

优选双花解毒合剂金银花超声提取工艺^{*}

黄群莲¹, 唐 灿^{2△}, 李婷婷²

(1. 泸州医学院附属医院, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院药学院, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的: 优选双花解毒合剂金银花的超声提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交表优选乙醇提取工艺条件, 以金银花有效成分绿原酸收率作为评价指标, HPLC 法测定绿原酸含量。结果: 经过验证试验确定最佳工艺: 65% 乙醇浸泡药材 0.5h、每次提取 1h、共提取 3 次。结论: 优选双花解毒合剂金银花的超声提取工艺稳定、合理、可行。

[关键词] 双花解毒合剂; 金银花; 绿原酸; 正交试验; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2011)05—0034—03

双花解毒合剂主要由金银花、黄芩、板蓝根、麦冬、连翘等药物组成, 具有清热解毒、利咽止咳等功效, 适用于外感风热所致咽喉肿痛、口干咳嗽等症。作为医院制剂在泸州医学院附属医院临床应用多年, 疗效确切。金银花作为双花解毒合剂的君药, 发挥清热解毒、泻火、抗病原微生物、抗炎等重要作用, 故必须首先对金银花提取工艺进行优选研究。金银花来源于忍冬科忍冬属植物忍冬 (*Lonicera japonica* Thunb.) 的干燥花蕾或带初开的花^[1]。性甘寒, 气芳香, 甘寒清热而不伤胃, 芳香透达又可祛邪。主要含木犀草苷及木樨草-7-葡萄糖苷等黄酮类、绿原酸 (Chlorogenic acid)、异绿原酸、肌醇、皂苷及挥发油。现已证明金银花的抗病原微生物的主要有效成分是绿原酸和异绿原酸。考虑到超声波在媒质中传播可使媒质点在其传播空间内进入振动状态, 强化溶质扩散、传质, 且超声波在传播过程中其能量不断被媒质质点吸收变成热能, 导致媒质质点温度升高。同时, 当大量的超声波作用于提取介质, 在振动处于稀疏状态时, 介质被撕裂成许多小空穴, 这些小空穴瞬间即闭合, 闭合时产生高达几千大气压的瞬间压力, 正是由于超声波具有节约时间、无须加热、提取效率高、溶剂用量少、提取有效成分含量高等诸多优

点, 结合绿原酸易溶于乙醇的理化性质, 双花解毒合剂金银花选择超声提取法较为经济合理^[2-4]。本文应用正交设计试验, 对影响金银花提取工艺重要参数 (乙醇浓度、浸泡时间、提取时间、提取次数) 进行优选研究。

1 材料与仪器

1.1 实验材料

金银花粗粉 (过 2 号筛); 乙醇 (AR 分析纯成都科龙化工试剂厂); 乙腈 (色谱纯上海陆都化学试剂厂)、多效蒸馏水 (泸州医学院附属医院制剂室); 绿原酸对照品 (20mg, 供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 110753-200413)、双花解毒合剂 (泸州医学院附属医院)。

1.2 实验仪器

美国戴安高效液相色谱仪 U3000, 旋转蒸发仪 RE-5²B (上海亚荣生化仪器厂), 白洋牌离心机 (河北省白洋离心机厂), ZK072 真空干燥箱 (上海实验仪器有限公司), AS3120A 超声波仪, FA104N 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司), SH2-95A 循环水式多用真空泵。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 十八烷基硅键合硅胶为填充剂 C_{18} ;

^{*} 基金项目: 泸州医学院附属医院科研课题 (No: 2009—39—10)

收稿日期: 2011—05—30 修回日期: 2011—09—01

作者简介: 黄群莲 (1972~), 女, 四川富顺人, 主管中药师, 主要从事中药学和中药质量标准工作。△ 通讯作者: 唐灿, Tel: 18982455783。

流动相:乙腈:0.4%磷酸溶液(13:87);检测波长:327nm;进样量:1μL;理论踏板数按绿原酸计算不得低于1 000^[5]。

2.2 线性关系考察

2.2.1 对照品溶液的配制

精密吸取甲醇定容,配制成1mg·mL⁻¹绿原酸对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制

以进样量M为横坐标,峰面积A为纵坐标绘制标准曲线,绿原酸在0.8~8μg范围内,峰面积A与进样量M呈现良好的线性关系。标准曲线方程为A=35.6529M+0.1769,r=0.9999,n=5。见图1。

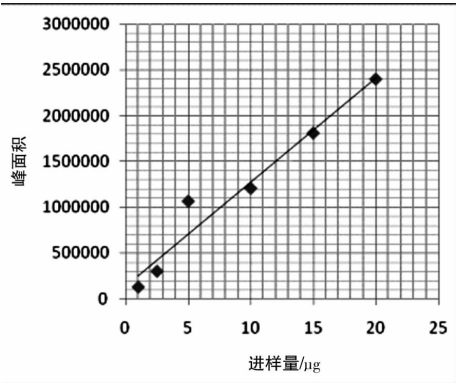


图1 绿原酸标准曲线

2.2.3 样品中绿原酸含量测定

按正交表提取样品溶液,提取液在40℃水浴上挥干乙醇,用无水甲醇溶解残渣并定容于25mL,即得样品溶液。按照2.1色谱条件进行测定,绿原酸的保留时间t_R=8.850min,绿原酸对照品色谱图见图2、样品色谱图见图3。

