

一极为显著的除杂质过程,才确保了树脂更好地发挥作用。

AB-8树脂对连翘酯苷 A 的分离纯化,是一个简单、环保且高效的纯化过程,非常适合于大生产操作,再加上树脂 A 和 B 后续除杂,形成了一条很好的连翘酯苷 A 的工艺开发路线,具有广阔的工业生产应用前景。

参考文献:

- [1] 张 炜,张汉明,郭美丽,等. HPLC 法测定感冒退热颗粒(冲剂)中连翘酯苷 A 的含量[J]. 中草药, 1999, 30(4): 268-270
- [2] 张亚梅,张小娟,简 晖,等. 大孔吸附树脂纯化山蜡梅叶中总黄酮的研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1226-1229.
- [3] 乔五忠,王艳辉,李美粉,等. 利用大孔吸附树脂精制甘草酸的研究[J]. 中成药, 2006, 28(6): 794-796

## 克感利咽口服液的超声提取工艺研究

秦春梅,廖晓嘉

(广州王老吉药业股份有限公司,广东 广州 510450)

**摘 要:**目的 研究克感利咽口服液处方药材的超声提取方法。方法 分别以黄芩苷、栀子苷、色谱图相似度、总固体得率作为指标,采用均匀设计试验,结合药理学指标,研究克感利咽口服液超声提取工艺。结果 优选最佳超声提取工艺为:8 mm 药材粒度,9 倍量 40% 乙醇,超声温度 60 ℃,超声功率 1 200 W,提取 2 次,每次 30 min。结论 克感利咽口服液采用超声提取工艺切实可行,具有节能、省时、提高提取效率等优势。

**关键词:**克感利咽口服液;均匀设计;超声提取

中图分类号:R284.2 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)05-0735-04

克感利咽口服液由黄芩、金银花、栀子等 14 味药材组成。原工艺中采用乙醇回流提取或水煎煮等传统提取工艺,整个工艺能耗较大,工艺流程长、成本较高。随着现代制剂提取工艺的飞速发展,超声提取技术作为一门药物提取的现代新技术,由于其省时、节能、提取效率高等特点和优势,在中药领域的应用已经受到了广泛关注和研究,并且具有广阔的应用前景和开发价值<sup>[1-3]</sup>。本实验将在原工艺基础上,采用均匀设计法,确立克感利咽口服液超声提取的最佳工艺参数,以化学评价和生物活性评价指标,进行原工艺与超声提取工艺的对比研究,力求科学、客观地评价新工艺的可行性和适用性。

### 1 仪器、试剂与材料

Waters 600 高效液相色谱仪(600 四元梯度泵,2996 DAD 检测器,717 自动进样器,柱温箱);Empower 工作站;Mettler AE 240 型电子天平(十万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司)。SCQ-2400 型超声波提取设备(25 kHz、40 kHz、2 400 W,上海声浦超声波设备厂)。

栀子苷(批号 110749-200410)、黄芩苷(批号

110715-200514)、木犀草苷(批号 111720-200501)、升麻苷(批号 522-200203)、绿原酸(批号 110753-200413)、黄芩素(批号 111595-200402)、连翘苷(批号 110821-200406)、甘草酸铵(批号 110731-200409)对照品由中国药品生物制品检定所提供。黄芩(批号 0601037)、金银花(批号 0601042)、荆芥(批号 0601040)、薄荷(批号 0602002)、防风(批号 0601039)、栀子(批号 0601032)、连翘(批号 0601003)、甘草(批号 0601031)、僵蚕(批号 0601034)、桔梗(批号 0601015)、蝉蜕(批号 0602009)、射干(批号 051102)、地黄(批号 0601038)、玄参(批号 051101)药材均由广州王老吉药业股份有限公司提供,经中心检验室药材组鉴定,符合《中国药典》2005 年版各药材项下的相关要求。

大耳白家兔,雌雄各半,体质量为(1.5±0.25) kg,由北京市海淀区天旺实验动物养殖场提供,许可证编号:SCXK(京)2006-006。昆明种小鼠,清洁级,体质量 21~23 g,雌雄各半,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCX-(军)2002-001。

①收稿日期:2009-08-06

基金项目:广东省关键领域重点突破项目(2003A30907)

