

正交试验优选四臣止咳颗粒处方药材的提取工艺

王光发¹, 廖正根^{1*}, 梁新丽¹, 祝靖云¹, 余日跃², 尼玛次仁³(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医学院药学院, 江西 南昌 330004;
3. 西藏藏医学院, 西藏 拉萨 850000)

摘要:目的 建立四臣止咳颗粒处方药材的最佳提取工艺。方法 以岩白菜素、甘草酸、绿原酸的提取率和浸膏得率为指标, 采用正交设计优选提取工艺参数。结果 最佳工艺条件: 分别用 10、8 倍量的 60% 乙醇回流提取 2 次, 1 h/次, 第 1 次提取前浸泡 2 h。结论 此工艺合理可行, 适用于四臣止咳颗粒的提取。

关键词: 四臣止咳颗粒; 正交试验; 提取工艺

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1901-04

Extracting process of optimization of Sichen Zhike Granula by orthogonal test

WANG Guang-fa¹, LIAO Zheng-gen¹, LIANG Xin-li¹, ZHU Jing-yun¹, YU Ri-yue², NIMA Ci-ren³

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. Tibetan College of Traditional Tibet Medicine Lhasa 850000, China)

Abstract: **Objective** To establish an optimal extracting method of Sichen Zhike Granula. **Methods** The extracting method of Sichen Zhike Granula was optimized by orthogonal design, taking the extraction rate of bergenin, glycyrrhizic acid, and chlorogenic acid and extract yield as indexes. **Results** The optimal extracting method was reflux extracted twice (1 h/time) with 10 and 8 times the volume of 60% ethanol, respectively; The medicinal materials were soaked for 2 h before the extraction. **Conclusion** The optimal technology is reasonable and suitable for the extraction process of Sichen Zhike Granula.

Key words: Sichen Zhike Granula; orthogonal test; extracting process

四臣止咳方由岩白菜、螃蟹甲、甘草、猪毛蒿 4 味药材组成, 为藏医理论经典古方加之名老藏医药专家多年经验方而成。藏医临床以传统汤剂使用, 经多年的临床使用证明具有非常显著的清热解毒、止咳平喘、润喉祛痰作用。四臣止咳颗粒由该方经提取加工而成。王聚乐等^[1]以浸膏得率为考察指标优选了四臣止咳颗粒剂处方药材的提取工艺, 但是仅从浸膏得率来考察提取工艺尚存不足。岩白菜素为岩白菜中的活性成分, 具有明显的止咳作用^[2]。绿原酸为猪毛蒿中的活性成分, 具有广泛的抗菌、抗病毒等药理作用^[3]。甘草酸为甘草的活性成分, 具有抗炎、抗病毒等药理作用^[4]。因此本实验以岩白菜素、甘草酸、绿原酸的提取率和浸膏得率为指标优化了四臣止咳方处方药材的提取工艺, 为四臣止咳颗粒制剂的提取工艺提供理论依据。

1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 包括四元梯度泵、真空脱气机、柱温箱、VWD 检测器; KDM 调温电热套(鄞城华鲁电热仪器有限公司); TG328A 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); KQ-250 VDB 型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

岩白菜素(批号 1532-200202)、绿原酸(批号 110731-200513)、甘草酸铵盐(批号 110731-200513)对照品由中国药品生物制品检定所提供。

岩白菜为虎耳草科植物岩白菜 *Bergeria purpurea* (Hook. f. et Thoms.) Engl. 的干燥根及根茎, 螃蟹甲为唇形科植物螃蟹甲 *Phlomis young-husbandii* Mukerjee 的块根, 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 猪

收稿日期: 2009-03-23

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(2007-第 2 批-12)

作者简介: 王光发(1984—), 男, 江西兴国人, 助教, 硕士, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。

Tel: (0791)7119011 E-mail: fda5@163.com

* 通讯作者 廖正根 Tel: (0791) 7119011 Fax: (0791)7118658 E-mail: lyzlyg@163.com

毛蒿为菊科植物猪毛蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kitag 的带根全草,均采购于西藏自治区,由江西中医学院中药鉴定教研室鉴定。甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 岩白菜素测定方法的建立

2.1.1 色谱条件:Symmetry-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(22:78:0.1);体积流量:1 mL/min;检测波长:275 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。在上述条件下,岩白菜素色谱峰与供试品溶液中其他色谱峰达到了基线分离,阴性试验结果表明阴性无干扰,色谱图见图1。

