

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01272

正交试验法优选感冒安颗粒总黄酮提取工艺

袁文琳[△], 宋洪杰^{△*}, 高鸿彬, 傅 芑, 王志君, 陈方剑

第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

[关键词] 感冒安颗粒; 总黄酮; 紫外-可见分光光度法; 正交试验; 超声提取

[中图分类号] R 917.73 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2012)11-1272-02

Orthogonal test in optimizing extraction technology of total flavonoids in Ganmao'an granules

YUAN Wen-lin[△], SONG Hong-jie^{△*}, GAO Hong-bin, FU Peng, WANG Zhi-jun, CHEN Fang-jian

Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Key words] Ganmao'an granules; total flavonoids; UV-VIS spectrophotometry; orthogonal test; ultrasonic extraction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11):1272-1273]

感冒安颗粒是由金银花、连翘、桑叶等七味中药制成的复方制剂,具有抗病毒、抗菌等作用,属纯中药制剂,在临床上使用多年,主治感冒发热、畏寒、头痛、咽喉肿痛等及由感冒所致上呼吸道感染、急性扁桃体炎、急性咽喉炎等,疗效十分显著,至今未发现与感冒安颗粒相关的不良反应,安全性好。其药效的物质基础尚不明确,已有研究^[1-3]表明该制剂药材成分中含有大量黄酮类化合物,如芦丁(芸香苷, rutin)、槲皮素(querletin)、木犀草素(luteolin)等,它们具有抑菌^[4]、解热抗炎^[5]、抗病毒^[6]等作用。目前未见对于感冒安颗粒总黄酮提取及测定分析,无定量指标,且未见对于该处方黄酮成分的相关报道。本研究针对感冒安颗粒中黄酮类成分展开研究,优化总黄酮提取工艺,以芦丁为计,量化感冒安颗粒总黄酮含量,为其质量标准提高以及处方进一步优化提供参考依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 XS205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司), DL-720A 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司), UV-2550 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 试剂 感冒安颗粒(第二军医大学长海医院自制,批号:120131、110418、110704、111025、111121、111130、111221、120207、120201、120214), 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,供 UV 法测定,含量为 92.5%,批号:100080-200707), 甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备 取在 120℃ 干燥至恒质量的芦丁对照品 50 mg,精密称定,置于 25 ml 棕色量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,放置至室温,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每 1 ml 中含无水芦丁 2 mg)。

2.2 测定波长的选择 分别取芦丁对照品溶液和供试品溶液适量,按 2.3 项下的方法显色后,在 300~700 nm 波长范围内进行光谱扫描,两种溶液的光谱图相似,均在 505 nm 波长处有最大吸收,故选择此波长为测定波长。

2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、2.75、3.00 ml,分别置 5 ml 量瓶中,70% 甲醇溶液定容。各取 0.5 ml,加蒸馏水 1.5 ml,混匀,加 5% 亚硝酸钠溶液 0.5 ml,混匀,放置显色 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 0.5 ml,摇匀,放置 6 min,加 4% 氢氧化钠溶液 5.0 ml,摇匀,放置约 15 min,以相应试剂为空白,紫外-可见分光光度法在 505 nm 波长处测定光密度。以光密度为纵坐标(Y),绝对浓度为横坐标(X),绘制标准曲线。其回归方程 $Y=1.3682X-0.0025$,相关系数 $r=0.9969$,说明在 0.15~0.60 mg 范围内方程线性关系良好。

2.4 正交试验设计及供试品溶液的制备 取感冒安颗粒(批号:120131)0.5 g,精密称定,置量瓶中,进行 $L_9(3^1)$ 正交试验,以溶剂甲醇浓度(A)、溶剂用量(B)和超声提取时间(C)为考察因素。提取后放置至室温,过滤,滤液加 70% 甲醇溶液定容至 50 ml 制成供试品溶液,取 2.0 ml 显色测定。以

[收稿日期] 2012-03-31 [接受日期] 2012-07-05

[基金项目] 上海市卫生局中药新药及院内制剂研发项目(2011ZJ028)。Supported by the Program for Research and Development of Novel Traditional Chinese Medicine and the Hospital Preparations of Shanghai Health Bureau (2011ZJ028)。

[作者简介] 袁文琳,第二军医大学药学专业本科 2008 级学员。E-mail: yuanwenlinn@163.com; 宋洪杰,博士,副主任药师。E-mail: hjsong123@yahoo.com.cn

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31162318, E-mail: hjsong123@yahoo.com.cn

平均光密度值为指标进行分析, 结果见表 1 和表 2。感冒安颗粒总黄酮提取最佳条件为 $A_2B_2C_1$, 即 70% 甲醇用量为 35 ml, 超声提取时间为 30 min。

表 1 正交试验方案和结果

编号	A	B	C	平均光密度值	总黄酮含量 $\omega_B/(mg \cdot g^{-1})$
1	50(1)	25(1)	30(1)	0.276	20.355
2	1	35(2)	45(2)	0.274	20.209
3	1	45(3)	60(3)	0.278	20.501
4	70(2)	1	2	0.275	20.282
5	2	2	3	0.281	20.721
6	2	3	1	0.280	20.648
7	30(3)	1	3	0.273	20.136
8	3	2	1	0.276	20.355
9	3	3	2	0.272	20.063
K_1	0.276	0.275	0.277	0.276	
K_2	0.279	0.277	0.274	0.276	
K_3	0.273	0.277	0.277	0.276	
R	0.005	0.002	0.003	0.000	

