

# 正交试验结合引喘试验优化三子方提取工艺

黎婉婉<sup>1</sup>, 梁劲康<sup>1</sup>, 胡巧红<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东药学院药科学院药剂系, 广州 510006; 2. 广东药学院药科学院临床药理学系, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选三子方的提取工艺。方法: 利用豚鼠组胺引喘试验比较水煎煮法和乙醇回流法对三子方药效的影响; 以芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量及浸膏得率的综合评分为指标, 采用正交试验考察乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间及提取次数对三子方提取工艺的影响, 结合豚鼠组胺引喘药效试验验证最佳工艺。结果: 采用乙醇回流法提取, 最佳提取工艺为加10倍量70%乙醇提取3次, 每次1h; 芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量分别为7.26, 5.63 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 结合药理学试验优选的提取工艺稳定可行, 重复性好, 适用于三子方的工业生产。

**[关键词]** 三子方; 豚鼠组胺引喘试验; 芥子碱硫氰酸盐; 迷迭香酸; 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0026-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110026

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1539.004.html>

**[网络出版时间]** 2014-03-24 15:39

## Optimization of Extraction Technology of Sanzi Prescription by Orthogonal Test Combined with Asthma Test

LI Wan-wan<sup>1</sup>, LIANG Jing-kang<sup>1</sup>, HU Qiao-hong<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Sanzi prescription. **Method:** Asthma test induced by histamine on guinea pigs was used to compare decoction and ethanol reflux extraction. With composite score of contents of sinapine thiocyanate and rosmarinic acid, yield of extract as index, orthogonal test was designed to optimize extraction technology by taking ethanol concentration, solvent consumption, extracting time and times as factors, optimal process was verified with asthma test induced by histamine on guinea pigs. **Result:** Ethanol reflux extraction was adopted, optimal extraction conditions were as follows: extracted thrice with ten times the amount of 70% ethanol for 1 h each time; under these conditions, extracting amounts of sinapine thiocyanate and rosmarinic acid were 7.26, 5.63 mg·g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** This extraction process was reasonable and reproducible, which was suitable for industrial production of Sanzi prescription.

**[Key words]** Sanzi prescription; asthma test induced by histamine on guinea pigs; sinapine thiocyanate; rosmarinic acid; extraction process

三子养亲汤源自明代《韩氏医通》,由白芥子、莱菔子、紫苏子组成,具有降气行痰、止咳平喘、消食导滞之功,临床常用于治疗老年支气管哮喘、咳嗽、小儿喘息性肺炎等<sup>[1-3]</sup>。梁文波等<sup>[4]</sup>对三子方水煎液、乙醇提取物及石油醚提取物的药效进行比较,发现乙醇提取物和石油醚提取物具有明显的平喘作

**[收稿日期]** 20131009(032)

**[基金项目]** 广州市科技计划项目(2010Y1-C841)

**[第一作者]** 黎婉婉,在读硕士,从事药剂学研究, Tel: 15920371232, E-mail: liwany@163.com

**[通讯作者]** \*胡巧红,博士,教授,从事药剂学研究, Tel: 020-39352117, E-mail: hu\_qiaohong@163.com

用,而水提液则具有明显的祛痰作用,说明该复方的药效部位既有脂溶性成分,又有水溶性成分。本实验以芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量和浸膏得率为综合评价指标,结合豚鼠组胺引喘药效试验<sup>[5]</sup>,采用正交试验优选三子方的提取工艺,初步探讨该复方中有效成分提取率与药效学指标间的相关性,确保提取结果的可靠性,为该处方的剂型开发提供参考。

## 1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), AUW220 型电子分析天平(日本岛津), DFY-200 型高速中药粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司), 402AI 型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司)。

白芥子、紫苏子和莱菔子均购自广药集团采芝林连锁药店,经广州市中药饮片厂化验员罗强鉴定分别为十字花科植物白芥 *Sinapis alba* L. 的干燥成熟种子,唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥成熟果实,十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子;芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111702-201102, 111871-201203),磷酸组胺(阿拉丁试剂有限公司),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

