

多指标正交试验优选麻黄附子细辛汤提取工艺

秦超, 容蓉*, 杨勇, 吕青涛, 蒋海强
(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优选麻黄附子细辛汤提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定指标成分含量, 以麻黄碱、伪麻黄碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱和干浸膏得率为检测指标, 采用 $L_9(3)^4$ 正交试验考察提取时间、提取次数和溶剂用量对提取工艺的影响。结果: 麻黄附子细辛汤最佳提取工艺为 16 倍量 pH 2.0 盐酸提取 2 次, 每次 2.5 h。结论: 多指标综合评定优化提取工艺更符合中医用药的整体观, 优化的提取工艺方法合理可行, 稳定可靠, 具可操作性和重复性。

[关键词] 麻黄附子细辛汤; 正交试验; 提取工艺; 多指标

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0035-05

Optimization of Extraction Technology for Mahuang Fuzi Xixin Decoction by Multi-index Orthogonal Test

QIN Chao, RONG Rong*, YANG Yong, LV Qing-tao, JIANG Hai-qiang

(College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Mahuang Fuzi Xixin decoction. **Method:** With ephedrine, pseudoephedrine, benzoyl aconine, benzoyl mesaconitine, benzoyl hypaconitine and yield of extract as indexes, the content of these were determined by HPLC, effect of extraction time, extraction times and the amount of solvents on extraction technology was investigated by $L_9(3)^4$ orthogonal test. **Result:** Optimum extraction conditions were: extracted 2 times with 16 times the amount of hydrochloric acid (pH 2.0) with 2.5 hours each time. **Conclusion:** It was more suitable for integral view of Chinese medicine by multi-index comprehensive evaluation method, this optimized extraction technology was reasonable, feasible, stable, reliable, operable and good reproducibility.

[Key words] Mahuang Fuzi Xixin decoction; orthogonal test; extraction technology; multi-index

麻黄附子细辛汤出自张仲景《伤寒论》, 由麻黄、附子、细辛 3 味药组成, 为温经散寒之圣剂^[1]。

[收稿日期] 20111016(001)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J10LF20)

[第一作者] 秦超, 硕士, 从事药物化学研究, Tel: 15863172040, E-mail: qinchaolo@126.com

[通讯作者] * 容蓉, 博士, 教授, 从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 0531-89628593, E-mail: r.rong@sducm.edu.cn

稳定合理的提取工艺, 为中药紫癜灵颗粒的进一步研究提供科学参考依据。

[参考文献]

- [1] 栗洪波, 荣大奇. 中医药治疗过敏性紫癜的研究进展[J]. 长春中医学院学报, 2004, 20(1): 53.
- [2] 龙艳华. 黄菊颗粒中黄芩的有效成份黄芩苷的含量测定[J]. 中国药师, 2006, 9(7): 646.
- [3] 蓝鸣生, 邓日建, 蒋莉. 高效液相色谱法测定复方百

部止咳冲剂中的黄芩苷含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 958.

- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 188.
- [5] 田吉, 何兵, 杨曦. 舒肤软膏中苦参碱的含量测定[J]. 泸州医学院学报, 2009, 32(5): 484.
- [6] 李越. 高效液相色谱法测定山豆根中苦参碱和氧化苦参碱的含量[C]. 运城: 全国中药创新与研究论坛论文集, 2009: 337.

[责任编辑 全燕]

现代药理研究发现该方具有镇痛、抗炎、调节免疫功能的作用,其主要活性成分为生物碱^[2]。麻黄的主要有效成分为麻黄碱和伪麻黄碱,其中麻黄碱对心血管系统、呼吸系统、中枢神经系统均有作用^[3];伪麻黄碱主要作为抗感冒药的成分,如伪麻黄碱水杨酸盐等^[4-5]。附子的主要有效成分为单酯型乌头碱生物碱,主要有苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱等^[6]。由于中药成分复杂,为避免单一指标进行工艺优化时产生偏差,本研究选用麻黄附子细辛汤中的麻黄碱、伪麻黄碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱和干浸膏得率为综合判断指标,采用正交试验对麻黄附子细辛汤提取工艺条件进行优选。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司), AF240 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司), 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱对照品(批号分别为 171213-200807, 0714-9903, 中国药品生物制品检定所), 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱对照品(批号分别为 RFS-B-110305, RFS-B-100713, RFS-B-110328, 成都曼思特生物科技有限公司), 麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf. 的干燥草质茎(产地内蒙古), 附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 子根的加工品(产地四川), 细辛为马兜铃科植物北细 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *Mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的干燥根及根茎(产地吉林), 以上药材均经山东中医药大学李峰教授鉴定。乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 正交试验因素与水平设计 采用 L₉(3⁴) 正交试验优选提取工艺, 以麻黄碱、伪麻黄碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱和干浸膏得率为指标, 对提取次数、提取时间、溶剂用量进行考察, 因素与水平见表 1。

