

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.011

多指标正交试验法优选清气解毒合剂浓煎剂提取工艺*

钱海燕,曹 杨[△]

(南京中医药大学第二附属医院·江苏省第二中医院,江苏 南京 210017)

摘要:目的 优选清气解毒合剂浓煎剂的提取工艺。方法 以加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,以干膏得率及柴胡皂苷 a、连翘苷、连翘酯苷 A 含量为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选清气解毒合剂浓煎剂的提取工艺。结果 最佳提取工艺为加 12 倍量水每次煎煮 2 h,煎煮 3 次。干膏得率大于 26%,柴胡皂苷 a、连翘苷、连翘酯苷 A 含量分别大于 1.9,3.8,2.1 mg/g。结论 该优选的工艺适合清气解毒合剂浓煎剂制备的生产,可操作性强,为未来的大生产提供了参考。

关键词:清气解毒合剂浓煎剂;提取工艺;正交试验;干膏得率

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)17-0042-04

Optimization of Extraction Process of Concentrated Decoction of Qingqi Jiedu Mixture by Multi-Index Orthogonal Test

QIAN Haiyan, CAO Yang

(The Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine · Jiangsu Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210017)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of concentrated decoction of Qingqi Jiedu Mixture. **Methods** The extraction process of concentrated decoction of Qingqi Jiedu Mixture was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal test with water addition, decocting time and decocting times as the investigation factors, with dry extract yield and the content of saikosaponin a, forsythin and forsythiaside A as the evaluation indexes. **Results** The best extraction process was decoction for 3 times with 2 h each time and adding 12 times the amount of water. The dry extract yield was higher than 26%, and the contents of saikosaponin a, forsythin and forsythiaside A were more than 1.9, 3.8 and 2.1 mg/g, respectively. **Conclusion** The optimized process is suitable for the preparation of concentrated decoction of Qingqi Jiedu Mixture, which has strong operability and provides a reference for large-scale production in the future.

Key words: concentrated decoction of Qingqi Jiedu Mixture; extraction process; orthogonal test; dry extract yield

清气解毒合剂为江苏省第二中医院国家中医药管理局重点专科肺病专科学科带头人王灿晖教授结合温病理论指导自拟的临床经验方,由醋柴胡、蒲公英、金银花、蝉蜕、连翘、板蓝根、忍冬藤、鸭跖草、半枝莲组方。方中,醋柴胡、蝉蜕透邪泄热、达邪外泄,半枝莲、蒲公英、金银花、连翘、板蓝根、忍冬藤清热解毒,各种药材配伍,清中有透而不滞,虽不以发汗为目的,但服药后有汗出而解的效果。清气解毒合剂具有透邪泄热、清气解毒功效,临床主要用于治疗病毒感染所致高热不退,对风热流感所产生的内毒素具有解毒清热功效,且起效时间快,可迅速缓解临床症状。方中主药柴胡味辛、苦,性微寒,归肝、胆、肺经,疏肝解郁,和解表里,升阳举陷,退热截疟,主治感冒发热、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛、寒热往来。其指标性成分为柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d,具有抗炎^[1]、中枢神经抑制^[2]、镇痛^[3]、镇咳^[4]、抗菌、抗病毒作用^[5],以及对幽门结扎型、应激型、醋酸型、组织胺型溃疡也有较好防治效果^[6]。刘得华^[7]的动物实验从细胞水平反映了清气解毒合剂对流感病毒内毒素拮抗

的影响,表明其解热效果良好。黄宝驹等^[8]证实清气解毒合剂与奥司他韦胶囊治疗风热感冒(流感病毒性感冒)效果类似,都具有解毒清热功效,且起效更快,临床症状缓解更迅速。本研究中优化了我院院内制剂清气解毒合剂浓煎剂的制备工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

双波长扫描高液相色谱系统(日本岛津公司),包括全自动在线脱气系统, SIL-20A 型全自动进样系统, SPD-20A 型紫外检测器, CTD-20AC 型自动温控柱温箱; KH-500E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 800 W,频率为 40 kHz); DK-98-IIA 电热恒温水浴锅, 98-1-C 型数字控温电热套,均购于天津市泰斯特仪器有限公司; ML104/02 型电子分析天平(精度为万分之一), XSR105 型电子分析天平(精度为十万分之一), PL602-L 型台秤,均购于瑞士 Mettler Toledo 公司; 调温电热器(南通市通州申通电热器厂); R-1010 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);

