

平喘敷贴膏提取工艺优选

虞慧贇¹, 姜林^{2*}, 陈良², 王远¹

(1. 新疆医科大学 中医学学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学 附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 优选平喘敷贴膏的提取工艺条件。**方法:** 以黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量的综合评分为指标, 在单因素试验基础上, 通过 $L_9(3)^4$ 正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对提取工艺的影响。采用 HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量, 流动相乙腈-水 (32:68); 利用 HPLC 测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量, 流动相乙腈-0.6% 磷酸 (3:97), 检测波长 208 nm; 总多糖的含量测定采用苯酚-硫酸比色法。**结果:** 黄芪甲苷、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和总多糖的线性范围分别为 1~17, 0.2~2, 0.1~1 μg , 3.27~7.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最佳提取工艺为加 10 倍量水回流提取 3 次, 每次 1.5 h; 黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量分别为 0.204, 0.900, 1.063 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。**结论:** 该提取工艺简单易行, 重复性好, 可作为评价平喘敷贴膏质量的有效方法。

[关键词] 平喘敷贴膏; 黄芪甲苷; 盐酸麻黄碱; 总多糖; 苦杏仁; 黄芪; 麻黄

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0047-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210047

Optimization of Extraction Procedure of Pingchuan Futie Plasters

YU Hui-yun¹, JIANG Lin^{2*}, CHEN Liang², WANG Yuan¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;
2. Hospital of Chinese Medicine Affiliated Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Pingchuan Futie plasters. **Method:** Taking composite score of extracting amounts of astragaloside, total polysaccharides, ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride as index, based on single factor tests, effects of the amount of water, extraction time and times on extraction process was investigated by $L_9(3^4)$ orthogonal test. HPLC-ELSD was adopted to determine the content of astragaloside with mobile phase consisting of acetonitrile-water (32:68). HPLC was adopted to determine contents of ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride with mobile phase of acetonitrile-0.6% phosphoric acid (3:97) and detection wavelength at 208 nm. Phenol-sulfuric colorimetric method was used to determine the content of total polysaccharides. **Result:** A good linearity was obtained over concentration ranges of 1-17, 0.2-2, 0.1-1 μg for astragaloside, ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride, respectively; while 3.27-7.63 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for total polysaccharides. Optimum process was adding 10 times amount of water for extracting three times, 1.5 h each time; extracting amounts of astragaloside, total polysaccharides, ephedrine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride were 0.204, 0.900, 1.063 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This extraction process is simple and feasible with good repeatability, which can be effectively used to evaluate quality of Pingchuan Futie plasters.

[Key words] Pingchuan Futie plasters; astragaloside; ephedrine hydrochloride; total polysaccharides; Armeniacae Semen Amarum; Astragali Radix; Ephedrae Herba

[收稿日期] 20140520(013)

[第一作者] 虞慧贇, 在读硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel:15099129270, E-mail:icedrop_520@163.com

[通讯作者] *姜林, 教授, 硕士生导师, 主任药师, 从事中药新药研究与开发, Tel:15999131684, E-mail:jianglinjjj@126.com

