

## 银翘解毒丸制备工艺中绿原酸转移率的影响因素研究

张爱丽, 刘德军, 苟琼心

江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222007

**摘要:**目的 研究银翘解毒丸各工艺因素对绿原酸转移率的影响,为制备工艺优化及质量标准修订提供实验数据。方法 按《中国药典》所载银翘解毒丸处方和制法,用 HPLC 跟踪绿原酸在各工艺步骤中的转移率;单因素考察提取温度、浓缩温度、干燥温度对绿原酸转移率的影响。结果 处方饮片粉碎后,经提取、浓缩、干燥、制丸 4 个环节绿原酸的转移率分别为 78.0%、69.53%、55.90%、55.41%;制备过程中温度是影响绿原酸转移率的主要因素。结论 规范银翘解毒丸的制备工艺条件可提高绿原酸的转化率,保证产品质量稳定可控。

**关键词:** 银翘解毒丸; 绿原酸; 转移率; 制备工艺

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2016)01-0092-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.017

## Study on factors affecting the transfer rate of chlorogenic acid in process of preparing Yinqiao Jiedu Pills

ZHANG AI-li, LIU De-jun, GOU Qiong-xin

Lianyungang Chinese Medicine Branch of Jiangsu United Vocational College, Lianyungang 222006, China

**Abstract: Objective** To investigate the transfer rates of chlorogenic acid in the preparation process of Yinqiao Jiedu Pills (YJP), and to provide experimental data for technical improvement and quality control. **Methods** According to the recipe and technique of YJP contained in pharmacopoeia, the transfer rates of chlorogenic acid in the preparation process of YJP were determined by HPLC. Meanwhile, single factor experiment was used to investigate the effect of extraction temperature, condensation temperature, and drying temperature on the transfer ratio of chlorogenic acid. **Results** The preparation process contained four steps: extraction, concentration, drying, and pelletizing. The mean transfer rates of chlorogenic acid in above step were 78.0%, 69.53%, 55.90%, and 55.41%, and in the process of preparation, temperature was the main factor affecting the transfer ratio of chlorogenic acid. **Conclusion** Standardization of YJP preparation conditions can improve the conversion rate of chlorogenic acid, to ensure the quality stable and controllable.

**Key words:** Yinqiao Jiedu Pills; chlorogenic acid; transfer rate; preparation process

银翘解毒丸(浓缩丸)<sup>[1]</sup>为《中国药典》2010年版一部(以下简称为药典)收载的品种,由金银花、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子(炒)、桔梗、淡竹叶、甘草等9味中药组成。具有疏风解表、清热解毒功效。方中金银花为君药,绿原酸为金银花的主要活性成分。该药品生产厂家较多、不同地域生产企业所用药材原料质量也不同<sup>[2]</sup>。各厂家虽然按药典标准制备,但可能因为工艺参数不同,造成质量参差不齐。《中国药典》2010年版中银翘解毒丸的质量标准仅以显微鉴别和薄层鉴别作为质量控制指标、以牛蒡苷为定量测定指标,有关银翘解

毒丸的文献报道<sup>[2-3]</sup>也主要集中在制剂中绿原酸的定量测定及特征图谱研究,目前尚无有关该制剂制备工艺中绿原酸转移率及影响因素的研究报道。实际生产过程中在线检测活性成分的转移率是中药制备工艺研究中一项重要的指标,转移率的稳定程度是用于评价制备工艺合理性和可行性的重要内容<sup>[4]</sup>。本研究是在前期研究的基础上<sup>[5-6]</sup>,按《中国药典》中银翘解毒丸的制备工艺,采用 HPLC 跟踪绿原酸在各工艺步骤中的转移率,采用单因素分析法考察影响绿原酸损失的原因,为提高银翘解毒丸及系列制剂中绿原酸的转移率和质量标准修订提供参考。

收稿日期: 2015-05-14

基金项目: 江苏省卫生厅“银翘解毒系列制剂中绿原酸转移率的影响因素研究”项目(J201113); 连云港市“521 高层次人才培养工程”项目

作者简介: 张爱丽,女,江苏连云港人,副教授,硕士,从事中药制剂教学与研究。Tel: 13851274690 E-mail: 251866513@qq.com

## 1 仪器与试药

LC-2010A 型高效液相色谱仪 (LC-Solution 工作站, 日本岛津); DL-180A 型超声清洗器 (上海之信仪器有限公司); BP110S 电子天平 (德国赛多利斯公司); DZF-6030A 型真空干燥箱 (上海风棱实验设备有限公司)。

