

[科研报道]

贾氏银柴退热汤提取工艺的优化

谭丽媛， 翟康欣， 遆安航， 李思思， 刘 瑞， 郭爱玲， 张淑蓉*
(山西中医药大学中药学院，山西 晋中 030600)

摘要：目的 优化贾氏银柴退热汤提取工艺。**方法** 以煎煮时间、煎煮次数、加水量为影响因素，绿原酸、黄芩苷转移率为评价指标，Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。**结果** 最佳条件为煎煮时间 60 min，煎煮次数 2 次，加水量 12 倍，绿原酸、黄芩苷转移率分别为 42.70%、78.97%。**结论** 该方法简便准确，专属性强，可用于提取贾氏银柴退热汤。

关键词：贾氏银柴退热汤；提取；Box-Behnken 响应面法

中图分类号：R284.2 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2021)06-1575-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.034

急性上呼吸道感染是常见疾病，全年都可发生，由病毒和细菌引起，由于感冒的致病原主要是病毒，而且种类繁多，目前尚未找到理想的具有特殊疗效的疫苗和药物，仍处于对症治疗阶段^[1-3]。贾六金主任医师是首届全国名中医，从事中医儿科临床及教学四十余载，擅长治疗儿科呼吸系统疾病，他自创的贾氏银柴退热汤由金银花、连翘、柴胡、黄芩等药材组成，具有辛凉解表、清热解毒、利咽透邪之功效，主治小儿急性上呼吸道感染等疾病^[4-6]，为银翘散和小柴胡汤加减组合而成，通过适当的配伍可达到标本兼治的效果，疗效肯定，用药易得，南北通用，真正做到了价廉效验，具有广泛的应用和开发前景^[7-13]。

提取工艺作为复方中药制备的关键环节，将直接影响其质量。本实验采用 Box-Behnken 响应面法优化贾氏银柴退热汤提取工艺，以期为该制剂后期开发应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪，配置 Waters 2998 检测器、Empower 工作站（美国 Waters 公司）；AE240 电子天平（十万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；FA2104 电子天平（万分之一，上海精密科学仪器有限公司）；H66MC 超声波清洗机（无锡超声电子设备公司）。

1.2 试剂与药物 黄芩、柴胡、金银花等药材购于安国市聚药堂药业有限公司、河北全泰药业有限公司、亳州市远光中药饮片厂、安徽盛堂中药饮片有限公司，连翘采自山西晋中（蒸制 30 min 后在 60 ℃ 以下烘干），所有药材经山

西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为 2015 年版《中国药典》收载品种。绿原酸（批号 110753-201716）、黄芩苷（批号 110842-201508）对照品购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯（批号 12960217，瑞典欧森巴克化学公司）；甲酸为色谱纯（批号 20141021，天津市光复科技发展有限公司）；甲醇为分析纯（批号 20140110，天津市科密欧化学试剂有限公司）；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 绿原酸、黄芩苷含量测定

2.1.1 色谱条件 BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 甲酸（B），梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 1.0 mL/min；柱温室温；检测波长 330 nm。

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0	8.0	92.0
10	8.0	92.0
13	15.0	85.0
26	25.5	74.5
29	8.0	92.0
36	8.0	92.0

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取对照品绿原酸 1.90 mg、黄芩苷 2.30 mg，甲醇定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，即得（每 1 mL 分别含 2 种成分 0.38、0.46 mg）。

收稿日期：2019-12-02

基金项目：山西省科技厅重点研发项目（201603D3113020）；晋药综合开发利用协同创新中心项目（2017-JYXT-04）；山西中医药大学科技创新团队项目（2018TD-008）

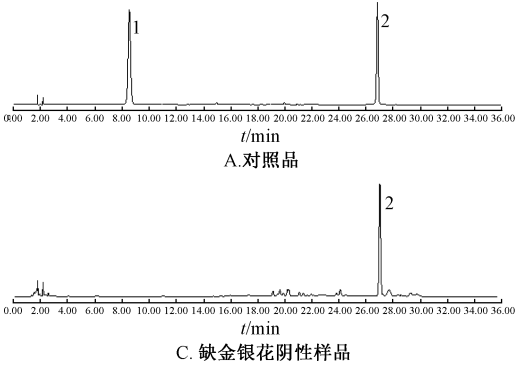
作者简介：谭丽媛（1995—），女，硕士生，从事中药活性成分分析及质量标准研究。Tel：18435166733，E-mail：935304417@qq.com