*基金项目:江苏省第二中医院科研课题[SEZJJP2018036]。

第一作者:钱海燕,女,大学本科,主任中药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)jerryq2009@163.com。

[△]通信作者:曹杨,男,大学本科,中药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)lenovocaoyang1988@126.com。

FLBP-250 型万能高速粉碎机(上海菲力博食品机械有限公司);YJX40-g 型微压循环中药煎药机(北京东华原医疗设备有限责任公司,功率为 3 000 W);R20 型蒸汽夹层锅(山东博兴县国龙厨房设备厂)。

1.2 试药

柴胡皂苷 a 对照品(批号为 110777-201309,纯度为 91.1%);连翘苷对照品(批号为 110821-200508,纯度为 98.0%);连翘酯苷 A 对照品(批号为 111810-201707,纯度为 97.3%),均购于中国食品药品检定研究院;半枝莲(批号为 1905137),醋北柴胡(批号为 1901010),蒲公英(批号为 1922053),金银花(批号为 1903133),蝉蜕(批号为 1901071),连翘(批号为 2001006),板蓝根(批号为 2002018),忍冬藤(批号为 1912015),鸭跖草(批号为 1903273),均购于亳州市中药饮片厂,由本院杨燕主管中药师鉴定为正品;水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 煎煮液制备

称取半枝莲 20 g,醋北柴胡 10 g,蒲公英 15 g,金银花 10 g,蝉蜕 10 g,连翘 20 g,板蓝根 20 g,忍冬藤 30 g,鸭跖草 30 g,倒入中药煎药机中浸泡、煎煮,大火烧开,保持微沸,开始计时,结束后过滤,滤渣加入中药煎药机再按上述方法提取 1 次,合并提取药液,再将药渣充分压榨,压榨出的药汁并入上述药液,置中转容器放置沉淀后经 200 目过滤筛滤过,将上述药汁置蒸汽夹层锅中加热至沸,改用文火,不断搅拌,浓缩至 80~120 mL,于 4℃ 存放备用。

2.2 含量测定

2.2.1 柴胡皂苷 a

色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B)溶液,梯度洗脱(程序见表 1);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 210 nm;进样量为 20 μL;柱温为 25℃。理论板数按柴胡皂苷 a 峰计应不低于 10 000。在此色谱条件下,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相应保留时间处有相同色谱峰出现,且阴性对照

无干扰。色谱图见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution procedure of mobile phase(%)

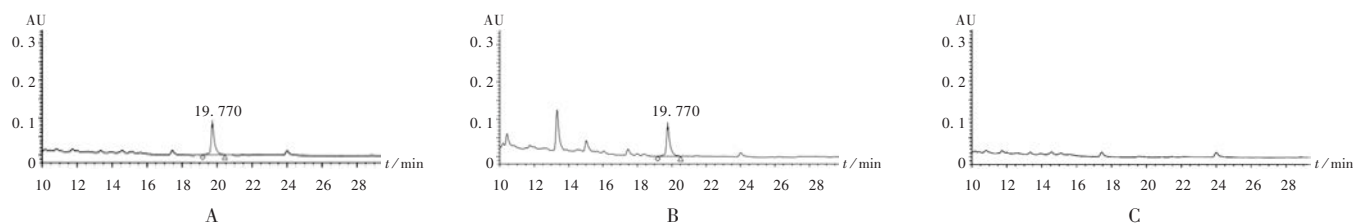
时间	流动相 A	流动相 B
0 min	25	75
50 min	90	10
55 min	90	10

溶液制备:取柴胡皂苷 a 对照品适量,精密称定,加甲醇适量使溶解,即得质量浓度为 0.4 mg/mL 的对照品溶液。精密量取清气解毒方水煎液 5 mL,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 20 mL,30℃ 水温超声处理(功率为 200 W,频率为 40 kHz)30 min,滤过,用甲醇 20 mL 分 2 次洗涤容器及药渣,合并洗液与滤液,回收溶剂至干。残渣加甲醇溶解,转移至 5 mL 容量瓶中,加甲醇 3 mL 溶解,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得柴胡皂苷 a 供试品溶液^[9-10]。取除柴胡、连翘外的其余药材,按 1/2 处方量称取,加 12 倍量水回流 1.5 h,提取 2 次,过滤,按柴胡皂苷 a 供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。

2.2.2 连翘苷

色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(25:75, V/V)溶液;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 277 nm;柱温为 30℃;进样量为 10 μL。理论板数按连翘苷峰计应不低于 3 000。在此色谱条件下,供试品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相应保留时间处有相同色谱峰出现,且阴性对照无干扰。色谱图见图 2。

