

正交设计法优选小青龙贴膏提取工艺的研究

潘 玲^{*}, 台小华, 韩建伟

(湖北中医学院中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的: 优选小青龙贴膏的乙醇渗漉提取工艺条件。方法: 以盐酸麻黄碱和芍药苷提取量为考察指标, 用高效液相色谱法测定其含量, 采用正交试验设计对提取条件优选。结果: 优选工艺为: 以 55% 乙醇浸泡时间 12 h 后渗漉, 溶剂用量 10 倍, 渗漉速度 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结论: 优选工艺所得盐酸麻黄碱和芍药苷含量较高, 工艺稳定可行。

[关键词] 正交设计; 提取工艺; 盐酸麻黄碱; 芍药苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0020-03

Study on Optimizing the Technological Condition of Ethanol Percolating Extraction for Xiaoqinglong Patch by Orthogonal Design Method

PAN Ling^{*}, TAI Xiao-hua, HAN Jian-wei

(Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription
Hubei College of TCM, Ministry of Education, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the technological condition of Ethanol percolating for Xiaoqinglong Patch. **Method:** The content of Ephedrinehydrochloride and Paeoniflorin extracted, which were regarded as chemical markers, were assayed by HPLC. Furthermore basis of initial research, the general content data determined were used to optimize the percolating extraction processing conditions by orthogonal Sampling design. **Result:** The optimum extraction condition was that the medicinal materials was soaked with 55% alcohol for 12h, then was percolated with 10 times amount of 55% alcohol and the percolating speed was $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion:** The content of Ephedrinehydrochloride and Paeoniflorin extracted by the the extraction process, were highest, and the optimiazed process is stable and efficient.

[Key words] orthogonal design; percolating extraction; ephedrinehydrochloride; paeoniflorin; HPLC

小青龙贴膏是由《伤寒论》中小青龙汤经剂型改革而研制的外敷穴位治疗急慢性支气管炎的贴膏制剂, 在工艺研究中, 将桂枝、干姜等含挥发性成分的药材提取挥发油, 将麻黄、白芍、半夏、五味子等药材用乙醇渗漉提取。为了优选提取工艺, 我们以君药麻黄中有效成分盐酸麻黄碱和佐药白芍中有效成分芍药苷的提取量为考察指标, 用高效液相色谱法测定其含量, 以乙醇浓度、渗漉速度、浸泡时间、乙醇用量为影响因素, 进行了 $L_9(3^4)$ 正交实验, 试验方法与结果报道如下。

1 仪器与试药

Agilent1100 系列高效液相色谱仪(美国); 盐酸麻黄碱与芍药苷对照品(批号分别为 1241-200102, 110736-200731, 中国药品生物制品检定所); 药材(湖北省药材公司); 试剂均为分析纯; 水为重蒸馏水。

2 试验与结果

2.1 正交试验设计 在预试验基础上设计正交试验因素水平, 见表 1。

按处方比例称取药材 30 g(12 目), 共 9 份, 按表 1 方案提取(200 mL 渗漉缸), 浓缩并减压干燥成干浸膏, 计算得膏率, 分别测定其盐酸麻黄碱和芍药苷的含量。

[收稿日期] 2008-02-02

[通讯作者] * 潘玲, Tel: 13986138126

表 1 正交因素水平设计表

水平	因素			
	乙醇浓度	渗漉速度	浸泡时间	乙醇用量
	(%)	(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	(h)	(倍)
	(A)	(B)	(C)	(D)
1	55	10	12	10
2	70	20	24	20
3	85	30	36	30

2.2 盐酸麻黄碱含量测定^[1,2]

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇: 0.1% 磷酸(10: 90); 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 波长: 207 nm, 柱温: 30 °C。

2.2.2 溶液制备 对照品 称取盐酸麻黄碱对照品 5.05 mg, 用甲醇溶解于 25 mL 量瓶中, 精密量取 1 mL, 用流动相稀释于 5 mL 量瓶中, 即得(每 mL 含盐酸麻黄碱 40.4 μg)。

供试品 称取 9 份干浸膏各约 0.5 g, 置锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 160 W, 频率 50 KHz) 45 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足缺失的重量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 1 mL, 置中性氧化铝柱(100~ 200 目, 1.5 g, 内径 1 cm) 上, 用 50% 甲醇洗脱, 收集洗脱液约 9 mL 于 10 mL 量瓶中, 加磷酸 1 滴, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

空白对照品 称取缺麻黄的其余药材用 70% 乙醇浸泡 36 h, 20 倍量溶剂渗漉提取, 速度 20 mL·min⁻¹·kg⁻¹, 渗漉液浓缩并减压干燥, 按供试品制法制备, 即得。

麻黄药材对照品 称取麻黄, 同空白对照品同法处理, 即得。

2.2.3 方法专属性 吸取对照品溶液 4 μL、2 号供试品、空白对照溶液、麻黄药材各 10 μL 进样, 检测, 盐酸麻黄碱、供试品在 12 min 左右出现盐酸麻黄碱吸收峰, 空白对照品无干扰。

2.2.4 线性关系考察 吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 进样检测, 以峰面积与进样量绘制回归方程: $Y = 2.2 \times 10^3 X - 15.635$, $r = 0.9999$ 。盐酸麻黄碱在(0.0404~ 0.404) μg 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 吸取对照品溶液 4 μL, 连续进样 6 次, RSD= 1.16%。吸取 2 号供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, RSD= 1.26%。

2.2.6 稳定性试验 吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 32 h 进样, RSD= 1.35%, 表明

供试品在 32 h 内基本稳定。

2.2.7 含量测定 吸取(1~ 9)号供试品各 10 μL 进样, 测定, 计算。

2.3 芍药苷的含量测定^[1]