绿原酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110753-201314); 金银花 (3 份, 2 份产于山东, 1 份产于河南)、连翘、薄荷、荆芥、淡豆豉、牛蒡子 (炒)、桔梗、淡竹叶、甘草饮片均购自安徽亳州中药材交易中心, 经江苏联合职业技术学院杨成俊副教授鉴定; 甲醇和乙腈为进口色谱纯; 磷酸和无水乙醇为国产分析纯; 水为双蒸水 (自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 制备工艺及各检测点的确定

称取金银花 200 g、桔梗 120 g, 粉碎成细粉 (过 6 号筛), 牛蒡子等其他饮片按《中国药典》中银翘解毒丸处方比例称取。考虑到牛蒡子中也含有绿原酸<sup>[7-8]</sup>, 为保证实验数据的准确性, 将金银花细粉与牛蒡子饮片中绿原酸总量作为检测点①, 薄荷、荆芥提取挥发油, 蒸馏后的水溶液另器收集, 药渣与其余连翘等 5 味加水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并煎液, 滤过, 得水提滤液 (检测点②); 滤液与上述水溶液合并, 浓缩, 得稠膏 (检测点③); 加入金银花、桔梗细粉, 混匀, 干燥, 粉碎, 得干膏粉 (检测点④); 喷入薄荷油、荆芥挥发油, 混匀。每 100 g 粉末加炼蜜 80 g 制成浓缩蜜丸 (检测点⑤), 即得。

### 2.2 各供试品溶液的制备

称取单味药材金银花、牛蒡子, 分别制备各项下供试品溶液。并按“2.1”项下分别对 5 个检测点取样, 并预处理, 以测定样品中绿原酸的量。

#### 2.2.1 金银花与牛蒡子单味饮片 分别取 3 种不同

产地的金银花细粉各 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 100 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得金银花供试品溶液<sup>[5]</sup>; 另取牛蒡子细粉 1.0 g, 精密称定, 按金银花供试品溶液的方法制备, 即得牛蒡子供试品溶液。

**2.2.2 金银花与牛蒡子混合饮片** 取金银花细粉 0.625 g、牛蒡子细粉 0.375 g, 精密称定, 均匀混合, 按金银花供试品溶液的方法制备, 得混合饮片溶液。

**2.2.3 水提滤液** 精密量取相当于 1.0 g 牛蒡子的水提滤液, 精密加入 50% 甲醇定容至 100 mL。

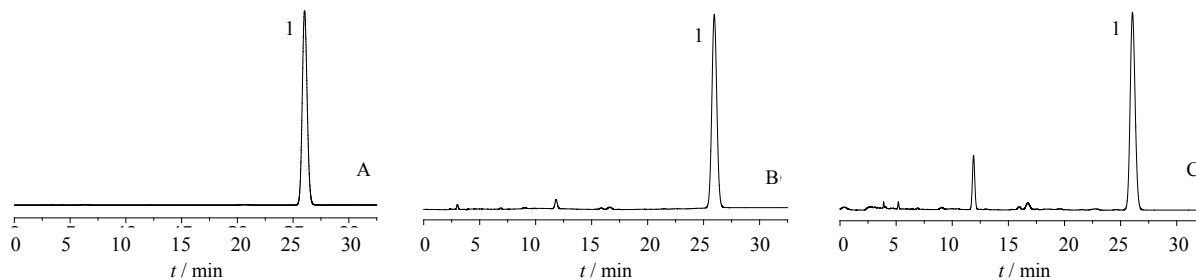
**2.2.4 稠膏** 精密称取相当于 1.0 g 牛蒡子的水提稠膏, 加入 50% 甲醇 50 mL 溶解, 超声处理 30 min, 放冷, 离心 10 min (5 000 r/min), 取上清液, 50% 甲醇定容至 100 mL。

**2.2.5 干膏粉** 精密称取相当于 1.0 g 金银花与牛蒡子混合饮片的干膏粉, 加入 50% 甲醇 50 mL 溶解, 超声处理 30 min, 放冷, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 50% 甲醇定容至 100 mL。