溶液制备:取连翘苷对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇适量使其溶解,即得质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。精密量取清气解毒方水煎液 5 mL,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL,混匀,密塞,称定质量,超声处理(功率为 250 W,频率为 40 kHz)25 min,放冷,再次称定质量,用 50% 甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,续取滤液(稀释 3 倍),用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得连翘苷供试品溶液。取除柴胡、连翘之外的其余药材,按 1/2 处方量称取,加 12 倍量水回流 1.5 h,提

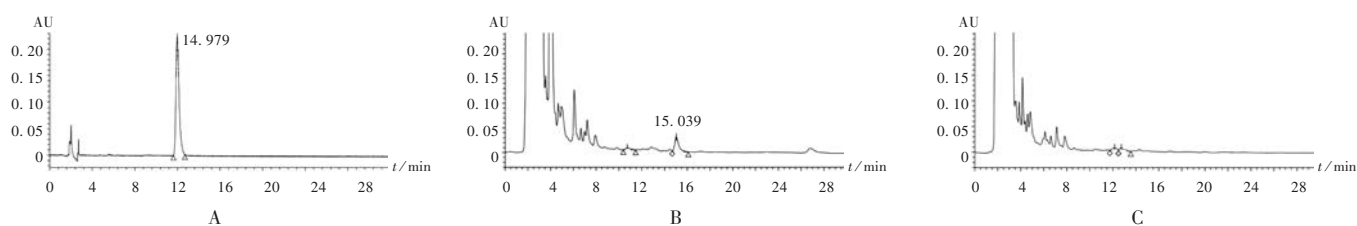


A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照药材溶液

图 1 柴胡皂苷 a 高效液相色谱图

A. Reference solution B. Test solution C. Reference medicinal material solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of saikosaponin a

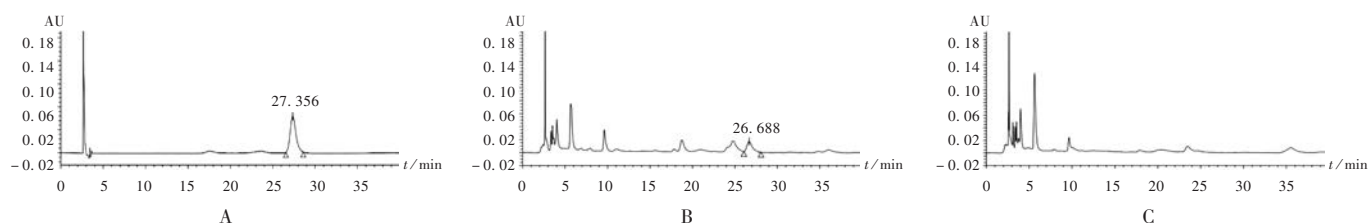


A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照药材溶液

图 2 连翘苷高效液相色谱图

A. Reference solution B. Test solution C. Reference medicinal material solution

Fig. 2 HPLC chromatograms of forsythine



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照药材溶液

图 3 连翘酯苷 A 高效液相色谱图

A. Reference solution B. Test solution C. Reference medicinal material solution

Fig. 3 HPLC chromatograms of forsythiaside A

取 2 次, 过滤, 按连翘苷供试品溶液方法制备, 即得阴性对照药材溶液。

2.2.3 连翘酯苷 A

色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱为 YMC-Pack ODS-A 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4% 冰醋酸溶液 (15:85, V/V); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 330 nm; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL。理论板数按连翘酯苷 A 峰计应不低于 5 000。在此色谱条件下, 供试品溶液色谱图中, 在与对照品溶液色谱相应保留时间处有相同色谱峰出现, 且阴性对照无干扰。色谱图见图 3。

溶液制备: 取连翘酯苷 A 对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇适量使溶解, 即得质量浓度为 0.2 mg/mL 的对照品溶液。精密量取清气解毒方水煎液 5 mL, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 20 mL, 混匀, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率为 250 W, 频率为 40 kHz) 25 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 (稀释 3 倍), 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得连翘酯苷 A 供试品溶液。取除柴胡、连翘外的其余药材, 按 1/2 处方量称取, 加 12 倍量水回流 1.5 h, 提取 2 次, 过滤, 按连翘酯苷 A 供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。

