

# 莲蓝口服液的制备工艺研究

耿元邦<sup>1</sup>,董发明<sup>1\*</sup>,马 霞<sup>2</sup>,张国祖<sup>2,3</sup>,刘永录<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471003; 2. 河南牧业经济学院,河南 郑州 450046;  
3. 河南省康星药业股份有限公司,河南 郑州 451464)

**摘要:**为了确定莲蓝口服液的生产工艺参数,为莲蓝口服液的生产提供参考,以(R,S)-告依春含量、穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量为依据,采用水提、水提醇沉的方法提取板蓝根和大青叶,醇提法提取穿心莲,筛选出各成分含量均较高的莲蓝口服液制备工艺。结果显示,穿心莲粗粉加10倍量85%乙醇进行渗漉提取,渗漉液中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量最高;板蓝根和大青叶进行水煎浓缩,浓缩液中加入穿心莲渗漉液使乙醇最终体积分数为60%时进行醇沉,穿心莲、板蓝根、大青叶三者的质量比为1:2:1制备的莲蓝口服液各标示成分含量最高。

**关键词:**穿心莲;板蓝根;大青叶;提取

**中图分类号:**S859.3   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2016)06-0126-04

## Study on Preparation Technology of Andrographis-isatidis Oral Liquid

GENG Yuanbang<sup>1</sup>, DONG Faming<sup>1\*</sup>, MA Xia<sup>2</sup>, ZHANG Guozu<sup>2,3</sup>, LIU Yonglu<sup>2</sup>

(1. College of Animal Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;  
2. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;  
3. Henan Kangxing Pharmaceutical Company Limited, Zhengzhou 451464, China)

**Abstract:** In order to optimize extraction process of andrographis-isatidis oral liquid and provide a reference for industrial production of this preparation, the research had been screened out the best abstraction technological conditions of andrographis-isatidis oral liquid by water extraction, water extraction and ethanol precipitation, with the content of R-S epigallocatechin gallate, andrographolide and dehydroandrographolide as the indexes. The results showed that the contents of andrographolide and dehydroandrographolide were the highest, when the extraction condition was *Andrographis paniculata* with 10 times amount of 85% ethanol. Concentration liquid was obtained by the methods of decoction and concentration of *Isatis tinctoria* and *Isatis indigofera*, percolation liquid were added to the concentration liquid for alcohol precipitation with the alcohol concentration of 60%. The active ingredient of andrographis-isatidis oral liquid peaked when the mass ratio of *Andrographis paniculata*, *Isatis tinctoria* and *Isatis indigofera* was 1:2:1.

**Key words:** *Andrographis paniculata*; *Isatis tinctoria*; *Isatis indigofera*; extraction

温热病由外感温热病邪引起,以热象偏重为主要特征。该病具有季节性,且有不同程度的传染性,易在动物群体中和群体间传播蔓延,给养殖业造成较大损失。临床用于预防治疗温热病的中药方剂有《中华人民共和国兽药典》(第2部)和《中华人民共和国药典》(第1部)中收录的清解合剂、清温败毒

散、银翘散、双黄连口服液等<sup>[1-2]</sup>,但这些方剂成分多、制备和质量控制程序繁琐、药材成本高,限制了其在养殖生产中的使用,如清解合剂由板蓝根、连翘、黄芩、金银花、玄参等12味中药组成,其双黄连口服液原料成本就在50~100元/kg。为此,本试验在《中华人民共和国兽药典》(第2部)收载的方剂

收稿日期:2015-12-20

基金项目:河南省重点科技攻关项目(122102110185);河南牧业经济学院科技创新团队项目(HUAHE2015009)

