

# 咽乐含片提取工艺的优化

余国祥, 蔡 鹰\*

(中国人民解放军第四五四医院, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的: 优化咽乐含片的提取工艺。方法: 采用正交试验, 以提取物重量, 绿原酸, 甘草酸含量为观察指标, 结果: 确立了采用第一次加 10 倍量水, 第二, 三次加 8 倍量水, 煎煮 3 次, 每次煎煮 1 小时的工艺。结论: 本工艺合理可行, 有利于生产。

[关键词] 咽乐含片; 提取工艺优化; 高效液相色谱法; 绿原酸; 甘草酸

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)08-0003-03

复方桔梗袋泡茶是我院开发的治疗急慢性咽炎的中药袋泡剂, 应用于临床疗效确切。为了进一步提高制剂质量, 方便患者使用, 我们在原方基础上制成了咽乐含片, 由金银花, 甘草, 桔梗, 木蝴蝶等 8 味药组成, 具有清热, 养阴, 祛痰, 利咽功效。为提高制剂质量, 我们对提取工艺进行了优化。

## 1 提取工艺的优化

根据预试验, 安排正交试验, 因素水平见表 1。每一试验号药材总量 435g, 以加水量, 煎煮时间, 煎煮次数为因素, 以煎出物重量, 绿原酸, 甘草酸为考察指标。煎出物重量= 每一试验号浓缩至 435mL (1g 生药/mL) 时重量。绿原酸, 甘草酸含量为每一试验号浓缩至 435mL (1g 生药/mL) 时浓度。

结果: 由表 2 可以看出, 用煎出物重量为指标, 煎煮次数, 加水量, 煎煮时间, 对结果有显著意义, 依次为煎煮次数> 加水量> 煎煮时间; 用绿原酸含量为指标, 煎煮次数, 加水量, 对结果有显著意义, 依次为煎煮次数> 加水量> 煎煮时间; 用甘草酸含量为

表 1 因素水平表

因素	加水量 A (倍)	煎煮时间 B (h)	煎煮次数 C (次)
水平 1	8	1	1
水平 2	10	1.5	2
水平 3	12	2	3

表 2  $L_9(3^4)$  正交试验表

试验号	A	B	C	D	煎出物 重量(g)	绿原酸 (mg/mL)	甘草酸 (mg/mL)
1	1	1	1	1	34.0	2.74	0.93
2	1	2	2	2	60.5	4.12	2.01
3	1	3	3	3	75.0	4.76	2.97
4	2	1	2	3	65.0	4.30	2.38
5	2	2	3	1	83.0	5.45	3.14
6	2	3	1	2	51.5	3.22	1.39
7	3	1	3	2	75.0	4.65	3.30
8	3	2	1	3	53.0	3.10	1.11
9	3	3	2	1	75.0	4.07	2.49
$\bar{K}_1$	56.5	58.0	46.2	64.0			
	3.87	3.90	3.02	4.09			
	1.97	2.20	1.14	2.19			
$\bar{K}_2$	66.5	65.5	66.8	62.3			
	4.32	4.22	4.16	4.00			
	2.30	2.09	2.29	2.23			
$\bar{K}_3$	67.7	67.2	77.7	64.3			
	3.94	4.02	4.95	4.00			
	2.30	2.28	3.14	2.15			
R	11.2	9.20	31.5	2.00			
	0.45	0.32	1.93	0.09			
	0.33	0.19	2.00	0.08			

指标, 煎煮次数, 加水量对结果有显著意义, 依次为煎煮次数> 加水量> 煎煮时间。综合以上影响因素, 确定工艺条件为第一次加 10 倍量水, 第二, 三次加 8 倍量水, 煎煮 3 次, 每次煎煮 1h。验证试验表明, 煎出物重量 81g, 绿原酸含量为 5.29mg/mL, 甘草酸含量为 3.11mg/mL, 说明该工艺提取率高, 又省时节能。

