

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.10.08

复方抗病毒口服液的提取工艺优化

吴保庆¹,张巧梅¹,黄兰秀¹,陈振威²,曹远东³,周志³

(1. 海大畜牧水产研究中心, 广东广州 511490; 2. 广州和生堂动物药业有限公司,

广东广州 510550; 3. 江西嘉博生物工程有限公司, 江西九江 332600)

[收稿日期] 2021-01-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 10-0049-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了优化复方抗病毒口服液的提取工艺,通过单因素试验和正交试验优化提取时间、提取次数、料液比三个因素,以连翘苷含量、绿原酸含量和干膏得率为考察指标,采用加权评分法进行综合评分。结果表明,提取温度控制在 80 ℃,提取时间为 1 h,提取 2 次,料液比为 1:8 时,综合评分最高。复方抗病毒口服液的提取工艺优化,为大生产提供一定的理论参考。

[关键词] 单因素试验;正交试验;提取工艺

Optimization of Extraction Process of Compound Antiviral Oral Liquid

WU Bao-qing¹, ZHANG Qiao-mei¹, HUANG Lan-xiu¹,CHEN Zhen-wei², CAO Yuan-dong³, ZHOU Zhi³

(1. Haid animal husbandry and Fisheries Research Center, Guangzhou, Guangdong 511490, China; 2. Guangzhou heshengtang Animal Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou, Guangdong 510550, China; 3. Jiangxi Jiabo Bioengineering Co., Ltd, Jiujiang, Jiangxi 332600, China)

Abstract: In order to optimize the extraction process of compound antiviral oral liquid, the three factors of extraction time, extraction times, and solid-liquid ratio were optimized through single factor test and orthogonal test. The content of forsythin, chlorogenic acid and dry extract yield were taken as the evaluation indexes, and the weighted grading method was used for comprehensive evaluation. The results showed that when the extraction temperature was controlled at 80 ℃, the extraction time was 1 h, the extraction was twice, and the solid-liquid ratio was 1:8, the comprehensive score was the highest. The optimization of the extraction process of the compound antiviral oral liquid provides a certain theoretical reference for mass production.

Key words: single factor experiment; orthogonal experiment; extraction process

近年来,随着抗生素禁令的逐步实施,人们对兽用抗生素滥用的危害也愈加警觉,在此背景下,中兽药制剂逐渐成为研究热点。复方抗病毒口服

液,由连翘、金银花、黄芩、栀子、桔梗、甘草六味中药制成。六味药根据中医中药的遣药组方原则,按照君、臣、佐、使进行配伍,具有清热解毒的功效,主

治外感发热,在临床上可用于畜禽多种病毒病的防治。胡克杰等^[1]通过实验表明,连翘脂苷对合胞病毒有抑制作用,有效抑制浓度为 0.39 mg/mL。段林建等^[2]研究表明,连翘苷抗病毒作用是通过抑制甲型流感病毒核蛋白转染后的表达来实现的。Li 等^[3]研究表明连翘酯苷 A 对鸡传染性支气管炎病毒具有体外抑制作用。马元元等^[4]研究表明,连翘苷对圆环病毒的抑制呈浓度依赖性。金银花与连翘同为君药,其中的有机酸对病毒具有一定的抑制作用^[5-7]。

研究采用正交法优化复方抗病毒口服液的提取工艺,通过 HPLC 法测定复方抗病毒口服液中连翘苷和绿原酸的含量,优选出复方抗病毒口服液的最佳提取工艺,为临床生产提供一定的理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent - 1260 II 高效液相色谱仪、AL - 204 电子天平、0.22 μm 滤器。

1.2 材料 连翘 300 g、金银花 150 g、黄芩 150 g、栀子 100 g、桔梗 50 g、甘草 50 g,购自河北全泰药业有限公司(批号:20200513)。

连翘苷(批号:110821 - 201112),购自中国食品药品检定研究院,绿原酸(批号:110753 - 202018),购自中国食品药品检定研究院。

2 方法

2.1 单因素试验

2.1.1 提取时间的考察 称取药材 5 份粉碎,加入 10 倍量的水量浸泡 1 h,提取温度控制在 80 ℃,提取 2 次,每次提取时间为 0.5、1、1.5、2、2.5 h,合并两次滤液,放置在 60 ℃减压干燥箱中浓缩成相对密度为 1.05 的浸膏,以连翘苷、绿原酸含量和干膏得率为考察指标,考察提取时间对提取工艺的影响。

