

## 甘草配方颗粒提取工艺优化及其质量标准研究

吕佳佳, 陈庆, 王莎, 周昌艳  
(遵义医学院药剂学教研室, 贵州 遵义 563000)

**摘要:** 目的 优化甘草配方颗粒提取工艺, 并且建立其质量标准。方法 以得膏率及甘草苷、甘草酸转移率为评价指标, 浸泡时间、提取时间、料液比为影响因素, Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。TLC 法定性鉴别, HPLC 法同时测定甘草苷、甘草酸含量。结果 最佳条件为浸泡时间 30 min, 提取时间 90 min, 料液比 1:12, 甘草苷、甘草酸转移率分别为 37.12%、32.10%, 得膏率为 43.26%。TLC 斑点清晰, 重复性好, 甘草苷、甘草酸含量稳定。结论 甘草配方颗粒提取工艺合理, 质量控制方法简便易行, 重复性好。

**关键词:** 甘草配方颗粒; 甘草苷; 甘草酸; 提取; Box-Behnken 响应面法; TLC; HPLC

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)10-2182-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.013

## Extraction optimization for Gancao Formula Granules and the quality standard

LÜ Jia-jia, CHEN Qing, WANG Sha, ZHOU Chang-yan  
(Department of Pharmaceutics, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

**KEY WORDS:** Gancao Formula Granules; liquiritin; glycyrrhizic acid; extraction; Box-Behnken response surface method; TLC; HPLC

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎<sup>[1]</sup>,《神农本草经》将其列为药之上乘;陶弘景将其尊为“国老”,并言:“此药为众药之王,经方少有不用者”<sup>[2]</sup>。甘草味甘性平,归心、脾、肺、胃经,具有补脾益气、清热解毒、缓急止痛、祛痰止咳、调和诸药等功效,主要用于脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短、咳嗽痰多、脘痛、痈肿疮毒、缓解药物毒性和烈性等<sup>[3-6]</sup>,在中医临床处方及中成药中的使用量较大,为历版《中国药典》所收载。

中药配方颗粒是在中医药理论指导下,采用现代科技手段将传统中药饮片按一定生产工艺制成的供临床调剂使用的颗粒状产品<sup>[7]</sup>,具有生产自动化、工艺条件稳定、质量可控、剂量准确等优势,并且还可避免中成药不能随症加减、汤剂服用不便等缺点,从而逐步得到广泛应用<sup>[8-9]</sup>。本实验将甘草制备成配方颗粒后优化其提取工艺,并建立其质量标准<sup>[10-13]</sup>,以期为相关产品质量控制提供参考,

并可进一步扩大该药材的开发利用。

### 1 材料

1.1 试药 甘草对照药材(成都新荷花中药饮片有限公司,批号160715)。甘草苷(批号160421,含量98.62%)、甘草酸铵(批号151013,含量99.35%)对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司。甘草饮片(成都新荷花中药饮片有限公司3批,1501009、1503022、1608002;北京同仁堂药业有限公司1批,1506011;贵州芝林堂药业有限公司1批,1503218),经遵义医学院杨建文教授鉴定为2015版《中国药典》记载的正品。乙腈、甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为去离子水。

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪,配置四元泵、DAD 检测器、在线真空脱气机、Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);T9CS 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);ZF-7 暗箱紫外分析仪(上海嘉鹏科技有限公司);ME204E 分析天平(梅特勒-托

收稿日期: 2017-12-12

基金项目: 遵义医学院硕士启动基金项目(F-751)

作者简介: 吕佳佳(1988—),女,硕士,讲师,研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail: 348124168@qq.com

利多仪器上海有限公司); DURA12 纯水机 (上海和泰仪器有限公司); DL-820D 智能超声波清洗器 (上海之信仪器有限公司)。

## 2 提取工艺优化

2.1 色谱条件及系统适用性试验 Diamonsil Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.05% 磷酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 19% B; 8 ~ 35 min, 19% ~ 50% B; 35 ~ 36 min, 50% ~ 100% B; 36 ~ 40 min, 100% ~ 19% B); 柱温 30 °C; 检测波长 237 nm; 体积流量 1.0 mL/min。精密吸取对照品、供试品溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由图可知, 供试品和对照品在相同位置处有吸收, 分离度大于 1.5, 理论塔板数按甘草苷峰计不低于 3 000。

