

正交试验法优化清开灵注射液中金银花提取液的醇沉工艺*

孙秀玉¹, 王英姿^{1**}, 乔延江¹, 冯艾灵¹, 段飞鹏¹, 周海燕²

(1. 北京中医药大学中药学院 北京 100102; 2. 亚宝北中大制药有限公司 北京 101300)

摘要:目的:优化金银花提取液的醇沉工艺,规范清开灵注射液中金银花提取液的生产,减少批次间差异。方法:采用正交试验,以绿原酸和木犀草苷的含量为指标,并采用多指标综合评分法处理数据,优化醇沉工艺中加醇时的药液温度、搅拌速度和加醇速度3个因素。结果:金银花提取液的最佳醇沉工艺为加醇时药液温度为20℃,搅拌速度240 rpm,加醇速度1倍生药量/min。结论:优化的醇沉工艺稳定可行。

关键词:清开灵注射液 金银花 正交试验 醇沉工艺 绿原酸 木犀草苷

doi: 10.11842/wst.2014.01.035 中图分类号:TQ460.6 文献标识码:A

清开灵注射液由栀子、板蓝根、金银花等8味中药材制备而来,具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍等功效,是国家基本药物目录品种。其中,金银花甘、寒,为忍冬科 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,归心、胃经,具有清热解毒、疏散风热的功效,常用于痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热^[1]。金银花中含有挥发油、有机酸、三萜皂苷、黄酮及其苷类等多种成分^[2,3]。

在清开灵注射液实际生产过程中,金银花提取液需要经过两次醇沉,进一步提高乙醇浓度及用量去除蛋白质、糖等杂质,醇沉操作对于金银花的提纯至关重要。而金银花液的醇沉工艺以人工操作方式为主,缺乏相对稳定的参数控制,受人为经验因素的影响较大,导致批次间金银花液质量差异较大。因此,优化金银花提取液醇沉工艺可有效规范药厂生产,保障金银花提取液质量均一、稳定,并为中药的生产工艺优化提供参考。本文以金银花中绿原酸和木犀草苷为指标,通过考察加醇速度、醇沉

时药液温度、搅拌速度3个因素对金银花醇沉工艺的影响,以期提高清开灵注射液中间体金银花提取液的质量。

1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司, SPD-20A, VWD 检测器, LC Solution 色谱工作站), 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 调温型电热套(天津泰斯特仪器有限公司), SHZ-D()型循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司)。

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413),木犀草苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:11720-201106);金银花药材由亚宝北中大(北京)制药有限公司提供,由北京中医药大学刘春生教授鉴定为忍冬科植物 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花;乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司),水为高纯水;其他试剂均为分析纯。

收稿日期:2013-03-21

修回日期:2013-06-03

* 科学技术部国家“重大新药创制”项目(2010ZX09502-002):清开灵注射液安全性关键技术研究,负责人:乔延江;北京中医药大学创新团队(2011-CXTD-13):复方中药制药研究,负责人:杜守颖。

** 通讯作者:王英姿,硕士生导师,主要研究方向:中药制剂新技术与新剂型研究。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为默克 C₁₈ 色谱柱(4.61 mm×250 mm, 5 μm), 绿原酸流动相: 乙腈-0.4%磷酸(11:89), 检测波长: 327 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30℃, 进样: 10 μL。理论板数按绿原酸计不低于 1 000。色谱图见图 1。木犀草苷流动相: 乙腈-0.5%醋酸, 二元梯度洗脱: 0~10 min, 乙腈 10%~20%; 10~20 min, 乙腈 20%~22%; 20~30 min, 乙腈 22%~28%。检测波长为 350 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 进样 10 μL。理论板数按木犀草苷计不低于 20 000。色谱图见图 2。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成 105 μg·mL⁻¹ 的溶液, 即得绿原酸对照品储备液; 精密称取木犀草苷对照品适量, 加 70% 乙醇制成 100 μg·mL⁻¹ 的溶液, 即得木犀草苷对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取清开灵注射液中处方量的金银花药材, 精密