2.1.2 提取次数的考察 称取药材 5 份粉碎,加入 10 倍的水量浸泡 1 h,提取温度控制在 80 ℃,每次提取 1 h,提取次数为 1、2、3、4、5 次,合并滤液,放置在 60 ℃减压干燥箱中浓缩成相对密度为 1.05 的浸膏,以连翘苷、绿原酸含量和干膏得率为考察指标,考察提取次数对提取工艺的影响。

2.1.3 料液比的考察 称取药材 5 份粉碎,分别加入 5 倍、8 倍、10 倍、15 倍、20 倍水量浸泡 1 h,提取温度控制在 80 ℃,提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,放置在 60 ℃减压干燥箱中浓缩成相对密度为 1.05 的浸膏,以连翘苷、绿原酸含量和干膏得率为考察指标,考察加水量对提取工艺的影响。

2.2 正交试验设计 根据单因素试验结果,选取提取时间、提取次数、料液比三个因素,进行三因素三水平 $L_9(3^3)$ 的正交试验,试验设计表见表 1。

表 1 $L_9(3^3)$ 正交试验设计表

Tab 1 The design of orthogonal test

水平	因素		
	A(提取时间/h)	B(提取次数/次)	C(料液比)
1	1	2	1:8
2	1.5	3	1:10
3	2	4	1:15

为了更加准确地评估药效,采用加权评分法将各主要因素综合评分。根据主次关系,人为的将连翘苷含量权重系数设置为 0.4,绿原酸含量权重系数设置为 0.4,干膏得率权重系数设置为 0.2。

综合评分 = (连翘苷含量 / 最大连翘苷含量) × 100 × 0.4 + (绿原酸含量 / 最大绿原酸含量) × 100 × 0.4 + (干膏得率 / 最大干膏得率) × 100 × 0.2。

2.3 含量检测

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Wonda SiL™ C18 柱(5 μm,4.6 mm × 250 mm);流速为 1 mL/min,进样量为 10 μL,柱温为 25 ℃。连翘苷含量检测:以乙腈 - 水(25:75)为流动相,检测波长为 278 nm;绿原酸含量检测:以甲醇 - 水 - 冰醋酸(20:80:1)为流动相,检测波长为 324 nm。

2.3.2 溶液的制备

2.3.2.1 对照品溶液 精密称定连翘苷对照品适量,加 50% 甲醇制成 60 μg/mL 的连翘苷对照品溶液;精密称定绿原酸对照品适量,加水制成 40 μg/mL 的绿原酸对照品溶液。

2.3.2.2 供试品溶液 精密量取本品 1 mL,加在

中性氧化铝柱上,用 70% 乙醇 40 mL 洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,残渣加 50% 甲醇适量,温热使溶解,转移至 100 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得连翘供试品;精密量取本品 2 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得金银花供试品。

2.3.3 标准曲线 将配制的连翘苷对照品溶液,用 50% 甲醇依次稀释成 10、5、2.5、1.25、0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液;将配制的绿原酸对照品溶液,用水依次稀释成 20、10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,按照上述色谱条件进行检测,以标准

液浓度为横坐标,以吸收峰面积为纵坐标,建立标准曲线,得线性回归方程和相关系数。

2.4 统计分析 运用 SPSS17.0 软件对数据进行正交统计分析。

3 结果与分析

3.1 单因素实验

3.1.1 提取时间的考察 由表 2 可见,随着提取时间的增加,连翘苷含量、绿原酸含量和干膏得率先增加后降低,所以确定正交试验的提取时间为 1、1.5、2 h。

表 2 提取时间的考察

Tab 2 The effect of extraction time

提取时间/h	0.5	1	1.5	2	2.5
连翘苷/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.4997 \pm 0.0012	0.6179 \pm 0.0004	0.6278 \pm 0.0023	0.6049 \pm 0.0004	0.5264 \pm 0.0007
绿原酸/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.0317 \pm 0.0006	1.5613 \pm 0.0004	1.4686 \pm 0.0001	1.3645 \pm 0.0002	1.1965 \pm 0.0002
干膏得率/%	33.15	33.23	33.32	34.27	34.24

