

中图分类号: R932; R283; TQ460.6 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)15-0038-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.15.010



## $L_9(3^4)$ 正交试验法优选肺炎合剂制备工艺\*

胡彦君, 黄洁瑶, 肖亚平, 钟良才, 方伟, 李柏群<sup>△</sup>

(重庆大学附属三峡医院, 重庆 404000)

**摘要:**目的 优选肺炎合剂的制备工艺。方法 以盐酸麻黄碱含量及干膏率的综合评分为评价指标, 以加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 采用  $L_9(3^4)$  正交试验法优选肺炎合剂水提取工艺, 采用单因素试验法考察其浓缩温度及纯化工艺, 并进行验证试验。结果 优选最佳制备工艺为煎煮2次, 第1次加8倍量水, 第2次加6倍量水, 每次煎煮1.5 h, 煎液减压(压强为0.05 mbar)浓缩温度控制在55~85 °C, 采用离心机(转速为10 000 r/min, 离心半径为92 mm)过滤。按优选工艺制备的3份样品中, 盐酸麻黄碱含量为0.14 mg/mL, 干膏率为10.66%。结论 优选工艺科学、合理, 操作简便, 且稳定性、重复性好, 可为肺炎合剂的工业化生产提供试验依据。

**关键词:**肺炎合剂;  $L_9(3^4)$  正交试验法; 盐酸麻黄碱; 干膏率; 工艺优选

\*基金项目: 中国博士后科学基金71批面上资助“地区专项支持计划”项目[2022MD713718]; 重庆市自然科学基金面上项目[cstc2020jcyj-msxmX1071]; 重庆市卫生健康委员会中医药科研项目[2024ZYQN013]; 重庆市万州区科技计划项目[wzstc-2020023]; 重庆市万州区科卫联合医学科研项目[wzstc-kw2020038, wzstc-kw2023017]; 重庆大学附属三峡医院院级科研项目[2022YJKYXM-005]。

第一作者: 胡彦君, 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向为医院制剂研发, (电子信箱)83784361@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 李柏群, 女, 大学本科, 主任中药师, 研究方向为中药制剂、炮制、鉴定与临床中医学, (电子信箱)27968521@qq.com。

兰州: 中国科学院兰州化学物理研究所, 2007.

[5] 王雪萍, 安承熙, 杨绪启, 等. 班种草籽油中脂肪酸组成的研究[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 1999(2): 41-44.

[6] JANG CH, EUN JS, LIM JP, et al. Phytochemical Components from the Whole Plants of *Bothriospermum tenellum* [J]. Korean Journal of Pharmacognasy, 2003, 34(2): 119-122.

[7] 刘虹, 陈海生. 新疆紫草化学成分与药理作用的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(3): 161-164.

[8] 崔晓秋. 中药紫草化学成分及药理作用最新研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(5): 356-358.

[9] 周健. 新疆紫草化学成分研究及根与茎残基成分的比较[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[10] 叶佳. 紫草化学成分及其抗耐药菌活性的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.

[11] BAI JR, ZHANG YS, TANG C, et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110985.

[12] AKTER R, RAHMAN MR, AHMED ZS, et al. Plausibility of natural immunomodulators in the treatment of COVID-19 - A comprehensive analysis and future recommendations [J]. Heliyon, 2023, 9(6): e17478.

[13] SHANG ZP, YI Y, YU R, et al. Bioactive compounds of Jingfang Granules against SARS-CoV-2 virus proteases 3CL<sup>pro</sup> and PL<sup>pro</sup> [J]. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2022, 54(5): 907-919.

[14] QIAO XR, FENG T, ZHANG D, et al. Luteolin alleviated neutrophilic asthma by inhibiting IL-36 $\gamma$  secretion-mediated MAPK pathways[J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 165-176.

[15] 董世奇, 赵鹿, 张东旭, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1546-1557.

[16] 蔡嵘鑫. 基于UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS技术研究中药酚酸RAF抗氧化机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.

[17] 武俊颖, 张武岗, 郎一帆, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的芒果核化学成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(6): 949-965.