作者简介:秦春梅(1979-),女,湖南娄底人,工程师,硕士,主要从事中药新药研究。

Tel:(020)86200716 Fax:(020)86601051 E-mail:chunmeiqin@hotmail.com

## 2 方法与结果

### 2.1 黄芩苷的测定<sup>[4]</sup>

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取黄芩苷对照品 8.15 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇至刻度, 摇匀, 制成 0.163 mg/mL 的溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备: 精密移取超声提取液样品 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 60% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 色谱条件: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸 (44: 56); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 277 nm; 柱温: 35 °C。该色谱条件下, 黄芩苷峰形良好, 对称因子 1.02, 且与相邻峰的分离度为 1.7 (均大于 1.5), 理论塔板数按黄芩苷峰计算为 4068, 保留时间 13.6 min。

### 2.2 栀子苷的测定<sup>[5]</sup>

2.2.1 对照品溶液的制备: 精密称取栀子苷对照品 5.91 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成 0.1182 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备: 精密移取超声提取液样品 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

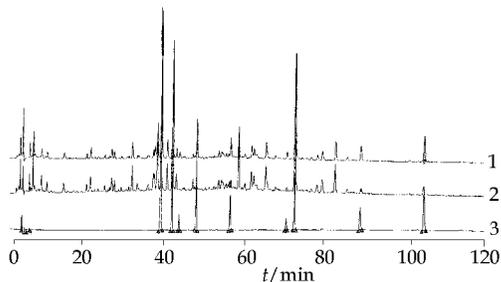
2.2.3 色谱条件: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (29: 71); 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 241 nm。该色谱条件下, 栀子苷峰形良好, 对称因子 1.03, 且与相邻峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数按栀子苷峰计算为 8562, 保留时间 14.7 min。

2.3 化学成分 HPLC 色谱图评价标准的研究<sup>[6]</sup>: 由于复方中药成分复杂, 为防止仅采用单一指标成分对工艺评价的片面性, 采用了指纹图谱的研究思路, 提取更多的成分信息并确定已知成分或特征峰的归属, 建立原工艺 HPLC 色谱图, 作为工艺研究的评价标准, 结果采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (A 版)》软件计算相似度, 以此相似度作为超声提取评价指标。

2.3.1 色谱条件: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 254 nm; 柱温: 35 °C; 流动相: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~90 min, 2% → 40% A, 体积流量: 0.8 → 1 mL/min; 90~120 min, 40% → 60% A, 体积流量: 1 mL/min。在此色谱条件下, 按照指纹图谱的方法学验证要求, 对其稳定性、精密度、重现性试验作了相应考察, 结果证明稳定性及重复性良好。

2.3.2 特征峰的归属: 将克感利咽口服液样品、自

制样品、处方药材以及各药材的指纹图谱叠加, 结合在样品溶液中加入已知对照品溶液的方法, 并借助保留时间、DAD 检测器提取的光谱图等进行综合分析, 初步筛选并确定其中 8 种成分的归属, 见图 1。

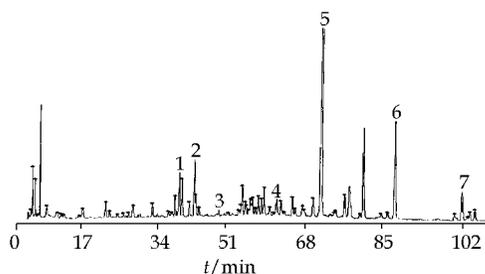


1-样品+混合对照品 2-样品 3-对照品  
1-sample+ mixed reference substances 2-sample  
3-mixed reference substances

图 1 色谱峰的归属和确定

### Fig 1 Assignment and definition of chromatographic peak

2.3.3 原工艺标准色谱图的建立: 10 批克感利咽口服液, 在上述色谱条件下完成 HPLC 分析, 所有图谱数据导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (A 版)》软件, 时间窗设为 0.5 s, 经自动匹配生成标准对照图谱 (图 2), 以此作为超声提取研究用的标准图谱。与对照图谱 (共有模式) 相比, 所有样品的相似度均大于 0.99。



1-绿原酸 2-栀子苷 3-升麻苷 4-木犀草苷  
5-黄芩苷 6-黄芩素 7-甘草酸铵

1-chlorogenic acid 2-gardenoside 3-cimside 4-cynaroside  
5-baicalin 6-baicalein 7-glycyrrhizic acid ammonium

图 2 用于超声提取研究的标准 HPLC 图谱 (共有模式)

### Fig 2 Typical HPLC chromatogram of ultrasonic extraction reference

该标准对照图谱所建立的色谱评价方法较简便可行, 重复性好, 反应的信息量较多, 采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (A 版)》软件计算相似度, 以此相似度结果作为下一步超声提取的重要评价指标。