[收稿日期] 2006-01-10

[通讯作者] 蔡鹰, Tel: (025) 80865307; E-mail: caiying\_1967@

126.com

表 3 方差分析表

变异来源	离均差平方和	自由度(n)	均方(ms)	F	P
(1)	(2)	(3)	(4) = (2)/(3)	(5)	(6)
A 因素	226.55	2	113.28	38.40	< 0.05
	0.3539	2	0.1770	28.55	< 0.05
	0.2200	2	0.1100	22.44	< 0.05
B 因素	143.55	2	71.78	24.33	< 0.05
	0.1638	2	0.0819	13.21	> 0.05
	0.0587	2	0.0294	6.00	> 0.05
C 因素	1537.22	2	768.61	260.55	< 0.01
	5.6691	2	2.8345	457.18	< 0.01
	6.0071	2	3.0036	612.98	< 0.01
误差 e	5.90	2	2.95		
	0.0124	2	0.0062		
	0.0097	2	0.0049		

$F_{0.05(2,2)} = 19.0, F_{0.01(2,2)} = 99.0$

## 2 仪器与试剂

LC-10AT 岛津高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外一可见检测器, N2000 色谱工作站。

绿原酸(中国药品生物制品检定所); 甘草酸(安徽 DELTA 天然有机化合物信息中心)。甲醇, 乙睛为色谱纯, 其余为分析纯。

## 3 含量测定与方法学考察

**3.1 色谱条件与系统适用性试验** 色谱柱: TURNER-YWG-C18 柱, (4.6mm × 200mm, 10 $\mu$ m), 流动相: A: 乙睛, B: 1% 醋酸水溶液。

洗脱方法: 1. A-B(5: 95 $\rightarrow$ 40: 60), 60min 线性梯度, 测定绿原酸; 2. A-B(40: 60) 保持 10min, 测定甘草酸。流速: 1mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 检测波长: 254nm。理论板数按绿原酸峰计算应不低于 3000, 理论板数按甘草酸峰计算应不低于 250000。

**3.2 供试品溶液阴性对照溶液及对照品溶液的制备** 每一试验号及阴性液浓缩至 1g 生药/mL(室温), 精密吸取 5mL, 水浴锅 100 $^{\circ}$ C 蒸干, 70% 甲醇分 3 次溶解, 抽滤, 定容至 50mL 量瓶。精密量取 4mL 置 10mL 量瓶中, 稀释至刻度, 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得供试品溶液和阴性对照品溶液。精密称取绿原酸对照品 13.1mg, 甘草酸对照品 4.8mg, 置 50mL 量瓶甲醇定容至刻度, 精密吸取 2.0, 4.0mL 分别至 5mL 容量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 制成每 1mL 中含绿原酸 104.8 $\mu$ g, 甘草酸 38.4 $\mu$ g 的溶液和每 1mL 中含绿原酸 209.6 $\mu$ g, 甘草酸 76.8 $\mu$ g 的溶液, 即得对

照品溶液。

**3.3 线性关系考察** 精密称取绿原酸对照品 13.1mg, 甘草酸对照品 4.8mg, 置 50mL 容量瓶甲醇定容至刻度, 精密吸取 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 分别至 5mL 容量瓶, 前 4 个用甲醇稀释至刻度, 分别精密吸取 20 $\mu$ L, 在上述色谱条件下, 注入液相色谱仪, 测定。重复 2 次, 测定绿原酸, 甘草酸的峰面积值, 以绿原酸峰面积值和浓度进行回归处理得回归方程:  $Y = 20321X + 38502$ , 相关系数  $r = 0.9996$ , 线性范围 52.4 $\mu$ g/mL ~ 262 $\mu$ g/mL; 以甘草酸峰面积值和浓度进行回归处理得回归方程:  $Y = 15218X - 19417$ , 相关系数  $r = 0.9998$ , 线性范围 19.2 $\mu$ g/mL ~ 96 $\mu$ g/mL。

**3.4 精密度试验** 用浓度为 157.2 $\mu$ g/mL 的绿原酸, 57.6 $\mu$ g/mL 甘草酸对照品溶液连续进样 5 次, 每次 20 $\mu$ L, 结果峰面积差异较小, RSD = 2.2%, 1.6%。

**3.5 重复性试验** 取第 5 试验号的供试液, 平行 5 份, 依法测定, 结果测得含量差异较小, 绿原酸, 甘草酸的平均含量分别为 5.27mg/mL ( $n = 5$ , RSD = 2.5%), 3.19mg/mL ( $n = 5$ , RSD = 2.7%)。