**2.2.6 成品** 精密称取相当于 1.0 g 金银花与牛蒡子混合饮片的浓缩丸, 研细, 精密加入 50% 甲醇 50 mL 溶解, 超声处理 30 min, 放冷, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 50% 甲醇定容至 100 mL。

### 2.3 绿原酸含量测定方法<sup>[5-6]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 色谱柱为 Inertsil ODS-SP (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈-0.3% 磷酸 (9:91), 等度洗脱, 检测波长 327 nm, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。按外标峰面积法测定。在此色谱条件下, 金银花供试品中绿原酸成分与相邻组分分离度大于 1.5, 理论塔板数按绿原酸计算大于 5 000, 分离度良好。色谱图见图 1。



A-对照品; B-金银花饮片; C-银翘解毒丸; 1-绿原酸

A-reference; B-Lonicerae Japonicae Flos; C-Yinqiaojiadu Pill; 1-chlorogenic acid

图1 对照品与供试品溶液的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of reference and test samples

**2.3.2 线性关系考察** 精密称取绿原酸对照品加流动相溶解并稀释至 500.02  $\mu\text{g/mL}$ , 作为对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液适量, 分别制成质量浓度为 25.0、50.0、150.0、300.0、500.0  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定, 记录峰面积。结果表明, 在 0.25~5.0  $\mu\text{g}$  峰面积与进样量呈良好的线性关系, 其回归方程为  $Y=1.38 \times 10^6 X + 5.16 \times 10^4$  ( $r=0.9998$ )。

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取同一绿原酸对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 每次 10  $\mu\text{L}$ 。结果绿原酸峰面积的 RSD 为 0.99%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 精密吸取检测点②水提滤液供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 各进样 10  $\mu\text{L}$ , 记录绿原酸的峰面积。计算绿原酸质量分数的 RSD 为 1.23%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.3.5 重复性试验** 准确称取同一产地金银花样品细粉共 6 份, 分别按“2.2.1”项下方法制备金银花

供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。代入回归方程计算绿原酸质量分数, 其 RSD 为 0.62%, 表明本方法重复性好。

**2.3.6 加样回收试验** 取已测定的同一产地的金银花饮片共 9 份, 精密称定 (约含绿原酸 1.25 mg), 分别置 10 mL 量瓶中, 每 3 份为 1 组, 按照绿原酸含量 80%、100%、120% 的比例于每组分别精密加入对照品贮备液, 加 50% 甲醇适量, 超声处理, 放冷, 定容, 摇匀, 过滤, 精密吸取续滤液 10  $\mu\text{L}$ , 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 测得样品中绿原酸 3 个浓度的回收率分别为 100.3%、98.5%、101.4%, RSD 分别为 1.25%、0.82%、1.44%, 表明本方法回收率好。

**2.3.7 绿原酸转移率的测定** 各供试品溶液分别摇匀, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 精密吸取续滤液 10  $\mu\text{L}$ , 按上述测定方法进样测定, 计算转移率。绿原酸转移率 = 供试品中绿原酸总量 / 原饮片中绿原酸总量。对 3 批不同产地的金银花分别标注样品号, 每个样品号重复 3 次, 实验结果取均值, 结果见表 1。

表 1 各检测点绿原酸含量及转移率 ( $n=3$ )

Table 1 Contents and transfer rates of chlorogenic acid in each test point ( $n=3$ )