表 1 麻黄附子细辛汤提取工艺因素与水平

水平	A 提取数/次	B 提取时间/h	C 溶剂用量/倍
1	1	1	10
2	2	1.5	16
3	3	2	24

2.2 提取液的制备 分别取麻黄、附子、细辛 20, 30, 10 g 药材粗粉(过 40 目筛), 按正交试验设计因

素水平表进行试验, 加入 pH 2.0 盐酸溶液回流提取, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 定容至 200 mL, 即得正交试验提取液 1~9 号。

2.3 含量测定

2.3.1 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱^[7] 色谱条件 流动相乙腈-0.2% 磷酸水(4:96), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 210 nm, 参比波长 360 nm, 进样量 10 μL。理论塔板数按盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱峰计算均不低于 3 000。

2.3.2 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱色谱条件 流动相 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~40 min, 75%~60% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 235 nm, 进样量 10 μL, 理论塔板数按苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱峰计算均不低于 3 000。

2.3.3 对照品溶液的制备

2.3.3.1 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 分别取对照品适量, 加甲醇溶解分别制成每 1 mL 含盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 1.64, 1.60 mg 对照品储备液, 分别取对照品溶液 0.25 mL, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得(盐酸麻黄碱 0.041 g·L⁻¹, 盐酸伪麻黄碱 0.040 g·L⁻¹)。

2.3.3.2 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱 取 3 种生物碱对照品适量, 加甲醇溶解分别制成每 1 mL 含苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱 1.04, 1.02, 1.00 mg 对照品储备液, 分别取对照品溶液 0.05 mL, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得(苯甲酰乌头原碱 0.005 2 g·L⁻¹, 苯甲酰新乌头碱 0.005 1 g·L⁻¹, 苯甲酰次乌头碱 0.005 0 g·L⁻¹)。

2.3.4 供试品溶液的制备

2.3.4.1 盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 取 2.2 项下提取液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 按 2.3.1 项下流动相定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液 1A~9A 号。

2.3.4.2 苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱供试品溶液 取 2.2 项下提取液各 3 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇定容至刻度, 静置过夜。滤过, 精密移取续滤液 5 mL 至蒸发皿中, 水浴浓缩至近干, 加甲醇溶解, 移置 5 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液 1B~9B 号。

2.3.5 标准曲线绘制 取 2.3.3 项下 5 种对照品

溶液 2,5,10,20,40 μL ,按 2.3.1 项下色谱条件测定,记录峰面积。以对照品量对色谱峰面积进行线性回归,结果盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的回归方程分别为 $Y=2\ 163.6C-1.823\ 1$ ($r=0.999\ 7$), $Y=2\ 103.5C-25.360$ ($r=0.999\ 9$),线性范围分别为 0.082~1.64,0.080~1.60 mg 线性关系良好。苯甲酰次乌头碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰乌头原碱的回归方程分别为 $Y=1\ 211.2C+5.996\ 1$ ($r=0.999\ 7$), $Y=964.81C+10.818$ ($r=0.999\ 7$), $Y=2\ 693.0C-14.366$ ($r=0.999\ 4$),线性范围分别为 0.010 4~0.208,0.010 2~0.204,0.010 0~0.200 μg 线性关系良好。

2.3.6 精密度的试验 取 2.3.3 项下所有对照品溶液 10 μL ,按 2.3.1 项下色谱条件测定,连续进样 5 次,测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱峰面积 RSD 分别为 0.5%,0.6%,0.3%,0.4%,0.5%。表明仪器精密度良好。