3.1.2 提取次数的考察 由表 3 可见,随着提取时间的增加,连翘苷的含量、绿原酸的含量先增加

后降低,干膏得率先升高后趋于平稳,综合分析,确定正交试验的提取次数为 2 次、3 次、4 次。

表 3 提取次数的考察

Tab 3 The effect of the number of extractions

提取次数/次	1	2	3	4	5
连翘苷/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.4653 \pm 0.0025	0.6296 \pm 0.0002	0.6096 \pm 0.0002	0.5687 \pm 0.0002	0.5449 \pm 0.0059
绿原酸/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.1575 \pm 0.0002	1.5580 \pm 0.0004	1.5427 \pm 0.0007	1.3333 \pm 0.0006	1.0678 \pm 0.0004
干膏得率/%	26.73	34.36	34.25	34.33	34.56

3.1.3 料液比的考察 由表 4 可见,连翘苷含量、绿原酸含量和干膏得率在料液比为 1:8、1:10、1:15

时都比较高,确定正交试验的料液比为 1:8、1:10、1:15。

表 4 料液比的考察

Tab 4 The effect of solid - liquid ratio

料液比/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1:5	1:8	1:10	1:15	1:20
连翘苷(mg/mL)	0.5138 \pm 0.0004	0.6235 \pm 0.0006	0.6052 \pm 0.0003	0.6139 \pm 0.0005	0.5333 \pm 0.0003
绿原酸/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.1838 \pm 0.0007	1.3682 \pm 0.0004	1.3438 \pm 0.0019	1.3062 \pm 0.0005	1.3027 \pm 0.0004
干膏得率/%	33.14	33.37	33.39	33.41	34.12

3.2 正交试验 由表 5 可见,三种因素对提取工艺的影响顺序为 B(提取次数) > C(料液比) > A(提取时间),表 6 方差分析看出,三个因素均无显

著性差异,综合方差分析与极差分析,确定最佳工艺为 $A_1B_1C_1$,即提取时间为 1 h,提取次数为 2 次,料液比为 1:8。

表 5 正交试验结果

Tab 5 Results of orthogonal experiment

提取时间 A/h	提取次数 B/次	料液比 C/ (g · mL ⁻¹)	连翘苷含量/ (mg · mL ⁻¹)	绿原酸含量/ (mg · mL ⁻¹)	干膏得率/%	综合得分	
1	2	4	1:8	0.5921	1.3324	33.56	91.30
2	1	3	1:15	0.6136	1.4263	34.28	95.49
3	2	2	1:15	0.6083	1.3567	34.21	93.33
4	1	4	1:10	0.5672	1.3359	33.63	89.85
5	1.5	4	1:15	0.5743	1.3027	33.37	89.30
6	2	3	1:10	0.6029	1.4531	33.61	95.11
7	1.5	3	1:8	0.6037	1.4058	33.54	93.91
8	1.5	2	1:10	0.6298	1.4752	32.71	96.86
9	1	2	1:8	0.6145	1.5621	33.34	98.48
K1	283.83	288.67	283.69				
K2	280.07	284.51	281.82				
K3	279.75	270.46	278.13				
R	4.08	18.21	5.56				

表 6 方差分析

Tab 6 Analysis of variance

因素 (Factor)	偏差平方和 (SS)	自由度 (df)	均方 (MS)	F	P
A	3.424	2	1.712	0.399	-
B	60.773	2	30.387	7.080	-
C	5.357	2	2.678	0.624	-
误差	8.583	2			

3.3 标准曲线 由表 7 可见,以对照品浓度为横坐标,吸收峰面积为纵坐标建立的标准曲线,线性回归方程、相关系数和线性范围。

表 7 对照品的线性方程、相关系数、线性范围

Tab 7 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of the standards

	线性回归方程	相关系数	线性范围
连翘苷	$y = 37434x - 15104$	0.9992	0.025 - 10 $\mu\text{g/mL}$
绿原酸	$y = 136823x - 398.5$	0.9995	0.5 - 20 $\mu\text{g/mL}$

4 讨论与结论

连翘、金银花为君药,连翘的主要生物活性成分有连翘苷、连翘酯苷、挥发油等,连翘善走上焦以泻心火,破血结,消痈肿。金银花,既能清气分之热,又能解血分之毒,两药合用,并走于上,升浮宣散,清气凉血、清热解毒,可用于外感风热,疮痈肿毒,咽喉肿痛。通过单因素试验将对提取工艺有影

