

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.06.003

正交试验法优选肺炎合剂提取工艺*

韦宝含, 林小明[△], 覃祖前, 曾毅, 韦平原, 李练忠

(广西壮族自治区贵港市人民医院, 广西 贵港 537100)

摘要:目的 优选肺炎合剂的提取工艺条件。方法 以盐酸麻黄碱和虎杖苷含量及浸出液浓缩后的相对密度所构成的综合评分为评定指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法, 考察加水量、浸泡时间、提取时间、提取次数 4 个因素对水提取工艺的影响, 并进行验证试验。结果 最优提取工艺为加 8 倍量水, 浸泡 90/120 min, 提取 3 次, 每次提取 1 h。结论 以优选提取工艺制备的肺炎合剂中盐酸麻黄碱、虎杖苷含量高, 溶液相对密度大, 且稳定性、重复性好。

关键词:肺炎合剂; 正交试验法; 提取工艺; 盐酸麻黄碱; 虎杖苷; 相对密度

中图分类号: R932; R974; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)06-0007-05

Optimization of Extraction Process for Feiyan Mixture by Orthogonal Test

WEI Baohan, LIN Xiaoming, QIN Zuqian, ZENG Yi, WEI Pingyuan, LI Lianzhong

(Guigang City People's Hospital, Guigang, Guangxi, China 537100)

Abstract: Objective To optimize the conditions of the extraction process for Feiyan Mixture. **Methods** With the comprehensive scores consisting of the content ephedrine hydrochloride and polydatin and the relative density of evaporated lixivium after concentration as the evaluation indexes, $L_9(3^4)$ orthogonal test was used to investigate the effects of water addition, soaking time, extraction time and extraction times on the water extraction process, and validation test was carried out. **Results** The optimum extraction process was as follows: adding 8 times of water, soaking for 90/120 min, extracting for 3 times with 1 h each time. **Conclusion** In the Feiyan Mixture prepared by the optimized extraction process, the content of ephedrine hydrochloride and polydatin is high, the relative density of the solution is high, the stability and repeatability are good.

Key words: Feiyan Mixture; orthogonal test; extraction process; ephedrine hydrochloride; polydatin; relative density

肺炎合剂由麻黄、虎杖、白花蛇舌草、肿节风、鱼腥草、金银花等中药组方, 有清热解毒、宣肺平喘、镇咳化痰功效, 常用于治疗急慢性支气管炎等呼吸系统疾病。方中麻黄、虎杖为主药, 麻黄主要成分为盐酸麻黄碱, 虎杖主要成分为虎杖苷^[1]。本试验中以盐酸麻黄碱和虎杖苷含量及提取液浓缩的相对密度为评定指标, 选择加水量、浸泡时间、提取次数、提取时间为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[2-4], 筛选肺炎合剂的最佳提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SSI1500 型高效液相色谱仪(美国 Scientific Systems Inc); FA-2004B 型电子分析天平(上海景科甜美科学仪器有限公司); VDR-20GU 型减压干燥器(韩国杰奥特有限公司); XO-5200TDS 型超声波清洗器(武汉恒信世纪科技有限公司)。

1.2 试药

盐酸麻黄碱对照品(批号为 171241-201007)、虎杖苷对照品(批号为 111575-200502), 均购自中国食

品药品检定研究院; 甲醇(批号为 2017090401)、乙腈(批号为 2017081401)均为色谱纯, 购于成都市科隆化学有限公司; 磷酸(西陇化工股份有限公司, 批号为 130525 1)、二正丁胺(国药集团化学试剂有限公司, 批号为 20150603)、乙醇(成都市科隆化学有限公司, 批号为 2017110201)均为分析纯; 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 盐酸麻黄碱含量测定^[5-9]

2.1.1 色谱条件

色谱柱: 极性乙醚连接苯基键合硅胶(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.092% 磷酸溶液(含 0.04% 三乙胺和 0.02% 二正丁胺)-甲醇(98.5:1.5); 检测波长: 210 nm; 进样量: 10 μL; 流速: 1 mL/min; 柱温: 35 °C; 室温: 28.3 °C。