| 供试品            | 质量分数/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) |       |       | 牛蒡子中绿原酸转移率/% |       |       |                  | 金银花+牛蒡子中绿原酸转移率/% |       |       |                  |
|----------------|------------------------------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|------------------|------------------|-------|-------|------------------|
|                | 样品 1                                     | 样品 2  | 样品 3  | 样品 1         | 样品 2  | 样品 3  | $\bar{x} \pm s$  | 样品 1             | 样品 2  | 样品 3  | $\bar{x} \pm s$  |
| 金银花            | 35.64                                    | 28.85 | 25.20 | —            | —     | —     | —                | —                | —     | —     | —                |
| 牛蒡子            | 3.30                                     | 3.31  | 3.30  | 100          | 100   | 100   | 100              | —                | —     | —     | —                |
| 金银花+牛蒡子 (检测点①) | 23.51                                    | 19.27 | 16.99 | —            | —     | —     | —                | 100              | 100   | 100   | 100              |
| 水提滤液 (检测点②)    | 2.58                                     | 2.59  | 2.56  | 78.18        | 78.24 | 77.57 | $78.0 \pm 0.47$  | —                | —     | —     | —                |
| 稠膏 (检测点③)      | 2.30                                     | 2.31  | 2.28  | 69.70        | 69.79 | 69.09 | $69.53 \pm 0.55$ | —                | —     | —     | —                |
| 干膏 (检测点④)      | 13.16                                    | 10.76 | 9.50  | —            | —     | —     | —                | 55.97            | 55.84 | 55.91 | $55.90 \pm 0.12$ |
| 成品 (检测点⑤)      | 13.03                                    | 10.67 | 9.42  | —            | —     | —     | —                | 55.42            | 55.37 | 55.44 | $55.41 \pm 0.06$ |

表 1 数据显示, 在提取、浓缩、干燥、制丸等 4 个工序中, 每步工序都会造成绿原酸的转移率降低, 尤其在稠膏干燥工序中绿原酸转移率降低明显。因此, 为提高绿原酸的保留率, 有必要就以上工序中对绿原酸转移率影响较大的提取、浓缩、干燥 3 个关键工序开展进一步实验研究。

## 2.4 工艺因素对绿原酸转移率的影响

为了进一步了解各工序对绿原酸转移率的影响, 对药典中本品制备工艺中不明确的提取温度、浓缩温度、干燥温度等工艺条件进行单因素考察, 每个样品平行处理 3 次。

**2.4.1 提取温度对转移率的影响** 按“2.1”项下方

法和处方量分别称取饮片, 在其他条件不变的情况下, 分别于 50、60、70、80、90、100  $^{\circ}\text{C}$  的条件下提取 2 h, 提取液按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下方法测定。以提取温度为横坐标, 绿原酸的转移率为纵坐标, 绘制温度-绿原酸转移率曲线。每个实验重复 3 次, 实验结果取均值, 结果见图 2。

**2.4.2 浓缩温度对转移率的影响** 按“2.1”项下方法和处方量分别称取饮片, 在其他条件不变的情况下, 分别于 60、70、80、90、100  $^{\circ}\text{C}$  的条件下浓缩, 得稠膏 ( $d=1.30$ , 60  $^{\circ}\text{C}$ ), 稠膏按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下方法测定。以

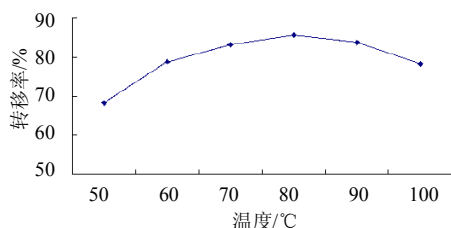


图2 提取温度对转移率的影响

Fig. 2 Effect of extraction temperature on transfer rate

浓缩温度为横坐标, 绿原酸的转移率为纵坐标, 绘制温度-绿原酸转移率曲线。每个实验重复3次, 实验结果取均值, 结果见图3。

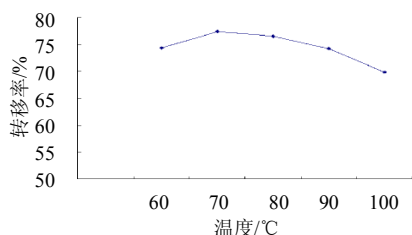


图3 浓缩温度对转移率的影响

Fig. 3 Effect of concentration temperature on transfer rate

**2.4.3 干燥温度对转移率的影响** 按“2.1”项下方法和处方量分别称取饮片, 在其他条件不变的情况下, 分别于50、60、70、80、90、100 °C的条件下减压干燥, 得干膏, 按“2.2.5”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下方法测定。以干燥温度为横坐标, 绿原酸的转移率为纵坐标, 绘制温度-绿原酸转移率曲线。每个实验重复3次, 实验结果取均值, 结果见图4。