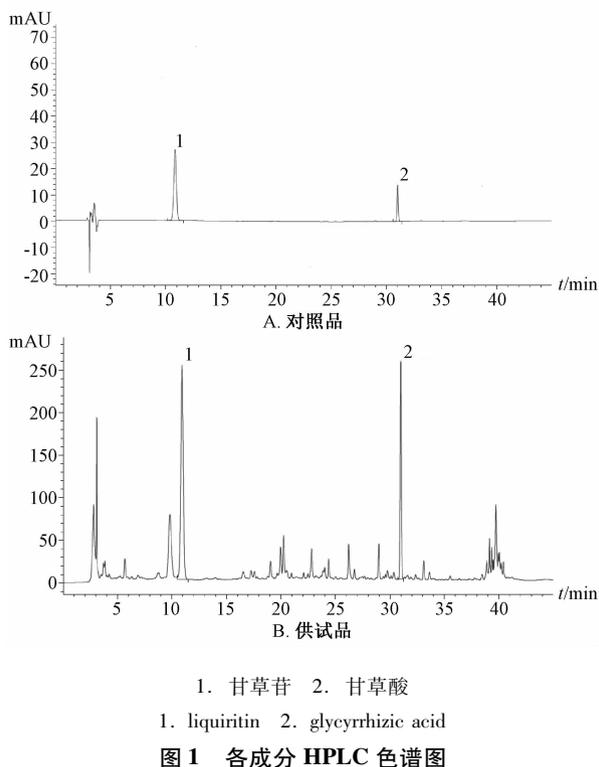


图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取甘草苷、甘草酸铵对照品 5.32、5.55 mg (由于甘草酸不稳定, 故根据 2015 年版《中国药典》要求选择更稳定的甘草酸铵), 置于 25 mL 量瓶中, 70% 乙醇定容, 制得含甘草苷 212.8 μg/mL、甘草酸铵 222 μg/mL 的贮备液。分别精密吸取 3 mL 置于 25 mL 量瓶中, 70% 乙醇定容, 即得, 4 °C 下避光保存。

2.3 供试品溶液制备 精密称取药材粉末 (24 目) 0.2 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙

醇 100 mL, 密塞后称定质量, 超声 (45 W) 30 min 后放冷, 70% 乙醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 得膏率测定 精密吸取样品水煎液 5 mL, 置于干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105 °C 干燥箱中干燥 5 h 后取出, 干燥器内冷却 1 h 后迅速取出, 精密称定质量, 计算出膏率, 公式为出膏率 =  $[(M \times V) / (5 \times W)] \times 100\%$ , 其中  $M$  表示出膏量,  $W$  表示药材质量,  $V$  表示样品溶液体积。

## 2.5 单因素试验

2.5.1 提取方法 精密称取药材粉末 5.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 45 mL 水, 按下述方法处理, 分别为 (1) 40 °C 水浴锅中浸渍 60 min; (2) 超声 (45 W) 60 min; (3) 加热回流 60 min, 精密量取滤液各 5 mL 置于恒重蒸发皿中, 水浴蒸干, 称定质量后 70% 乙醇溶解, 定容于 10 mL 量瓶中, 混匀后测定。结果见图 2。