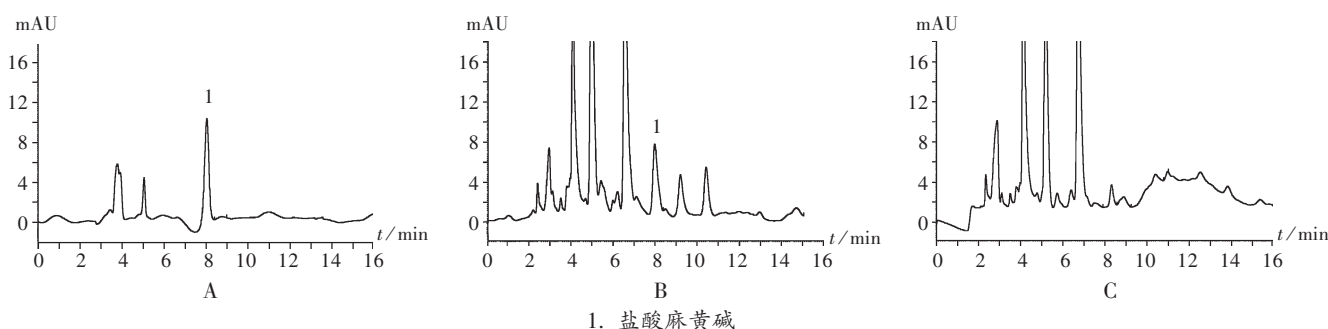
2.1.2 溶液制备

取盐酸麻黄碱对照品 0.0284 g, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成 1 mL 含 284 μg 的对照品溶液。按 1/5 处方量取药材 87.9 g, 加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次煎煮 2 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至适量放

*基金项目: 广西壮族自治区贵港市科学研究与技术开发计划项目[贵科攻 1408036]。

第一作者: 韦宝含, 男, 壮族, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)weibaohan@126.com。

[△]通信作者: 林小明, 男, 汉族, 大学本科, 主任中医师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)lxm168@126.com。



1. 盐酸麻黄碱
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 盐酸麻黄碱含量测定高效液相色谱图

冷后定容至 200 mL, 摇匀, 即得供试品贮备液; 精密量取 2 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用 1.44% 磷酸溶液定容, 称定质量, 超声 (功率为 600 W, 频率为 50 kHz) 处理 20 min, 放冷, 再称定质量, 用 1.44% 磷酸溶液补足缺失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法制备缺麻黄的阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验: 精密量取 2.1.2 项下 3 种溶液各 10 μL , 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果理论板数按盐酸麻黄碱峰计应不低于 3 000, 阴性对照无干扰, 详见图 1。

线性关系考察: 精密量取对照品溶液 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4, 1.6 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀。按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 以峰面积 (Y) 对样品质量浓度 (X , mg/mL) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 9\,284.2X + 41\,278$, $R^2 = 0.999\,7$ ($n = 6$)。结果表明, 盐酸麻黄碱质量浓度在 4.5444 ~ 18.176 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密吸取对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样, 依法测定盐酸麻黄碱峰面积, 平行操作 6 次。结果的 RSD 为 0.261% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取供试品溶液, 室温下按 2.1.1 项下色谱条件分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时依法进样测定盐酸麻黄碱峰面积。结果的 RSD 为 0.262% ($n = 6$), 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取同一供试品贮备液, 按供试品溶液制备方法平行制备 6 份, 按 2.1.1 项下色谱条件依法进样测定盐酸麻黄碱的含量。结果平均含量为 7.3267 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 0.75% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密吸取已知含量的供试品贮备液 1 mL, 共 6 份, 每两份为一组, 分别精密加入对照品溶液 0.3, 0.7, 1.1 mL, 混匀, 依法制备试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样依法测定盐酸麻黄碱含量, 计

算含量及回收率。结果见表 1。

表 1 盐酸麻黄碱加样回收试验结果 ($n = 6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测定量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
189.75	85.20	273.25	98.00	100.69	1.80
189.75	85.20	274.75	99.77		
189.75	198.80	390.50	100.98		
189.75	198.80	390.25	100.86		
189.75	312.40	505.25	100.99		
189.75	312.40	513.25	103.55		