2.4 超声提取工艺的均匀试验设计: 以提取物 HPLC 色谱图与标准图谱的相似度、黄芩苷、栀子苷的量及总固体得率共 4 个指标作为化学评价手段, 采

用均匀设计试验,以药材粒度、超声温度、超声功率、超声时间、溶媒用量、溶媒体积分数、提取次数为考察因素,采用 7 因素表  $U_{10}(10^7)$  安排 14 味药材乙醇超声提取试验。试验水平和因素见表 1,结果见表 2。

采用 SAS 软件,针对以上均匀设计的 4 个评价指标即:总固体得率、栀子苷、黄芩苷的量、色谱图相似度结果分别进行方差分析、多重比较及回归分析,

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素						
	A 药材粒度/mm	B 超声温度/℃	C 超声功率/W	D 超声时间/min	E 乙醇用量/倍	F 乙醇体积分数/%	G 提取次数/次
1	6	常温	300	20	3	0	1
2	8	45	600	25	4	10	2
3	10	50	1 200	30	5	20	3
4	12	60	1 800	40	6	30	1
5	不粉碎	70	2 400	45	7	40	2
6	6	常温	300	50	8	50	3
7	8	45	600	55	9	60	1
8	10	50	1 200	60	10	70	2
9	12	60	1 800	65	11	80	3
10	不粉碎	70	2 400	70	12	90	2

表 2  $U_{10}(10^7)$  结果分析( $n=2$ )

Table 2 Results of  $U_{10}(10^7)$  uniform design test ( $n=2$ )

编号	因素							总固体/%	黄芩苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	栀子苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	相似度
	A	B	C	D	E	F	G				
1	1	7	5	2	3	10	4	4.18	0.75	1.21	0.6380
2	2	3	10	4	6	9	8	11.99	2.46	2.76	0.7320
3	3	10	4	6	9	8	1	8.86	1.86	1.89	0.2845
4	4	6	9	8	1	7	5	10.60	1.83	0.76	0.8040
5	5	2	3	10	4	6	9	16.82	3.91	1.38	0.8745
6	6	9	8	1	7	5	2	16.37	4.80	3.26	0.8860
7	7	5	2	3	10	4	6	21.66	5.05	4.28	0.8845
8	8	1	7	5	2	3	10	12.90	0.00	1.75	0.3335
9	9	8	1	7	5	2	3	20.04	0.00	2.53	0.2340
10	10	4	6	9	8	1	7	15.23	0.00	0.56	0.2970

表 3 验证试验结果( $n=3$ )

Table 3 Result of verification test ( $n=3$ )

不同提取方法	总固体/%	黄芩苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	栀子苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	相似度
超声提取新工艺	15.1±0.36	5.94±0.20	2.52±0.18	0.943±0.007
原工艺	17.0±1.41	7.74±0.13	1.39±0.18	0.995±0.007
原质量标准限度		> 3.379	> 0.56	

以上验证试验结果表明,应用超声提取新工艺稳定可行,且与原工艺样品比较,相似度大于 0.9 以上,指标性成分也符合质量标准限度要求。

2.6 生物活性(药理)指标优选超声提取工艺:以上仅仅为通过化学分析手段初步筛选出来的优化工艺,为了进一步评价超声提取工艺的可行性和适用性,结合克感利咽口服液“疏风散热、解毒利咽”的功能主治以及相关文献报道<sup>[7,8]</sup>,采用对大肠杆菌脂多糖致家兔发热的影响和抑制炎性肿胀试验,对超

根据 SAS 统计分析结果,初步确定克感利咽口服液乙醇超声提取工艺:14 味药材,8 mm 药材粒度,9 倍量 40% 乙醇,超声温度 60 ℃,超声功率 1 200 W,提取 2 次,每次 30 min。

2.5 验证试验:按上述优化工艺,放大生产 3 批样品,并与原工艺样品及质量标准限度进行比较分析,结果见表 3。

声优化工艺及原工艺进行药效学比较,结果分别见表 4 和表 5。

以上结果表明,超声提取新工艺表现出相对更强的作用效果。通过以上比较分析,进一步证明克感利咽口服液应用超声提取是切实可行的。

### 3 讨论

在本研究中,化学评价是确定优化工艺的重要因素,为了最大限度地反映复方中大多数药材的特征成分或指标性成分,故以原工艺建立的标准图谱

表 4 不同工艺的克感利咽口服液对内毒素致热家兔的解热作用( $n=10$ )

Table 4 Effect of Kegan Liyan Oral Solution by different technology on rabbit fever induced by endotoxin ( $n=10$ )