豚鼠,150~200 g,雌雄不拘,由广州白云区穗北实验动物养殖场提供,合格证号 4400210000805。

## 2 方法与结果

### 2.1 提取方法考察

**2.1.1 煎煮法** 按处方比例称取药材,加 10 倍量水浸泡 1 h,加热煮沸,煎煮 1 h 后过滤,滤渣加 7 倍量水煎煮 50 min,过滤,合并 2 次滤液,减压浓缩至  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,得水提液。

**2.1.2 乙醇回流法** 按处方比例称取药材粗粉,加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h,滤过,滤渣同法再提取 1 次,合并滤液,减压浓缩至  $1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,得醇提液。

**2.2 豚鼠组胺引喘试验<sup>[6]</sup>** 以引喘潜伏期为评价指标,考察三子方复方和单味药材水提液、醇提液的抗喘效果。将豚鼠放入自制密闭容器内,喷入 0.1% 组胺溶液 20 s,记录豚鼠从吸入气雾至产生严重喘息的时间,即引喘潜伏期,超过 120 s 定为不敏感,不予使用。取合格豚鼠 27 只,雌雄不拘,分为 9 组,每组 3 只,各组连续灌胃给药 7 d,于最后一次给药 1 h 后测定引喘潜伏期。其中空白对照组不给药,

哮喘模型组按  $1 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$  给予生理盐水,地塞米松组按  $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给药,其他组按  $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  给药,结果见表 1。

表 1 不同提取方法豚鼠组胺引喘试验考察( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	引喘潜伏期		延长时间/s
	给药前/s	给药后/s	
空白对照	84.8 ± 5.90	92.7 ± 6.82	7.9 ± 0.99
哮喘模型	82.4 ± 6.50	78.5 ± 5.23	-3.9 ± 1.33
紫苏子水提	72.3 ± 7.99	88.0 ± 9.77	15.7 ± 6.13 <sup>1)</sup>
紫苏子醇提	79.9 ± 8.40	85.1 ± 11.73	5.2 ± 3.54
白芥子、莱菔子水提	72.6 ± 12.98	91.7 ± 11.79	19.1 ± 7.27 <sup>2)</sup>
白芥子、莱菔子醇提	73.7 ± 12.23	123.0 ± 18.47	50.2 ± 6.25 <sup>2)</sup>
三子方水提	71.1 ± 5.20	112.0 ± 16.71	41.0 ± 14.85 <sup>1)</sup>
三子方醇提	73.9 ± 5.15	151.6 ± 18.8	77.7 ± 8.69 <sup>2)</sup>
地塞米松	74.6 ± 7.95	173.1 ± 16.93	98.5 ± 14.37 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 5 同)。

由表 1 可知,白芥子、莱菔子的水提组和醇提组抗喘效果均优于紫苏子水提组和醇提组;三子方复方水提组和醇提组抗喘作用强于单味药水提组和醇提组,说明 3 味药材合用比单独使用效果更好;三子方醇提组给药前后引喘潜伏期延长明显高于三子方水提组,可能是因为三子方中抗喘有效成分在醇溶液中溶出更好,故选用乙醇提取法。