平喘敷贴方为新疆医科大学附属中医医院院内制剂,由黄芪、炙麻黄、苦杏仁及新疆地产中草药组成,具有益气固表、宣肺平喘、化痰通络的功效,用于治疗以痰饮伏肺、肺失宣降为主要病机的支气管哮喘及慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)急性加重期患者。前期对平喘敷贴散的生产工艺进行研究,建立了该散剂中麻黄等药材的 TLC 鉴别方法,临床观察了 160 例 COPD 患者的治疗效果,结果发现运用穴位敷贴疗法可在一定程度上改善患者的肺功能及缓解症状,减少急性发作次数,达到了提高患者生活质量的目的。但散剂在稳定性、携带和使用方便等方面存在问题,为方便患者使用,将其改制成乳膏剂,系通过穴位经皮给药,将中药制剂与促透剂混合,促使药物经穴位由表及里,循经络内达脏腑,以调节气血阴阳。方中各饮片均以水为提取溶媒,黄芪为方中君药,主要化学成分包括皂苷类、黄酮类、多糖类及氨基酸类等,其中主要有效成分黄芪甲苷具有降血压、镇痛、镇惊作用^[1-2];麻黄主要含有生物碱、挥发油、黄酮类等化学成分,其中生物碱类成分中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱是一对差向异构体^[3,4],盐酸麻黄碱具有松弛支气管平滑肌、收缩血管等药理作用^[5],盐酸伪麻黄碱亦可用于支气管哮喘和鼻炎的治疗。黄芪等饮片中还含有多糖类成分,黄芪多糖因其在增强机体免疫力、降血糖、抗衰老等方面有较强的活性而备受关注。故本实验以黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量为综合评价指标,采用单因素试验和正交试验优选平喘敷贴膏的水提工艺,为该制剂的临床应用与评价提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(2424 型蒸发光散射检测器,美国 Waters 公司),Cintra20 型紫外-可见分光光度计(澳大利亚 GBC 科学仪器有限公司),AG-135 型 1/10 万和 AL204 型 1/1 万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),TD2001A 型电子天平(余姚市金诺天平仪器有限公司),Direct-QTM5 型超纯水仪(美国密理博公司),XYJ80-1 型电动离心机(金坛市医疗仪器厂),VOS-90A 型电热恒温干燥箱(湖北省黄石市医疗器械厂)。

黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* Hsiao,炙麻黄 *Ephedra sinica*,苦杏仁 *Prunus armeniaca* var. *ansu* 等饮片均购自于安徽雷允上国药有限公司,经新疆医科大学附属中医医院药学部李永和主任中医师鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》一部相关

项下要求;黄芪甲苷、盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110781-200613, 071241-201007, 171237-200807, 110933-200602),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芪甲苷的 HPLC-ELSD 测定^[6]

2.1.1 色谱条件 Symmetry Shield Rp C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(32:68),流速 1 mL·min⁻¹,柱温(30 ± 5)℃;ELSD 参数为漂移管温度 60℃,载气 N₂,气流体积流量 2.50 L·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 25 mg 至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,作为储备液。

2.1.3 标准曲线的绘制 分别精密量取对照品储备液适量,配置成 0.05, 0.25, 0.45, 0.65, 0.85 g·L⁻¹ 的系列溶液,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 20 μL 按 2.1.1 项下方法测定,以峰面积为横坐标,进样量为纵坐标,得回归方程 $Y = 9.1 \times 10^6 X + 6.3 \times 10^4$ ($r = 0.9998$),线性范围 1 ~ 17 μg。

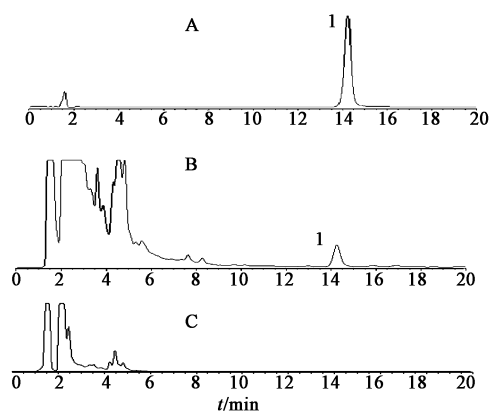
2.1.4 供试品溶液的制备 按比例称取处方量黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,加一定量水提取,提取液过滤,续滤液用水饱和的正丁醇振摇萃取 4 次,每次 40 mL,收集正丁醇液,用氨试液洗涤 2 次,每次 40 mL,回收正丁醇液,蒸干,加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.5 专属性考察 按处方要求制备不含黄芪的阴性样品,按 2.1.4 项下方法制成阴性样品溶液。取对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 20 μL,按 2.1.1 项下方法测定,结果显示该处方中其余药材对黄芪甲苷的含量测定无干扰,见图 1。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下方法连续注入液相色谱仪 6 次,计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.18%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品 6 份,分别按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下方法测定,计算黄芪甲苷含量的 RSD 1.53%,表明本法重复性良好。

2.1.8 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 16, 20, 24 h 按 2.1.1 项下方法测定,计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.46%,表明供试品溶液在