称定, 置 1 000 mL 圆底烧瓶中, 加水适量, 回流提取 2 次, 每次 0.5 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至 60 mL, 加乙醇使含醇量达 75%, 滤过, 滤液调节 pH 值至 8.0, 冷藏, 抽滤, 滤液回收乙醇, 再加乙醇使含醇量达 85%, 冷藏, 滤过, 滤液回收乙醇, 加水, 冷藏备用。移液枪精密吸取提取液 1 000 μL, 置 25 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇定容, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液。

2.4 线性关系的考察

精密量取绿原酸对照品储备溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0、7.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度分别为 2.1、5.25、10.5、21、42、73.5 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 分别精密吸取上述对照品溶液 10 μL, 按前述绿原酸色谱条件进行测定, 以峰面积(Y)和对照品质量(X)进行线性回归, 回归方程为 $Y = 2\,621.5X - 23\,973$, $r = 0.999\,8$, 绿原酸在 0.021~6.080 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

精密量取木犀草苷对照品储备溶液 1.0 mL, 分别置于 25、10、5、2 mL 容量瓶中, 精密量取木犀草

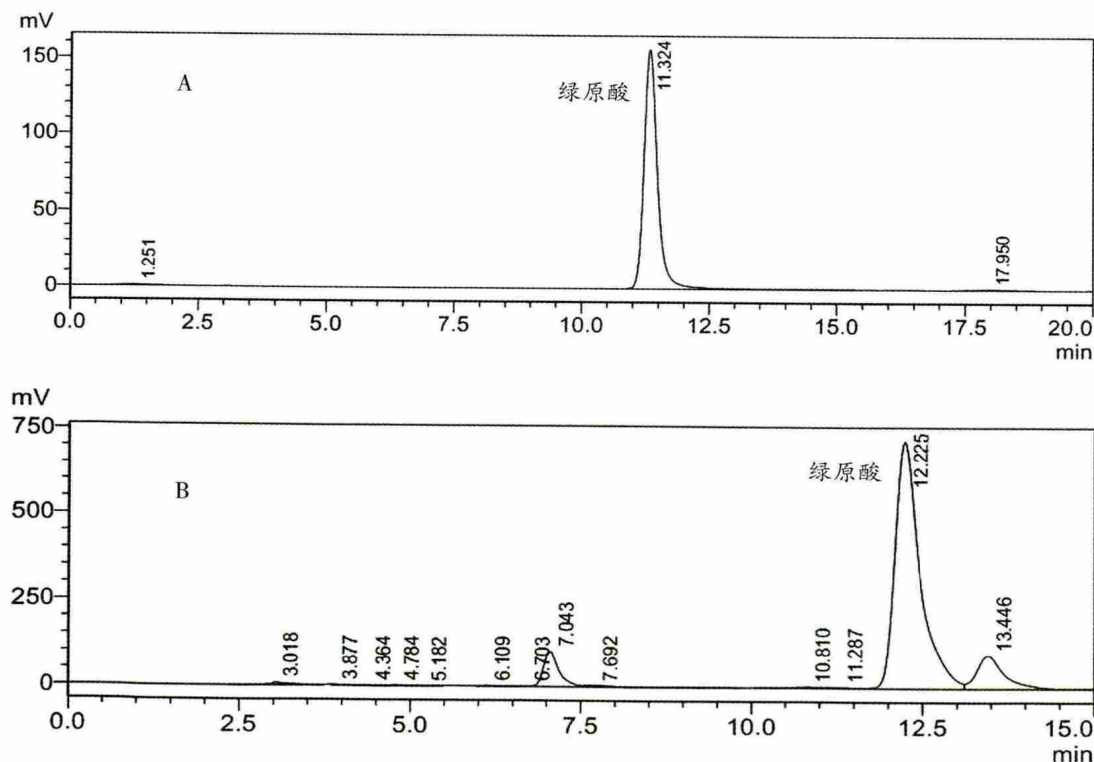


图 1 绿原酸对照品(A)及样品(B)的 HPLC 色谱图

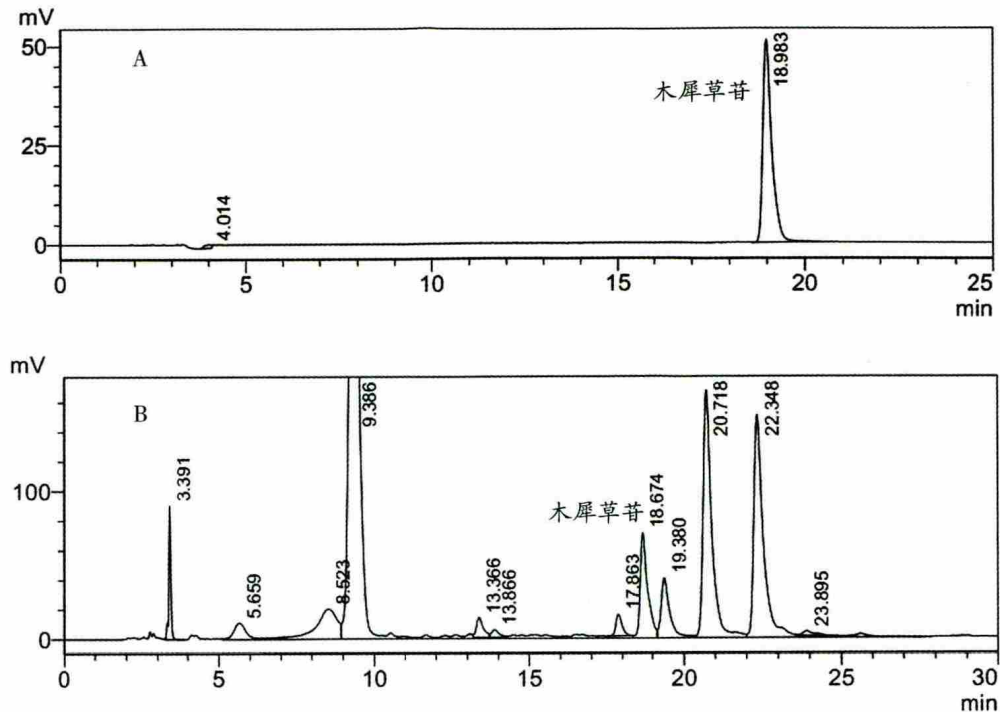


图2 木犀草苷对照品(A)及样品(B)的HPLC色谱图