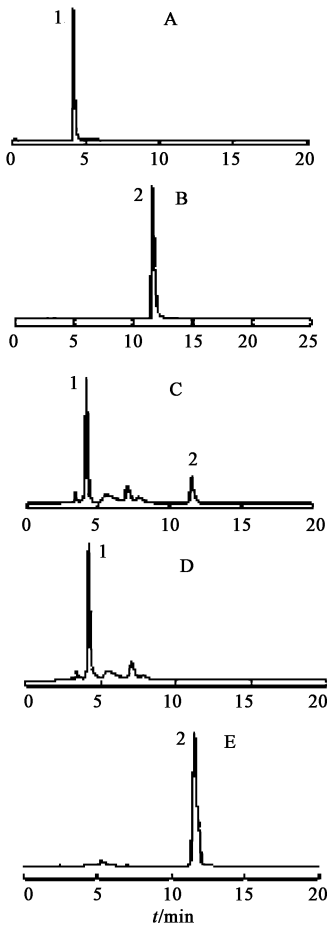
### 2.3 提取物的含量测定

**2.3.1 色谱条件** Dikma C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(含 0.15% 三乙胺,B)梯度洗脱(0~2 min, 25% A; 3~5 min, 20% A; 7~11 min, 60% A; 15~20 min, 25% A),检测波长 330 nm,进样量 20 μL,流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温 30 ℃。理论塔板数按芥子碱硫氰酸盐峰计算应不低于 3 000,见图 1。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 精密称取芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸对照品 3.42, 3.70 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相(乙腈-0.1% 甲酸水溶液 = 25:75,下同)溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.3.3 标准曲线的绘制** 精密移取对照品溶液适量,加流动相配制系列对照品溶液,分别按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得芥子碱硫氰酸盐和迷迭香酸的回归方程依次为  $Y = 35.734X - 9.5245$  ( $r^2 = 1.0000$ ),  $Y = 32.639X - 48.878$  ( $r^2 = 0.9998$ ),线性范围分别为 2.67~342, 2.89~370  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.3.4 供试品溶液的配制** 精密称取白芥子、紫苏



A, B. 对照品; C. 供试品; D. 白芥子-莱菔子样品; E. 紫苏子样品;  
1. 芥子碱硫氰酸盐; 2. 迷迭香酸

图 1 三子方提取液 HPLC

子、莱菔子粗粉各 9 g, 按一定工艺条件提取, 提取液过滤, 减压浓缩得稠浸膏, 保存。精确称取适量稠浸膏, 加流动相稀释至一定浓度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

**2.3.5 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液连续进样 6 次, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果芥子碱硫氰酸盐和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.19%, 1.77%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 精密量取同一供试品溶液, 分

别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果芥子碱硫氰酸盐和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 1.87%, 1.66%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.3.7 重复性试验** 精密称取同一样品 6 份, 按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果芥子碱硫氰酸盐和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 2.39%, 2.71%, 表明本方法重复性良好。

**2.3.8 加样回收率试验** 精密称取已知含量的三子方提取物约 10 mg, 加流动相溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 分别精密加入高、中、低质量浓度的芥子碱硫氰酸盐对照品溶液和迷迭香酸对照品溶液适量, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸的平均回收率分别为 95.84%, 102.8%, RSD 分别为 0.91%, 2.41%。

**2.4 浸膏得率的测定** 取 2.3.4 项下稠浸膏适量, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 于 105 °C 干燥 3 h, 移置干燥器中, 冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算浸膏得率。

**2.5 正交设计试验** 选取乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间及提取次数为考察因素, 称取白芥子、紫苏子、莱菔子粗粉各 9 g, 共 9 份, 按  $L_9(3^4)$  正交表安排试验, 以芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量及浸膏得率的综合评分为指标, 权重系数分别为 0.4, 0.3, 0.3, 因素水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。

表 2 三子方提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 乙醇用量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数/次
1	50	6	1	1
2	60	8	2	2
3	70	10	3	3

表 3 三子方提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D	芥子碱硫氰酸盐/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	迷迭香酸/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	浸膏得率/%	综合评分
1	1	1	1	1	4.33	3.10	7.41	68.52
2	1	2	2	2	4.36	3.35	10.41	76.27
3	1	3	3	3	4.36	3.12	14.15	83.17
4	2	1	2	3	5.59	3.74	12.00	91.78
5	2	2	3	1	2.64	1.81	12.18	52.72
6	2	3	1	2	5.37	4.26	12.04	93.96
7	3	1	3	2	4.93	4.03	9.89	88.78

续表 3

No.	A	B	C	D	芥子碱硫氰酸盐/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	迷迭香酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	浸膏得率/%	综合评分
8	3	2	1	3	5.01	3.63	11.85	88.37
9	3	3	2	1	4.94	3.19	12.59	78.71
$K_1$	75.987	83.027	83.617	66.650				
$K_2$	79.487	72.453	82.253	86.337				
$K_3$	85.287	85.280	74.890	87.773				
R	9.300	12.827	8.727	21.123				