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 黄芪甲苷

图1 平喘敷贴膏中黄芪甲苷 HPLC-ELSD

24 h内稳定,该方法日内精密度良好。取同一供试品溶液,分别按 2.1.1 项下方法连续测定 6 d,计算黄芪甲苷峰面积的 RSD 1.61%,表明供试品溶液在 6 d 内稳定,该方法日间精密度良好。

2.1.9 加样回收率试验 称取处方量黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,共 6 份,各加入一定量黄芪甲苷对照品,按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下方法测定,计算黄芪甲苷平均加样回收率 98.96%,RSD 1.01%,表明该分析方法准确可靠。

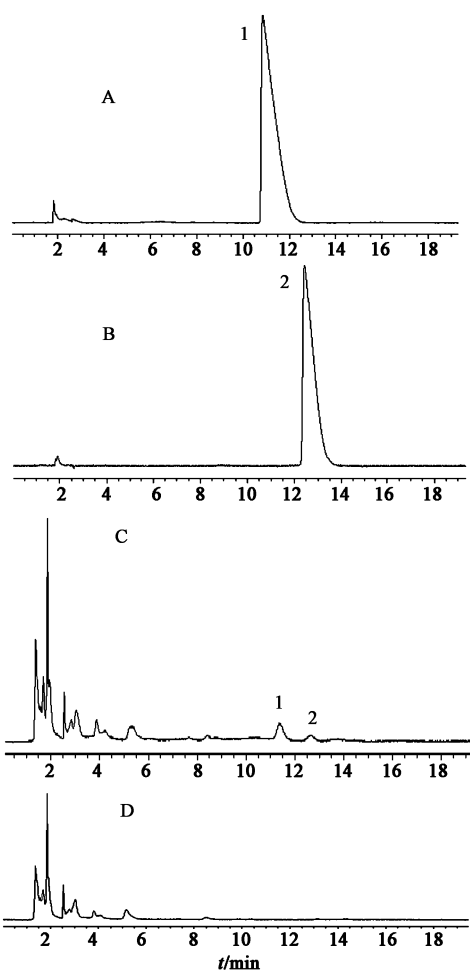
2.2 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量测定^[7]

2.2.1 色谱条件 Symmetry Shield Rp C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-0.6%磷酸(3:97),检测波长 208 nm,流速 1 mL·min⁻¹,柱温(30±5)℃,进样量 10 μL,见图 2。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品各 4.2 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密量取盐酸麻黄碱对照品储备液适量,配置成 0.02,0.04,0.06,0.08,0.20 g·L⁻¹ 的系列溶液;同法配制 0.01,0.04,0.06,0.08,0.10 g·L⁻¹ 的盐酸伪麻黄碱对照品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积积分值对进样量进行拟合,得回归方程分别为 $Y = 2.2 \times 10^7 X + 1.1 \times 10^5$ ($r = 0.9997$), $Y = 4.1 \times 10^7 X + 8.4 \times 10^4$ ($r = 0.9994$),线性范围依次为 0.2~2,0.1~1 μg。

2.2.4 供试品溶液的制备 按处方比例称取黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,加适量水提取一定时间,提取液过滤,精密吸取滤液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。



A,B. 对照品;C. 供试品;D. 阴性样品;

1. 盐酸麻黄碱;2. 盐酸伪麻黄碱

图2 平喘敷贴膏中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 HPLC

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件连续测定 6 次,计算盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的 RSD 分别为 1.2%,0.88%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品按 2.2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱含量的 RSD 依次为 1.2%,1.3%,表明本法重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0,4,8,16,20,24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的 RSD 分别为 1.5%,1.4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定,本法日内精密度良好。取同一供试品溶液,连续 6 d 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰面积的 RSD 依次为 1.9%,1.5%,表明供试品溶液在 6 d 内稳定,本方法日间精密度良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取处方量黄芪、炙麻

黄、苦杏仁等饮片共 50 g,共 6 份,各加入一定量盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱对照品,按 2.2.4 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算平均加样回收率分别为 96.62%,99.95%,RSD 依次为 1.6%,1.4%,表明该分析方法准确可靠。

