

# 正交试验法优选平哮颗粒的提取纯化工艺

张潮, 潘金火\*, 史锁芳, 严国俊, 史钱平  
(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

**[摘要]** **目的:** 优选平哮颗粒的水提醇沉工艺条件。**方法:** 以出固率、盐酸麻黄碱和芍药苷的总提取率为综合评价指标, 采用正交试验法考察浸泡时间、加水量、煎煮次数、煎煮时间 4 个因素对提取工艺的影响; 以盐酸麻黄碱和芍药苷的总转移率为考察指标, 正交试验考察药液与药材比例、醇沉时间、醇沉体积分数对醇沉工艺的影响。**结果:** 平哮颗粒的最佳水提工艺为加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 h; 最佳醇沉工艺为水煎液浓缩至生药质量浓度  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 加乙醇使含醇体积分数达 60%, 搅匀, 静置 8 h。**结论:** 该优选工艺可确保有效成分最大限度保留, 可用于工业化生产。

**[关键词]** 平哮颗粒; 提取工艺; 醇沉工艺; 正交试验; 盐酸麻黄碱; 芍药苷

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0042-04

## Optimization of Extraction and Purification Process for Pingxiao Granule by Orthogonal Test

ZHANG Chao, PAN Jin-huo\*, SHI Suo-fang, YAN Guo-jun, SHI Qian-ping  
(College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize water extraction and alcohol precipitation technology for Pingxiao granule. **Method:** With solid ratio, total extraction rate of ephedrine hydrochloride and paeoniflorin as comprehensive evaluation indexes, orthogonal test was used to optimize extraction technology with soaking time, the amount of water, decocting times and decocting time as factors; With total transfer rate of ephedrine hydrochloride and paeoniflorin as index, effect of solid-liquid ratio, alcohol precipitation time and the concentration of ethanol on alcohol precipitation technology was optimized by orthogonal test. **Result:** Optimum water extraction process was as follows: decocted 3 times with 8 times the amount water, 1 h each time; Optimum alcohol precipitation process was: the concentration of decoction liquid concentrated  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , precipitated to the concentration of ethanol 60%, stirred well, stilled 8 h. **Conclusion:** These optimized technology could ensure effective components saved to the maximum, it could be used for industrial production.

**[Key words]** Pingxiao granule; extraction process; alcohol precipitation process; orthogonal test; ephedrine hydrochlorid; paeoniflorin

平哮颗粒处方来源于江苏省中医院治疗哮喘的临床经验方, 由麻黄、白芍、石菖蒲、地龙等 11 味中药材组成, 具有宣肺通阳、祛风豁痰、止痉平喘的功

效, 临床用于治疗风痰阻肺引起的哮喘, 症见胸闷、气喘、喉间鸣响、咯痰白黏等。为便于临床使用, 拟将汤剂改成颗粒剂。为使该方更好地发挥药效, 最大限度保留有效成分盐酸麻黄碱和芍药苷<sup>[1-4]</sup>, 本试验对其水提醇沉工艺<sup>[5-8]</sup>进行优选, 为该制剂临床推广提供试验依据。

### 1 材料

2695 型高效液相色谱仪 (Waters-2996 型紫外检测器, Empower 色谱工作站, 美国 Waters), AG135 型电子天平 (瑞士梅特勒), FA1104N 型电子分析天

**[收稿日期]** 20120514(009)

**[基金项目]** 江苏省康缘基金项目 (HZ1011KY)

**[第一作者]** 张潮, 在读硕士, 从事药剂学研究, E-mail: zc19860707@163.com

**[通讯作者]** \* 潘金火, 教授, 博士后, 从事药物制剂和中药研发, Tel: 13951856876, E-mail: panjinhua@163.com

平(上海精密科学仪器有限公司),盐酸麻黄碱、芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为0736-200219,171241-200506),甲醇、乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯,各味药材由安徽国鑫中药饮片有限公司提供,经南京中医药大学中药鉴定教研室陈建伟教授鉴定均符合《中国药典》2010年版一部相关项下要求。

## 2 方法与结果

**2.1 水提工艺设计** 根据浸提理论与预试验结果,确定平哮颗粒水提工艺与浸泡时间、加水量、煎煮次数等密切相关,选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,以出固率、盐酸麻黄碱和芍药苷的总提取率为考察指标,因素水平见表1。按处方比例量称取麻黄等11味药共9份,每份55g,按正交试验安排进行试验,收集提取液,滤过,合并,浓缩或稀释,分别定容至1 000,1 500,2 000 mL,备用。