* **通信作者：**张淑蓉（1962—），女，教授，硕士生导师，从事中药活性成分分析及其药效物质基础研究。Tel：13935110348，E-mail：zhangsr62@163.com

网络出版日期：2020-03-16

网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20200315.2325.002.html

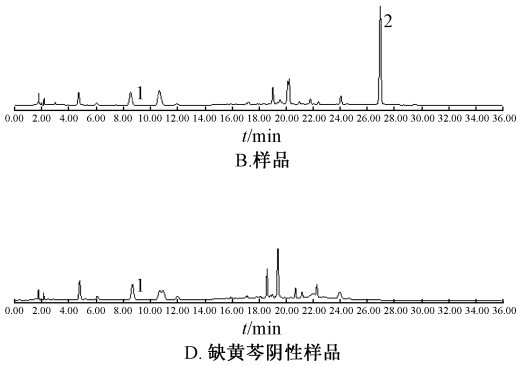
2.1.3 供试品溶液制备 按照处方比例取金银花、柴胡、连翘等药材，蒸馏提取挥发油，蒸馏后水溶液用另外容器收集，药渣与板蓝根等其余药材加12倍量水煎煮2次，每次1 h，合并煎液与水溶液，滤过，滤液浓缩至相对密度为1.15~1.20（80℃），60℃下干燥。精密称取汤剂提取物0.5 g，置于密塞锥形瓶中，精密加入50 mL 50%甲醇，称定质量，超声（功率250 W、频率45 kHz）提取40 min，取出，放冷，50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取



续滤液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.1.4 阴性样品溶液制备 按方剂处方和工艺，分别制备缺金银花、缺黄芩的阴性样品，按“2.1.3”项下方法制备，即得。

2.1.5 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各10 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由此可知，各成分峰形对称，分离度良好，阴性无干扰。



1. 绿原酸 2. 黄芩苷

图1 各成分HPLC色谱图

2.1.6 方法学考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得到回归方程分别为绿原酸 $Y=125\,858X+3\,519.2$ （ $r=0.999\,9$ ）、黄芩苷 $Y=487\,976X+13\,907$ （ $r=0.999\,8$ ），分别在0.04~0.38、0.05~0.46 mg/mL 范围内线性关系良好；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验中绿原酸、黄芩苷峰面积RSD均小于3%，表明仪器精密度、方法重复性、溶液12 h内稳定性良好；绿原酸、黄芩苷平均加样回收率分别为105.06%、107.24%，RSD分别为1.55%、2.12%。

2.2 单因素试验 以绿原酸、黄芩苷转移率的加权值（Y）为评价指标（ $Y=绿原酸转移率\times 50\%+黄芩苷转移率\times 50\%$ ），对浸泡时间（30、45、60、90、120 min）和煎煮时间（30、45、60、90、120 min）进行考察，结果见图2。

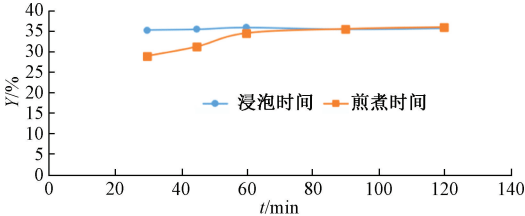


图2 单因素试验结果

2.3 Box-Behnken 响应面法 以煎煮时间（A）、煎煮次数（B）、加水量（C）为影响因素，“2.2”项下加权值（Y）为评价指标，设计三因素三水平15组试验，因素水平见表2，结果见表3，方差分析见表4。由此可知，因素B有极显著影响（ $P<0.01$ ），而因素A、C无显著影响（ $P>0.05$ ）； B^2 有极显著影响（ $P<0.01$ ），而因素 A^2 、 C^2 无显