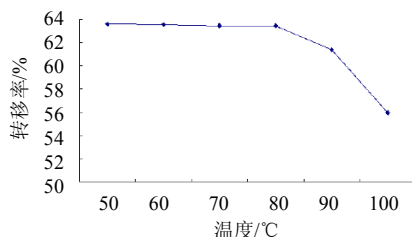


图4 干燥温度对转移率的影响

Fig. 4 Effect of drying temperature on transfer rate

### 3 讨论

从表1实验结果可以看出, 绿原酸在干燥工序转移率降低明显, 损失最多。主要原因是金银花粉

碎成细粉后, 直接与其他饮片提取浓缩后的稠膏混合干燥、制丸, 所以在提取、浓缩工序没有损失。加之绿原酸在牛蒡子中的含量明显比金银花少, 且处方中牛蒡子用量只有金银花用量的0.6倍, 所以在提取、浓缩工序绿原酸的含量没有明显降低。但牛蒡子单味饮片在提取、浓缩工序结束后, 绿原酸的转移率为69.53%, 提示其他银翘解毒系列制剂品种银翘解毒软胶囊及银翘解毒颗粒在制备过程中, 要考虑金银花醇提和水提工序温度对绿原酸转移率的影响。

《中国药典》中银翘解毒丸制备工艺中, 关于饮片提取的加水量、提取温度、浓缩温度、干燥温度等工艺参数没有明确规定。为保证“2.1”项实验数据具有可比性, 通过预实验, 对饮片加水量做出具体规定, 第1次提取加10倍量水, 第2次提取加8倍量水。固定提取温度为100 °C, 浓缩温度为100 °C, 干燥温度为100 °C, 稠膏相对密度为1.30 (60 °C测)。图2、3、4对影响绿原酸转移率的3个主要工序的实验结果表明, 制备工艺中控制提取温度80 °C、浓缩温度70 °C时, 绿原酸转移率最高, 分别为85.68%、77.35%, 干燥温度在50~80 °C时, 绿原酸的转移率相差不大, 其中80 °C的转移率为63.45%。考虑到为提高生产效率、节约成本, 干燥温度设定为80 °C, 可以有效减少绿原酸的损失率。本研究只对各工序温度对绿原酸转移率的影响作单因素考察, 对于提取、浓缩、干燥时间对其影响还待进一步实验证明。另外银翘解毒丸采用传统的浓缩、干燥制备工艺, 存在浓缩、干燥时间长、有效成分易损失、操作繁琐等问题, 再加温度对金银花中绿原酸转移率的影响, 可以考虑采用现代先进技术以改进生产工艺、改善产品质量、提高生产效率。

文献报道不同产地不同批次金银花中绿原酸的含量不同<sup>[6, 9]</sup>。实验中所用饮片, 均购自安徽亳州中药材交易中心, 考虑到可能与药厂采购的饮片来源不同, 所以本研究没有与药厂生产的银翘解毒丸做对比。后续研究将在车间规模生产条件下, 用药品生产企业采购的饮片按优化的温度、时间工艺参数条件, 以绿原酸及固含物为指标, 开展工艺放大验证, 为银翘解毒丸大生产提供更具体直观的数据, 为产品生产过程中的动态监控提供更可靠的信息。

### 参考文献

- [1] 国家药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 罗曼, 周兰, 申瑾, 等. 银翘解毒丸特征图谱初



- 步研究 [J]. 中成药, 2012, 34(11): 2162.
- [3] 马兴玲. 银翘解毒丸中绿原酸含量测定的研究 [J]. 北方药学, 2012, 9(7): 7.
- [4] 赵粉荣, 刘 斌, 崔慧茹. 维药祖卡木颗粒制备过程中吗啡转移率的研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, (2): 49.
- [5] 刘德军, 张源源, 苟琼心. 银翘解毒颗粒中与金银花共煎饮片对绿原酸转移率的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 48.
- [6] 刘德军, 张源源, 张爱丽, 等. 银翘解毒软胶囊制备过程中绿原酸转移率的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 23.
- [7] 赵 英, 周 凯, 张 静, 等. HPLC 法测定牛蒡子中绿原酸的含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2012, (9): 44.
- [8] 刘世名, 董国霞, 陈靠山. 牛蒡叶中绿原酸的提取工艺优化 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(9): 659.
- [9] 刘 涛, 万德光, 王永香, 等. HPLC 法测定金银花药材中绿原酸的转移率 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(5): 350.