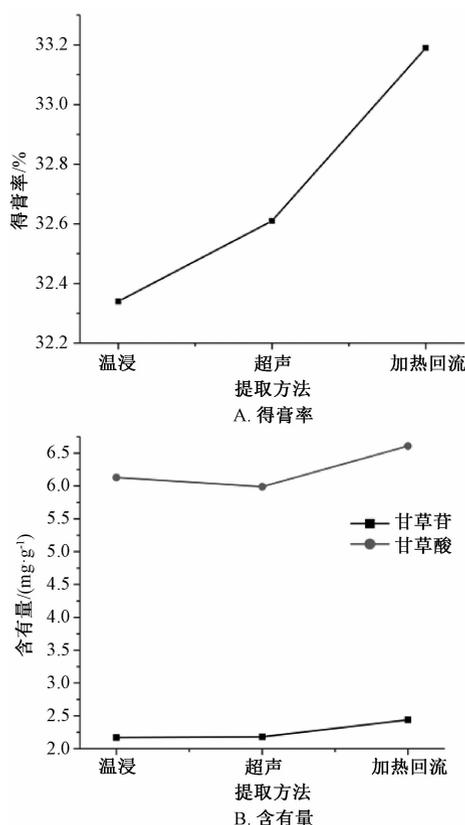


图 2 提取方法考察结果

Fig. 2 Results of extraction method investigation

2.5.2 浸泡时间 称取药材粉末 5 份, 每份 5 g, 置于圆底烧瓶中, 加 10 倍量水分别浸泡 10、30、60、90、120 min 后加热回流 90 min, 过滤, 精密量取滤液各 5 mL 置于恒重蒸发皿中, 水浴蒸干,

称定质量后70%乙醇溶解，定容至10 mL量瓶中，混匀后测定。结果见图3。

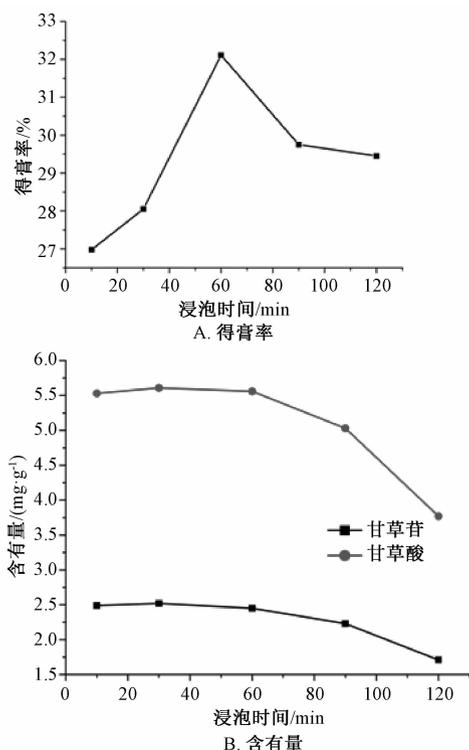


图3 浸泡时间考察结果

Fig. 3 Results of soaking time investigation

2.5.3 提取时间 称取药材粉末5份，每份5 g，置于圆底烧瓶中，加10倍量水浸泡60 min后分别加热回流30、60、90、120、150 min，过滤，精密量取滤液各5 mL置于恒重蒸发皿中，水浴蒸干，称定质量后70%乙醇溶解，定容至10 mL量瓶中，混匀后测定。结果见图4。

2.5.4 加水量 称取药材粉末5份，每份5 g，置于圆底烧瓶中，分别加入6、8、10、12、14倍量水浸泡60 min后加热回流90 min，过滤，精密量取滤液各5 mL置于恒重蒸发皿中，水浴蒸干，称定质量后70%乙醇溶解，定容于10 mL量瓶中，混匀后测定。结果见图5。

2.5.5 提取次数 称取药材粉末5 g，置于圆底烧瓶中，加入10倍量水浸泡60 min后提取90 min，分别提取1、2、3次，精密量取滤液各5 mL置于恒重蒸发皿中，水浴蒸干，称定质量后70%乙醇溶解，定容于10 mL量瓶中，混匀后测定。结果见图6。

2.6 响应面设计<sup>[14-17]</sup> 在单因素试验基础上，选择浸泡时间(A)、提取时间(B)、料液比(C)作为影响因素，得膏率及甘草苷、甘草酸转移率作为评价指标，因素水平见表1，结果见表2。然后，根据Hassan法对每个指标进行归一化处理，公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ ，其中 $Y_i$ 为实