表 4 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	132.38	2	8.78	>0.05
B	281.40	2	14.06	>0.05
C(误差)	132.23	2	5.66	
D	835.82	2	47.50	<0.05

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为  $D > B > A > C$ 。以极差最小的 C 因素为误差项进行方差分析,结果发现 D 因素具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,确定最佳提取工艺组

合  $A_3B_3C_1D_3$ ,即加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。

**2.6 验证试验** 按处方比例称取各药材粗粉 3 份,每份 27 g,按最佳工艺条件进行提取,按 2.3 项下方法测定,计算芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量分别为 7.26,5.63  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 分别为 4.14%,3.12%,表明优选的工艺稳定可行。

按最佳提取工艺确定乙醇用量、提取时间和提取次数,分别制备不同体积分数乙醇(50%,60%,70%)的三子方提取液及 70% 乙醇的单味药材提取液,同时制备水提液,应用豚鼠组胺引喘试验对三子方最佳提取工艺进行验证,结果见表 5。

表 5 三子方最佳提取工艺豚鼠组胺引喘试验验证( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	引喘潜伏期		延长时间/s
		给药前/s	给药后/s	
空白对照	-	82.3 ± 12.63	82.9 ± 15.58	0.6 ± 6.18
哮喘模型	-	76.5 ± 8.19	78.0 ± 9.10	1.3 ± 4.28
三子水提	12	92.3 ± 13.66	125.6 ± 19.1	33.3 ± 8.70 <sup>2)</sup>
紫苏子-70%乙醇	12	91.2 ± 9.12	107.0 ± 14.35	15.8 ± 8.66
白芥子、莱菔子-70%乙醇	12	78.7 ± 11.95	133.9 ± 20.05	55.2 ± 8.38 <sup>2)</sup>
三子方-50%乙醇	12	86.9 ± 7.78	135.4 ± 20.67	48.5 ± 19.70 <sup>1)</sup>
三子方-60%乙醇	12	76.1 ± 9.88	146.0 ± 9.26	69.9 ± 13.9 <sup>2)</sup>
三子方-70%乙醇	12	78.3 ± 5.80	157.5 ± 16.49	79.2 ± 14.7 <sup>2)</sup>
地塞米松	1	73.3 ± 11.18	178.7 ± 19.63	105.4 ± 18.1 <sup>2)</sup>

由表 5 可知,三子方复方和单味药 70% 乙醇提取组的抗喘效果为三子方 > 白芥子,莱菔子 > 紫苏子;三子方不同体积分数乙醇提取组的抗喘效果为 70% 乙醇组 > 60% 乙醇组 > 50% 乙醇组;三子方 3 味药材合并提取的效果优于单味药提取;70% 乙醇提取的三子方抗喘效果最好,进一步验证了三子方的最佳提取工艺为加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h。

### 3 讨论

文献报道三子方平喘作用的有效成分集中于极

性小的部分<sup>[7]</sup>,本文通过豚鼠组胺引喘试验证明该方乙醇提取液的平喘效果最好,较单味药物的止喘作用更强。

2010 年版《中国药典》中均选择芥子碱硫氰酸盐含量作为白芥子和莱菔子的药材质量控制指标。芥子碱具有明显的平喘作用,主要作用机制是通过使气管平滑肌舒张以达到抗喘效果<sup>[8]</sup>。迷迭香酸为紫苏子主要成分之一,具有很强的抗组胺释放活性<sup>[9]</sup>;Sanbongi 等<sup>[10]</sup>研究发现口服含迷迭香酸的紫苏提取物对过敏性哮喘具有一定疗效。故本文选择

# 大孔树脂纯化豆豉溶栓酶的工艺优选

王鹏娇<sup>1</sup>, 孟小夏<sup>1</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 蒋建民<sup>2</sup>, 高秀丽<sup>1\*</sup>