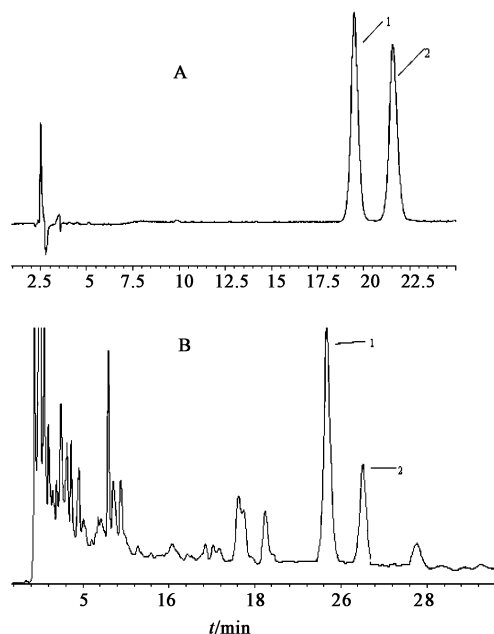
2.3.7 稳定性试验 取 2.2 项下正交试验提取液 6A 号供试品,分别于放置 0,2,4,8,12,24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱色谱峰面积,结果该 2 种成分的 RSD 分别为 0.8%,0.6%;取 2.3.4 项下 6B 号供试品同法测定峰面积,结果 3 种成分 RSD 分别为 0.5%,0.7%,0.9%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.8 重复性试验 取 2.2 项下正交试验提取液 6 号样品,按照 2.3.4 项下方法制备 6 份盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱供试品,按照 2.3.1 项下色谱条件测定峰面积计算 5 种成分含量,RSD 分别为 0.7%,0.8%,0.5%,0.8%,1.0%。表明试验重复性良好。

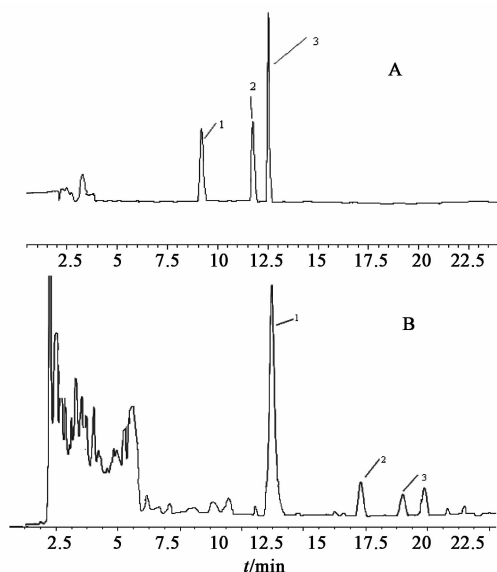
2.3.9 回收率试验 取已知含量的 2.2 项下已知含量的正交试验提取液 6 号样品,分别加入 2.3.3 项下麻黄碱对照品溶液和伪麻黄对照品储备液 65,35 μL ,按照 2.3.4 项下制备 5 份 6A 号供试品,按 2.3.1 项下色谱条件测定峰面积,计算平均加样回收率,结果盐酸麻黄碱 99.2% (RSD 1.2%);盐酸伪麻黄碱 98.5% (RSD 0.9%)。取已知含量的 5 份 2.2 项下正交试验提取液 6 号样品,分别加入 2.3.3 项下苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱对照品溶液苯甲酰次乌头碱对照品储备液 20,80,10 μL ,按照 2.3.4 项下制备 5 份 6B 号供试品,按 2.3.2 项下色谱条件测定峰面积,计算平均加样回收率,结果苯甲酰乌头

原碱 100.8% (RSD 1.5%),苯甲酰新乌头碱 99.8% (RSD 1.3%),苯甲酰次乌头碱 97.6% (RSD 1.0%)。

2.4 样品测定 按照 2.3 项下色谱条件,分别测定 2.3.4 项下供试品溶液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱的含量(图 1,2),计算正交试验提取液 1~9 号中



