

清热败毒合剂提取工艺优化及绿原酸含量测定

张 臻, 高 熙, 阙华发(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: **目的** 改进和优化清热败毒合剂的制剂提取工艺。**方法** 采用双提法提取金银花等药物, 通过高效液相色谱测定清热败毒合剂中绿原酸的含量。运用 SPSS 软件进行方差分析, 通过对指标成分进行综合评分确定最佳提取工艺。**结果** 确定其最佳条件为加水量 8 倍, 浸泡 60 min, 煎煮时间为 2 h, 煎煮 2 次。**结论** 绿原酸含量高于原有的提取工艺, 改进的提取工艺优于原有的工艺。

关键词: 清热败毒合剂; 金银花; 绿原酸

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0121-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.030

Optimization of Extraction Process for *Qingre Baidu* Mixture and Determination of Chlorogenic Acid

ZHANG Zhen, GAO Xi, QUE Huafa (Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process for *Qingre Baidu* mixture which has the heat-clearing and detoxifying actions. **Methods** Two extraction methods were used. Firstly, aqueous extraction and steam distillation were used for Flos *Lonicerae*, and then the content of chlorogenic acid was assayed by HPLC. SPSS software was used for the analysis of variance and the extraction process was optimized after comprehensive analysis of the indicative components. **Results** The optimized extraction process condition was as follows: soaking the herbs of the decoction with 8 times of water for 60 min, and then decocting for two times, 2 hours for each time. **Conclusion** Higher chlorogenic acid has been obtained through the improved extraction process, indicating that the improved process is superior to the conventional process.

Keywords: *Qingre Baidu* mixture; Flos *Lonicerae*; Chlorogenic acid

清热败毒合剂为上海中医药大学附属龙华医院医院制剂, 经多年临床验证, 疗效显著。现有的清热败毒合剂在制剂方面只是进行简单的水煎提取, 浓缩, 加辅料, 灭菌。工艺生产过于简单, 没有根据每味中药的有效成分性质进行适当的提取。本课题针对以上不足, 研究清热败毒合剂中君药金银花等药物提取的最佳工艺条件, 以期获得最优化的提取方式, 提高临床疗效, 并为同类制剂的优化方式提供参考和依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 清热败毒合剂, 批号: 061109, 龙

华医院药剂科; 中药药材, 上海养和堂中药饮片有限公司; 绿原酸, 批号: 110753-200413, 中国药品生物制品检定所。

1.2 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪, 美国惠普公司; SHIMADZU 紫外分光光度仪, 岛津公司; DL-302A 型调温调湿箱, 上海跃欣科学仪器厂; 202-AO 台式干燥箱, 南通科学仪器厂; TGL-16G 台式高速离心机, 上海医用分析仪器厂; SBXZ-1A 旋转蒸发器, 上海申玻仪器公司; 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司。

收稿日期: 2014-08-24

作者简介: 张臻, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 中医外科学。Email: olive_z@sohu.com。

基金项目: 上海市卫生局中药新药及院内制剂研发项目(2011ZJ015); 上海市海派中医传承研究项目(ZYSNXD-CC-APGC-JD002)。

2 方法与结果

2.1 指标成分 在清热败毒合剂中金银花、连翘等为君药，其有效成分为绿原酸，其主要作用为抗病原微生物，抑制多种致病菌，抗炎解热、促进白细胞吞噬^[1-2]，故将其作为研究分析清热败毒合剂最佳工艺条件的指标成分之一。

2.2 工艺研究考察因素^[3-7]及结果

2.2.1 提取次数 按处方比例称取复方药材，加 15 倍水，浸泡 1.5 h，进行提取，分别在 10，20，30，45，60，90，120，180，240 min，观察记录挥发油的量，直至挥发油量不再增加，收集挥发油待测。结果表明在 60 min 后挥发油为 0.01 mL，之后挥发油量保持不变。按处方比例称取复方药材，加 15 倍水，浸泡 1.5 h，分别提取 1 次和 2 次，按照指标成分测定法测定绿原酸含量，干浸膏得率，并对绿原酸含量，干浸膏得率进行综合评分，结果表明提取 2 次绿原酸含量最高，因此确定提取 2 次为最佳提取次数。见表 1。