作者简介:耿元邦(1990-),男,河南禹州人,在读硕士研究生,研究方向:中兽药新制剂研发。E-mail:348856323@qq.com

\*通讯作者:董发明(1964-),男,河南武陟人,教授,博士,主要从事中兽医与中兽药研究。E-mail:dfming24@aliyun.com

板蓝颗粒基础上进行加减化裁/重新组方。板蓝根和大青叶均含有(R,S)-告依春、靛玉红等成分<sup>[3]</sup>,有清热解毒、凉血清咽的功效,一般采用水提或水提醇沉的方法进行提取。穿心莲的主要有效成分为二萜内酯类,具有解热、抗炎、镇静的药效<sup>[4-5]</sup>,其中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量最高,但其在水中的溶解度非常小,故本研究对穿心莲采用醇提工艺进行研究,在保证提取率的前提下,简化操作步骤,以(R,S)-告依春、穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量为依据,分别筛选板蓝根、大青叶的最佳组成及提取工艺,优化穿心莲提取工艺<sup>[6-8]</sup>,最终确定莲蓝口服液的最佳组方及最佳生产工艺,为莲蓝口服液的生产提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试药

SHZ-D(Ⅲ)型旋转蒸发仪,由巩义市瑞德仪器设备有限公司生产;津腾溶剂过滤器,由天津津腾实验设备有限公司生产;高效液相色谱仪(P230Ⅱ),由大连依利特分析仪器有限公司生产;色谱柱:Hypersil BDS C18(4.6 mm×250 mm);超声波清洗器(KQ3200),由昆山市超声仪器有限公司生产;电子分析天平(AUW220D),由日本岛津公司生产。

板蓝根、大青叶、穿心莲全叶购自禹州凯旋药业有限公司,所有药物经鉴定均符合生药质量标准;95%乙醇、分析甲醇,由天津市富宇精细化工有限公司生产;一级色谱甲醇,由天津四友精细化学品有限公司生产;(R,S)-告依春标准品(批号为111753-201304)、穿心莲内酯标准品(批号为110854-201313)、脱水穿心莲内酯标准品(批号为110797-200307)、靛玉红标准品(批号为110717-200204)均购自中国药品生物制品检定所。

### 1.2 穿心莲提取工艺的优化

将穿心莲粗粉碎后分别加不同体积倍数的乙醇进行渗漉提取,以穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量为指标,进行三因素三水平正交试验设计(表1),分别设置加乙醇体积分数(75%、85%、95%)、加醇量(5倍、10倍、15倍)及浸泡时间(12 h、24 h、36 h)进行正交试验<sup>[9]</sup>,统计每个因素各个水平下的指标总和 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ ,平均值 $k_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 以及极差 $R$ 。分析各因素对穿心莲提取的影响程度,以确定最佳提取条件。穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量采用高效液相色谱法检测。

### 1.3 板蓝根、大青叶提取工艺的优化

参考药典中板蓝根颗粒、板青颗粒的制备工艺,

表1 三因素三水平的正交试验设计

因素	水平		
	1	2	3
乙醇体积分数(A)%	75	85	95
加醇量(B)/倍	5	10	15
提取时间(C)/h	12	24	36

以(R,S)-告依春含量为指标,对板蓝根、大青叶的制备工艺进行优化筛选,即板蓝根和大青叶分别采用水提和水提醇沉的工艺进行提取<sup>[10-11]</sup>。

1.3.1 水提工艺 分别按照板蓝根:大青叶=2:1、板蓝根:大青叶=1:1、板蓝根:大青叶=1:2的质量比称取适量原药材,加10倍量水,浸泡30 min,煎煮2次,每次2 h,过滤,合并滤液浓缩至每毫升相当于1 g原药材。各样品均分为2份,离心后备用。各样品取其中1份分别标记为样品1、样品2、样品3。

1.3.2 水提醇沉工艺 分别取上述水提工艺中板蓝根和大青叶水提液的另一份样品,分别加乙醇至终体积分数为60%,4℃静置24 h,弃去沉淀,过滤,滤液回收浓缩至每毫升相当于1 g原药材,离心,分别标记为样品4、样品5、样品6。