响的因素进行考察,由于连翘苷与绿原酸对温度都比较敏感,温度过高会破坏连翘苷的结构,使其变性^[8],升温可以破坏金银花的成分,使绿原酸更好的溶出,绿原酸本身不稳定,过高的温度,会使其内部基团发生反应,绿原酸浓度下降^[9],故将提取温度固定在 80 ℃。对提取时间的考察,结果显示随着提取时间的增加连翘苷含量、绿原酸含量均为先升高后降低,这可能是由于随着提取时间的增加,有效成分逐渐溶出,当有效成分基本溶出完全时,提取时间的增加会导致有效成分的降解。对提取次数的考察,随着提取次数的增加连翘苷含量、绿原酸含量先增加后降低,可能是由于前几次的提取已经将有效成分提出,过多的提取不会再有有效成分的溶出^[10]。对料液比的考察,随着料液比的增加,会增大药物与溶剂的接触面积,利于有效成分的溶出^[11],但是过大的料液比会增加能源成本。根据单因素试验的结果设计正交试验,以连翘苷含量、绿原酸含量和干膏得率为考察指标,采用加权法对各因素进行综合评分,使结果更加客观、准确。

研究表明,复方抗病毒口服液提取温度控制在 80 ℃,提取时间为 1 h,提取次数为 2 次,料液比为 1:8 时,综合评分最高,作为优选提取工艺。

参考文献:

- [1] 胡克杰,徐凯建,王跃红,等. 连翘酯甙体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2001(02):89.
Hu K J, Xu K J, Wang Y H, *et al.* Experimental study on antiviral effect of forsythiaside in vitro [J]. China Science and technology of traditional Chinese medicine, 2001 (02): 89.
- [2] 段林建,张清,王农荣,等. 连翘苷对甲型流感病毒核蛋白基因表达的影响研究[J]. 中国全科医学,2012,15(18):2082-2084.
Duan L J, Zhang Q, Wang N R, *et al.* Effect of forsythin on the expression of nucleoprotein gene of influenza A virus [J]. Chinese Journal of general practice, 2012,15 (18): 2082-2084
- [3] Li H, Wu J, Zhang Z, *et al.* Forsythoside a inhibits the avian infectious bronchitis virus in cell culture [J]. Phytotherapy Research, 2010.
- [4] 马元元,张中文,李华伟,等. 连翘酯苷对 IFN- α 和 Mx1 表达的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(15):3237-3243.
Ma Y Y, Zhang Z W, Li H W, *et al.* Effect of forsythiaside on the expression of IFN - α and MX1 [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2010,43 (15): 3237-3243
- [5] Ding Y, Cao Z Y, Cao L, *et al.* Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1 N1/H3 N2) virus and its inhibition of neuraminidase. Scientific Reports, 2017, 7:45723.
- [6] Utsunomiya H, Ichinose M, Ikeda K, *et al.* Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication *in vitro* [J]. Int J Mol Med,2014,34(4):1020-1024.
- [7] Yang J, Hotz T, Broadnax L C, *et al.* Anomalous uptake and circulatory characteristics of the plant-based small RNA MIR2911. Scientific Reports, 2016, 6:26834.
- [8] 赵咏梅,王雷. 连翘苷的提取及其稳定性研究[J]. 陕西农业科学,2016,62(05):21-23.
Zhao Y M, Wang L. Study on the extraction and stability of forsythin [J]. Shanxi Agricultural Sciences, 2016, 62 (05): 21-23
- [9] 王鑫,李楠,齐佳慧,等. 金银花中绿原酸的提取工艺研究[J]. 黑龙江大学学报,2020,11(03):36-39.
Wang X, Li N, Qi J H, *et al.* Extraction of chlorogenic acid from honeysuckle [J]. Journal of engineering, Heilongjiang University, 2020,11 (03): 36-39
- [10] 张俊顺,骆嘉原,姜喆卉,等. 连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 现代食品科技,2020,36(07):193-201+104.
Zhang J S, Luo J Y, Jiang Z H, *et al.* Optimization of extraction process and antibacterial activity of forsythin [J]. Modern food science and technology, 2020,36 (07): 193-201 + 104
- [11] 纪丽丽. 正交试验法优化连翘叶中连翘苷提取工艺的研究[J]. 中国林副特产,2014(01):11-13.
Ji L L. Optimization of extraction technology of forsythin from Forsythia suspensa leaves by orthogonal test [J]. Chinese forest by-products, 2014 (01): 11-13

(编辑:陈希)