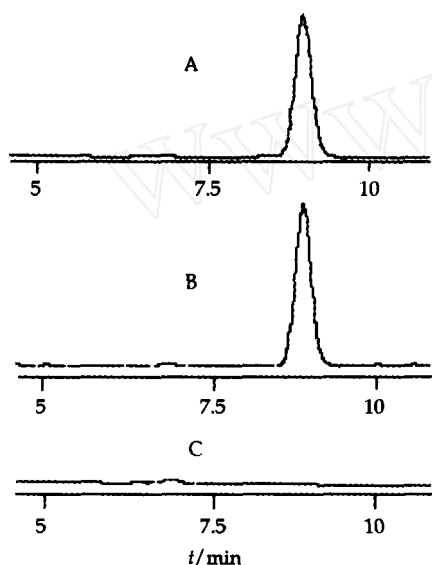


图1 岩白菜素对照品(A)、复方提取液(B)和缺岩白菜阴性样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of bergenin reference substance (A), compound extract solution (B), and negative sample without *Herba Bergeniae* (C)

2.1.2 供试品溶液的配制:精密量取提取液1 mL置于10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,从中精密量取1 mL溶液置于5 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的配制:精密称取岩白菜素对照品5.86 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。得浓度为117.2 μg/mL的对照品储备液。

2.1.4 标准曲线的绘制:分别精密吸取对照品储备液0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。分别进样10 μL,以进样质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明岩白菜素在5.86~58.6 μg/mL呈良好线性关系,回归方程为 $Y = 11\,808 X - 1\,657.4$, $r = 0.999\,9$ 。

2.1.5 精密度试验:精密吸取岩白菜素对照品溶液10 μL,重复进样6次,测得峰面积积分值,计算得RSD为0.27%。

2.1.6 稳定性试验:取供试品溶液,分别于0、2、4、8、10 h进样测定。计算岩白菜素质量浓度,得到RSD为1.05%。结果显示,供试品溶液在10 h内测定结果稳定。

2.1.7 加样回收率试验:在已测定岩白菜素质量浓度的四臣止咳颗粒处方药材提取液中加入已知量约80%、100%、120%的岩白菜素对照品,制备供试品溶液,进行测定,计算回收率。结果岩白菜素平均回收率为98.42%,RSD为1.89%。

2.1.8 样品的测定:精密吸取供试品溶液和岩白菜素对照品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,按外标法计算。

2.2 甘草酸测定方法的建立

2.2.1 色谱条件:Waters Symmetry-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.2 mol/L醋酸铵溶液-冰醋酸(57:43:1);体积流量:1 mL/min;检测波长:250 nm。柱温:25 ℃;进样量:20 μL。在上述条件下,甘草酸色谱峰与供试品溶液中其他色谱峰达到了基线分离,阴性试验结果表明阴性无干扰,色谱图见图2。

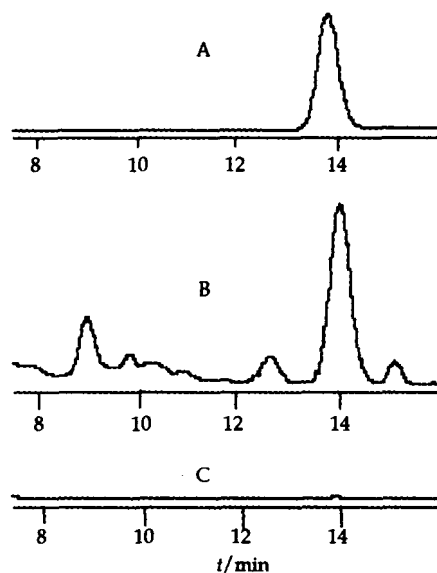


图2 甘草酸对照品(A)、复方提取液(B)和缺甘草阴性样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of glycyrrhizic acid reference substance (A), compound extract solution (B), and negative sample without *Radix et Rhizoma Glycyrrhizae* (C)

2.2.2 供试品溶液的配制:精密量取提取液1 mL置于5 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,0.45 μm

微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 对照品溶液的配制:精密称取甘草酸铵盐对照品 5.10 mg,置 25 mL 量瓶中,加流动相溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 204 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.2.4 标准曲线的绘制:分别精密吸取甘草酸铵盐对照品储备液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。分别进样 20 μL ,以进样质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,进行线性拟合。结果表明岩白菜素在 5.1~81.6 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系,回归方程为 $Y=15.415 X+7.076 4$, $r=0.999 9$ 。

2.2.5 精密度试验:精密吸取甘草酸铵盐对照品溶液 20 μL ,重复进样 6 次,测得峰面积积分值,计算得 RSD 为 0.53%。

2.2.6 稳定性试验:取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10 h 进样测定。计算甘草酸铵盐质量浓度,得到 RSD 为 1.55 %。结果显示,供试品溶液在 10 h 内测定结果稳定。

