% | 连翘酯苷 A 提取率/% | 干膏得率/% |
|-----|----------|--------------|--------|
| 1 | 89.6 | 65.7 | 21.7 |
| 2 | 86.5 | 69.4 | 23.0 |
| 3 | 87.1 | 74.2 | 23.4 |
| 平均值 | 87.7 | 69.8 | 22.7 |

3 讨论

由于中药复方药味多，化学成分复杂，各药材中有效成分间化学性质有众多相似之处，对于指标成分测定的色谱条件选择上需要经过大量条件摸索，最终确定最佳方法。经查阅文献和预试验^[3]，本方中盐酸麻黄碱的流动相考察了甲醇-水系统和乙腈-水系统，并添加0.1%磷酸水溶液、0.05%磷酸水溶液，加入三乙胺、二正丁胺调pH值为2、3、4。结果表明，以乙腈-0.1%磷酸水溶液(4:96)，并加三乙胺调pH值为3.2左右时，盐酸麻黄碱的分离度最好，且基线较平稳。

本实验经提取工艺参数优化后得到的最佳提取工艺为加65%乙醇，回流提取3次，每次1h，加乙醇8倍量。为节约成本，结合工厂生产实际，提取次数及加醇量应再次做进一步考察，进而为实际大生产提供切实可行的提取工艺。

参考文献

[1] 张守平, 刘瑛丽, 曹洪锦. 苦杏仁3种提取工艺中苦杏仁苷提取率的比较 [J]. 齐鲁药事, 2010, 29(11): 656-657.

[2] 王曙宾, 郑亚杰. 连翘提取物和连翘酯苷 A 原料中连翘酯苷 A 的稳定性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 909-911.

[3] 曾永长, 张莉, 曾晓燕, 等. HPLC 法测定馥感淋口服液盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(2): 252-255.