著影响（ $P>0.05$ ）；因素AB、AC、BC无显著影响（ $P>0.05$ ）。回归方程为 $Y=38.26+5.96B-8.26B^2$ ，相关系数 $R^2=0.964\,4$ ，表明拟合情况良好，工艺可行^[14-15]；调整相关系数 $R^2=0.900\,4$ ，能解释90.04%响应值的变化，可用于预测分析。

表2 因素水平

水平	A 煎煮时间/min	B 煎煮次数/次	C 加水量/倍
1	60	1	8
2	90	2	10
3	120	3	12

表3 试验设计与结果

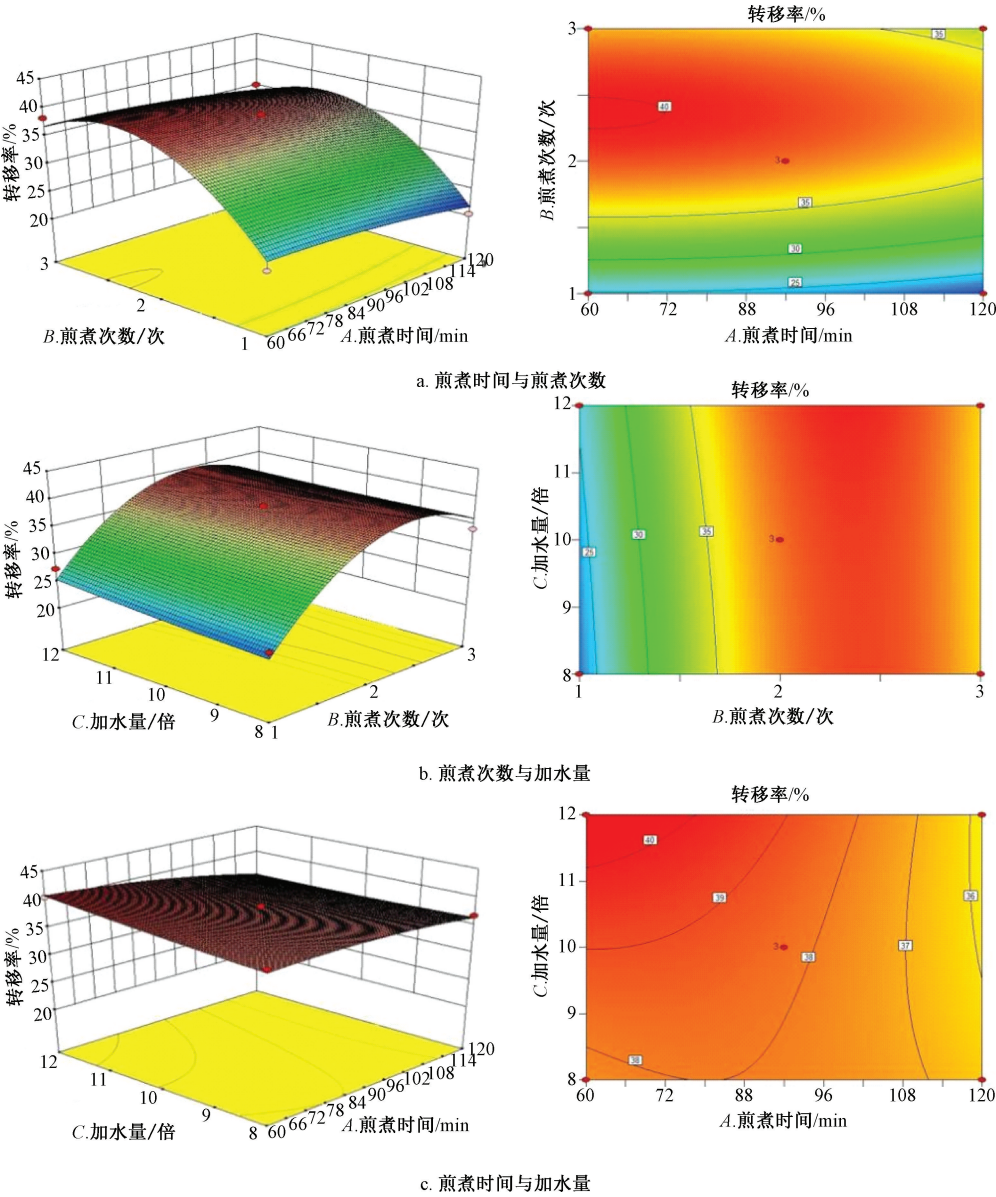
试验号	A 煎煮时间/min	B 煎煮次数/次	C 加水量/倍	绿原酸转移率/%	黄芩苷转移率/%	Y/%
1	90	1	12	41.70	50.60	46.15
2	90	2	10	42.90	50.41	46.66
3	120	1	10	35.20	37.90	36.55
4	60	3	10	44.10	48.90	46.50
5	90	3	8	42.10	66.56	54.33
6	90	2	10	47.30	58.39	52.85
7	90	1	8	41.10	47.48	44.29
8	120	2	8	36.80	53.24	45.02
9	90	3	12	41.10	57.45	49.28
10	90	2	10	43.60	57.76	50.68
11	60	2	12	63.10	74.52	68.81
12	120	2	12	49.00	63.59	56.30
13	60	1	10	38.80	41.26	40.03
14	120	3	10	49.80	71.15	60.48
15	60	2	8	49.20	50.31	49.76