表1 平哮颗粒水提工艺优选正交试验因素水平

水平	A 浸泡时间/h	B 加水量/倍	C 煎煮数/次	D 煎煮时间/h
1	0	6	2	1
2	0.5	8	3	1.5
3	1	10	4	2

**2.2 出固率的测定** 精密量取以上各样品溶液10 mL,置恒重蒸发皿中,水浴蒸干,105℃常压干燥3 h,取出,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,即得。

### 2.3 盐酸麻黄碱含量测定

**2.3.1 色谱条件** HederaODS-2 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸(3:97),流速1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长207 nm。

**2.3.2 对照品溶液制备** 精密称取盐酸麻黄碱对照品5.23 mg,加1.44%磷酸溶解并定容至10 mL,配成0.523 g·L<sup>-1</sup>溶液,备用。

**2.3.3 供试品溶液制备** 精密吸取相当于原药液1/100的样品溶液于蒸发皿中,水浴蒸干,加入1.44%磷酸约9 mL溶解于10 mL量瓶中,摇匀,超声提取30 min,用1.44%磷酸定容至10 mL,过滤,取续滤液,即得。

**2.3.4 线性范围考察** 精密量取上述对照品溶液0.20,0.40,0.60,0.80,1.00,1.20 mL,分别置于10 mL量瓶中,用1.44%磷酸稀释至刻度,进样量10 μL,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 2 \times 10^6 X - 25 495$  ( $r = 0.999 7$ )。表明盐酸麻黄碱0.104 6 ~

0.627 6 μg与峰面积呈良好线性关系。

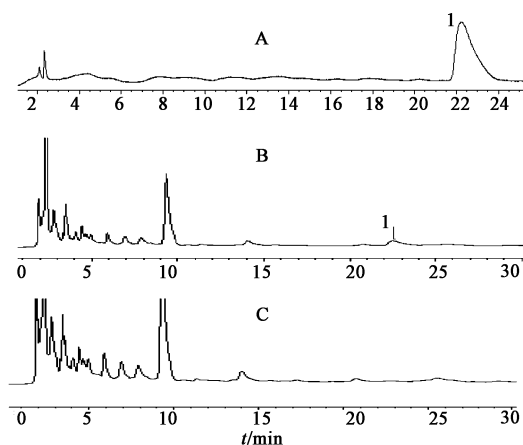
**2.3.5 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液10 μL,重复进样6次,测得峰面积,计算盐酸麻黄碱含量,结果RSD 0.24%,表明仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 取同一水煎液,按2.3.3项下方法制备6份供试品溶液,测定峰面积,计算盐酸麻黄碱含量,结果RSD 0.57%。

**2.3.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,12 h进样测定峰面积值,计算盐酸麻黄碱含量,结果RSD 0.56%。表明供试品溶液在12 h内稳定。

**2.3.8 回收率试验** 取同一供试品溶液6份,每一样品中加入相同质量的盐酸麻黄碱对照品,按供试品溶液制备方法制备样品,按上述色谱条件分别进样分析,进样量10 μL,记录峰面积,结果表明盐酸麻黄碱平均加样回收率101.75%,RSD 1.25%。

**2.3.9 专属性考察** 将对照品、供试品溶液、阴性样品溶液,按上述色谱条件下分别进行检测,见图1。结果表明处方中其他成分对待测成分无干扰。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性对照;1. 盐酸麻黄碱

图1 平哮颗粒中盐酸麻黄碱HPLC

**2.3.10 样品测定** 分别取上述各样品溶液10 μL,按2.3.1项下方法进行测定。

### 2.4 芍药苷含量测定

**2.4.1 色谱条件** HederaODS-2 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸溶液(12:88),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长230 nm,柱温30℃。

**2.4.2 对照品溶液制备** 精密称取在五氧化二磷减压干燥器中干燥36 h的芍药苷对照品4.00 mg,置10 mL量瓶中,加80%甲醇至刻度,摇匀,配成0.400 g·L<sup>-1</sup>溶液。

**2.4.3 供试品溶液制备** 精密量取样品溶液适量

于蒸发皿上,蒸干,加 80% 甲醇约 9 mL 溶解于 10 mL 量瓶中,超声提取 30 min,放冷,用 80% 甲醇定容至 10 mL,滤过,取续滤液,即得。

**2.4.4 线性范围的考察** 精密量取上述对照品溶液 0.30, 0.60, 0.90, 1.20, 1.50, 1.80 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中,用 80% 甲醇稀释至刻度,进样量 10  $\mu$ L,按上述色谱条件测定峰面积值,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程  $Y = 1 \times 10^6 X - 9500.1 (r = 0.9996)$ ,芍药苷在 0.120 ~ 0.720 0  $\mu$ g 与峰面积呈良好线性关系。

