

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.21.010

$L_9(3^4)$ 正交试验法优选黄芩解毒颗粒水提取工艺*

罗朝亮¹, 韦开昕¹, 龙立活¹, 陆治宇¹, 周贤强², 张浩², 吴芳芳^{1△}, 陈路¹

(1. 广西壮族自治区药用植物园·西南濒危药材资源开发国家工程实验室, 广西南宁 530023; 2. 广西壮要方医院, 广西南宁 530150)

摘要:目的 优选黄芩解毒颗粒的水提取工艺。方法 以加水量、煎煮时间和煎煮次数为考察因素, 以干膏得率和主药黄芩中指标性成分黄芩苷的回收率为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选提取工艺, 并进行验证试验。结果 最佳提取工艺为加 8 倍量水, 煎煮 2 次, 每次 1.0 h。所制备样品的平均干膏得率和黄芩苷回收率分别为 27.51% 和 44.65%, RSD 分别为 0.93% 和 0.61% ($n=3$)。结论 优选的提取工艺操作简便、工艺稳定, 可用于黄芩解毒颗粒的工业化生产。

关键词:黄芩解毒颗粒; $L_9(3^4)$ 正交试验; 水提取法; 工艺优选

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)21-0044-05

Optimization of Water Extraction Process of Huangqin Jiedu Granules by the $L_9(3^4)$ Orthogonal Test

LUO Chaoliang¹, WEI Kaiting¹, LONG Lihuo¹, LU Zhiyu¹, ZHOU Xianqiang², ZHANG Hao², WU Fangfang¹, CHEN Lu¹

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants · National Engineering Laboratory of Southwest Endangered Medicinal Resources Development, Nanning, Guangxi, China 530023; 2. Guangxi Zhuangyao Fang Hospital, Nanning, Guangxi, China 530150)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of Huangqin Jiedu Granules. **Methods** The extraction process was optimized by the $L_9(3^4)$ orthogonal test with the amount of water addition, decocting time and decocting times as the investigation factors, and with the yield of dry extract, recovery rate of baicalin, the index component in the main drug of Scutellariae Radix, as the evaluation indexes. Then the verification test was carried out. **Results** The optimal extraction process was as follows: adding eight times the amount of water, decocting twice, each time for 1.0 h. The average yield of dry extract and the average recovery rate of baicalin in the prepared samples were 27.51% and 44.65% with RSDs of 0.93% and 0.61% ($n=3$) respectively. **Conclusion** The optimal extraction process is simple and stable, which can be used for the industrial production of Huangqin Jiedu Granules.

Key words: Huangqin Jiedu Granules; $L_9(3^4)$ orthogonal test; water extraction; process optimization

五味消毒饮出自《医宗金鉴·外科心法要诀》卷七十二方,由金银花、蒲公英、紫花地丁、紫背天葵子、野菊花组方^[1],具有清热解毒、消散疔疮之功效,消痈散结之功偏重,主治热毒蕴蒸肌肤所致疔疮痈肿。广西壮要方医院对五味消毒饮原处方进行了加减,增加黄芩清热燥湿、穿心莲泻火解毒、栀子凉血消痈,减去紫花地丁、紫背天葵子,最终形成了由黄芩、山银花、穿心莲、蒲公英、野菊花、栀子 6 味药材组方的黄芩解毒颗粒,旨在提升其清热、凉血、解毒之功效,治疗风热感冒的疗效良好。为保证改良后处方的质量和疗效,提高制剂的安全性与可控性,本研究中对黄芩解毒颗粒的制剂工艺进行了优化,为该制剂的进一步开发与利用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

VARIAN 210 型高效液相色谱仪(美国瓦里安公

司); BSA124S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为万分之一); SB-5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率 200 W,频率 40 kHz); ZF-8 型暗箱式四用紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