采用高效液相色谱法检测样品1—6中(R,S)-告依春和靛玉红含量<sup>[12]</sup>。

### 1.4 莲蓝口服液提取工艺的优化

试验中发现,板蓝根与大青叶质量比为2:1的水煎浓缩液中加入1份以上穿心莲时,渗漉液醇沉回收后的样品易出现结晶现象,对结晶样品离心检测发现,结晶物为穿心莲内酯成分,故选择板蓝根2份、大青叶1份的水煎浓缩液中加入1份穿心莲渗漉液进行醇沉,即配方组成为板蓝根:大青叶:穿心莲为2:1:1。

以穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量及(R,S)-告依春含量为考察指标,采用穿心莲渗漉液(乙醇体积分数75%)对板蓝根、大青叶质量比为2:1的水煎液进行醇沉,对醇沉时乙醇最终体积分数进行考察。将同一批板蓝根、大青叶质量比为2:1的水煎浓缩液均分为12份(每份240 mL),每3份为1个处理,处理1加入乙醇使乙醇终体积分数为60%,醇沉过夜,过滤,滤液回收浓缩至每毫升相当于1 g原药材,然后加入穿心莲渗漉回收液(穿心莲渗漉液回收乙醇至含药量1 g/mL)。处理2—4中分别加入等量穿心莲渗漉液(800 mL),调节乙醇的最终体积分数依次为50%、60%、70%,醇沉过夜,过滤,滤液回收浓缩至每毫升相当于1 g原药材。优选醇沉时乙醇的体积分数,处理分组见表2。

表 2 莲蓝口服液制备工艺处理分组

处理	样品编号	加入溶液	乙醇终体积分数/%
1	1—3	乙醇	60
2	4—6	穿心莲渗漉液	50
3	7—9	穿心莲渗漉液	60
4	10—12	穿心莲渗漉液	70

## 2 结果与分析

### 2.1 穿心莲提取工艺的优化结果

根据表 3 极差大小可知,影响穿心莲的提取因素主次顺序为 A > B > C,即:乙醇体积分数 > 加醇量 > 浸泡时间,即乙醇体积分数为 85%、10 倍加醇量时穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量最高,浸泡时间对提取影响较小。综合正交试验结果和生产的可行性,选取最佳工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>,即加 10 倍量 85% 乙醇、常温浸泡 12 h 后渗漉。

表 3 正交试验穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量结果

编号	因素			穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的含量/(mg/mL)
	A	B	C	
1	1	1	1	3.65
2	1	2	2	3.37
3	1	3	3	2.38
4	2	1	2	4.00
5	2	2	3	5.86
6	2	3	1	3.97
7	3	1	3	3.14
8	3	2	1	5.18
9	3	3	2	4.04
K <sub>1</sub>	9.40	10.79	11.80	
K <sub>2</sub>	13.83	14.41	11.53	
K <sub>3</sub>	12.36	10.39	11.38	
k <sub>1</sub>	3.13	3.60	3.93	
k <sub>2</sub>	4.61	4.80	3.84	
k <sub>3</sub>	4.12	3.47	3.79	
R	1.48	1.33	0.14	

### 2.2 板蓝根、大青叶提取工艺的优化结果

由表 4 可以看出,水提醇沉样品(样品 4—6)中(R,S)-告依春和靛玉红含量高于相应组方比例的水提样品(样品 1—3)。靛玉红在水提或水提醇沉提取液中含量均很低,仅为 0.13~0.23 μg/mL,但在水提醇沉样品中的含量稍高于相应的水提样品中的含量;(R,S)-告依春在水提样品 1—3 中含量较低,在醇沉后的样品 4—6 中含量较高,样品 4 中(R,S)-告依春含量高达 140.6 μg/mL。故选择样品 4 的比例(板蓝根:大青叶=2:1)进行后续研究。

表 4 不同提取工艺板蓝根、大青叶样品中各成分的含量

样品编号	(R,S)-告依春	靛玉红
1	58.1	0.13
2	26.3	0.17
3	18.7	0.21
4	140.6	0.18
5	93.2	0.21
6	47.8	0.23