(1. 贵阳医学院, 贵阳 550004; 2. 贵州秀生堂医药生物有限公司, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 优选豆豉溶栓酶的大孔树脂纯化工艺。方法: 以湿比吸附量为指标筛选大孔树脂型号; 以豆豉溶栓酶比活性为指标, 采用单因素试验考察吸附性能(上样体积、吸附时间)和洗脱性能(洗脱剂种类、洗脱剂 pH、洗脱速度、洗脱剂体积), 利用 SDS-PAGE 电泳对纯化效果进行分析。结果: HPD-400 型大孔树脂对豆豉溶栓酶具有很好的吸附作用, 优选的工艺条件为上样量 2 BV, 吸附时间 2 h, 加水 2 BV 洗去杂质, 加 pH 8.0 的 Tris-HCl-30% 乙醇缓冲液 4 BV 以 2 BV·h<sup>-1</sup> 流速洗脱; 豆豉溶栓酶比活性 2 254.29 IU·mg<sup>-1</sup>, 纯化数 44.17 倍, 发酵液 20 mL 平均可得到蛋白质 2.86 mg, 电泳检测显示豆豉溶栓酶呈现单一条带, 相对分子质量 28 kD。结论: HPD-400 型大孔树脂可用于豆豉溶栓酶的分离纯化, 优选的工艺条件稳定可行。

**[关键词]** 大孔树脂; 豆豉溶栓酶; 纯化工艺; 湿比吸附量; 比活性

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0030-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110030

## Optimization of Purification Technology of Lobster Sauce Streptokinase by Macroporous Resin

WANG Peng-jiao<sup>1</sup>, MENG Xiao-xia<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, JIANG Jian-min<sup>2</sup>, GAO Xiu-li<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 20131228(001)

**[基金项目]** 贵州省科学技术厅项目[黔科合 LG 字(2011)020 号]; 贵阳市科技局计划项目(筑科合同[2013204]4-2 号)

**[第一作者]** 王鹏娇, 硕士, 讲师, 从事新药研发及体内药物分析研究, Tel: 18985419011, E-mail: 25209728@qq.com

**[通讯作者]** \* 高秀丽, 硕士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量研究, Tel: 0851-6908783, E-mail: xiuligao@hotmail.com

芥子碱硫氰酸盐、迷迭香酸提取量作为三子方醇提取物的评价指标, 同时结合豚鼠组胺引喘药效试验, 使优选的提取工艺更为合理。

传统中药的提取常采用水煎煮法以保持复方的组成结构, 发挥多成分的协同作用, 但存在有效成分提取率低、服药量大等缺点; 而盲目使用乙醇等有机溶剂提取则可能破坏中药复方的组成结构<sup>[11]</sup>。本文通过豚鼠组胺引喘药效试验初步确定乙醇提取法有利于三子方的药效发挥, 结合药效学指标辅助化学指标优化的提取工艺既可保证有效成分的提取率, 又可保证中药复方的整体药效。

### [参考文献]

[1] 潘洪平, 潘毓宁. 三子养亲汤的研究进展[J]. 中成药, 1995, 17(10): 42.  
[2] 沈顺琴. 三子养亲汤止咳、祛痰疗效观察[J]. 中药通报, 1986, 11(8): 56.  
[3] 何安健. 自拟“二三方”治疗小儿急性支气管炎 88 例[J]. 上海中医药杂志, 1991, 10(1): 22.  
[4] 梁文波, 赵红, 孙学梅, 等. 三子养亲汤镇咳、祛痰、平

喘作用的药理研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(2): 11.

[5] 郑林, 黄勇, 兰燕宇, 等. 化学指标结合药效学指标优选紫金透骨喷雾剂提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 26.  
[6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理试验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 165.  
[7] 赵红, 张志强, 李洋, 等. 三子养亲汤的化学成分研究[J]. 中医学报, 2003, 31(2): 15.  
[8] 王辉, 苑艳霞, 邱琳, 等. 芥子碱平喘作用及其机制[J]. 中草药, 2011, 42(1): 134.  
[9] 吴建章, 郁建平, 赵东亮. 迷迭香酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 383.  
[10] Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, et al. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model[J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(6): 971.  
[11] 贾晓斌, 黄洋, 陈斌, 等. 药效学结合正交试验优选通脉颗粒抗心肌缺血成分的提取工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 154.

[责任编辑 刘德文]