表 1 双提法单因素试验含量结果

Table 1 The concentrations of the index components in the single factor experiments of aqueous extraction and steam distillation

编号	绿原酸 /mg·L ⁻¹	干浸膏得率 /%
水提 1 次	214.42	29.02
水提 2 次	255.29	34.84

2.2.2 加水量、浸泡时间及提取时间正交试验 根据单因素实验的结果及文献报道将每个因素设为 3 水平，忽略各因素间的交互作用，选用 L₉(3⁴)正交设计安排正交试验，将考察的指标设为绿原酸含量及干浸膏得率，采用高效液相色谱测定绿原酸含量，并对绿原酸含量及干浸膏得率进行综合评分，见表 2~表 4。

表 2 双提法正交试验因素表

Table 2 The orthogonal test for aqueous extraction and steam distillation

水平	因素		
	A(加水量)	B(浸泡时间)/min	C(提取时间)/h
1	8 倍水	45	1.5
2	11 倍水	60	2
3	14 倍水	90	2.5

由表 5、表 6 方差分析可知，3 个因素间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。对于因素 A(加水量)，由于考虑到浓缩方便，因此选择 8 倍水，由表 4 可知，对于因素 B(浸泡时间)和因素 C(煎煮时间)，由于 K₂ >

K₁，K₃，且按照因素 B 浸泡 60 min，C 提取 2 h，所得的绿原酸含量也最高，因此确定最佳条件 A₁B₂C₂，即加水量 8 倍，浸泡 60 min，煎煮时间为 2 h，煎煮 2 次。见表 3~表 6。

表 3 双提法工艺正交试验测定绿原酸含量

Table 3 Assay of chlorogenic acid by the orthogonal tests of aqueous extraction and steam distillation

编号	A	B	C	绿原酸 /mg·L ⁻¹	干浸膏得率 /%
1	1	1	1	189.07	30.28
2	1	2	2	575.61	37.11
3	1	3	3	146.12	16.79
4	2	1	2	251.94	29.02
5	2	2	3	290.89	38.07
6	2	3	1	256.11	34.67
7	3	1	3	260.39	46.00
8	3	2	1	300.96	43.76
9	3	3	2	266.38	42.76

表 4 双提法指标成分工艺正交试验

Table 4 The orthogonal test for the index components extracted by aqueous extraction and steam distillation

编号	A	B	C	绿原酸 /%	干浸膏得率 /%	综合评分 /%
1	1	1	1	10.00	46.18	17.23
2	1	2	2	100	69.57	93.91
3	1	3	3	0	0	0
4	2	1	2	24.64	41.87	28.09
5	2	2	3	33.71	72.85	41.54
6	2	3	1	25.61	61.21	32.73
7	3	1	3	26.61	100	41.29
8	3	2	1	36.05	92.33	47.31
9	3	3	2	28.00	88.91	40.18
K1	114.14	86.61	97.27			
K2	102.36	182.76	162.18			

表 5 绿原酸含量分析表

Table 5 Analysis of the content of hlorogenic acid

因素	离差平方和	自由度	方差	F	显著性
A(加水量)	121.89	2	60.95	0.07	0.92
B(浸泡时间)	2813.74	2	1406.87	1.69	0.37
C(煎煮时间)	1689.93	2	855.96	1.02	0.50

表 6 综合评分分析表

Table 6 Analysis of the comprehensive scores

因素	离差平方和	自由度	方差	F	显著性
A(加水量)	120.70	2	60.35	0.07	0.93
B(浸泡时间)	2388.84	2	1194.42	1.73	0.39
C(煎煮时间)	1190.92	2	595.46	1.04	0.56

2.2.3 验证实验 称取实验处方量，加 8 倍量水，浸

泡 60 min，煎煮时间为 2 h，煎煮 2 次，进行验证实验，结果表明，其干浸膏得率，绿原酸含量基本稳定，说明工艺稳定可行。见表 7。

表 7 双提法验证实验结果

Table 7 Validation results of the experiments of aqueous extraction and steam distillation