1.2 试药

黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110715-201821,含量以 95.4% 计); 黄芩(产地山西,批号为 20180902), 山银花(产地湖南,批号为 20190401), 穿心莲(产地广西,批号为 20190501), 蒲公英(产地湖北,批号为 20181201), 野菊花(产地湖北,批号为 20180701), 栀子(产地江西,批号为 20180801), 均购于广西仙荣中药科技有限公司,经广西壮族自治区药用植物园蓝鸣生主任药师鉴定为正品; 甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

* 基金项目: 广西壮族自治区科学技术厅科技项目[桂科 ZY21195044, 桂科 AD18126013]; 广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目[20203109]; 广西壮族自治区药用植物园创新团队计划项目[桂药创 2019001]。

第一作者: 罗朝亮, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药及民族药开发, (电子信箱)373834102@qq.com。

△通信作者: 吴芳芳, 女, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向为中药分析与质量标准, (电子信箱)48230276@qq.com。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件^[2-7]与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil 100-5-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(48:52:0.1, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:330 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。理论板数按黄芩苷峰计应不低于5 000。

2.1.2 溶液制备

取黄芩苷对照品0.025 5 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,加50%甲醇溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度为0.243 3 mg/mL);精密量取对照品贮备液5 mL,置10 mL容量瓶中,用50%甲醇稀释并定容,即得黄芩苷对照品溶液(质量浓度为0.121 7 mg/mL)。分别取正交试验项下黄芩解毒颗粒浸膏样品各0.2 g,精密称定,共9份,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。取除去黄芩以外的其他药材,按优选提取工艺制备阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:分别精密吸取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。结果黄芩苷色谱峰分离效果良好,且阴性对照品溶液在相同保留时间处无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:精密量取2.1.2项下对照品贮备液1,2,3,4,5,6,7,8 mL,分别置10 mL容量瓶中,用50%甲醇稀释并定容,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 33.46X + 2.2797$, $r = 0.9997$ ($n = 8$)。结果表明,黄芩苷进样量在0.243 ~ 1.946 μg范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取2.1.2项下黄芩苷对照品溶液,用50%甲醇逐级稀释,按2.1.1项下色谱条件进

样测定,分别以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的进样量计算检测限和定量限。结果黄芩苷的检测限为7.5 ng,定量限为22.4 ng。

精密度试验:取2.1.2项下黄芩苷对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件在1 d内重复进样6次,考察日内精密度;连续3 d重复进样6次,考察日间精密度,并记录峰面积。结果日内精密度RSD为0.79% ($n = 6$),日间精密度RSD为1.25% ($n = 18$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批样品1 g,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,分别于配制后0,1,2,4,8,12,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果黄芩苷峰面积的RSD为1.63% ($n = 7$),表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批样品1 g,精密称定,共6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为1.82% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

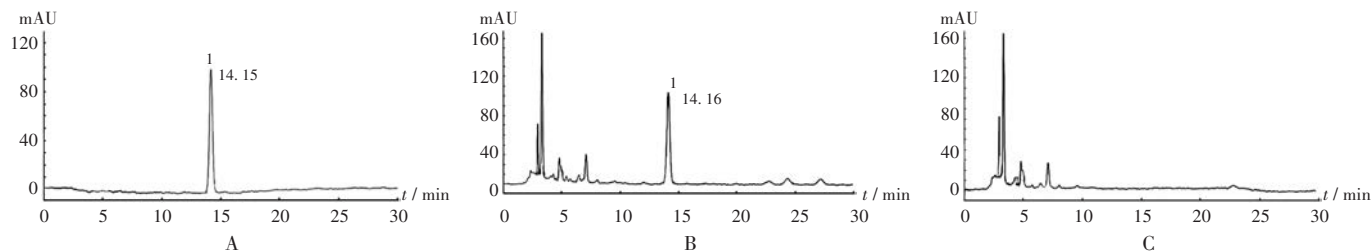
加样回收试验:取黄芩苷对照品0.039 3 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,加50%甲醇溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度为0.374 9 mg/mL);取已知黄芩苷含量的样品0.5 g,精密称定,共9份,依次精密加入上述黄芩苷对照品贮备液3,6,9 mL,各3份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