2.3 总多糖的含量测定^[8]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取于 105℃干燥至恒重的葡萄糖对照品 10.90 mg,置 10 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,精密吸取 2.5 mL 至 25 mL 量瓶中,加水定容,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 按处方比例称取黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片 50 g,加 10 倍量水,称定质量,加热回流 1 h,加水补足减失的质量,加乙醇醇沉至体积分数达 80%,过滤,取沉淀用水冲洗干净,加水将沉淀溶解,加热挥干乙醇,即得。

2.3.3 检测波长的确定^[9-10] 精密吸取供试品溶液 0.2 mL 于 10 mL 具塞试管中,加入水 0.8 mL 和 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,迅速加入硫酸 5 mL,快速混匀,放置 10 min,置沸水浴中加热 20 min,取出迅速冷却至室温;吸取对照品溶液 0.2 mL 于 10 mL 具塞试管中,同法处理。以相应试剂为空白,于 400~800 nm 扫描,结果显示对照品溶液和供试品溶液的最大吸收波长均为 485 nm,且阴性无干扰。

2.3.4 标准曲线的制备 吸取葡萄糖对照品溶液 0.3,0.4,0.5,0.6,0.7 mL,分别置于 10 mL 具塞试管中,按 2.3.3 项下操作,于 485 nm 处测定吸光度

(A),以 A 对葡萄糖质量浓度(C)进行线性回归分析,得标准曲线 $A = 10.771C + 0.024$ ($r = 0.9999$),表明葡萄糖在 3.27~7.63 mg·L⁻¹ 与 A 线性关系良好。

2.4 提取工艺优选 以黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量的综合评分为指标,根据各药在复方中配伍比例及药效贡献大小拟定黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的权重系数分别为 40,30,30。

2.4.1 单因素试验 按处方比例称取黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,固定其他影响因素不变,通过单因素试验考察加水量(6,8,10,12,14 倍)、提取时间(0.5,1,1.5,2,2.5 h)及提取次数(1,2,3,4 次)对平喘敷贴膏水提工艺的影响,结果综合评分分别为 0.557,0.696,0.804,0.959,0.798;0.561,0.733,0.839,0.951,0.990;0.450,0.724,0.811,0.802。故加水量选择 10,12,14 倍,提取时间选择 1.5,2,2.5 h,提取数选择 1,2,3 次。

2.4.2 正交试验 在单因素试验基础上,选择加水量、提取时间及提取次数为考察因素,称取处方量黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,共 9 份,按 L₉(3⁴) 正交表进行试验,每个试验同时做 3 个平行样,以黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量的综合评分为指标,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 平喘敷贴膏水提工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /h	C 提取数 /次	D(空白)	黄芪甲苷 /g·g ⁻¹	盐酸麻黄碱和盐酸 伪麻黄碱/g·g ⁻¹	总多糖 /g·g ⁻¹	综合评分 /%
1	10	1.5	1	1	0.076 1	0.868 7	0.634 9	42.19
2	10	2.0	2	2	0.256 8	0.908 1	0.823 3	61.46
3	10	2.5	3	3	0.404 4	0.904 8	1.356 7	83.35
4	12	1.5	2	3	0.244 9	0.970 0	0.942 2	64.45
5	12	2.0	3	1	0.493 7	0.782 9	1.521 9	90.30
6	12	2.5	1	2	0.147 1	0.747 9	0.764 2	47.02
7	14	1.5	3	2	0.392 2	1.081 4	1.597 4	91.78
8	14	2.0	1	3	0.117 5	0.622 6	0.687 6	39.71
9	14	2.5	2	1	0.342 7	0.941 9	1.098 1	74.52
K ₁	187.00	198.42	128.92	207.01				
K ₂	201.77	191.47	200.43	200.26				
K ₃	206.01	204.89	265.43	187.51				
R	19.01	13.42	136.51	19.50				

表2 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	66.390	33.195	1.016	>0.05
B	30.029	15.014	0.459	>0.05
C	3 108.815	1 554.092	47.544	<0.05
D(误差)	65.375	32.688		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对提取工艺的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 对该方的提取效果具有显著性影响,其他因素则均无显著性影响。结合大工业生产,从节约成本的角度考虑,确定最佳提取工艺 $A_1B_1C_3$,即加 10 倍量水回流提取 3 次,每次 1.5 h。