苷对照品储备溶液 1.5 mL, 分别置于 10、5、2 mL 容量瓶中, 加 70%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度分别为 4.0、10.0、15.0、20.0、30.0、50.0、75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 按前述木犀草苷色谱条件进行测定, 以峰面积(Y)和对照品质量(X)进行线性回归, 回归方程为 $Y = 2\,776.4X + 1\,958.3$, $r = 0.999\,9$, 木犀草苷在 0.04~0.75 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取绿原酸、木犀草苷对照品溶液 10 μL , 按各自色谱条件连续进样 6 次, 测得绿原酸对照品平均峰面积为 2 866 465, RSD 为 0.66%; 木犀草苷对照品平均峰面积为 537 930.17, 峰面积的 RSD 为 0.23%。表明该方法精密度良好。

2.6 重复性试验

称取清开灵注射液中处方量的金银花药材, 平行 6 份, 精密称定, 按前述供试品溶液的制备方法制备供试品, 进样 10 μL , 测得金银花提取液中绿原酸平均百分含量为 1.621 2%, RSD 为 1.53%; 木犀草苷平均百分含量为 0.031 3%, 峰面积的 RSD 为 2.72%。表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取供试品溶液, 按前述绿原酸、木犀草苷色谱条件, 分别于配制后 0、1、2、4、8、12 h 进样 10 μL , 测定绿原酸、木犀草苷峰面积值。计算其 RSD 值分别为 1.93%、2.72%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

精密量取已知绿原酸和木犀草苷含量的金银花提取液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密量取供试品溶液, 然后等体积加入高、中、低 3 个浓度的绿原酸对照品与木犀草苷对照品溶液, 每个浓度平行 3 次, 计算加样回收率。绿原酸平均回收率为 102.46%, RSD 为 1.72%。木犀草苷平均回收率为 97.21%, RSD 为 0.90%。结果见表 1、表 2。

2.9 正交试验

2.9.1 正交试验设计

为规范清开灵注射液中间体金银花精制工艺, 确保产品质量稳定, 本实验以加醇时的药液温度(A)、搅拌速度(B)和加醇速度(C) 3 个影响较大的因素为考察对象, 设计正交试验, 每个因素设 3 个