2.1.4 样品含量测定

精密吸取2.1.2项下对照品溶液和供试品溶液各10 μL,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算黄芩苷含量。

2.2 干膏得率测定

取样品水提浓缩稠膏适量,精密称定,置已干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴蒸干,转移至烘箱,以105 ℃干燥至恒定质量,取出,置干燥器中冷却30 min,精密称定质量,按公式[干膏得率(%) = (干膏质量 × 稠膏总质量) / (药材饮片质量 × 取样量) × 100%]计算。



1. 黄芩苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Baicalin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 黄芩苷加样回收试验结果 (n=9)

Tab.1 Results of the recovery test of baicalin (n=9)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
0.5146	2.5786	1.1247	3.6842	98.30		
0.5094	2.5525	1.1247	3.6274	95.57		
0.4932	2.4713	1.1247	3.5412	95.13		
0.5168	2.5896	2.2494	4.7761	97.20		
0.5095	2.5530	2.2494	4.7572	97.99	97.30	1.78
0.5127	2.5690	2.2494	4.8335	100.67		
0.5032	2.5214	3.3741	5.7457	95.56		
0.5066	2.5385	3.3741	5.8444	97.98		
0.5029	2.5199	3.3741	5.8027	97.29		

2.3 单因素试验^[8-9]

加水量:按处方称取药材5份,分别按药材量的6倍、8倍、10倍、12倍、14倍加水,置锅中煎煮1.0 h,滤过,水浴蒸发浓缩成浸膏。按2.1.2项下方法制备供试品溶液,测定黄芩苷回收率和干膏得率。结果见图2 A。可见,加入药材8倍、10倍、12倍量水时,药材干浸膏得膏和黄芩苷回收率均较高,且从8倍量起增加趋于平缓。故加水量选择加入8倍、10倍、12倍进行正交试验。

煎煮时间:按处方称取药材5份,分别加入8倍量水,煎煮提取1次,煎煮时间分别为0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h,滤过,水浴蒸发浓缩成浸膏。按2.1.2项下方法制备供试品溶液,测定黄芩苷回收率和干膏得率,结果见图2 B。可见,煎煮时间为1.0 h时,黄芩苷回收率和干膏得率均最大。故煎煮时间选择0.5, 1.0, 1.5 h进行正交试验。

煎煮次数:按处方称取药材5份,分别加入8倍量水,煎煮1.0 h,分别煎煮1次、2次、3次、4次,滤过,合并滤液,水浴蒸发浓缩成浸膏。按2.1.2项下方法制备供试品溶液,测定黄芩苷回收率和干膏得率,结果见图2 C。可见,煎煮2次后,黄芩苷回收率趋于平缓甚至下降,干膏得率逐渐增大。故煎煮次数选择1次、2次、3次进行正交试验。