A. 对照品;B. 样品;1. 盐酸麻黄碱;2. 盐酸伪麻黄碱
图 1 麻黄附子细辛汤盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱 HPLC



A. 对照品;B. 样品;1. 苯甲酰新乌头碱;2. 苯甲酰次乌头碱;3. 苯甲酰乌头原碱
图 2 麻黄附子细辛汤苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱和苯甲酰次乌头碱 HPLC

各指标成分的含量,结果见表 2。

2.5 干浸膏得率的测定 分别精密量取 2.2 项下

表 2 麻黄附子细辛汤提取工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	指标成分质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					干浸膏得率 /%	综合指标
					M	W	X	Y	C		
1	1	1	1	1	309.4	163.8	47.26	5.201	4.257	26.49	-9.633
2	1	2	2	2	361.4	186.0	69.89	10.26	5.765	33.81	-2.259
3	1	3	3	3	453.8	225.6	73.56	9.596	5.735	34.71	1.569
4	2	1	2	3	434.2	219.0	62.67	13.95	6.346	30.37	2.459
5	2	2	3	1	495.2	243.8	85.11	12.72	6.570	36.31	5.762
6	2	3	1	2	422.2	214.4	54.75	14.30	6.141	30.58	-0.057
7	3	1	3	2	400.8	202.4	73.56	12.36	6.323	34.40	1.041
8	3	2	1	3	343.4	176.3	47.06	8.164	5.346	29.63	-5.995
9	3	3	2	1	452.8	231.4	86.03	16.42	8.603	38.73	8.101
K_1	-10.320	-6.133	-15.68	4.230							
K_2	8.164	-2.492	8.301	-1.275							
K_3	3.147	9.613	8.371	-1.967							
R	18.49	15.75	24.06	6.20							

注: M. 盐酸麻黄碱; W. 盐酸伪麻黄碱; X. 苯甲酰新乌头碱; Y. 苯甲酰次乌头碱; C. 苯甲酰乌头原碱(表 4 同)。

表 3 正交试验综合指标方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	60.993	2	30.466	7.927	0.112
B	45.305	2	22.652	5.894	0.145
C	128.227	2	64.114	16.681	0.057
D(误差)	7.687	2	3.844		

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

1~9 号正交试验提取液 20 mL, 平行 3 份, 置干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴蒸干后于 105 °C 干燥 3 h, 干燥器中冷却 30 min, 迅速称定质量, 结果见表 2。

2.6 正交试验考察指标数据的标准化处理 将正交试验中的 6 个指标, 按下列公式进行标准化处理。

$X'_{i,j} = \frac{X_{i,j} - \bar{X}_j}{S_j}$, 式中 $X_{i,j}$ 为 i 试验号中指标 j 的测量值, \bar{X}_j 为不同试验号中指标 j 的测量平均值, S_j 为不同试验号中指标 j 的标准偏差(即 $S_j = \sqrt{\frac{\sum (X_{i,j} - \bar{X}_j)^2}{n-1}}$), $X'_{i,j}$ 为标准化处理后的值。设

表 4 麻黄附子细辛汤提取时间单因素试验考察

提取时间/h	指标成分质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					干浸膏得率 /%	综合指标值
	M	W	X	Y	C		
1.5	414.8	224	63.13	14.03	6.105	27.92	-4.532
2.0	437.6	219.4	62.34	14.26	6.412	31.08	-0.926
2.5	440.8	210.8	71.97	15.80	6.996	30.37	2.165
3.0	461.0	202.8	72.67	15.88	7.359	30.43	3.278

2.8 验证试验 为确定该工艺的优劣和稳定性, 按照最佳提取条件进行 3 次重复试验, 结果提取液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、苯甲酰新乌头碱、苯

定各指标的权重系数均为 1, 将 $X'_{i,j}$ 相加, 得综合指标, 结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

由表 2 结果可知, 3 个因素对结果均无显著影响, 影响因素主次为 $C > B > A$, 最佳组合为 $A_2B_3C_2$, 由于综合指标值随着提取时间的增加而升高, 为优选最佳提取条件, 对提取时间做进一步单因素考察, 即考察 16 倍溶媒(C_2)、提取 2 次(A_2), 提取时间对提取率的影响。