2.4.3 验证试验 按处方量各药的比例称取黄芪、炙麻黄、苦杏仁等饮片共 50 g,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,分别测定黄芪甲苷、总多糖、盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱提取量,计算综合评分,结果见表 3,表明优选的水提工艺稳定可行。

表3 平喘敷贴膏水提工艺验证试验

No.	黄芪 甲苷 $/g \cdot g^{-1}$	盐酸麻黄碱 和盐酸伪 麻黄碱 $/g \cdot g^{-1}$		总多糖 $/g \cdot g^{-1}$	综合 评分 $/\%$	平均值	RSD $/\%$
1	0.198	1.04	0.89	96			
2	0.212	1.06	0.90	99	0.97 ± 0.05	1.9	
3	0.203	1.09	0.90	98			

3 讨论

方中黄芪为君药,其主要活性成分黄芪甲苷的含量常采用 HPLC-ELSD 检测^[11-12],亦有报道采用近红外光谱技术^[13]。本文采用 HPLC-ELSD,能实现黄芪甲苷与有关物质的有效分离,且峰形好,含量测定结果重复性好。在确定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱色谱条件时,考察了甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水等流动相,结果显示二者未能有效分离。在供试品溶液经酸化、醇化处理后,选择流动相乙腈-0.6% 磷酸溶液(3:97)时,二者与其他色谱峰可有效分离,空白对照亦无干扰,且峰形较好。黄芪总多糖选择葡萄糖作为对照品测定其含量,由于蒽酮-浓硫酸法

的线性关系不佳,故不宜采用,本文采用的苯酚-硫酸比色法能够较好地反映黄芪多糖含量。

本文采用自治区中医院专家的临床经验方,独具特色。根据处方特性将其研制成中药复方软膏剂,使其疗显著效、质量稳定、副作用及不良反应小、外观均匀细腻、便于携带和使用。本文对平喘敷贴膏中 3 种有效成分的提取工艺进行了探讨,为完善平喘敷贴膏的质量标准研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 张银娣,王幼林,沈建平,等. 黄芪皂苷甲的抗炎和降压作用[J]. 药学报,1984,19(5):333.
- [2] 张银娣,王幼林,沈建平,等. 黄芪皂苷甲的镇痛、镇静作用[J]. 南京医学院学报,1984,4(4):225.
- [3] 郑萍,戴贵东,李汉青. 麻黄碱及伪麻黄碱药理作用研究进展[J]. 宁夏医学杂志,2002,24(2):126.
- [4] 李吉来,陈飞龙,刘传明. 麻黄汤中麻黄碱与伪麻黄碱的 GC-MS 法测定及配伍因素对汤剂中该成分含量的影响[J]. 中草药,2002,33(4):307.
- [5] 罗丽雯. 慢性阻塞性肺疾病的病因病机探讨[J]. 陕西中医学院学报,2007,30(3):13.
- [6] 钱广生,刘三康,李章万. HPLC 测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量[J]. 华西药学杂志,2002,17(1):41.
- [7] 祁海宏,郭瑾丽,项乐源,等. HPLC 法测半夏露冲剂中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 科技咨询导报,2008(16):2.
- [8] 韩鲁佳,阎巧娟,江正强,等. 黄芪多糖及皂甙的提取工艺研究[J]. 农业工程学报,2000,16(5):118.
- [9] 肖风华. 正交实验法优选五味子的提取工艺[J]. 黑龙江医药,2009,22(3):306.
- [10] 肖凯军,刘晓红. 金樱子果实的化学成分及其应用[J]. 现代食品与药品杂志,2006,16(4):1.
- [11] 刘佳煜. HPLC-ELSD 法测定宫血停颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 化工之友,2008,27(6):69.
- [12] 裴彩云,王宗权,贾继明,等. HPLC-ELSD 内标法测定 8 个产地黄芪药材、饮片中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(14):1982.
- [13] 肖杰,王晶,吴玉田,等. 近红外光谱技术在中药注射剂鉴别中的初步应用[J]. 武警医学,2005,16(7):498.

[责任编辑 刘德文]