[18] 龙红萍, 易健, 蔺晓源, 等. 基于UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS技术的复方钩藤降压片化学成分分析[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(3): 396-403.

[19] 黄华靖, 江洁怡, 肖观林, 等. UPLC-Q-TOF-MS法分析猫爪草化学成分[J]. 中成药, 2022, 44(7): 2405-2409.

[20] 陈辉华, 祁金丽, 梁洁, 等. 基于网络药理学及实验验证分析止咳颗粒治疗咳嗽的作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(1): 128-143.

[21] 权赫秀, 朱穆峰, 姚凤云, 等. 山楂有机酸对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 513-516.

[22] 杨泓毅, 林龙飞, 刘宇灵, 等. 黄酮类化合物抗骨关节炎机制研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(24): 8290-8300.

[23] 石梦瑶, 赵薇, 杨安全, 等. 酚酸类化合物在化妆品中的原料制备与应用[J]. 精细化工, 2024, 41(2): 245-256.

[24] 董熠, 刘丽佳, 韩璐雯, 等. 香豆素类化学成分的药理作用及毒性机制研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(16): 5462-5472.

[25] 赵小超, 胡筱希, 程英歌, 等. 鬼点灯药材脂溶性成分及抗氧化活性研究[J]. 中国药业, 2023, 32(4): 55-58.

(收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2024-02-14)

## Optimization of Preparation Process for Feiyan Mixture by the $L_9(3^4)$ Orthogonal Test

HU Yanjun, HUANG Jieyao, XIAO Yaping, ZHONG Liangcai, FANG Wei, LI Boqun  
(Chongqing Three Geoges Central Hospital, Chongqing, China 404000)

**Abstract: Objective** To optimize the preparation process for Feiyan Mixture. **Methods** With comprehensive score of ephedrine hydrochloride content and extract rate as the evaluation index, the  $L_9(3^4)$  orthogonal test was used to optimize the extraction process of Feiyan Mixture with water addition, decoction time, and decoction times as the investigation factors. Single factor test was used to investigate the concentration temperature and purification process, and validation test was carried out. **Results** The optimal extraction process was as follows: decocting twice, adding eight times the amount of water for the first time and six times the amount of water for the second time, decocting for 1.5 h each time, controlling the concentration temperature in the range of 55 – 85 °C under reduced pressure (pressure of 0.05 mbar), and filtering by a centrifuge (speed of 10 000 r / min, centrifuge radius of 92 mm). The ephedrine content in three samples prepared by the optimal process was 0.14 mg / mL, and the extract rate was 10.66%. **Conclusion** The optimal extraction process is scientific, reasonable, easy to operate, and has good stability and repeatability, which can provide experimental evidence for the industrial production of Feiyan Mixture.

**Key words:** Feiyan Mixture;  $L_9(3^4)$  orthogonal test; ephedrine hydrochloride; extract rate; process optimization

肺炎合剂由生石膏、麻黄、金银花、甘草、杏仁、黄芩等中药饮片组方,具有清热解毒、化痰止咳、宣降肺热等功效<sup>[1]</sup>,用于治疗痰热闭肺型或风热闭肺型肺炎,以及急性支气管炎、慢性支气管炎的急性发作、病毒性肺炎、大叶性肺炎(细菌型)等疾病的咳嗽、黄浓痰、发热或不发热、胸闷痛、咽喉痛等症<sup>[2]</sup>。该方在我院作为医院中药制剂已使用多年,效果良好,但原制备工艺粗糙,缺少规范化标准,中药提取液澄明度欠佳,久存有沉淀析出,可能影响临床疗效<sup>[3]</sup>。为方便患者用药,我院将该方制成合剂,改善了汤剂临用新制、久置易发霉变质、不便携带、服用量大、患者依从性较差等缺点<sup>[4-5]</sup>,并对其制备工艺进行研究<sup>[6]</sup>。为此,本研究中以盐酸麻黄碱含量及提取液浓缩后的干膏率为综合评价指标,以加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素<sup>[7]</sup>,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选肺炎合剂的提取工艺,采用单因素试验法考察浓缩温度及纯化工艺,并进行验证试验。现报道如下。