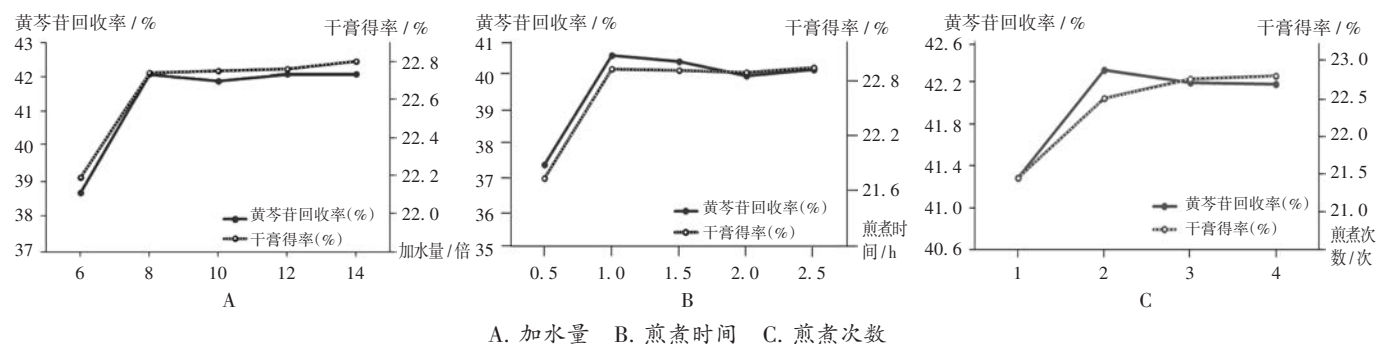


图2 单因素试验优选黄芩解毒颗粒水提取工艺

A. Amount of water addition B. Decocting time C. Decocting times

Fig. 2 Optimization of water extraction process of Huangqin Jiedu Granules by the single factor test

2.4 正交试验

根据单因素试验结果,以干膏得率和黄芩苷回收率为评价指标,以加水量(因素A)、煎煮时间(因素B)、煎煮次数(因素C)为考察因素进行正交试验,每个因素设3个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验,因素与水平见表2。按制剂处方比例称取黄芩解毒颗粒方药材饮片280 g,其中黄芩50 g,山银花35 g,穿心莲50 g,蒲公英50 g,野菊花45 g,栀子50 g,共9份,按正交试验表进行设计与试验。结果见表3。

表2 因素与水平

Tab.2 Factors and their levels

水平	因素A(倍)	因素B(h)	因素C(次)
1	8	0.5	1
2	10	1.0	2
3	12	1.5	3

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab.3 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	因素A	因素B	因素C	干膏得率(%)	黄芩苷回收率(%)
1	1	1	1	17.58	37.44
2	1	2	2	24.57	43.38
3	1	3	3	23.73	43.28
4	2	1	2	20.49	39.01
5	2	2	3	24.19	41.52
6	2	3	1	21.25	38.37
7	3	1	3	19.91	37.65
8	3	2	1	22.83	39.76
9	3	3	2	22.81	40.08
干膏得率	K_1 21.9600	K_2 21.9767	K_3 21.8500	19.3267	20.5533
	R 0.1267	4.5367	2.0700	23.8633	22.6233
黄芩苷回收率	K_1 41.3667	K_2 39.6333	K_3 39.1633	38.0333	38.5233
	R 2.2033	3.5200	2.2933	40.5767	40.8167

由表3极差分析可知,以干膏得率为评价指标时,影响因素由大至小为煎煮时间(因素B) > 煎煮次数(因素C) > 加水量(因素A),且B₂, C₂, A₂最佳,但A₁与A₂的差异不大;以黄芩苷回收率为评价指标时,影响因素由大至小为煎煮时间(因素B) > 煎煮次数(因素C) > 加水量(因素A),且B₂, C₂, A₁最佳。采用SPSS 23.0统计学软件对正交试验结果进行方差分析,以P < 0.05为对结果有显著影响,结果见表4。可见,以干膏得率为评价指标时,煎煮时间(因素B)为显著影响因素(P < 0.05),而加水量、煎煮次数均为无显著影响因素(P > 0.05);以黄芩苷回收率为评价指标时,加水量、煎煮时间、煎煮次数均为无显著影响因素(P > 0.05)。综合考虑成本和提取效率,确定最佳工艺为A₁B₂C₂,即加8倍量水,煎煮2次,每次1.0 h,滤过,水浴蒸发,浓缩成稠膏。

表4 方差分析结果

Tab.4 Results of the ANOVA

方差来源		离差平方和	自由度	MS值	F值	P
干膏得率	因素A	0.03	2	0.01	0.03	>0.05
	因素B	32.88	2	16.44	32.28	<0.05
	因素C	8.51	2	4.26	8.36	>0.05
	误差	1.02	2	0.51		
黄芩苷回收率	因素A	8.08	2	4.04	0.41	>0.05
	因素B	19.81	2	9.91	1.00	>0.05
	因素C	10.55	2	5.27	0.53	>0.05
	误差	1.80	2	0.91		