2.2.7 加样回收率试验:在已测定甘草酸铵盐质量浓度的四臣止咳颗粒处方药材提取液中加入已知量约 80%、100%、120% 的甘草酸铵盐对照品,制备供试品溶液,进行测定,计算回收率。结果岩白菜素平均回收率为 97.81%,RSD 为 1.62%。

2.2.8 样品的测定:精密吸取供试品溶液和甘草酸铵盐对照品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,测定,按外标法计算。

2.3 绿原酸测定方法的建立

2.3.1 色谱条件:Waters Symmetry- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸 (26:74:0.1);体积流量:1 mL/min;检测波长:327 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。在上述条件下,绿原酸色谱峰与供试品溶液中其他色谱峰达到了基线分离,阴性试验结果表明阴性无干扰,色谱图见图 3。

2.3.2 供试品溶液的配制:精密量取提取液 1 mL 置于 25 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 对照品溶液的配制:精密称取绿原酸对照品 5.06 mg,置 100 mL 棕色量瓶中,加 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 50.6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.3.4 标准曲线的绘制:分别精密吸取绿原酸对照品储备液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL,置 10 mL 棕

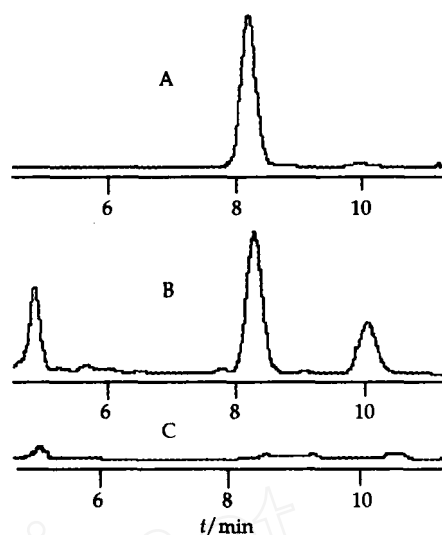


图 3 绿原酸对照品(A)、复方提取液(B)和缺猪毛蒿阴性样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of chlorogenic acid reference substance (A), compound extract solution (B), and negative sample without *Herba Salsolae Collinae* (C)

色量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。分别进样 20 μL ,以进样质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。结果表明绿原酸在 5.06~25.3 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好线性关系,回归方程为 $Y=58.282 X+2.753 7$, $r=0.999 9$ 。

2.3.5 精密度试验:精密吸取绿原酸对照品溶液 20 μL ,重复进样 6 次,测得峰面积积分值,计算得 RSD 为 0.28%。

2.3.6 稳定性试验:取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、10 h 进样测定,计算绿原酸质量浓度,得到 RSD 为 1.07%。结果显示,供试品溶液在 10 h 内测定结果稳定。

2.3.7 加样回收率试验:在已测定绿原酸质量浓度的四臣止咳颗粒处方药材提取液中加入已知量约 80%、100%、120% 的绿原酸对照品,制备供试品溶液,进行测定,计算回收率。结果绿原酸平均回收率为 98.08%,RSD 为 1.26%。

2.3.8 样品的测定:精密吸取供试品溶液和绿原酸对照品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,测定,按外标法计算。

2.4 因素水平的确定:根据预试验考察结果,提取前先浸泡 2 h,提取次数确定为 2 次。剩下主要考察提取溶剂用量(A)、提取时间(B)、乙醇体积分数(C)3 个影响因素,每个因素选择 3 个水平进行,因素水平见表 1。

2.5 正交试验设计及结果:称取四臣止咳复方处方药材 100 g,按照表 2 安排试验进行提取,合并 2 次

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	因 素		
	A/倍	B/h	C/%
1	8+6	1.0	60
2	10+8	1.5	70
3	12+10	2.0	80

提取液,分别测定提取液中岩白菜素、甘草酸、绿原酸的质量浓度,计算岩白菜素、甘草酸、绿原酸的提取率和干浸膏得率。试验结果采用综合评分进行评判,选取岩白菜素提取率(y_1)、甘草酸提取率(y_2)、绿原酸提取率(y_3)和干浸膏得率(y_4)为考察指标,综合评分时指定岩白菜素、甘草酸、绿原酸提取率指标权重系数各为 0.3,干浸膏得率指标权重系数为 0.1。规定岩白菜素提取率最高的 102.16% 为 30 分,最低的 87.53% 为 0 分,每升高 1% 则加 2.050 分 $[30/(102.16-87.53)]$,同理甘草酸提取率每升高 1% 则加 2.228 分 $[30/(76.88-63.42)]$,绿原酸提取率每升高 1% 则加 1.179 分 $[30/(101.1-75.64)]$,规定浸膏得率最低的 26.13% 为 10 分,最高的 4 号 33.74% 定为 0 分,每升高 1% 则减去 1.313 分 $[10(33.74-26.13)]$ 。试验结果见表 2,方差分析结果见表 3。