水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行实验,实验结果以绿原酸和木犀草苷含量为评价指标。正交试验因素水平表见表 3。

2.9.2 实验方法

准确称取处方量金银花药材 9 份,置圆底烧瓶中,加水适量,回流提取 2 次,每次 0.5 h,合并煎液,滤过,滤液浓缩至 60 mL。根据正交表控制相应的药液温度、搅拌速度和加醇速度,向浓缩药液中加入乙醇使含醇量达 75%,滤过,滤液调 pH 值至 8.0,冷藏,回收乙醇,再按正交表控制相应的条件加入乙醇使含醇量达 85%,冷藏,滤过,滤液回收乙醇,加水定量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,并进行含量测定。

2.9.3 正交试验结果

按表 3 条件进行实验,分别测定绿原酸和木犀草苷的含量,并采用多指标综合评分法处理数据^[4]。评分时以各指标的最大值为参照将数据进行归一化。绿原酸和木犀草苷都是金银花中的主要成分,因此绿原酸含量(X_1)和木犀草苷含量(X_2)的权重系数均为 0.5。以综合值进行统计分析,其中综合评分 $M = (0.5X_1/1.6604 + 0.5X_2/0.0453) \times 100$ 。数据处理结果和方差分析见表 4、表 5。

从综合评分的直观分析结果来看,3 个因素的影响作用大小顺序为: $C > B > A$,且 $C_1 > C_2 > C_3$, $B_3 > B_2 > B_1$, $A_3 > A_2 > A_1$,即加醇速度(C)对实验结果的影响较大;方差分析结果表明,因素 C 对综合评分的影响

表 1 金银花提取液中绿原酸的加样回收率试验结果

样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
9.00	8.4	17.407 0	100.08		
9.00	8.4	17.470 8	100.84		
9.00	8.4	17.445 6	100.54		
9.00	18.9	28.245 1	101.83		
9.00	18.9	28.417 4	102.74	102.46	1.72
9.00	18.9	28.452 5	102.92		
9.00	27.3	37.319 1	103.73		
9.00	27.3	37.516 5	104.46		
9.00	27.3	37.667 9	105.01		

表 2 金银花提取液中木犀草苷的加样回收率试验结果

样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
301	160	457.14	97.59		
301	160	461.48	100.30		
301	160	461.25	100.16		
301	350	638.56	96.44		
301	350	641.87	97.39	97.21	2.01
301	350	640.85	97.10		
301	500	773.84	94.57		
301	500	779.67	95.73		
301	500	778.96	95.59		

表3 金银花醇沉工艺正交试验因素水平表

水平	加醇药液温度 A /°C	搅拌速度 B/rpm	加醇速度 C(倍量/min)
1	20	80	1
2	30	160	4
3	40	240	7

具有显著性意义($P<0.05$) ,A、B两因素对实验结果均无显著性差异。因此,结合药厂实际生产及节省能耗和成本的角度考虑,本实验最终确定的金银花水提取液的最佳醇沉工艺条件为 $A_1B_3C_1$, 即加醇时

药液温度为 20°C , 搅拌速度 240 rpm, 加醇速度 1 倍生药量/min。

2.9.3 验证实验

准确称取处方量金银花药材 3 份,按上述最佳醇沉工艺条件 $A_1B_3C_1$ 进行验证试验。3 次实验金银花提取液中绿原酸、木犀草苷综合评分为 98.73 ± 2.62 ,RSD 为 2.64%,表明金银花提取液稳定,且方法可行。结果见表 6。

3 讨论

实验中所选择的评价指标不同,所得到的最佳工艺和提取效果也有差异。因此在金银花的醇沉工

表4 正交试验数据及其计算分析

试验序号	药液温度(A)	搅拌速度(B)	加醇速度(C)	绿原酸百分含量/%	木犀草苷百分含量/%	综合评分(M)
1	1	1	1	1.391 7	0.040 3	86.40
2	1	2	2	1.428 3	0.038 5	85.53
3	1	3	3	1.366 5	0.037 6	82.64
4	2	1	2	1.405 7	0.039 4	85.85
5	2	2	3	1.326 0	0.037 9	81.80
6	2	3	1	1.660 4	0.045 3	100.00
7	3	1	3	1.343 6	0.035 9	80.17
8	3	2	1	1.629 7	0.044 1	97.78
9	3	3	2	1.522 5	0.041 1	91.28
K1	84.85	84.14	94.72			
K2	89.22	88.37	87.55			
K3	89.74	91.30	81.54			
R	4.89	7.17	13.19			