注: $F_{0.05}(1,2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(1,2) = 19.00$ 。

2.5 验证试验

按制剂处方比例称取黄芩解毒颗粒处方药材饮片280 g,各3份,按优选的最佳工艺进行煎煮,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,计算干膏得率和黄芩苷回收率。结果见表5。可见,干膏得率和指标性成分黄芩苷回收率高且稳定,表明优选工艺合理、可行。

表5 最佳提取工艺验证试验结果(% , n = 3)

Tab.5 Results of the verification test of the optimal extraction process (% , n = 3)

评价指标	1	2	3	\bar{X}	RSD
干膏得率	27.75	27.24	27.55	27.51	0.93
黄芩苷回收率	44.94	44.61	44.40	44.65	0.61

3 讨论

3.1 评价指标选择

五味消毒饮为中医常用方剂,其方剂及加减方广泛应用于治疗眼科早期睑腺炎^[10]、外科急性关节炎^[11]、痤疮^[12]、湿疹^[13]等疾病,却鲜见报道治疗风热感

冒等发热性疾病。广西壮要方医院以广西壮药^[14]应用为理论基础,通过辨证论治,对五味消毒饮进行加减而创制黄芩解毒颗粒。方中,黄芩为君药,味苦,性寒,有清热燥湿、泻火解毒、凉血止血等功效^[15]。评价指标的选择是本研究的关键步骤之一。黄芩为君药,起主要治疗作用。黄芩苷为黄芩的主要活性成分,具有抑菌、抗炎、抗过敏等药理作用^[16-18],与本方专用于治疗热毒侵袭引发的风热感冒一致。考虑本方为复方中药制剂,药效物质基础为多成分共同作用,故选择黄芩苷回收率和干膏得率为评价指标。

3.2 色谱条件选择

方法学考察关系到试验数据的可靠性,由于黄芩解毒颗粒为新创制剂,相关研究较少,系统参数确定困难。曾考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水-磷酸等多个流动相系统,色谱峰峰形和分离度均不理想,最终采用甲醇-水-磷酸(48:52:0.1, V/V/V)作为流动相的效果较好;曾考察不同品牌色谱柱[Kromasil 100-5 C₁₈柱、Agilent Eclipse XDB C₁₈柱、Diamonsil C₁₈柱,(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)],结果色谱峰峰形和分离度均符合要求。

3.3 水提取工艺方法评价

正交试验设计常用于优化生产工艺,本研究中采用L₉(3⁴)正交试验确定了黄芩解毒颗粒的最佳水提取工艺,操作简便、指标成分含量高,可用于规模化生产。黄芩解毒颗粒提取工艺的初步研究可为该制剂质量控制提供依据,为进一步开发奠定基础。

参考文献

- [1] 王倩. 五味消毒饮临床应用研究[J]. 中国民康医学, 2012, 24(24): 2988.
- [2] 杨巧虹, 邓开英, 申丽莎. 高效液相色谱法测定射麻口服液中药芩苷含量[J]. 中国药业, 2021, 30(15): 65-67.
- [3] 李岩岩, 周妍. HPLC法测定牛黄清心丸中黄芩苷含量[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(61): 12.
- [4] 盛家峰, 许文静, 于耀杰. HPLC法测定银黄颗粒中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素含量[J]. 湖北医药学院学报, 2018, 37(5): 444-446.
- [5] 吴国华, 代那音台, 奥·乌力吉. 蒙药材黄花黄芩定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(11): 2014-2020.
- [6] 王巍, 索天娇, 张强, 等. 黄芩不同炮制品的质量及抗溃疡性结肠炎作用比较研究[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(3): 43-46.
- [7] 罗群, 杨思进, 蒲清荣, 等. 清肺排毒合剂(新冠1号)质量标准研究[J]. 中国药业, 2020, 29(21): 52-55.
- [8] 翁燕, 范智毅, 刘志辉. 正交试验法优选益气活血颗粒水提工艺[J]. 中国现代中药, 2021, 23(1): 111-116.