表 4 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	565.48	9	62.83	15.07	0.004 1
A	19.42	1	19.42	4.66	0.083 4
B	283.93	1	283.93	68.10	0.000 4
C	2.70	1	2.70	0.65	0.457 8
AB	0.017	1	0.017	4.053×10^{-3}	0.951 7
AC	3.47	1	3.47	0.83	0.403 5
BC	1.44	1	1.44	0.35	0.582 3
A ²	2.33	1	2.33	0.56	0.487 9
B ²	251.70	1	251.70	60.37	0.000 6
C ²	0.15	1	0.15	0.037	0.854 8
残差	20.85	5	4.17	—	—
失拟项	20.60	3	6.87	55.81	0.017 7
纯误差	0.25	2	0.12	—	—
总和	586.33	14	—	—	—

通过 Design Expert 软件对表 3 数据进行响应面分

析^[16-17]，结果见图 3。图 3a（固定加水量 10 倍）直观显示，煎煮时间不变时随着煎煮次数增加，响应值先升高后趋于平稳，而煎煮次数不变时随着煎煮时间延长，响应值保持平稳，即煎煮次数 2 次或 3 次时响应值最高，而煎煮时间对其影响不大；图 3b（固定煎煮时间 90 min）直观显示，煎煮次数不变时随着加水量上升，响应值缓慢升高，而加水量不变时随着煎煮次数增加，响应值先升高后趋于平稳，故煎煮次数 2 次或 3 次，或加水量为 12 倍时响应值最高；图 3c（固定煎煮次数 2 次）直观显示，煎煮时间不变时随着加水量上升，响应值逐渐升高，而加水量不变时随着煎煮时间延长，响应值趋于平稳，故加水量 12 倍时响应值较高，而煎煮时间对其影响不大，综上所述，直观所得最优工艺为煎煮时间 60 min，煎煮次数 2 次，加水量 12 倍；软件所得最优工艺为煎煮时间 120 min，煎煮次数 3 次，加水量 10 倍，2 种方法所得结果差异较大，需作进一步考察。



注：左边 3 张小图均为三维曲面图，右边 3 张小图均为等高线图。

图 3 各因素响应面图

2.4 验证试验 将直观、软件所得优化工艺参数各取 3 批进行验证试验,结果见表 5。由此可知,2 种方法所得结果无明显差异,考虑到提取效率、资源成本,最终选择直观所得优化工艺,即煎煮时间 60 min,煎煮次数 2 次,加水量 12 倍。

表 5 验证试验结果 (n=3)

试验号	绿原酸转移率/%	黄芩苷转移率/%	Y/%
1	41.40	78.37	59.89
2	42.30	76.04	59.17
3	42.90	78.57	60.74
平均值	42.20	77.66	59.93
4	44.20	79.03	61.62
5	42.30	78.97	60.64
6	41.60	78.90	60.25
平均值	42.70	78.97	60.84