2.3 正交试验

根据前期预试验的单因素考察结果, 以清气解毒剂浓煎剂浸出物含量和柴胡皂苷 a、连翘苷、连翘酯苷 A 3 种活性成分为指标, 其中 3 种活性成分权重系数分别为 20, 浸出物含量权重系数为 40, 计算综合评分。综合评分 = 浸出物含量 / 浸出物含量_{Max} × 40 + 连翘苷含量 /

连翘苷含量_{Max} × 20 + 柴胡皂苷 a 含量 / 柴胡皂苷 a 含量_{Max} × 20 + 连翘酯苷 A 含量 / 连翘酯苷 A 含量_{Max} × 20。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验对清气解毒剂浓煎剂提取工艺进行优选, 因素和水平见表 2。试验结果使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 结果见表 3 和表 4。由表 4 可知, 各因素影响作用顺序为煎煮次数 (C) > 煎煮时间 (B) > 加水量 (A)。方差分析结果表明, 煎煮次数对有效成分的含量和浸出物得率有影响。综合有效成分含量、浸出物得率的方差分析结果, 经直观分析, 最终确定最优工艺条件为 $A_2B_2C_3$, 即加 12 倍量水, 煎煮 3 次, 每次 2 h。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Tab. 2 Factor levels of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	因素 A (倍)	因素 B (min)	因素 C (次)	因素 D (g)
1	10	90	1	0
2	12	120	2	0
3	14	150	3	0

2.4 干膏得率测定

取表 3 中 1-9 号提取液, 过滤, 滤液浓缩为浸膏, 取 10 mL 置已恒重的蒸发皿中 (质量为 M_1), 水浴蒸干溶剂, 于 105 ℃ 烘箱中干燥 3 h 后取出, 移至干燥器中, 冷却至室温, 称定质量, 在相同条件下继续干燥 1 h, 冷却, 称定质量, 直至连续 2 次的质量差不超过 5 mg 为止, 记录此时的质量 (M_2), 计算干膏得率。

得率 (%) = $[(M_2 - M_1) \times (\text{总浓缩液量} / 10 \text{ mL}) / \text{原药材质量}] \times 100\%$

2.5 最佳提取工艺验证试验

根据试验结果优选出来的最优工艺参数, 按原来清

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Tab. 3 Results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	因素 A (倍)	因素 B (min)	因素 C (次)	因素 D	干膏得 率(%)	连翘苷 (mg/g)	连翘酯苷 A (mg/g)	柴胡皂苷 a (mg/g)	综合 评分
1	1	1	1	0	14.32	0.564 9	1.689 8	0.537 5	41.35
2	1	2	2	0	21.04	1.515 1	2.953 8	1.285 3	74.61
3	1	3	3	0	24.52	1.886 7	4.114 3	1.716 6	93.50
4	2	1	2	0	19.93	1.255 8	3.332 3	0.686 0	66.44
5	2	2	3	0	25.60	1.992 8	3.701 2	2.112 9	97.99
6	2	3	1	0	20.75	0.662 7	1.748 3	0.611 5	53.36
7	3	1	3	0	22.39	1.967 6	3.632 2	1.506 8	86.65
8	3	2	1	0	17.03	0.793 2	1.835 7	0.835 4	51.40
9	3	3	2	0	20.59	1.282 0	3.535 2	1.460 6	76.05
K_1	209.46	194.11	146.11						
K_2	217.80	224.00	217.10						
K_3	214.79	222.91	278.14						
R	2.78	9.85	44.01						

注:连翘苷、连翘酯苷 A 为该成分占投入连翘的质量比;柴胡皂苷 a 为该成分占投入柴胡的质量比。

Note: Forsythin and forsythiaside A respectively represent the mass ratio of the corresponding component to *Forsythia suspensa*, and saikosaponin a represent the mass ratio of the component to *Radix bupleuri*.

表 4 正交试验方差分析结果

Tab. 4 Results of the ANOVA of the orthogonal test

方差来源	SS	df	F 比	F 临界值
因素 A	11.615	2	0.015	4.460
因素 B	187.280	2	0.241	4.460
因素 C	2 910.820	2	3.740	4.460

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$, $F_{0.01(2,2)} = 99.00$ 。

Note: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$, $F_{0.01(2,2)} = 99.00$ 。

气解毒合剂浓煎剂制备处方量的 5 倍,平行称取 3 份,按 $A_2B_2C_3$ 最优清气解毒合剂制备工艺进行验证试验,具体制备方法同前面,结果见表 5。验证结果表明,正交试验设计的最佳提取工艺适合清气解毒合剂浓煎剂制备生产实践,方法具有可操作性。