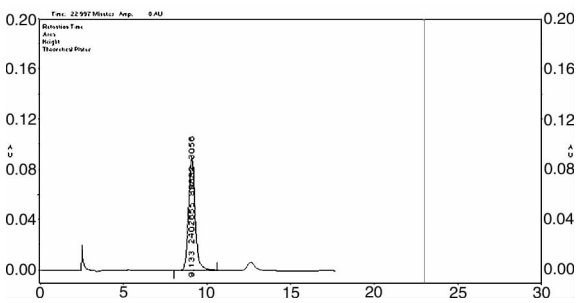


图2 绿原酸对照品色谱图

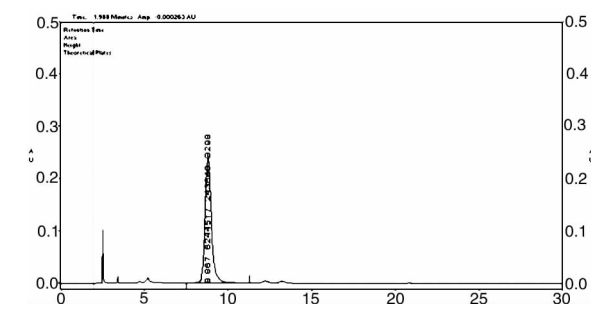


图3 样品色谱图

2.3 正交试验优选提取工艺

2.3.1 正交试验方案设计

根据金银花中绿原酸的性质,采用乙醇超声提取。因乙醇浓度、浸泡时间、提取时间、提取次数4个因素是影响提取效率的主要因素。每个因素设定3个水平,选用L₉(3⁴)正交安排试验,因素水平安排见表1。

表1 正交因素表

序号	乙醇浓度	浸泡时间	提取时间	提取次数
	A/%	B/h	C/h	D
1	50	0.5	0.5	1
2	65	1.0	1.0	2
3	80	1.5	2.0	3

2.3.2 正交试验结果分析

精密称取金银花粗粉(过2号筛)2g,共9份,置于胶塞瓶中。按表1安排实验,正交试验结果见表2。

表2 正交试验结果

	A	B	C	D	提取率
					/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	1	1	5.897
2	1	2	2	2	7.377
3	1	3	3	3	6.803
4	2	1	2	3	8.168
5	2	2	3	1	6.113
6	2	3	1	2	6.865
7	3	1	3	2	6.861

续表 2 正交试验结果

	A	B	C	D	提取率 / (mg · g ⁻¹)
8	3	2	1	3	6.941
9	3	3	2	1	5.260
I	20.077	20.926	19.703	17.270	
II	21.147	20.431	20.805	21.104	
III	19.092	18.929	20.530	21.912	
K1	6.692	6.975	6.568	5.757	
K2	7.049	6.810	6.935	7.034	
K3	6.364	6.310	6.843	7.304	
R	0.685	0.666	0.367	1.547	
SS	0.0521	0.0493	0.0150	0.266	

通过直观分析和方差分析可知，D > A > B > C。通过正交设计推导双花解毒合剂金银花绿原酸最佳提取工艺是 A₂B₁C₂D₃，有待验证试验检验。

2.4 验证试验

为了验证最佳提取条件的重复性，按 A₂B₁C₂D₃ 作 3 次平行试验，结果见表 3。

表 3 验证试验结果

序号	1	2	3
峰面积	8 443 367	8 719 210	8 707 856
提取总量/mg	16.338 8	16.872 6	16.850 6
提取率/ (mg · g ⁻¹)	8.168 1	8.434 1	8.423 2

结果表明该提取工艺条件有较好的重复性以及绿原酸提取率达到最高。因此双花解毒合剂金银花绿原酸最佳提取工艺是 A₂B₁C₂D₃，即采用 65% 乙醇浸泡药材 0.5h、每次提取 1h、共提取 3 次。

3 小结与讨论

通过超声波法提取金银花中绿原酸，比较不同的乙醇浓度、浸泡时间、提取时间以及提取次数下

金银花中绿原酸的提取率来优选其最佳工艺。经实验看出，乙醇浓度 50%、80% 都低于 65% 的；浸泡时间 1.0h 和 1.5h 的提取率均低于 0.5h 的，说明浸泡时间越长提取率越低；提取时间 0.5h 和 2.0h 的都低于 1.0h 的提取率，说明提取时间不宜过短也不宜过长；提取 1 次、2 次的都低于 3 次的提取率，说明 1 次和 2 次提取不能将绿原酸充分提取完。综合实验数据分析可得，金银花中绿原酸的最优提取条件是：65% 的乙醇浸泡 0.5h、每次提取 1.0h、共提取 3 次。

绿原酸 (chlorogenic acid)，又名咖啡鞣酸 (caffeotamic acid)，是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素化合物。绿原酸在 25℃ 时水中溶解度约为 4%，易溶于乙醇、丙醇、甲醇等极性溶剂，难溶于三氯甲烷、乙醚、苯等亲脂性有机溶剂，因此选择乙醇为提取溶剂可行^[6]。利用超声波的空化效应、振动效应、微波热效应、界面效应和聚能效应产生强大剪切力使金银花细胞壁破裂，使细胞更容易释放内容物；而微波热效应促进溶剂进入金银花细胞，加速有效成分进入溶剂。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中国药典 (2010 年版一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 205-205.