2.2 虎杖苷含量测定^[10-14]

2.2.1 色谱条件

色谱柱: ODS 胶 C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 水 (23 : 77, V/V); 检测波长: 306 nm; 进样量: 10 μL ; 流速: 1 mL/min; 柱温: 45 $^{\circ}\text{C}$; 室温: 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 溶液制备

称取经五氧化二磷干燥剂减压干燥 24 h 的虎杖苷对照品 0.004 0 g, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加稀乙醇溶解并定容, 摇匀, 制成对照品溶液 (质量浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$)。按 1/5 处方量取药材 87.9 g, 加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次煎煮 2 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩至适量, 放冷后定容至 200 mL, 摇匀, 即得供试品贮备液; 精密量取 2 mL 置 50 mL 容量瓶中, 用稀乙醇定容, 称定质量, 加热回流 30 min, 放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 取上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。按供试品溶液制备方法制备不含虎杖的阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2.2 项下 3 种溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件依法测定。结果理论板数按虎杖苷峰计应不低于 3 000, 阴性对照无干扰, 详见图 2。

线性关系考察: 精密量取对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL, 分别置 10 mL 容量瓶中, 用稀乙醇定容, 摇匀。按拟订色谱条件依法测定, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X , mg/mL) 进行线性回归, 得回归方程

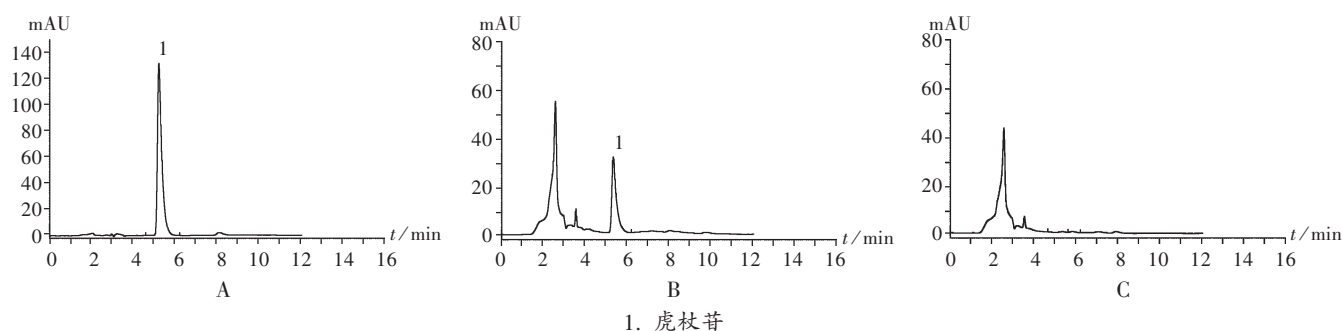


图2 虎杖苷含量测定高效液相色谱图

$Y = 27\,091X - 2\,312.8$, $R^2 = 0.9996$ ($n = 6$)。结果表明,虎杖苷质量浓度在 $4 \sim 24 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件依法测定虎杖苷峰面积,平行操作 6 次。结果的 RSD 为 0.77% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取供试品溶液,室温下按拟订 2.2.1 项下色谱条件分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 时进样依法测定虎杖苷峰面积。结果的 RSD 为 0.21% ($n = 6$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一供试品贮备液,按供试品溶液制备方法平行制备 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样依法测定虎杖苷的含量。结果平均含量为 $17.1267 \mu\text{g/mL}$, RSD 为 1.65% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取已知含量的供试品贮备液 1 mL 共 6 份,每两份为一组,分别精密加入对照品溶液(质量浓度为 $400 \mu\text{g/mL}$) 0.5, 1.0, 1.5 mL,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样依法测定虎杖苷含量,计算含量及回收率。结果见表 2。

表2 虎杖苷加样回收试验结果 ($n = 6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测定量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
437.00	200.00	623.50	93.25	95.56	2.93
437.00	200.00	619.00	91.00		
437.00	400.00	827.00	97.50		
437.00	400.00	826.00	97.25		
437.00	600.00	1025.00	98.00		
437.00	600.00	1015.00	96.33		