A: 溶剂甲醇浓度(%); B: 溶剂用量(V/ml); C: 超声提取时间(t/min)

表 2 正交试验方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	4×10^{-5}	2	2×10^{-5}	42.25	< 0.05
B	1×10^{-5}	2	5×10^{-6}	10.75	> 0.05
C	3×10^{-5}	2	1×10^{-5}	30.25	< 0.05
误差(E)	9×10^{-7}	2	4×10^{-7}		

A: 溶剂甲醇浓度; B: 溶剂用量; C: 超声提取时间。
 $F_{\alpha=0.05}(2,2)=19.0$

2.5 稳定性试验 精密量取 2.0 ml 供试品溶液(批号: 120131), 分别在 10、20、30、40、50、60、90、120 min 按 2.3 项下条件显色, 光密度 RSD 为 0.95% ($n=8$), 说明在 10~120 min 内稳定性较好。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号: 120131)5 份, 每份 2.0 ml, 按 2.3 项下条件显色测定, 光密度 RSD 为 0.71% ($n=5$), 说明精密度良好。

2.7 重复性试验 取感冒安颗粒(批号: 120131)5 份各 0.5 g, 精密称定, 按 2.4 项确定的最佳条件制备供试品溶液, 按 2.3 项下条件显色后光密度 RSD 为 0.46% ($n=5$), 说明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知总黄酮含量的感冒安颗粒(批号: 120131, 每 0.5 g 含总黄酮约 10 mg)9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 各精密加入芦丁对照品约 10 mg, 分别按 2.4 项确定的最佳条件制备提取液, 各精密量取 1.0 ml, 按 2.3 项下条件显色, 测定光密度, 计算加样回收率。9 次测定的平均加样回收率为 95.48%, RSD 为 0.58%, 说明方法回收率良好。

2.9 样品测定 取 10 个批号感冒安颗粒各 0.5 g, 按 2.4 项确定的最佳条件制备供试品溶液, 按 2.3 项下条件显色后测定

光密度, 计算感冒安颗粒总黄酮含量, 结果见表 3。

表 3 感冒安颗粒总黄酮测定结果

批号	总黄酮 $\omega_B/(mg \cdot g^{-1})$	RSD (%)
110418	15.77 \pm 0.17	1.07
110704	15.36 \pm 0.11	0.73
111025	17.21 \pm 0.15	0.86
111121	18.57 \pm 0.26	1.38
111130	18.80 \pm 0.17	0.89
111221	18.77 \pm 0.34	1.78
120131	19.84 \pm 0.06	0.28
120207	18.44 \pm 0.04	0.20
120201	18.84 \pm 0.26	1.40
120214	18.94 \pm 0.18	0.96

$n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究采用正交试验设计方法, 以总黄酮含量为考察指标, 运用紫外-可见分光光度法对感冒安颗粒中黄酮类成分进行分析。黄酮类成分易溶于甲醇, 结合感冒安颗粒提取工艺, 选用超声提取法经预试验设定 $L_9(3^4)$ 正交表来考察提取条件, 确定最佳提取条件为 $A_2B_2C_1$, 即 70% 甲醇, 溶剂用量 35 ml, 超声提取时间为 30 min。依最佳条件对不同批号感冒安颗粒进行总黄酮含量测定, 发现不同批号感冒安颗粒中总黄酮含量存在差异。制剂贮存时间长短、药材质量, 不同批次的药材由于其产地、采收期的不同和干燥、加工炮制及制剂生产过程工艺条件控制均可能造成黄酮成分含量的不同。

综上所述, 本研究针对感冒安颗粒中黄酮成分展开研究, 优化了总黄酮提取工艺, 建立了感冒安颗粒总黄酮含量测定方法, 为感冒安颗粒的质量标准的制订以及处方工艺进一步优化提供了基础。由于本实验仅随机抽取 10 个批号感冒安颗粒样品进行分析, 对制剂中总黄酮含量范围的确定还需要进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 杨颖, 黄荣春, 鲁静, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染病毒感染的黄酮类成分的定量研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26: 426-430.
- [2] 李倩, 冯卫生. 连翘的化学成分研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2005, 20: 78-80.
- [3] 吴好好, 孙冬黎, 钱文春, 楼丽静, 蒋惠娣. 酸水解 HPLC 测定桑叶中鞣质及山奈酚的含量[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27: 248-251.
- [4] 梁薇, 梁莹, 应慧芳. 桑叶水提物及醇提物抗菌作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16: 753.
- [5] 宋建华. 金银花解热抗炎作用的实验研究[J]. 重庆医学, 2011, 40: 2252-2253.
- [6] 王艳芳, 王新华, 朱宇同, 孙汉董. 芦丁对甲型流感病毒抑制作用实验研究[J]. 中医药学刊, 2005, 23: 827.

[本文编辑] 尹茶