注:试验号 1~3 为直观所得优化工艺参数,试验号 4~6 为软件所得优化工艺参数。

3 讨论

3.1 提取条件优化 本实验针对贾氏银柴退热汤中有效成分绿原酸、黄芩苷极性较大的特点,考察了提取溶剂(50%甲醇、75%甲醇、甲醇、稀乙醇、无水乙醇)、提取方法(超声、加热回流)、提取时间(15、30、45 min)、溶剂用量(25、50、100 mL),最终确定“2.1.3”项下提取条件。

3.2 因素水平确定 中药成分复杂,是其具有多种功效或药理作用的物质基础。文献大多以加水量、煎煮时间、煎煮次数、浸泡时间为优化中药提取工艺的影响因素;课题组前期对浸泡时间、煎煮时间进行了单因素试验,发现不同浸泡时间下有效成分转移率无明显差异,故未列入 Box-Behnken 响应面试验中;随着煎煮时间延长,有效成分转移率呈递增趋势,考虑到大生产实际情况,将其确定为 60~120 min。另外,工厂大生产时不仅要关注产率,更重要的是能耗及成本问题,结合文献可知煎煮次数一般不超过 3 次,故本实验将其确定为 1~3 次;贾氏银柴退热汤中大多为草、叶等松泡类药材,加水量过少时难以浸没药材,而过多时能耗态大,故将其确定为 8~12 倍。

参考文献:

[1] 杨 琴,马红玲,陈 佳. 急性下呼吸道感染住院儿童的

病毒病原学分析 [J]. 海南医学, 2018, 29 (13): 1818-1820.

[2] 马君一,于 明,李雅静. 小儿急性肺炎合并呼吸道感染的临床护理体会 [J]. 中国医药指南, 2018, 16 (25): 259-260.

[3] 丁珍凤. 急性上呼吸道感染的护理体会及预防措施分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5 (38): 120; 127.

[4] 刘小渭. 贾六金治疗小儿外感发热经验 [J]. 中医儿科杂志, 2007, 3 (4): 1-2.

[5] 高 旅,曹 霞,刘小渭,等. 贾六金主任医师运用银柴退热汤临证举隅 [J]. 中医儿科杂志, 2017, 13 (1): 19-21.

[6] 张丽琛,张慧媛,周 钊. 贾六金主任医师银柴退热汤验案举隅 [J]. 光明中医, 2017, 32 (16): 2318-2320.

[7] 李兴平,白筱璐,雷 玲,等. 金银花的解热作用 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28 (2): 37-40.

[8] 刘玉峰,李鲁盼,马海燕,等. 金银花化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 辽宁大学学报 (自然科学版), 2018, 45 (3): 255-262.

[9] 孙晓波. 柴胡多糖对实验性胃粘膜损伤的保护作用 [J]. 吉林中医药, 1991 (6): 33-34.

[10] 卫 昊,刘 清,卫伟光. 秦岭柴胡抗菌解热作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23 (2): 315-316.

[11] 杨 辉,杨 亮,蒋 玲. 柴胡、竹叶柴胡对小鼠的抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国药房, 2012, 23 (47): 4442-4444.

[12] 郑纯威,丁华燮,陈 宇,等. 柴胡皂苷改善大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2011, 20 (5): 755; 774.

[13] 付国辉,马香芹. 黄芩的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2015, 22 (22): 18-20.

[14] 裘荣刚,吴立军,王立波,等. 响应曲面法优化延胡索中延胡索乙素的提取工艺 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34 (1): 84-89.

[15] 郑 妮,张生潭,汪铁山,等. 水蒲桃种子总多酚提取工艺的响应曲面法优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (17): 41-44.

[16] 孟宪军,李冬男,汪艳群,等. 响应曲面法优化五味子多糖的提取工艺 [J]. 食品科学, 2010, 31 (4): 111-115.

[17] 张百霞,郭庆梅,王真真,等. 响应曲面法优化金银花总酚酸提取工艺 [J]. 中成药, 2013, 35 (10): 2144-2148.