2.7 提取时间的单因素考察 取药材粗粉(过 40 目筛)麻黄 20 g、附子 30 g、细辛 10 g, 加入 16 倍量 pH 2.0 盐酸回流提取 2 次, 每次分别提取 1.5, 2, 2.5, 3 h, 滤过, 合并 2 次提取液, 浓缩, 定容至 200 mL, 按照正交试验中指标测定方法测定各个指标, 并且将指标进行标准化处理, 结果见表 4。通过对不同提取时间考察, 综合成本、时间考虑各种因素, 最终选取 2.5 h 为最佳提取时间。

甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头碱质量浓度分别为 435.70, 206.50, 69.73, 14.56, 6.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; RSD 分别为 1.6%, 1.9%, 2.1%, 1.5%, 2.4%; 干浸膏得

率 30.32%, RSD 1.7%。试验结果表明优化的提取工艺方法合理可行,稳定可靠,具可操作性和重现性。

3 讨论

2010年版《中国药典》中“附子”的质量标准^[8]以双酯型生物碱为限量检测成分,单酯型生物碱为含量测定的指标成分;本实验选用与双酯型生物碱药理作用相近、但毒性显著降低的3种单酯型乌头碱^[6]作为优化指标,对于提取工艺的质量控制具有重要意义。对麻黄等药材的提取工艺中,往往只局限于以麻黄碱含量为指标进行工艺的优选^[9],具有一定的局限性;本实验增加了伪麻黄碱的含量测定。综上,本实验在麻黄附子细辛汤提取工艺优化过程中,进行多指标综合评定,优化提取工艺,较之以往可以更全面反映提取物有效成分的信息,更符合中医用药的整体观。

试验数据分析是将各指标数据标准化后加权加和作为综合指标,消除由于不同指标量纲不同、含量差异较大对结果造成的影响。加权加和可以根据不同指标在复方中的作用不同给予不同的权重,更符合中医复方用药的特色。各个指标在复方中的作用相同,因此将各指标的加权系数定为1,将标准化后的各数据求和即得综合评价值,根据综合指标值对正交试验结果进行分析。

2010年版《中国药典》中“附子”项下“含量测定项”^[8]规定以高效液相色谱法测定苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰次乌头碱3种成分的含量,流动相体系为乙腈-四氢呋喃(25:15)为A,0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液为B,进行梯度洗脱。由于四氢呋喃储存过程中易产生具有紫外吸收的过氧化物,使得流动相的本底吸收较高,影响测定。本实验对

色谱条件进行优化,将流动相调整为乙腈-0.1 mol·L⁻¹醋酸铵溶液体系,梯度洗脱,梯度变化时间调整为40 min,待测成分与干扰组分之间分离度良好。经方法学考察,测定结果精密度、稳定性、重复性及准确度良好,较之于2010年版《中国药典》方法,分析时间缩短,同时避免了试剂质量的影响,可作为3种单酯型生物碱的测定方法。

[参考文献]

- [1] 李志刚,王睿非,罗艳玲. 麻黄附子细辛汤及其临床应用[J]. 河南中医, 2009, 29(3): 239.
- [2] 王艳宏,包蕾,刘振强,等. 麻黄细辛附子汤药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 20(1): 216.
- [3] 任晓玲,张建春. 麻黄碱的生物活性及测定方法研究进展[J]. 临床军医杂志, 2010, 38(4): 666.
- [4] 吴桂荣,王晓文. 伪麻黄碱水杨酸盐的药用研究(1)-镇痛、抗炎及对胃粘膜的刺激考察[J]. 药学进展, 2000, 24(2): 107.
- [5] 吴桂荣,王晓文. 伪麻黄碱水杨酸盐的药用研究(2)-解热、对心率和血压及组胺所致刺激反应的影响[J]. 药学进展, 2000, 24(4): 238.
- [6] 刘文龙,刘志强,宋凤瑞,等. 乌头类双酯型生物碱组分转化为单酯水解型及脂型生物碱组分的研究[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(3): 717.
- [7] 葛斌,罗燕梅,许爱霞. HPLC测定麻黄药材中麻黄碱与盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 371.
- [8] 中国药典. 一部[S]. 2010:178.
- [9] 吴晓云. 正交试验法优选麻黄的提取工艺研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 747.

[责任编辑 全燕]