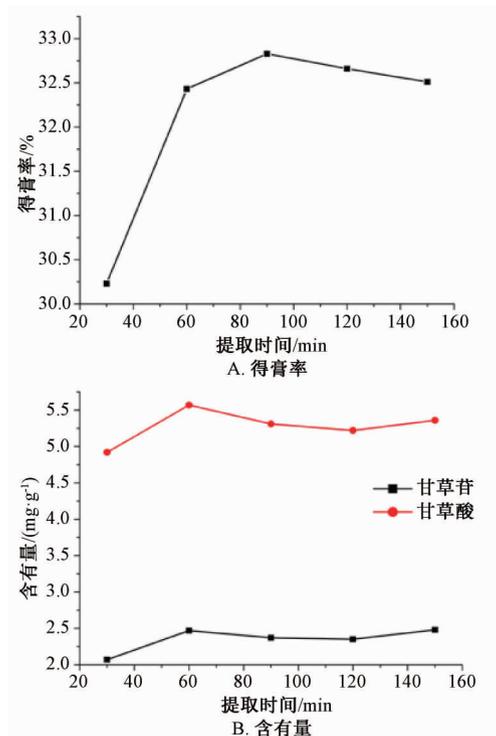


图4 提取时间考察结果

Fig. 4 Results of extraction time investigation

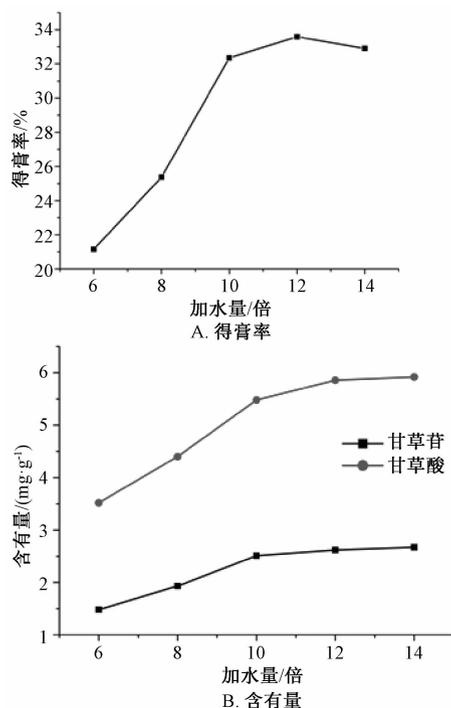


图5 加水量考察结果

Fig. 5 Results of water consumption investigation

为评价指标，因素水平见表1，结果见表2。然后，根据Hassan法对每个指标进行归一化处理，公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ ，其中 $Y_i$ 为实

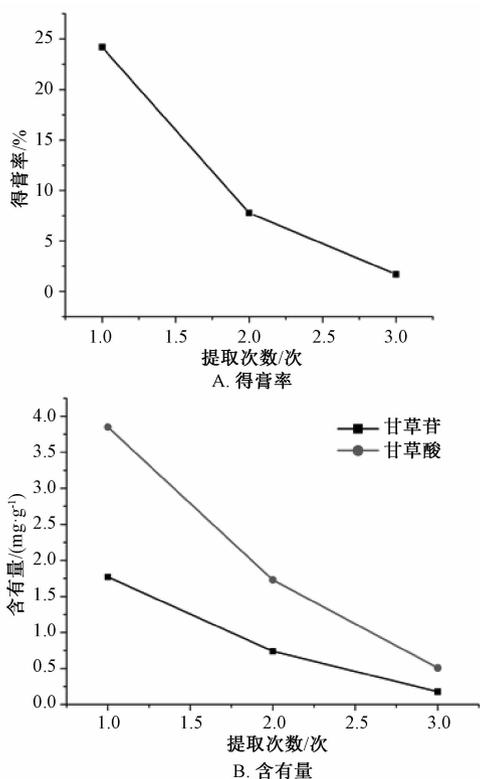


图6 提取次数考察结果

Fig. 6 Results of extraction times investigation

测值,  $Y_{max}$  和  $Y_{min}$  分别为每个指标在不同试验中的最大值和最小值, 再计算“总评归一值”(OD), 公式为  $OD = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/n}$ 。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 浸泡时间/min	B 提取时间/min	C 料液比
-1	10	30	1:10
0	30	60	1:12
1	60	90	1:14