**2.4.5 精密度试验** 精密吸取上述对照品溶液 10  $\mu$ L,重复进样 6 次,测得峰面积,计算芍药苷含量,结果 RSD 0.14%,表明仪器精密度良好。

**2.4.6 重复性试验** 取同一水煎液,按上述方法制备 6 份供试品溶液,分别测得峰面积并计算芍药苷含量,结果 RSD 0.96%。

**2.4.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,测定峰面积值,计算芍药苷含量,结果 RSD 0.635%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

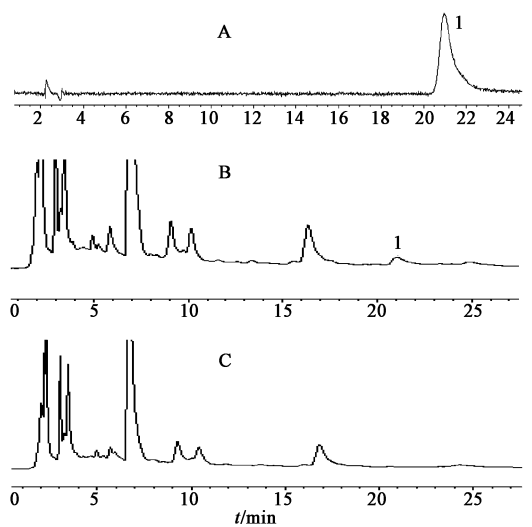
**2.4.8 回收率试验** 取同一供试品溶液 6 份,分别加入相同质量的芍药苷对照品,按供试品溶液制备方法制备样品,按上述色谱条件进样分析,进样量 10  $\mu$ L,记录峰面积,结果表明芍药苷平均加样回收率 102.91%,RSD 1.54%。

**2.4.9 专属性考察** 精密量取对照品、供试品溶液、阴性样品溶液适量,按上述色谱条件分别进行检测,见图 2。结果表明处方中其他成分对测定无干扰。

**2.4.10 样品测定** 精密量取上述各样品 10  $\mu$ L,按 2.4.1 项下色谱条件进行测定。

**2.5 正交试验分析** 按实际情况,将出固率 ( $Y_1$ )、盐酸麻黄碱和芍药苷总提取率 ( $Y_2$ ) 最高值定为 100%,其余进行相应折算,按公式  $Y = 0.3Y_1 + 0.7Y_2$  计算综合评分作为筛选指标。盐酸麻黄碱和芍药苷总提取率 = (盐酸麻黄碱提取量/麻黄药材重量 + 芍药苷提取量/白芍药材重量)  $\times$  100%,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

由表 2 可知,煎煮次数为影响水提工艺的重要因素,其次是煎煮时间和加水量,最后是浸泡时间。由表 3 可知,以极值最小的 A 因素为误差项进行方差分析,C 因素对水提工艺有显著性差异,其余因素影响不大。结合大生产实际综合考虑,确定最佳水提工艺  $A_1B_2C_2D_1$ ,即加 8 倍量水提取 3 次,不浸泡,



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照; 1. 芍药苷  
图 2 平哮颗粒中芍药苷 HPLC

表 2 平哮颗粒水提工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y/\%$
1	1	1	1	1	15.587	8.203	77.872
2	1	2	2	2	20.744	8.740	88.413
3	1	3	3	3	22.800	10.010	100.000
4	2	1	2	3	20.101	8.932	88.909
5	2	2	3	1	19.892	9.943	95.703
6	2	3	1	2	19.167	8.102	81.878
7	3	1	3	2	20.498	9.061	90.338
8	3	2	1	3	19.585	8.152	82.780
9	3	3	2	1	20.495	8.513	86.502
$K_1$	88.761	85.706	80.843	86.692			
$K_2$	88.830	88.965	88.965	86.876			
$K_3$	86.540	89.460	95.347	90.563			
R	2.290	3.754	14.504	3.871			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A(误差)	10.181	2	1.000	
B	24.957	2	2.451	
C	315.585	2	30.997	< 0.05
D	28.606	2	2.810	

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ (表 6 同)。

每次 1 h。

**2.6 验证试验** 按最佳提取工艺制备 3 批样品,测定样品中盐酸麻黄碱和芍药苷总提取率和出固率,结果盐酸麻黄碱和芍药苷总提取率的平均值 8.62%,RSD 1.53%,平均出固率 19.89%,RSD 1.28%。说明该工艺稳定可行。