表5 正交试验方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	43.166	2	21.583	4.564	0.180
B	77.878	2	38.939	8.235	0.108
C	261.633	2	130.817	27.664	0.035
误差	9.457	2	4.729		

注: $F_{0.1}(2,2)=9.0, F_{0.05}(2,2)=19.0$ 。

表 6 验证实验结果

编号	绿原酸百分含量/%	木犀草苷百分含量/%	综合评分	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
1	1.552 6	0.043 8	93.70		
2	1.668 9	0.046 5	101.58	98.73±2.61	2.64
3	1.657 7	0.044 8	99.43		

艺研究中,不能仅以单一成分为指标进行评价。目前,绿原酸和木犀草苷已作为金银花药材含量测定的指标性成分收录到 2010 年版《中国药典》。因此,本文同时以绿原酸和木犀草苷为指标,并采用多指标综合评分法处理数据,优化醇沉工艺中加醇时的药液温度、搅拌速度和加醇速度 3 个因素。

金银花醇沉工艺的影响因素很多,包括温度、乙醇浓度、加醇速度、搅拌速度、药液密度、醇沉时间等。其中,加醇时药液温度不能过高,主要是防止乙醇挥发损耗;其次是缩短含醇药液的静置时间;醇沉时应提高搅拌速度,控制加醇速度,以避免药液中局部乙醇浓度过高造成有效成分被沉淀物包裹所造成的损失,在醇沉工艺中,搅拌速度、加醇速度应有一个适宜的范围。因此,本实验采用正交试验的方法,优化醇沉工艺中的药液温度、搅拌速度

和加醇速度,得到最佳理论组合 $A_1B_3C_1$,并经验证实验最终确定最佳醇沉工艺参数为:加醇时药液温度为 20℃,搅拌速度 240 rpm,加醇速度 1 倍生药量/min。本次实验为清开灵注射液中间体金银花提取液醇沉工艺的参数设置及中药的生产控制提供科学依据。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京:中国医药科技出版社,2010:205~206.
- 2 黄西峰. 金银花的研究概况及展望. 中国中药杂志,1997,22(4): 247~249.
- 3 刘恩荔,李青山. 金银花的研究进展. 山西医科大学学报,2006,37(3):331~334.
- 4 陈雯,杜守颖,陆洋. 多指标正交试验优选仙灵骨葆胶囊中丹参、补骨脂提取工艺. 中国中药杂志,2009,34(14):1792~1794.

Optimization of Alcohol Precipitation Techniques for Honeysuckle Extract of *Qingkailing* Injection by Orthogonal Test

Sun Xiuyu¹, Wang Yingzi¹, Qiao Yanjiang¹, Feng Ailing¹, Duan Feipeng¹, Zhou Haiyan²

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Yabao Beizhongda (Beijing) Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101300, China)

Abstract: This study was aimed to optimize the alcohol precipitation techniques for honeysuckle extract in order to standardize the production of honeysuckle extract of *Qingkailing* Injection and reduce the differences among batches. The orthogonal test was applied in this study. The content of chlorogenic acid and galuteolin were taken as comprehensive indicators. Multi-index comprehensive scoring method was used in the data analysis. Three influencing factors, which were the fluid temperature, the stirring speed and the speed of adding alcohol, were optimized in the alcohol precipitation techniques. The results showed that the optimal alcohol precipitation techniques were when the fluid temperature was 20℃, the stirring speed was 240 rpm and the speed of adding alcohol was one time of the material per minute. It was concluded that the optimized alcohol precipitation process was stable and feasible.

Keywords: *Qingkailing* Injection, honeysuckle, orthogonal test, alcohol precipitation, chlorogenic acid, galuteolin

(责任编辑:李沙沙 张志华,责任译审:王 晶)