然后, 通过 Design-Expert8.0 软件进行多元线性回归以及二项式方程拟合, 得到方程为  $OD = 0.59 - 0.02A + 0.031B + 0.038C + 0.051AB - 0.2AC + 0.022BC - 0.18A^2 + 0.079B^2 - 0.21C^2$ ,  $R^2 = 0.9870$ ,  $R_{adj}^2 = 0.9703$ , 方差分析见表3。由表可知, 提取时间(B)、料液比(C)有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 失拟项  $P > 0.05$ , 表明未知因素对试验结果干扰小; 模型  $P < 0.001$ , 拟合检验极显著, 表明回归方程拟合度良好。由回归模型进行预测分析, 可知 OD 最大预测值为 0.7064, 最优工艺为浸泡时间 30 min, 提取时间 90 min, 料液比 1:12。

表2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	得膏率/%	甘草苷转移率/%	甘草酸转移率/%	OD
1	-1	-1	0	33.73	30.81	31.14	0.5246
2	1	0	-1	36.65	31.42	26.21	0.3664
3	1	-1	0	32.56	31.26	30.46	0.3767
4	0	0	0	37.47	31.75	27.85	0.6143
5	1	0	1	31.88	30.53	30.27	0
6	-1	0	-1	35.84	27.76	25.60	0
7	0	0	0	36.51	30.92	28.81	0.6009
8	0	0	0	35.82	31.63	28.63	0.5976
9	-1	0	1	34.09	29.57	30.04	0.4345
10	0	1	-1	34.25	30.74	27.59	0.4019
11	-1	1	0	36.57	31.98	26.98	0.5016
12	0	0	0	37.56	29.27	29.66	0.5439
13	0	0	0	37.97	31.60	27.64	0.6040
14	0	-1	-1	37.25	29.28	27.33	0.4026
15	0	1	1	38.92	33.31	26.59	0.5633
16	1	1	0	38.87	30.03	27.97	0.5580
17	0	-1	1	35.94	30.14	28.02	0.4763

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.55	9	0.061	59.07	<0.0001
A	$3.187 \times 10^{-3}$	1	$3.187 \times 10^{-3}$	3.07	0.1232
B	$7.480 \times 10^{-3}$	1	$7.480 \times 10^{-3}$	7.20	0.0314
C	0.011	1	0.011	11.06	0.0127
AB	0.010	1	0.010	10.06	0.0157
AC	0.16	1	0.16	154.46	<0.0001
BC	$1.920 \times 10^{-3}$	1	$1.920 \times 10^{-3}$	1.85	0.2161
A <sup>2</sup>	0.14	1	0.14	133.35	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.027	1	0.027	25.57	0.0015
C <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	179.78	<0.0001
残差	$7.269 \times 10^{-3}$	7	$1.038 \times 10^{-3}$	—	—
失拟项	$4.198 \times 10^{-3}$	3	$1.399 \times 10^{-3}$	1.82	0.2830
纯误差	$3.071 \times 10^{-3}$	4	$7.677 \times 10^{-4}$	—	—
总和	0.56	16	—	—	—

2.7 验证试验 取药材粉末3份, 每份100g, 根据优化工艺进行验证试验, 结果见表4。由表可知, 模型预测性良好, 工艺条件重复性理想。

表4 验证试验结果 (n=3)

Tab. 4 Results of verification tests (n=3)

试验号	得膏率/%	甘草苷转移率/%	甘草酸转移率/%
1	42.26	37.84	31.08
2	43.52	36.55	32.64
3	43.99	36.96	32.59
平均值	43.26	37.12	32.10
RSD/%	2.07	1.78	2.76

2.8 制备工艺 取药材粗颗粒500g, 加12倍量水浸泡30min后提取90min, 共2次, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至相对密度为1.20后进行真空