**2.7 醇沉工艺优选**

**2.7.1 醇沉条件的选择** 影响醇沉的主要因素有药液浓缩比、醇沉时间、醇沉体积分数。一般药液与

药材比选择 1:0.5~1:2(70~75℃),醇沉时间 8~24 h,选择醇沉体积分数为 60%,70%,80%。以盐酸麻黄碱和芍药苷的总转移率(因盐酸麻黄碱和芍药苷均为主要药效成分,故将盐酸麻黄碱和芍药苷权重系数均定为 0.5,总转移率=0.5 盐酸麻黄碱转移率/盐酸麻黄碱最大转移率+0.5 芍药苷转移率/芍药苷最大转移率)为指标,选用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验,因素水平见表 4。根据处方比例称取药材,按优选的最佳水提工艺提取,将提取液浓缩至生药质量浓度  $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  药液,平均分成 12 份,其中 9 份按表 5 设计的水平进行醇沉试验,剩余 3 份留作验证试验。醇沉工艺正交试验结果见表 5,方差分析见表 6。

表 4 平哮颗粒醇沉工艺优选正交试验因素水平

水平	A 药液浓缩比	B 醇沉时间/h	C 醇沉体积分数/%
1	1:0.5	8	60
2	1:1	12	70
3	1:2	24	80

表 5 平哮颗粒醇沉工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	盐酸麻黄碱 转移率/%	芍药苷 转移率/%	总转移 率/%
1	1	1	1	1	60.35	59.51	84.46
2	1	2	2	2	56.43	54.76	78.35
3	1	3	3	3	58.23	57.39	81.47
4	2	1	2	3	60.20	64.90	88.13
5	2	2	3	1	57.84	60.37	83.28
6	2	3	1	2	61.36	71.25	93.41
7	3	1	3	2	68.43	64.13	93.42
8	3	2	1	3	70.68	69.27	98.61
9	3	3	2	1	67.78	67.01	94.98
$K_1$	81.424	88.668	92.158	87.572			
$K_2$	88.273	86.747	87.153	88.391			
$K_3$	95.669	89.951	86.055	89.403			
R	14.834	3.204	6.103	1.831			

表 6 醇沉工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	304.523	2	60.361	<0.05
B	15.602	2	3.093	
C	63.498	2	12.586	
D(误差)	5.04	2		

由表 5 结果可知,各因素影响大小顺序  $A > C > B$ ,最佳醇沉工艺  $A_3B_3C_1$ 。由表 6 结果可知,A 因素对盐酸麻黄碱和芍药苷总转移率均有显著性差异,B,C 因素均无显著性差异,从提高生产效率考虑,

最终确定最佳醇沉工艺  $A_3B_1C_1$ ,即药液浓缩至生药质量浓度  $2\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,醇沉时间 8 h,醇沉体积分数 60%。

**2.7.2 验证试验** 按最佳醇沉工艺制备 3 批样品,测定样品中盐酸麻黄碱转移率和芍药苷转移率,结果盐酸麻黄碱转移率平均值 69.79%,RSD 1.48%,芍药苷转移率平均值 64.98%,RSD 1.63%。说明该工艺稳定可行。

### 3 讨论

方中麻黄和芍药均为君药,故以盐酸麻黄碱和芍药苷的含量为指标,采用高效液相色谱法测定其含量,运用正交试验法对水提及醇沉的工艺条件进行优化,同时结合出固率为考察指标,可全面准确地优选工艺。为除去水提液中淀粉、树胶等多糖类和蛋白质等杂质并最大限度地保留有效成分,减小服用剂量,延长药液保留时间,采用醇沉工艺进行纯化。醇沉工艺研究中,由于药液量太少,药液相对密度实际操作不易控制,故以药液与药材体积比代替,方便实用。本试验优选工艺可作为平哮颗粒工艺优化的依据,但试验只以化学成分为指标,未结合药效学指标进行研究,故还有待进一步完善。

### [参考文献]

- [1] 姚琳,邓康颖,罗佳波.麻黄总生物碱与麻黄碱镇咳平喘作用比较研究[J].中药药理与临床,2008,24(2):18.
- [2] 刘平.芍药甘草汤止咳平喘和抗炎作用的实验研究[J].海南医学,2008,19(1):110.
- [3] 林建海,刘宝裕.平喘中药对致敏性哮喘豚鼠气道的作用[J].上海医学,1996,19(11):638.
- [4] 蔡宛如,钱华,朱渊红,等.芍药甘草汤平喘和抗过敏作用的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(6):341.
- [5] 孙梦锦,何群,赵碧清,等.湿疹喷雾剂醇沉纯化工艺的研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(12):46.
- [6] 刘芳,王小平,向爱民,等.正交试验法优选胃安冲剂的制备工艺[J].中草药,2002,33(6):507.
- [7] 宋伟.三拗汤制剂水提工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):48.
- [8] 张津津.咽喉颗粒的提取工艺[J].华西药学杂志,2008,23(2):241.

[责任编辑 全燕]