2.3 相对密度测定

按 2015 年版《中国药典(四部)》相对密度测定法(通则 0601)项下“比重瓶法”测定各样品溶液的相对密度,结果见表 3。

2.4 评分标准制订

将相对密度(X)的考核满分定为 20 分,盐酸麻黄碱含量(Y)、虎杖苷含量(Z)的考核满分均定为 40 分。即综合评分计算公式为:总分 = $(X_i / X_{\max}) \times 20 + (Y_i /$

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果 ($n = 9$)

序号	因素	相对密度		盐酸麻黄碱		虎杖苷		综合评分
		测定值	评分(分)	含量($\mu\text{g/mL}$)	评分(分)	含量($\mu\text{g/mL}$)	评分(分)	
1	$A_1B_1C_1D_1$	1.015	19.77	2.58	6.31	7.58	13.39	39.47
2	$A_1B_2C_2D_2$	1.022	19.90	9.47	23.15	15.88	28.04	71.09
3	$A_1B_3C_3D_3$	1.024	19.94	16.36	40.00	20.13	35.55	95.49
4	$A_2B_1C_1D_2$	1.023	19.92	9.57	23.40	12.87	22.73	66.05
5	$A_2B_2C_2D_1$	1.015	19.77	5.28	12.91	6.60	11.56	44.24
6	$A_2B_3C_3D_2$	1.025	19.96	12.14	29.68	15.66	27.66	77.30
7	$A_3B_1C_1D_2$	1.027	20.00	8.74	21.37	16.85	29.76	71.13
8	$A_3B_2C_2D_3$	1.023	19.92	13.97	34.16	22.65	40.00	94.08
9	$A_3B_3C_3D_1$	1.017	19.80	9.28	22.69	10.02	17.70	60.19
K_1	206.05							
K_2	187.59							
K_3	225.40							
R	37.81							

$Y_{\max}) \times 40 + (Z_i / Z_{\max}) \times 40$ (i 介于 $1 \sim 9$)。

2.5 正交试验优选

因素与水平:选取加水量(A,倍)、浸泡时间(B,min)、提取时间(C,h)、提取次数(D,次)为考察因素,每个因素选取 3 个水平,见表 4。

表4 正交试验因素水平表

水平	因素 A(倍)	因素 B(min)	因素 C(h)	因素 D(次)
1	8	30/60	1.0	1
2	10	60/90	1.5	2
3	12	90/120	2.0	3

注:B 因素中后一个数为虎杖浸泡时间。

试验设计与方法:称取 1/5 处方量药材,按表 2、表 3 正交试验设计试验。提取液过滤,合并提取液浓缩至适量,放冷后用水定容至 200 mL,摇匀,即得 9 个试验样品溶液。依法测定盐酸麻黄碱和虎杖苷含量及溶液相对密度。结果见表 3。

结果分析:由表 3 直观分析结果可知,各因素影响程度为 $D > B > A > C$,其中,因素 A: $A_3 > A_1 > A_2$,因素 B: $B_3 > B_2 > B_1$,因素 C: $C_3 > C_1 > C_2$,因素 D: $D_3 > D_2 > D_1$,因此选用提取工艺为 $A_3B_3C_3D_3$ 。由表 5 方差分析结果可

知,因素D对试验结果有极显著影响,因素B对试验结果有显著影响,因素A及因素C对试验结果几乎无影响。

表5 方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P
A	238.30	2	119.15	5.86	
B	533.53	2	266.76	13.12	<0.01
C	40.65	2	20.32		
D	2166.99	2	1083.49	53.31	<0.05

注: $F_{0.1(2,2)} = 9.000$, $F_{0.05(2,2)} = 19.000$ 。

最佳工艺确定:利用直观分析法分析正交试验结果后,由于所得最佳搭配只是相对于被选因素和水平而

表6 最佳提取工艺验证试验结果

序号	相对密度		盐酸麻黄碱		虎杖苷		综合评分 (分)
	测定值	评分(分)	测定值($\mu\text{g/mL}$)	评分(分)	测定值($\mu\text{g/mL}$)	评分(分)	
1	1.029	20.04	19.27	47.12	19.33	34.14	101.30
2	1.025	19.96	18.23	44.33	20.96	37.02	101.31
3	1.024	19.42	18.66	45.62	19.79	34.95	100.51