### 1 仪器与试药

#### 1.1 仪器

Perkin Elmer Series 200型高效液相色谱仪(美国PE公司);ZF-1型三用紫外分析仪(江苏其林贝尔仪器制造有限公司);UC-1000型超声波清洗机(宁波科生仪器厂,功率为400 W,频率为50/60 kHz);ME204E型电子分析天平(梅特勒-托利多科技<中国>有限公司,精度为0.001 g);101A-Z型鼓风干燥箱(上海市实验仪器总厂);旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限公司);离心机(美国Beckman Coulter公司)。

#### 1.2 试药

盐酸麻黄碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110753-20041317124-201001,纯度为99.7%);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸为优级纯,水为超纯水;生石膏(批号为230101),麻黄(批号为230101),金银花(批号为211101),燀苦杏仁(批号为230101),黄芩(批号为

230101),虎杖(批号为221202),北柴胡(批号为220901),贯众(批号为201201),大青叶(批号为220101),野菊花(批号为230101),青蒿(批号为180601),重楼(批号为230201),地龙(批号为220101),炒僵蚕(批号为20082501),均购于重庆康嘉药业有限公司;甘草(重庆上药慧远药业有限公司,批号为230102)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 盐酸麻黄碱含量测定

##### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Inertsustain  $C_{18}$ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:0.1%磷酸水溶液(含0.1%三乙胺)-乙腈(97:3, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:205 nm;柱温:30 °C;进样量:10  $\mu$ L。

##### 2.1.2 溶液制备

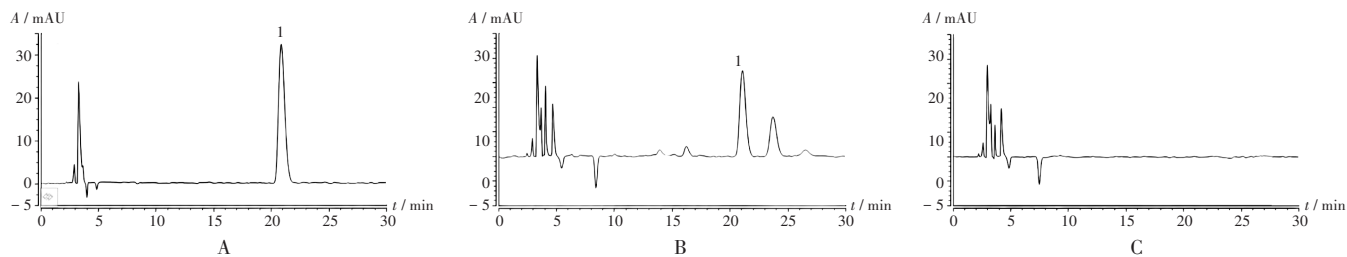
取盐酸麻黄碱对照品10 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液溶解并定容,摇匀,即得对照品溶液。

按处方工艺称取中药饮片,麻黄、生石膏加投料总量的8倍量水煎煮30 min,再加入其余中药饮片煎煮2次,每次2.0 h,煎液过滤,合并滤液,减压(压强为0.05 mbar)浓缩至适量,静置,滤过,即得供试品贮备液。取供试品贮备液5 mL,加水10 mL及浓氨试液0.5 mL,用乙醚振摇提取5次(每次30, 30, 20, 20, 20 mL),合并乙醚液,加盐酸乙醇溶液(1 → 20)2 mL,混匀,低温挥干,用5 mL乙醇溶解残渣,转移至25 mL容量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液定容,摇匀,即得供试品溶液。

按处方工艺制备缺麻黄的阴性样品,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:精密量取2.1.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10  $\mu$ L,按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶



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 高效液相色谱图

1. Ephedrine hydrochloride

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

Fig. 1 HPLC chromatograms

液相色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且阴性对照无干扰,各成分分离度良好,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:取2.1.2项下对照品溶液适量,加0.1 mol/L盐酸溶液稀释成质量浓度分别为6.496 5, 8.661 9, 10.827 4, 21.654 8, 43.309 7, 64.964 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以峰面积( $Y$ )为纵坐标、对照品溶液质量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 38.464 X + 0.016 4 (R^2 = 0.999 5, n = 6)$ 。结果表明,盐酸麻黄碱的进样量在0.064 965 ~ 0.649 645  $\mu\text{g}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.1.2项下供试品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的 $RSD$ 为1.21% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.1.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 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。结果的 $RSD$ 为1.04% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取2.1.2项下同一供试品贮备液,平行制备供试品溶液6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 $RSD$ 为2.22% ( $n = 6$ ),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6份,各5 mL,分别加入盐酸麻黄碱对照品溶液(质量浓度为1.004 mg/mL)0.5 mL,依法制备供试品溶液,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。结果平均回收率为93.81%,  $RSD$ 为1.12% ( $n = 6$ ),表明方法准确度良好。

## 2.2 提取物干膏率计算

精密吸取肺炎合剂水提取液适量,置干燥的恒定质量蒸发皿中,水浴蒸干,105  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥3.0 h,取出,干

燥器中冷却20 min,迅速称定质量,按公式计算干膏率。

## 2.3 $L_9(3^4)$ 正交试验法优选提取工艺

按比例称取处方量234 g中药饮片,平行9份,加水提取,合并、浓缩提取液,定容至150 mL,以盐酸麻黄碱含量和干膏率(权重系数分别为0.8, 0.2)为综合评价指标,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。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。盐酸麻黄碱含量( $\text{mg}/\text{mL}$ ) = 盐酸麻黄碱的质量 / 麻黄中药饮片的质量,干膏率(%) = (干膏质量 / 中药饮片投入总量)  $\times 100\%$ 。

表1 因素与水平

Tab. 1 Factors and their levels

水平	因素A(倍)	因素B(h)	因素C(次)
1	6	1.5	2
2	8	2.0	3
3	10	2.5	4

注:第1次煎煮多加2倍量水。

Note: Adding twice the amount of water for the first decoction.

表2  $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of the  $L_9(3^4)$  orthogonal test

序号	因素A	因素B	因素C	空白	盐酸麻黄碱含量( $\text{mg}/\text{mL}$ )	干膏率(%)	综合评分
1	1	1	1	1	0.18	9.81	0.164
2	1	2	2	2	0.17	9.51	0.155
3	1	3	3	3	0.15	9.80	0.140
4	2	1	2	3	0.17	9.42	0.155
5	2	2	3	1	0.07	9.51	0.075
6	2	3	1	2	0.16	9.69	0.147
7	3	1	3	2	0.13	9.44	0.123
8	3	2	1	3	0.15	8.81	0.138
9	3	3	2	1	0.12	9.33	0.115
$K_1$	0.153	0.140	0.150				
$K_2$	0.123	0.127	0.137				
$K_3$	0.123	0.133	0.113				
$R$	0.030	0.130	0.037				

表3 方差分析结果

Tab. 3 Results of the analysis of variance

因素	MS	自由度	F比	F临界值	P
A	0.001	2	0.001	19	> 0.05
B	0.001	2	0.001	19	> 0.05
C	0.001	2	0.001	19	> 0.05
误差	1.35	2			

由表2和表3可知,影响提取效果的因素由大至小依次为B>C>A,即煎煮时间>煎煮次数>加水量,确定最佳提取工艺为A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>。参考文献[8-10],并综合考虑实际生产成本,确定提取工艺为取处方量中药饮片煎煮2次,第1次加8倍量水,第2次加6倍量水,每次煎煮1.5 h。

#### 2.4 单因素试验考察减压浓缩温度与纯化工艺

减压浓缩温度:按比例称取23.4 kg处方量中药饮片,按2.3项下优选工艺提取,过滤,合并滤液,将滤液平均分成3份,分别采用不同减压(压强为0.05 mbar)浓缩温度(55, 75, 85 °C)浓缩至相对密度1.05,测定收率及干膏率。结果3种减压(压强为0.05 mbar)浓缩温度对收率及干膏率均无明显影响,实际生产中减压(压强为0.05 mbar)浓缩温度可控制在55~85 °C范围内。详见表4。

表4 浓缩温度试验结果(%)

Tab. 4 Results of the concentration temperature test (%)