干燥,得到浸膏粉。按照浸膏粉与乳糖1:1.5比例进行混合,适量70%乙醇制备“手握成团,轻按即散”的软材,过14号筛进行挤压制粒,60℃下干燥5h后采用双筛分法进行整粒,即得。

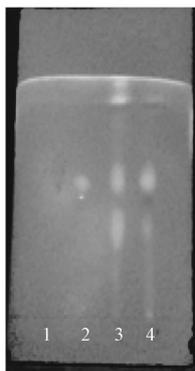
### 3 质量控制

3.1 性状 本品为浅棕色颗粒,味微甜。

3.2 粒度 利用双筛分法进行检测,结果为11.23%。

3.3 溶化性 取配方颗粒10g,加200mL热水搅拌5min后立即观察,发现其溶于热水后有淡淡的香甜味,并呈轻微浑浊状。

3.4 鉴别 称取配方颗粒1g,加40mL水溶解后正丁醇振摇提取3次,每次20mL,合并正丁醇液,水洗涤3次,每次20mL,正丁醇液蒸干,残渣加5mL甲醇溶解,得到供试品溶液,同法制得阴性对照、对照药材溶液。以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2)为展开剂,展开,取出,室温晾干,以10%硫酸乙醇为显色剂,在105℃下加热至斑点显色清晰,于紫外灯(365nm)下检测,结果见图7。



1. 阴性对照 2. 甘草苷 3. 对照药材 4. 供试品

1. negative control 2. liquiritin 3. reference medicinal material  
4. test sample

图7 甘草苷 TLC 色谱图

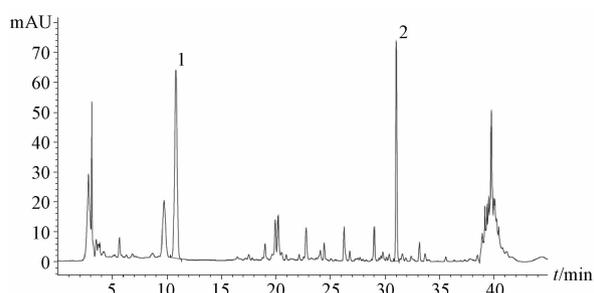
Fig. 7 TLC chromatogram of liquiritin

### 3.5 含有量测定

3.5.1 对照品溶液制备 同“2.2”项。

3.5.2 供试品溶液制备 称取配方颗粒1g,置于具塞锥形瓶中,加100mL70%乙醇,密塞后称定质量,超声(45W)30min,放冷,称定质量,70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过0.45μm微孔滤膜,即得。在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,结果见图8。

3.5.3 线性关系考察 精密吸取甘草苷贮备液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5mL,置于



1. 甘草苷 2. 甘草酸

1. liquiritin 2. glycyrrhizic acid

图8 甘草配方颗粒 HPLC 色谱图

Fig. 8 HPLC chromatogram of Gancao Formula Granules

5mL量瓶中,70%乙醇定容,摇匀;精密吸取甘草酸铵贮备液1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5mL,置于5mL量瓶中,70%乙醇定容,摇匀,得到2种相应对照品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,结果见表5,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表5 各成分线性关系

Tab. 5 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
甘草苷	$Y = 17.867X + 3.2857$	0.9993	21.28 ~ 148.96
甘草酸铵	$Y = 3.9398X + 12.071$	0.9995	66.6 ~ 199.8

3.5.4 精密度试验 精密吸取对照品溶液10μL,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定6次,测得甘草苷、甘草酸峰面积RSD分别为1.3%、2.0%,表明仪器精密度良好。

3.5.5 重复性试验 精密称取配方颗粒1g,平行6份,按“3.5.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10μL,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得甘草苷、甘草酸含有量RSD分别为1.8%、0.9%,表明该方法重复性良好。

3.5.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液10μL,于0、4、8、12、24h在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,测得甘草苷、甘草酸峰面积RSD分别为2.8%、1.6%,表明溶液在24h内稳定性良好。

