

多指标综合评分法考察金银花连翘药对最佳提取工艺

李莉,王冰,陶小军,孙艳涛*

(辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:确定金银花连翘药对的最佳提取工艺。方法:以绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂素为考察指标,采用综合评分法,对采用乙醇回流的提取时间、提取次数、溶剂浓度和用量进行考察。结果:金银花连翘药对的最佳提取工艺为 8 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次提取 2 h。结论:本结果可为金银花连翘药对的提取工艺研究提供参考。

[关键词] 药对;多指标综合评分法;提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)22-0021-03

Investigate Optimum Extraction Technology of Drug Couple Composed of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

LI Li, WANG Bing, TAO Xiao-jun, SUN Yan-tao*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain optimum extraction process of drug couple composed of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus. **Method:** Examined extraction time, extraction times, concentration and the amount of ethanol with chlorogenic acid, luteolin, quercetin and forsythiaside as indexes by multi-index comprehensive evaluation method. **Result:** Optimal extraction technology of the drug couple was as followed: extracted 3 times with 8 times amount of 60% ethanol for 2 h each time. **Conclusion:** The optimum extraction technology could provide a reference to study on the extraction technology of drug couple composed of Lonicerae Japonicae Flos and Forsythiae Fructus.

[Key words] drug couple; multi-index comprehensive evaluation method; extraction technology

金银花-连翘为清热解毒药物中最为常用的药对。二者相须为用,清热解毒效力更强,并能宣通气血,导十二经之气滞血凝,消肿散结。在温病初起以及热入气分之高热,发斑、发疹,二药常联合使用,方如银翘散^[1]。当前对于金银花连翘药对的研究主要集中于药效学^[2,4],有效成分含量测定^[5]以及挥发油

成分分析方面^[6]。本实验采用综合评分法,对金银花连翘药对中 4 种有效成分的提取率进行考察,从有效成分角度考察金银花、连翘药对的最佳提取工艺,为金银花连翘药对的研究提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(CBM 检测器,日本岛津),Betasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 依利特), AB135-S 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 METTLER), AR2140 型电子分析天平(上海奥豪斯公司), XW-80A 型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司), 876-1 型真空干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司)。

金银花、连翘(购自于大连德泰药房,经药学院鉴定教研室王荣祥教授鉴定为正品药材),绿原酸、

[收稿日期] 20110702(004)

[第一作者] 李莉,副教授,从事物理化学教学和中药药剂学研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: lili630508@126.com

[通讯作者] *孙艳涛,博士,讲师,从事药物分析及新药开发研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: sunyt_ky@163.com

槲皮素、木犀草苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110753-200212, 100081-200406, 111720-200604),连翘脂苷对照品(云南生物医药公司,批号 10865-200303),乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 金银花连翘药对中绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂苷含量测定

2.1.1 色谱条件 依利特 Betasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液(0~10 min, A-B 20:80;10 min 后, A-B 50:50),检测波长 280 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂苷对照品适量,加甲醇分别制成绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂苷质量浓度分别为 1.04, 1.06, 1.12, 1.14 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 样品的处理 按金银花连翘质量比 1:1 取生药粉末共约 10 g,精密称定,加入一定量的乙醇回流提取,滤过合并浓缩至 50 mL,吸取 5 mL 过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液备用。

2.1.4 线性关系考察 分别精密量取绿原酸、木犀草苷、槲皮素、连翘脂素对照品储备液 120, 4, 40, 9 μL,精密加入甲醇 1 027 μL,涡旋混匀,精密吸取 4, 6, 8, 12, 16, 20 μL 进样,以峰面积 *Y* 为纵坐标,进样量 *X* 为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 4 种对照品标准曲线

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/μg
绿原酸	$Y = 1.25 \times 10^7 X - 3.89 \times 10^6$	0.999 7	0.412 ~ 2.16
木犀草苷	$Y = 2.0 \times 10^7 X + 2.6 \times 10^4$	0.999 5	0.001 41 ~ 0.007 07
槲皮素	$Y = 5.0 \times 10^6 X + 6.5 \times 10^3$	0.999 5	0.014 9 ~ 0.074 7
连翘脂素	$Y = 1 \times 10^7 X + 1 \times 10^4$	0.999 6	0.003 42 ~ 0.017 1

2.1.5 精密度试验 取金银花连翘药对共约 10 g,精密称定,按编号 3 试验方案提取后按 2.1.3 方法处理,得样品液,连续进样 6 次,测定各有效成分的峰面积。结果绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂素的 RSD 分别为 1.8%, 1.2%, 2.3%, 1.1%。

2.1.6 重复性试验 按 2.1.5 项下方法制备样品液 6 份,分别进样测定。结果显示绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂素的 RSD 分别为 2.1%, 2.4%, 1.9%, 2.0%, 表明重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取 2.1.6 项下样品液,分别于 0, 1, 3, 5, 6, 8 h 进样,结果显示绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂素的 RSD 分别为 1.8%, 2.4%, 1.7%, 1.2%, 表明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取金银花连翘药对约 1 g,共 6 份,精密称定,分别加入混合对照品适量,按编号 3 实验方案比例,提取后按 2.1.3 方法处理,进样分析,结果显示绿原酸、木犀草苷、槲皮素和连翘脂素的平均回收率分别为 99.2%, 98.8%, 101.2%, 98.4%, RSD 分别为 1.9%, 2.8%, 2.3%, 1.7%, 表明本方法回收率良好。