[2] 苟占平, 万德光. 金银花品种及其鉴定研究概述 [J]. 中药材, 2004, 27 (3): 229-232.

[3] 武雪芬, 景晓奇, 李国茹. 金银花叶药用成分的提取及抑菌试验 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13 (3): 43-44.

[4] 陈刚, 侯世祥, 胡平, 等. 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (3): 223-226.

[5] 国家药典委员会. 中国药典 (2010 年版一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 206-206.

[6] 石任兵, 陆蕴如. 我国药用金银花资源、化学成分及药理研究进展 [J]. 中国药学杂志, 1999, 34 (1): 724-727.

(编辑: 迟 越)
(英文摘要见第 39 页)

患者两月前无明显诱因出现刺激性干咳, 查全身 PET/CT 检查发现: 右中肺癌伴两肺转移, 左锁骨上、纵膈及两肺门淋巴结转移。随后行左锁骨上淋巴结穿刺活检, 病理诊断“腺癌细胞”。2010 年 12 月初起反复发热, 本拟入院后接受化疗, 但因发热而暂缓, 先接受抗生素治疗十余日, 热不退, 体温在 37.8 ~ 39.5℃, 午后体温升高明显, 加用激素静脉输注及消炎痛栓纳肛治疗后热降, 但停药体温又上升。诊见: 面红消瘦, 烦躁, 干咳无痰, 手足心热, 口干不多饮, 纳差, 乏力, 舌质红绛、苔少, 脉细数。魏师初诊拟方: 青蒿 6g, 鳖甲 30g, 桑白皮 10g, 地骨皮 15g, 柴胡 15g, 黄芩 30g, 天花粉 15g, 石膏 30g, 薄荷 10g, 生地 15g, 丹皮 15g, 杏仁 9g, 秦艽 15g, 蛇舌草 30g, 紫菀 15g, 龙葵 30g, 淡豆豉 6g, 黄芪 30g, 炒楂曲 (各) 30, 生甘草 6g。7 剂, 每日 1 剂, 水煎服。二诊: 体温持续在 37.3 ~ 38.1℃, 咳嗽、纳差、口干明显好转, 夜间盗汗, 大便干结, 仍觉乏力明显前方去青蒿、天花粉、紫菀, 加煅牡蛎 30g、碧桃干 30g、制大黄 12g、炒莱菔 30g。继服二诊方 1

(原文见第 34 页)

周后, 患者体温恢复至正常, 其余症状明显改善, 后接受化疗, 至今未出现发热。

3 结语

对药是指处方配伍中成对出现的药物, 对药配伍可以增强疗效, 扩大治疗范围, 调和药物偏性, 适合复杂病情, 既照顾到正邪矛盾, 又可调整机体功能。《本草纲目》云: “药有七情, 独行者, 单方不用辅也; 相须者, 同类不可离也……相使者, 我之佐使也; 相恶者, 本我之能也; 相畏也, 受彼之制也; 相反者, 两不相合也; 相杀者, 制彼之毒也。” 魏教授的对药表面看是一对一的药物, 实际上是许多明方的精华, 是临床实践中的精华, 用之得当, 效如桴鼓。

[参考文献]

[1] 清·吴鞠通. 增补评注温病条辨 [M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 13.
[2] 沈映君. 中药药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 190, 278, 281.

(编辑: 李 平)

Optimization of Extracting Process in Flos Lonicerae Japonicae

HUANG Qun - lian¹, TANG Can², LI Ting - ting²

- (1. The Hospital Affiliated With Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China;
2. The Pharmacy School of Luzhou Medical College, Luzhou, 646000, China)

[ABSTRACT] Objective: Optimization of double Jiedu oral liquid by ultrasonic extraction technology of honeysuckle. Methods: Using L₉ (3⁴) orthogonal table is preferably ethanol extraction process conditions, with the effective components of honeysuckle Lv Yuan acid as the evaluation index, the HPLC method for the determination of Lv Yuan acid content; Results: After validation test to determine the optimum craft: 65% ethanol soaking herbs 0.5h, each 1H extraction, extracting for 3 times; Conclusion: Optimization of double Jiedu oral liquid honeysuckle ultrasonic extraction process is stable and reasonable and feasible.

[KEY WORDS] Double flowers detoxification; honeysuckle; chlorogenic; orthogonal test HPLC