综合评分值 $y = 30 - (102.16 - y_1) \times 2.050 + 30 - (76.88 - y_2) \times 2.228 + 30 - (101.1 - y_3) \times 1.179 + 10 - (y_4 - 26.13) \times 1.313$

以综合评分值为考察指标,直观分析显示因素作用主次为 $B > C > A$,方差分析结果表明 B 因素对综合评分值具有显著影响,根据 K 值,B 因素应选

表 2 正交试验的结果

Table 2 Results of orthogonal test

实验号	因 素				试验结果				
	A	B	C	D	y_1	y_2	y_3	y_4	y
1	1	1	1	1	87.53	76.88	101.10	31.10	63.47
2	1	2	2	2	92.91	72.45	81.70	29.94	43.31
3	1	3	3	3	87.61	63.42	88.51	26.13	25.34
4	2	1	2	3	102.16	71.65	84.90	29.72	64.52
5	2	2	3	1	95.50	64.87	76.30	28.72	26.94
6	2	3	1	2	94.53	75.56	90.76	33.68	59.29
7	3	1	3	2	94.03	69.36	97.37	27.01	61.01
8	3	1	1	3	89.55	71.75	79.38	33.74	27.12
9	3	3	2	1	94.08	76.23	75.64	33.53	42.25
K_1	44.040	63.000	49.960	44.220					
K_2	50.250	32.457	50.027	54.537					
K_3	43.460	42.293	37.763	38.993					
R	6.790	30.543	12.264	15.544					

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	显著性
A	85.005	2	0.336	
B	1 458.421	2	5.761	$P < 0.05$
C	299.152	2	1.182	
误差	759.500	6		

$F_{0.05}(2,6) = 5.14$

B_1 。综合上述分析,确定最佳工艺为 $A_2B_1C_1$ 。即分别用 10 倍量、8 倍量的 60% 乙醇回流提取第 1、2 次,每次提取 1 h。

2.6 验证试验:根据试验结果,按最佳优化条件进行 3 次试验,分别测得岩白菜素、甘草酸、绿原酸提取率及干浸膏得率。表 4 结果表明该提取工艺稳定可行。

表 4 验证试验结果

Table 4 Results of verification test

试验号	岩白菜素 提取率/%	甘草酸提 取率/%	绿原酸提 取率/%	干浸膏得 率/%
1	88.83	76.19	96.18	32.61
2	87.42	75.34	96.45	31.93
3	90.65	74.60	95.79	32.50

3 讨论

提取物活性成分的得率与药物的疗效密切相关,提取工艺的优劣直接影响到提取物活性成分得率的高低。如何评价提取工艺的优劣,选择合理的评价指标非常关键。若考察的成分过于单一,则不能代表复方药物的整体性;若考察的成分与药物的功效无关,则考察意义不大。考察复方药物的提取工艺时,应选择代表复方药物整体的多个与复方功效相关的活性成分作为指标。四臣止咳颗粒的主要功效为清热解暑、止咳平喘及润喉祛痰。岩白菜素为岩白菜中的活性成分,具有明显的止咳作用。绿原酸为猪毛蒿中的活性成分,具有广泛的抗菌、抗病毒等作用。甘草酸为甘草的活性成分,具有抗炎、抗病毒等作用。本实验同时考察了复方中 3 种与药物功效相关的活性成分提取率,兼顾多味药材中多种活性成分的提取工艺更能体现复方药物的整体作用。

参考文献:

[1] 王聚乐,周慧英,尼玛次仁,等. 用正交实验方法优选藏药四臣止咳冲剂的提取工艺[J]. 西藏医药杂志,2007, 29(2):56-57.
[2] 湖南医学院药理研究组. 岩白菜素的止咳作用[J]. 中华医学杂志,1973,53(12):706.
[3] 张敏灵,马 琼,高锦明,等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药,2001,32(2):173-175.
[4] 高章圈,张建新,徐 铎,等. 甘草酸抗炎、抗病毒及免疫调节作用研究进展[J]. 解放军药学报,1999,15(5):27-29.