项目	55 °C	75 °C	85 °C
收率	56.39	56.87	56.51
干膏率	12.39	12.50	12.42

纯化工艺:根据2020年版《中国药典(四部)》中合剂相关规定,除另有规定外,合剂应澄清<sup>[8]</sup>;贮存期间不得有发霉、酸败、异物、变色、产生气体或其他变质现象,允许有少量摇之易散的沉淀。按比例称取23.4 kg处方量中药饮片,按2.3项下优选工艺提取,过滤,合并滤液,减压(压强为0.05 mbar)浓缩至相对密度1.05,静置,过滤,将滤液定容至15 L,通过不同过滤方式[200目筛手工过滤,离心机(转速为10 000 r/min,离心半径为92 mm)]过滤,观察澄清度,并测定干膏率和盐酸麻黄碱含量。结果2种过滤方式对澄清度均无明显影响,但离心机过滤后的干膏率和盐酸麻黄碱含量较200目筛手工过滤高,故选择离心机过滤。详见表5。

表5 纯化工艺试验结果

Tab. 5 Results of the purification process test

项目	200目筛手工过滤	离心机过滤
澄清度	澄清	澄清
干膏率(%)	11.79	13.03
盐酸麻黄碱含量(mg/mL)	0.10	0.15

#### 2.5 验证试验

为进一步考察优选工艺的可靠性及稳定性,按比例称取2.34 kg处方量中药饮片各3份,按2.3和2.4项下优选工艺进行验证试验,测定干膏率及盐酸麻黄碱含量。结果的RSD分别为0.01%和0.19%(n=9),表明优选工艺稳定、合理、可行。详见表6。

表6 验证试验结果(n=3)

Tab. 6 Results of the verification test (n=3)

项目	1	2	3	$\bar{x}$
盐酸麻黄碱含量(mg/mL)	0.14	0.13	0.15	0.14
干膏率(%)	10.68	10.64	10.66	10.66

#### 3 讨论

中药制剂疗效高低的关键在于中药饮片中有有效成分是否被完全提取,而提取工艺合理性、提取技术的高低都会直接影响中药饮片中有有效成分提取的质量。因此,合理的提取工艺是生产中中药制剂的重要环节<sup>[9]</sup>。目前,多采用正交试验法优选制剂提取工艺<sup>[10-12]</sup>,根据各指标的理化性质,从试验中挑选具有代表性的指标进行考察,是一种高效、快速、经济的试验设计方法<sup>[13]</sup>,符合中药复方肺炎合剂的作用特点。

肺炎合剂成分复杂,原制备工艺粗糙,为提高该制剂的质量与患者使用的便利性及依从性,本研究中采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法对其制备工艺进行了优化。根据预试验结果,选择对制剂质量影响较大的煎煮次数、煎煮时间、加水量3个因素进行考察。采用高效液相色谱法测定方中君药麻黄的主要指标性成分盐酸麻黄碱的含量<sup>[14]</sup>,并以盐酸麻黄碱的含量和干膏率综合评价制备工艺参数组合的优劣。根据本试验结果,综合考虑能源、成本、时间、实际生产等因素<sup>[15]</sup>,确定最优制备工艺为取处方量中药饮片,煎煮2次,第1次加8倍量水,第2次加6倍量水,每次煎煮1.5 h,煎液减压(压强为0.05 mbar)浓缩温度控制在55~85 °C,采用离心机(转速为10 000 r/min,离心半径为92 mm)过滤。经验证,该制备工艺稳定、可行,可为肺炎合剂的工业化生产提供试验依据。

本研究中按传统中药制剂生产要求,采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验法优化了肺炎合剂的制备工艺。优化工艺既节省了制作时间,又有较高的生产效率,能更好地满足临床需求。但中药是多成分、多靶点作用于机体的,单一成分很难反映制剂的整体疗效,后续将开展临床疗效评价研究。

#### 参考文献

- [1] WAN SX, XIANG Y, HU YJ, et al. Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing[J]. J Med Virol, 2020, 92(7): 797-806.
- [2] 陈勇, 刘华宝, 牟方政, 等. 万州地区196例新型冠状病毒