### 2.3 莲蓝口服液提取工艺的优化结果

按照 1.4 中的处理方法制得 4 批莲蓝口服液样品,各标示成分的含量见表 5。处理 1 与处理 3、4 的穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯含量、(R,S)-告依春含量差异不显著,但显著高于处理 2。处理 1 先用乙醇醇沉板蓝根和大青叶的水煎浓缩液,再回收穿心莲渗漉液中的乙醇,提取过程复杂并且用乙醇量多,增加了成本。处理 4 和处理 3 仅需回收 1 次乙醇,但处理 4 的乙醇最终体积分数为 70%,比处理 3 用量大。考虑到提取过程的简化及成本的节约,最终确定处理 3 为莲蓝口服液的提取工艺,即板蓝根、大青叶(2:1)的水煎浓缩液 240 mL,加入穿心莲渗漉液 800 mL,调节乙醇的最终体积分数为 60%,醇沉过夜,过滤,滤液回收浓缩至每毫升相当于 1 g 原药材。

表 5 不同醇沉浓度莲蓝口服液中各成分的含量

处理	乙醇体积分数/%	穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯/(mg/mL)	(R,S)-告依春/(μg/mL)
1	60	1.35 ± 0.12a	83.5 ± 4.1a
2	50	1.18 ± 0.13b	75.4 ± 5.2b
3	60	1.32 ± 0.09a	85.5 ± 6.7a
4	70	1.37 ± 0.11a	83.9 ± 6.5a

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

穿心莲的提取工艺多选用乙醇温浸或者渗漉提取<sup>[13]</sup>,但乙醇温浸工艺耗时长、用醇量大,因此,本试验选用渗漉提取方法,通过不同渗漉时间、不同乙醇体积分数和不同体积的乙醇进行优化,获得最佳提取方法。最后确定穿心莲的提取工艺为:10 倍量 85% 乙醇进行渗漉提取 12 h。

将板蓝根和大青叶的提取工艺进行对比,发现水提醇沉工艺的标示成分含量明显比直接水提的含量高,且以板蓝根、大青叶质量比为 2:1 的样品中含量最高。因此,板蓝根和大青叶的提取工艺定为板蓝根、大青叶质量比为 2:1,加 10 倍量水煎煮 2 次,浓缩,再进行醇沉。

结合穿心莲及板蓝根和大青叶提取工艺的初步研究,按简化操作步骤、节约成本的原则,将板蓝根、大青叶质量比 2:1 水煎醇沉回收乙醇后与穿心莲渗漉回收液(含药量 1 g/mL)混合,以及采用穿心莲渗漉液(醇体积分数 75%)对板蓝根、大青叶(2:1)水煎液进行醇沉,对醇沉时乙醇最终体积分数(50%、60%、70%)进行了考察,对莲蓝口服液提取工艺进行了优化。结果显示,穿心莲与板蓝根及大青叶分别提取再混合的工艺与采用穿心莲渗漉液对板蓝

根、大青叶(质量比2:1)水煎液进行醇沉(乙醇最终体积分数60%和70%)处理间差异不显著。最终将莲蓝口服液的最佳提取工艺确定为:穿心莲粗粉加10倍量85%乙醇浸泡12 h后渗漉,得渗漉液;板蓝根和大青叶以质量比2:1进行水煎浓缩,浓缩液中加入穿心莲渗漉液使乙醇最终体积分数为60%进行醇沉,回收乙醇调节至每1 mL相当于1 g原药材,制备莲蓝口服液。

穿心莲、板蓝根、大青叶三者的质量比为1:2:1,并将穿心莲渗漉液用作板蓝根和大青叶水提液的醇沉溶液,制得的莲蓝口服液各标示成分含量较高。用穿心莲的含醇渗漉液对板蓝根和大青叶提取液进行醇沉,不仅节省乙醇的使用量,而且减少乙醇的回收次数,简化了提取工艺,降低了生产成本,更利于临床的推广应用。