表 5 清气解毒合剂浓煎剂优选工艺验证试验结果

Tab. 5 Validation of optimal extraction process of concentrated decoction of Qingqi Jiedu Mixture

序号	干膏得率(%)	连翘苷含量(mg/g)	连翘酯苷 A(mg/g)	柴胡皂苷 a(mg/g)
1	26.72	1.958 2	3.857 4	2.207 4
2	27.13	2.015 1	3.901 4	2.124 5
3	28.01	1.970 5	3.891 2	2.182 7

3 讨论

选择干膏得率及柴胡皂苷 a、连翘苷、连翘酯苷 A 含量为清气解毒合剂浓煎剂的评价指标^[11],柴胡皂苷 a 为清气解毒合剂方中君药柴胡^[12-14]的特征指标为产品的控制指标,同时选取臣药连翘中的连翘苷和连翘酯苷 A

为工艺优化指标,可间接标志连翘药材的优劣^[15-16]。

清气解毒合剂浓煎剂为我院院内制剂的临床经验方。原设计了四因素的正交试验,即加水量、煎煮时间、煎煮次数和浸泡时间。预试验中,发现加水量越多、煎煮时间越长、煎煮次数越多、浸泡时间越长,提出物越多。但煎煮时间过长,某些活性物质可能会因为长时间高温煎煮而变性失活;煎煮次数和加水量越多,后期提取出的物质可能就越少,会造成不必要的浪费。考虑到工厂大生产的特点,以及实际生产所用时间和资源成本,故选择煎煮时间、煎煮次数和浸泡时间 3 个因素进行考察。由于长时间的提取,某些药物中的有效成分是否会造成破坏而影响药物疗效、是否要进行更多的临床试验来确定所做的提取工艺对药效有影响等,还需更多试验研究来验证。

参考文献

- [1] 张英杰,苑述刚,苏桂花,等. 柴胡的中药学及临床应用文献研究概述[J]. 甘肃中医学院学报,2011,28(1):74-77.
- [2] 于云红. 柴胡皂苷 a 对大鼠海马神经元癫痫样放电抑制作用及相关离子通道电流调节作用的研究[D]. 广州:南方医科大学,2013.
- [3] 巫丹. 柴胡与赤芍、醋柴胡与白芍配伍前后药效学比较[J]. 亚太传统医药,2017,13(1):18-19.
- [4] 舒文将,姚昕利,陈宗游,等. 中药柴胡的药理研究与临床应用[J]. 广西科学院学报,2017,33(4):268-273.
- [5] 李云静. 小柴胡汤及其拆方抗流感病毒作用的体外实验研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2010.
- [6] 杨小兰,张保国,段艳锋. 中西医结合治疗胃溃疡临床观察[J]. 山西中医,2014,30(12):20-21.
- [7] 刘得华. 清气解毒汤解热作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,1996,3(3):23-24.
- [8] 黄宝驹,朱益敏,赵裕沛,等. 清气解毒合剂治疗风热性流行性感冒临床研究[J]. 山西中医,2018,34(9):16-18.
- [9] 宿健桃,罗晋萍,崔宇宏. 高效液相色谱法测定逍遥丸中柴胡皂苷 a、b₂ 的含量[J]. 山西职工医学院学报,2017,27(2):1-3.
- [10] 缪希红,李晓燕,高君文,等. 高效液相色谱法测定柴胡配方颗粒中柴胡皂苷 a 含量[J]. 中国药业,2017,26(3):33-35.
- [11] 黄宝驹,朱益敏,赵裕沛,等. 清气解毒合剂治疗风热性流行性感冒临床研究[J]. 山西中医,2018,34(9):16-18.
- [12] 黄涵签,王潇晗,付航,等. 柴胡属药用植物资源研究进展[J]. 中草药,2017,48(14):2989-2996.
- [13] 孙晓卉,张量. 柴胡药理作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2017,14(10):52-55.
- [14] 朱明恒. 春柴胡中的柴胡皂苷 a 与 d 的含量测定[J]. 云南中医中药杂志,2014,35(7):65-66.
- [15] 张宁. 连翘主要有效成分的提取与药理作用[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(91):180.
- [16] 张晨曦,刘素香,赵艳敏. 基于液质联用技术的连翘化学成分分析[J]. 中草药,2016,47(12):2053-2060.

(收稿日期:2020-10-15;修回日期:2021-01-28)