2.2 正交试验 根据金银花、连翘中各指标成分的性质以及相关文献的报道,采用乙醇回流考察金银花连翘药对的最佳提取工艺。选取溶剂用量(*A*)、提取次数(*B*)、溶剂浓度(*C*)、提取时间(*D*)4 因素,各取 3 水平,按正交设计 L₉(3⁴) 安排试验。因素水平见表 2。

表 2 金银花连翘药对乙醇提取正交试验因素水平

水平	<i>A</i> 溶剂用量 /倍	<i>B</i> 提取次数 /次	<i>C</i> 乙醇体积 分数/%	<i>D</i> 提取时间 /h
1	6	1	40	0.5
2	8	2	60	1
3	10	3	80	2

2.3 数据处理 将 9 组试验所得样品,按 2.1.1 色谱条件进样 10 μL 进行测定,确定 4 种指标成分绿原酸(*a*)、木犀草苷(*b*)、槲皮素(*c*)、连翘脂素(*d*),采用综合评分对上述结果进行分析,结果(*e*)见表 3(权重分别为 *a*:0.5, *b*:0.05, *c*:0.35, *d*:0.1)。将综合评分结果数据运用数据分析软件 SPSS 10.0 处理,得到正交试验的数据结果,见表 3,4。

由表 3,4 可知提取时间为显著性因素,确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₂D₃,即溶剂倍量为 8 倍,提取 3 次,乙醇体积分数 60%,提取时间 2 h。

3 讨论

经查阅大量文献,古方中金银花连翘药对比例为 1:1。在进行有效成分含量测定的预试验中,由于 4 种指标成分的极性不同,故检测时采用梯度洗脱,同时为减少测定的极性成分绿原酸的电离,采用磷酸水溶液为流动相。

试验采用多指标综合评分法,选用绿原酸、木犀草苷、连翘脂素和槲皮素为指标成分,根据在预试验中发现绿原酸含量在选定 4 种有效成分总含量中所占比例达到 80% 左右,而其他有效成分含量都较

表3 金银花连翘药对乙醇提取正交试验安排及结果

No.	A	B	C	D	a/ μg	b/ μg	c/ μg	d/ μg	e
1	1	1	1	1	0.807	0.005 63	0.046 34	0.010 86	57.24
2	1	2	2	2	1.886	0.002 72	0.016 16	0.007 11	59.74
3	1	3	3	3	2.155	0.004 79	0.050 74	0.010 83	90.48
4	2	1	2	3	2.132	0.003 59	0.045 46	0.003 46	81.51
5	2	2	3	1	2.148	0.005 37	0.058 49	0.003 77	91.25
6	2	3	1	2	1.403	0.001 58	0.019 76	0.004 81	48.44
7	3	1	3	2	0.468	0.006 40	0.046 16	0.013 93	51.67
8	3	2	1	3	1.763	0.001 57	0.017 28	0.009 25	57.92
9	3	3	2	1	2.093	0.003 59	0.031 25	0.016 99	80.07
K_1	42.78	48.25	50.24	78.87					
K_2	112.63	50.24	80.25	65.65					
K_3	47.33	97.33	60.80	88.36					
R	10.52	9.53	25.27	23.36					

注:a.绿原酸;b.木犀草素;c.槲皮素;d.连翘脂素;e.综合评分。提取率评分=提取量/最大提取量 $\times 0.5 \times 100$;e=a提取率评分+b提取率评分+c提取率评分+d提取率评分。

表4 乙醇提取正交试验综合评分方差分析

误差来源	SS	f	MS	F	P
A	66.711	2	0.189	4.860	
B	99.970	2	0.142	3.654	
C	227.729	2	3.610	11.857	
D	2 370.143	2	38.471	158.568	<0.05

低,为了更加体现其他有效成分作用并结合相关文献报道,将绿原酸权重设为0.5,其他3种成分通过预试验相对含量比较并由于木犀草苷为金银花中典型有效成分故提高木犀草苷权重为0.05,降低槲皮素权重为0.35,连翘脂素选定为0.1。以4种指标成分确定最佳提取工艺可以为后续药理药代动力学试验提供依据。根据分析结果可见提取时间为显著性因素,而提取次数、溶剂用量、乙醇体积分数为非显著因素,在后续实验中,应对提取时间进行深入考察,以期得到金银花连翘药对有效成分提取的最佳工艺。

[参考文献]

- [1] 王希琳,吴晨,魏琴,等.常用中药及配伍手册[M].赤峰:内蒙古科学技术出版社,2002:90.
- [2] 林丽美,王智民,王金华,等.金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):473.
- [3] 段红妍,赵琴,马成.银花连翘配伍对发热大鼠体温和血清中NO含量的影响[J].新疆中医药,2009,27(2):11.
- [4] 段红妍,马成.金银花与连翘配伍退热机制的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2009,18(11):1214.
- [5] 林丽美,王智民,王维皓,等.RP-HPLC对金银花和连翘单煎、单煎后合并及混煎的分析[J].中国中药杂志,2007,32(21):2240.
- [6] 刑学锋,陈飞龙,罗佳波.金银花、连翘药对配伍挥发油成分的GC-MS分析[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):358.

[责任编辑 全燕]