**3.6 稳定性试验** 取 5 号供试液 20 $\mu$ L 分别于 0, 2, 4, 6, 8h 进样, 测定峰面积计算绿原酸、甘草酸含量, RSD 分别为 1.7%, 2.7%。说明样品稳定性好。

**3.7 加样回收试验** 取 5 号样品液 0.5mL, (绿原酸, 甘草酸含量为 5.45mg/mL, 3.14mg/mL), 再精密加入 2mg 绿原酸, 1.5mg 甘草酸对照品, 水浴锅 100 $^{\circ}$ C 蒸干, 70% 甲醇分 3 次溶解, 抽滤, 定容至 50mL 容量瓶。微孔滤膜过滤, 取续滤液, 作供试液, 平行 6 份。依法测定, RSD 分别为 2.6%, 2.8%。

**3.8 样品含量测定法** 分别精密量取对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液各 20 $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 由图 1 可见, 绿原酸, 甘草酸保留时间约为 13 和 61min, 空白溶液在绿原酸, 甘草酸峰位置处无吸收峰(图 2), 即本试验条件下绿原酸, 甘草酸峰与其他组分分离完全(图 3)。用外标法计算样品中绿原酸, 甘草酸的含量。

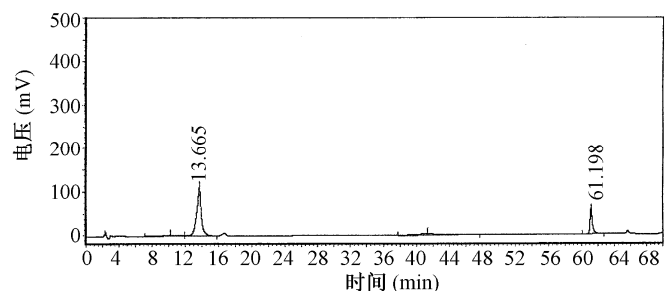


图 1 绿原酸, 甘草酸对照品 HPLC 图谱

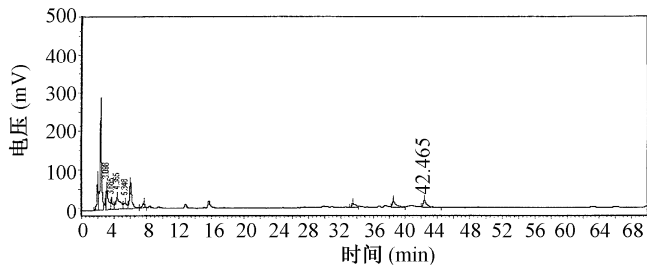


图2 缺金银花, 甘草的阴性对照液 HPLC 图谱

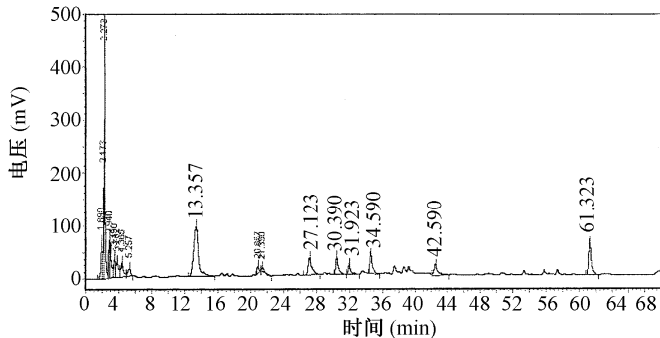


图3 样品液 HPLC 图谱

## 4 讨论

根据极性不同,用梯度洗脱同时测定了绿原酸和甘草酸的含量。由于是水提取液,成分多,极性大,不容易分开,经过摸索,以文中色谱条件为好。

工艺优化评价标准一般以有效成分或已知成分为指标,综合考虑浸膏中总固体量,但不宜单独使用浸膏中总固体量作为评价标准,因其高低并不完全代表提取效果的优劣,在最终确定各因素水平时,在有效成分无显著差异的情况下,应选择适合大生产的因素水平。