3.5.7 加样回收率试验 精密称取含有量已知的配方颗粒约0.5g,平行6份,按样品量-对照品量1:1的大致比例加入对照品溶液,按“3.5.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取10μL,在“2.1.1”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果,甘草苷、甘草酸平均加样回收率分别为

98.4%、97.4%，RSD分别为1.9%、2.1%。

3.5.8 样品含有量测定 精密称取3批配方颗粒，每批1g，按“3.5.2”项下方法制备供试品溶液，精密吸取10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表6。

表6 各成分含有量测定结果 (n=3)

Tab. 6 Results of content determination of various constituents (n=3)

批号	甘草苷/(mg·g <sup>-1</sup> )	甘草酸/(mg·g <sup>-1</sup> )
160218	6.1	14.5
160224	6.2	15.0
160225	5.9	15.3
平均值	6.1	14.9
RSD/%	2.52	2.71

#### 4 讨论

甘草苷和甘草酸均为甘草活性成分，故选择其作为工艺优化考察指标，但甘草化学成分复杂，总黄酮及其有效成分不能仅以两者为代表。得膏率可直接反映甘草水溶性成分的总含有量，并且配方颗粒基本都沿用传统汤剂的溶剂——水，故它能反映有效成分提取程度。Box-Behnken 响应面法结果显示，这2种成分转移率较低，其原因可能是《中国药典》测定两者含有量时以70%乙醇为溶剂，而本实验选择水所致。

本实验对不同来源、批号的5批甘草饮片进行质量检查，发现其水分、总灰分均满足2015年版《中国药典》要求；购于成都新荷花中药饮片有限公司的第3批饮片中总黄酮含有量最高，达到2.1%，甘草苷、甘草酸含有量亦然（1.0%、2.51%），这可能与原药材产地、采收季节、生产工艺等因素有关。

在制备甘草配方颗粒时，本实验以吸湿率为指标，对可溶性淀粉、糊精、乳糖进行考察，发现乳糖吸湿率最低。然后，考察浸膏粉与辅料比例，发现在1:1.5时软材硬度适中，较易进行挤压制粒。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 86-87.
- [2] 孙明谦. 甘草中化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [3] 张玉龙, 王梦月, 杨静玉, 等. 炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(3): 99-102.
- [4] 李玉山. 甘草次酸的药理作用及制备工艺研究进展[J]. 化学与黏合, 2015, 37(6): 458-463.
- [5] 刘雅茜. 蜜炙对甘草化学成分及药理作用的影响[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [6] 贾世亮, 武雪玲, 李筱筱, 等. 甘草中黄酮类物质的功能研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2016, 30(4): 67-73.
- [7] 胡莲, 周杰, 袁慧. 夏枯草配方颗粒高效液相色谱特征图谱研究[J]. 中国药业, 2016, 25(24): 16-19.
- [8] 郝云芳, 倪艳, 李先荣. 中药配方颗粒的质量控制方法研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 307-310.
- [9] 于姗姗, 李敏, 张秋红. 中药配方颗粒的指纹图谱研究进展[J]. 中国执业药师, 2016, 13(1): 38-40.
- [10] 钮正睿, 王如峰, 荆宇, 等. 玄参配方颗粒的制备工艺和含量测定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 39-42.
- [11] 沈廷明, 刘知远, 施小华, 等. 金线莲配方颗粒的制备与质量标准研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(11): 15-19.
- [12] 叶殷殷. 大黄配方颗粒制备工艺及质量标准的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [13] 栾海云, 张树平, 李金莲, 等. HPLC法测定甘草酸和甘草苷的含量[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1539-1542.
- [14] 常星洁, 刘汉清, 邹建荣, 等. 响应面法优化女贞子有效成分的提取工艺[J]. 中成药, 2012, 34(5): 839-842.
- [15] 吕佳佳, 李俊生, 王兴慧, 等. 响应面法优选红豆杉枝叶中有效成分的提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(2): 280-285.
- [16] 常星洁. 麦贞花颗粒的药学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [17] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.