编号	绿原酸 /mg·L ⁻¹	干浸膏得率 /%
1	568.72	35.58
2	582.49	36.41

2.2.4 最佳提取工艺合剂与原清热败毒合剂的初步比较 称取实验处方量的药材，分别按照最佳提取工艺及原有工艺提取药液，将上述 2 个供试品溶液注入高效液相色谱，按上述色谱条件进行含量测定，进样量为 10 μL，比较绿原酸含量。结果按最佳提取工艺条件提取的药液中指标成分远高于原有合剂中指标成分的含量。结果见表 8。

表 8 清热败毒合剂与最佳提取工艺比较

Table 8 Comparison of the concentrations of the index components in Qingre Baidu mixture extracted by conventional process and optimized process

样品	绿原酸 /mg·L ⁻¹
清热败毒合剂	261.15
优化工艺提取药液	1458.48

3 讨论

皮肤感染性疾病是常见病、多发病，约占外科所有疾病的 1/3 ~ 1/2，可累及各年龄段人群，严重影响了人们的生活质量。现代医学认为感染的本质是细菌异常增殖的结果，通常选用具有抑菌或杀菌作用的抗生素治疗，但世界卫生组织调查发现，我国患者抗生素药物的使用率高达 80 %，远高于 30 % 的国际水平，如此大量的使用抗生素，将导致细菌的耐药性，二重感染以及抗生素的毒副作用等问题。因此探寻新的具有抗生素样作用药物，已逐渐成为世界医学界研

究的热点。我院院内制剂清热败毒合剂既具有抗菌作用，又与现代医学倡导的“提高非特异性免疫功能”的观点相吻合^⑧。

清热败毒合剂由金银花、连翘等 10 味中药组成，其中有效成分种类较多，且化学性质不一，所用的提取方法也不同。如果对这 10 味中药使用单一方法提取，会造成提取效率低，提取不完全的结果。因此，我们以绿原酸含量、干浸膏得率为指标，通过正交设计试验，确立了清热败毒合剂中金银花、连翘等所含的绿原酸在水中的溶解度较大的中药的最佳提取工艺条件，即为加 8 倍量水，浸泡 60 min，煎煮 2 次，每次 2 h。结果表明，按最佳提取工艺条件提取的药液中，指标成分绿原酸的含量远高于原有合剂中指标成分的含量。清热败毒合剂制作工艺的优化研究为改进清热败毒合剂提取工艺的可行性提供了科学的实验资料，并对进一步提高临床疗效和合理用药有一定的指导意义。

参考文献：

[1] 潘清平，雷志君，周日宝. 灰毡毛忍冬与正品金银花抑菌作用的比较研究[J]. 中医药学刊，2004，22(2)：243.
[2] 庞瑞. 金银花有效成分的药理学研究进展[J]. 陕西中医学院学报，2011，5，34(3)：77-79.
[3] 刘丽芳，卢海刚，边虹铮. 当归补血滴丸提取工艺研究[J]. 河北医药，2010，32(8)：2595-2596.
[4] 谢宗明，彭素梅. 复方金银花颗粒制剂工艺研究[J]. 中国现代药物应用，2010，4(4)：124-125.
[5] 范晓良，颜继忠，张纯. 响应面法优化 CO₂ 超临界萃取紫花地丁总黄酮的工艺研究[J]. 中国现代应用药学，2014，2：172-178.
[6] 雷秋香，单彪. 连翘药理学作用研究进展[J]. 综述与讲座，2012，34(24)：3802-3804.
[7] 李菊，刘淑君. 苯甲酸和苯甲酸钠安全性与检测方法研究进展[J]. 粮食与油脂，2012，9：49-51.
[8] 韩翎. 提倡合理使用抗生素，防止药源性疾病[J]. 中华现代中西医杂志，2005，3(11)：1034-1035.

(编辑：邓响潮)

欢迎订阅 《中药新药与临床药理》，邮发代号：46-210