3 讨论

3.1 测定方法选择

含量测定成分选择:一般应根据制剂的功能主治或活性试验结果来选择相应的专属性成分、活性成分作为含量测定指标,同时应首选样品中原含成分,避免选用水解成分。当单一成分不能反映该药的整体活性时,应采用多成分或多组分的检测方法。麻黄和虎杖作为肺炎合剂主药,盐酸麻黄碱和虎杖苷作为主要成分,被2015年版《中国药典(一部)》收载为麻黄和虎杖的定量指标,本研究中选择盐酸麻黄碱和虎杖苷作为定量指标具有重要意义。

流动相选择:虎杖苷含量测定试验中,比较了流动相为乙腈-水(20:80, V/V)、乙腈-水(23:77, V/V)、乙腈-水(30:70, V/V)时对分离结果的影响,结果发现,乙腈-水(23:77, V/V)的分离效果最好。盐酸麻黄碱含量测定试验中,比较了流动相为0.092%磷酸溶液(含0.04%三乙胺和0.02%二正丁胺)-甲醇(98.5:1.5, V/V)和(98:2, V/V)对分离结果的影响,结果分离效果基本一致。

避光操作:试验中发现,虎杖苷需在避光下操作,否则在光照条件下易分解,含量下降明显^[16-17]。

3.2 提取工艺选择

加水量:加水量为8,10,12倍时,综合评分(3个样品之和,下同)分别为206.06,187.59,225.40分($P > 0.05$)。结果显示,加水量在8~12倍之间时对制剂质量影响甚微,但8倍加水量更节约资源,成本更低。因此,加水量选择8倍。

言,不是绝对的“最佳”,因此通常需作进一步讨论,而这一点恰恰容易被研究人员忽视^[15]。综合表3和表5及从降低能源消耗和生产成本考虑,优选提取工艺的最佳条件为 $A_1B_3C_1D_3$,即加8倍量水,浸泡90/120 min,每次提取1 h,共提取3次,此为肺炎合剂的最佳提取工艺。

2.6 验证试验

按处方量比例平行称取药材3份,分别按 $A_1B_3C_1D_3$ 提取工艺操作,依法测定盐酸麻黄碱、虎杖苷的含量及溶液相对密度。结果见表6。可见,3份提取液的综合评分分别为101.30,101.31,100.51分,均高于表3的最高评分。说明该提取工艺科学合理,稳定可行。

浸泡时间:浸泡时间分别为30/60,60/90,90/120 min时,综合评分分别为176.65,209.41,232.98分($P < 0.05$)。结果表明,浸泡时间对制剂质量有一定影响。故浸泡时间选择综合评分最高的 B_3 ,即浸泡时间选择90/120 min。

提取时间:提取时间为1,1.5,2 h时,综合评分分别为210.85,197.33,210.86分,说明提取时间在1~2 h范围内时对制剂质量几乎无影响,从节约能源和生产成本考虑,提取时间选择1 h。

提取次数:提取次数分别为1,2,3次时,综合评分分别为143.90,219.52,255.62分($P < 0.05$)。结果表明,提取次数对制剂质量有显著影响,在1~3次范围内提取次数越多,制剂有效成分含量越高,故提取次数选择3次。

综上所述,高效液相色谱法测定肺炎合剂提取液中盐酸麻黄碱、虎杖苷的含量,专属性强,操作简便,结果准确,重复性好。最佳提取工艺条件为加水8倍,浸泡90/120 min,每次提取1 h,提取3次。此提取工艺经验证证明科学合理,稳定可行。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:1870,3093.
- [2] 贾越光,丁志英,张越,等. 正交试验筛选北五味子保肝活性成分的提取工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015,35(1): 151-155.
- [3] 林淑贞,李美霞,罗春燕. 正交设计优化桂枝和营消风合剂的制备工艺[J]. 海峡药学, 2015,27(12):18-20.