#### 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典:第2部 [S]. 北京:中国农业出版社,2011:4.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:第1部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:1.
- [3] 徐丽华,黄芳,陈婷,等. 板蓝根中的抗病毒活性成分 [J]. 中国天然药物,2005,3(6):359-360.
- [4] 江冬青,罗晓红,谢智颖,等. 穿心莲临床药理研究概况[J]. 国际中医中药杂志,2013,35(11):1030-1032.
- [5] 肖树雄,王晓钰,郑剑红. 穿心莲的成分及其分析方法研究概况[J]. 中国药师,2002,5(11):693-694.
- [6] 张玲,尚立霞,单卫华,等. 穿心莲的提取工艺研究 [J]. 时珍国医国药,2003,14(8):458-460.
- [7] 吴爱群,张国强. 穿心莲内酯提取工艺研究[J]. 河池学院学报,2009,29(5):66-68.
- [8] 张建强,张玲,王欢,等. 穿心莲提取工艺研究[J]. 食品与药品,2005,7(1):37-40.
- [9] 尹秀莲,游庆红,王振华. 穿心莲中穿心莲内酯的提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学,2009,37(15):6988-6989.
- [10] 和翀翼,刘文,吴晨晨,等. 大青叶中靛玉红提取工艺的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2008(3):53-54.
- [11] 莫迎. 不同的提取方法对板蓝根中(R,S)-告依春的影响[J]. 中医药导报,2011,17(6):89-91.
- [12] 张叶,张蕾,王玉. RP-HPLC法测定板蓝根药材中腺苷和表告依春的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1848-1850.
- [13] 刘蕾,许笑笑,韩光. 均匀设计法优化穿心莲的提取工艺[J]. 河南大学学报(医学版),2006,25(4):33-35.

(上接第125页)

- [7] Bartel D P. MicroRNA: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2):281-297.
- [8] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? [J]. Nature Reviews Genetics, 2008, 9(2):102-114.
- [9] Yu Z H, Teng M, Sun A J, et al. Virus-encoded miR-155 ortholog is an important potential regulator but not essential for the development of lymphomas induced by very virulent Marek's disease virus[J]. Virology, 2014, 448(1):55-64.
- [10] Strassheim S, Stik G, Rasschaert D, et al. mdv1-miR-M7-5p, located in the newly identified first intron of the latency-associated transcript of Marek's disease virus, targets the immediate-early genes ICP4 and ICP27[J]. The Journal of General Virology, 2012, 93(Pt 8):1731-1742.
- [11] Xu S, Xue C, Li J, et al. Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting Smad2 of the transforming growth factor beta signal pathway[J]. Journal of Virology, 2011, 85(1):276-285.
- [12] Chi J Q, Teng M, Yu Z H, et al. Marek's disease virus-encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF-β signaling pathway[J]. Virology, 2015, 476:72-84.
- [13] Teng M, Yu Z H, Sun A J, et al. The significance of the individual Meq-clustered miRNA of Marek's disease virus in oncogenesis[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(pt 3):637-649.
- [14] Burnside J, Bernberg E, Anderson A, et al. Marek's disease virus encodes microRNAs that map to meq and the latency-associated transcript [J]. Journal of Virology, 2006, 80(17):8778-8786.
- [15] 罗俊,滕蔓,樊剑鸣,等. 马立克氏病病毒编码的microRNA:从基因组学到功能研究[J]. 中国科学(生命科学),2010,40(6):476-483.
- [16] Li M, Wang B, Lin W. Cl-channel blockers inhibit cell proliferation and arrest the cell cycle of human ovarian cancer[J]. European Journal of Gynaecological Oncology, 2008, 29(3):267-271.
- [17] Zhang H N, Zhou J G, Qiu Q Y, et al. CIC-3 chloride channel prevents apoptosis induced by thapsigargin in PC12 cells[J]. Apoptosis, 2006, 11(3):327-336.
- [18] Capasso M. Regulation of immune responses by proton channels[J]. Immunology, 2014, 143(2):131-137.
- [19] Lee J L, Kang S W. Reactive oxygen species and tumor metastasis[J]. Molecules and Cells, 2013, 35(2):93-98.