组别	剂量/ ( $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ )	基础体温 ( $\bar{x} \pm s$ )/ $^{\circ}C$	药后不同时间体温升高值( $\bar{x} \pm s$ )/ $^{\circ}C$			
			1 h	2 h	3 h	4 h
模型对照	—	39.23 ± 0.241	1.59 ± 0.331	1.71 ± 0.470	1.88 ± 0.358	1.51 ± 0.418
阿司匹林	0.1	39.32 ± 0.270	1.15 ± 0.447*	1.39 ± 0.482	1.49 ± 0.520	1.01 ± 0.657
原工艺	10	39.40 ± 0.368	1.20 ± 0.291*	1.47 ± 0.395	1.60 ± 0.457	1.27 ± 0.648
	5	39.20 ± 0.316	1.34 ± 0.295	1.75 ± 0.337	1.95 ± 0.398	1.58 ± 0.492
新工艺	10	39.37 ± 0.347	1.04 ± 0.313* *	1.22 ± 0.559*	1.63 ± 0.414	1.41 ± 0.493
	5	39.34 ± 0.184	1.19 ± 0.338*	1.46 ± 0.481	1.55 ± 0.306*	1.22 ± 0.305

与模型对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

表 5 不同工艺的克感利咽口服液对二甲苯所致小鼠耳肿胀的抑制作用( $n=10$ )

Table 5 Inhibition of Kegan Liyan Oral Solution by different technology on ear edema of mice induced by xylene ( $n=10$ )

组别	剂量(生药 $g \cdot kg^{-1}$ )	左耳质量/mg	右耳质量/mg	肿胀率/%
对照	—	17.00 ± 1.62	39.43 ± 5.33	134.52 ± 41.62
氯化可的松	0.025	16.14 ± 1.92	28.35 ± 4.58	75.80 ± 20.76**
原工艺	24	16.14 ± 1.75	33.50 ± 5.32	107.71 ± 26.85*
	12	16.57 ± 1.95	35.64 ± 2.90	116.64 ± 20.69
新工艺	24	16.86 ± 1.95	30.28 ± 5.32	81.28 ± 34.91***
	12	17.14 ± 2.07	32.78 ± 7.04	92.26 ± 39.99**

与对照组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group

作为评价标准,将克感利咽口服液中的特征信息尽量多地反映在 HPLC 色谱图上,寻找并确定已知成分或特征峰的归属,以此评价超声新工艺,可以弥补仅以某单一指标成分评价工艺的局限性,也具有一定创新性和可行性。

本研究对超声提取的影响因素如超声功率、超声温度、药材粒度、溶媒量等均进行了综合考察,其中超声波频率也是其主要影响因素,但是由于使用的设备为 24、40 kHz 的固定双频率,在研究中均采用固定的低频率,未进行不同频率对超声提取影响的研究,需要在以后实验中进一步完善。

通过化学评价、工艺验证、生物活性(药理)指标及与原工艺进行比较分析,认为克感利咽口服液处方药材采用乙醇超声提取工艺是可行的,并具有节能、省时、提高提取效率等优势,值得继续深入研究。在后续工作中,笔者将结合生产成本等实际大生产需求,采用水作为提取溶媒,进一步深入研究克感利

### 咽口服液处方药材的超声提取工艺。

致谢:所有试验由陈凤庭顾问指导完成,其中药效学试验为委托中国中医科学院广安门医院顾丽贞等完成,SAS 统计分析由 奎龙博士完成。

### 参考文献:

- [1] 邬方宁. 超声提取技术在现代中药中的应用[J]. 中草药, 2007, 38(2): 315
- [2] 冷薇. 超声提取技术的新探索[J]. 中国现代实用医学杂志, 2006, 5(5): 43
- [3] 韩丽. 实用中药制剂新技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [4] 冯波, 施春玲, 郝乘仪, 等. RP-HPLC 法测定芎藭上清丸中黄芩苷[J]. 中草药, 2009, 40(5): 743-745
- [5] 喻贵英, 罗伟, 刘伟霞, 等. HPLC 法测定八正合剂中梔子苷的含量[J]. 中草药, 2004, 35(9): 1004-1005
- [6] 霍翠翠, 徐兰兰, 尚强, 等. 痛安注射液 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中草药, 2009, 40(4): 569-571
- [7] 顾丽贞, 张百舜, 李多娇, 等. 克感利咽口服液解热、镇痛作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1998, 5(5): 305
- [8] 顾丽贞, 李多娇, 张百舜, 等. 克感利咽口服液抗炎、免疫作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1998, 5(5): 307