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SBC₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈: 水(12: 88), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 波长: 230 nm, 柱温: 35 °C。

2.3.2 溶液制备 对照品 称取芍药苷对照品 4.02 mg, 用甲醇溶解于 20 mL 量瓶中, 精密量取 2.5 mL, 甲醇稀释于 5 mL 量瓶中, 即得(每 mL 含芍药苷 100.5 μg)。

供试品 称取 9 份干浸膏各约 0.1 g, 置 25 mL 量瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 甲醇稀释至刻度, 滤过, 取续滤液 10 mL, 即得。

空白对照品 称取除去白芍的其余药材用 70% 乙醇浸泡 36 h, 用 20 倍量溶剂渗漉提取, 速度 20 mL·min⁻¹·kg⁻¹, 渗漉液浓缩并减压干燥, 按供试品制法制备。

白芍药材对照品 称取白芍, 同空白对照品同法处理, 即得。

2.3.3 方法专属性 吸取对照品溶液 6 μL、2 号供试品、空白对照溶液、白芍药材对照溶液各 10 μL 进样, 检测, 芍药苷、供试品在 18 min 左右出现芍药苷吸收峰, 空白对照品中无干扰。

2.3.4 线性关系考察 吸取对照品 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL, 进样检测, 以峰面积与进样量绘制回归方程: $Y = 1.2 \times 10^3 X - 3.702$, $r = 0.9998$ 。芍药苷在(0.1005~ 1.005) μg 范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度试验 吸取对照品溶液 6 μL, 连续进样 6 次, RSD= 1.82%。吸取 2 号供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, RSD= 1.85%。

2.3.6 稳定性试验 吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 进样, RSD= 1.16%, 供试品在 24 h 内基本稳定。

2.3.7 供试品测定 吸取(1~ 9)号供试品各 10 μL 进样, 测定, 计算。

2.4 正交试验结果 见表 2 3 4 5。从表 2 的直观分析, 4 个因素对得膏率、盐酸麻黄碱和芍药苷提取量的影响次序不同, 得膏率为 A > D > C > B, 盐酸麻黄碱为 C > B > A > D, 芍药苷为 A > B > C > D。表 3 4 5 者的方差分析表明: 渗漉速度及浸泡时间对盐酸麻黄碱和芍药苷的提取量均有显著性影响, 但在

表 2 乙醇提取工艺正交试验结果

试验号	乙醇浓度 (A)	渗漉速度 (B)	浸泡时间 (C)	乙醇用量 (D)	得膏率 (%) (a)	盐酸麻黄碱* (g × 10 ⁻²) (b)	芍药苷* (g × 10 ⁻²) (c)
1	1	1	1	1	20.868 3	5.034 6	7.925 6
2	1	2	2	2	21.186 3	4.191 4	8.466 5
3	1	3	3	3	21.292 3	4.587 1	8.395 0
4	2	1	2	3	20.457 3	4.428 3	7.907 6
5	2	2	3	1	18.703 7	4.310 7	8.008 1
6	2	3	1	2	20.540 0	5.063 6	8.439 5
7	3	1	3	2	17.646 0	4.384 1	6.614 7
8	3	2	1	3	19.556 3	4.771 2	7.318 6
9	3	3	2	1	16.738 3	4.382 2	7.539 7
<i>aK</i> ₁	21.116	19.657	20.322	18.770			
<i>aK</i> ₂	19.900	19.815	19.461	19.791			
<i>aK</i> ₃	17.980	19.524	19.214	20.435			
<i>R</i>	3.136	0.291	1.108	1.665			
<i>bK</i> ₂	4.604	4.616	4.956	4.576			
<i>bK</i> ₂	4.601	4.424	4.334	4.546			
<i>bK</i> ₂	4.513	4.678	4.427	4.596			
<i>R</i>	0.091	0.254	0.622	0.050			
<i>cK</i> ₃	8.262	7.483	7.895	7.824			
<i>cK</i> ₃	8.118	7.931	7.971	7.840			
<i>cK</i> ₃	7.158	8.125	7.673	7.874			
<i>R</i>	1.104	0.642	0.298	0.050			

* 盐酸麻黄碱、芍药苷的含量均为所投药材总量中的含量。

表 3 得膏率方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	14.995	2	117.148	< 0.01
B	0.128	2	1.000	误差
C	2.029	2	15.852	> 0.05
D	4.230	2	33.047	< 0.05

表 4 盐酸麻黄碱提取量方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	0.016	2	4.000	> 0.05
B	0.105	2	26.250	< 0.05
C	0.676	2	169.000	< 0.01
D	0.004	2	1.000	误差

表 5 芍药苷提取量方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	2.164	2	541.000	< 0.005
B	0.651	2	162.750	< 0.01
C	0.144	2	36.000	< 0.05
D	0.004	2	1.000	误差

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$, $F_{0.01}(2, 2) = 99$, $F_{0.005}(2, 2) = 199$

浸泡时间这一项, 盐酸麻黄碱最好的是 12 h, 而芍药苷为 24 h, 乙醇浓度对得膏率和芍药苷提取量均有显著性影响, 而乙醇用量只对得膏率有显著性影响。

出于麻黄为方中君药及节省时间、减少浸膏得率考虑, 选择优选工艺为 A₁B₃C₁D₁, 即: 55% 乙醇浸泡时间 12 h、渗漉速度 30 mL·min⁻¹·kg⁻¹、乙醇用量 10 倍。

2.5 优选提取工艺验证试验及与乙醇回流提取工艺比较 称取药材 30 g (12 目), 共 3 份, 按优选工艺提取, 结果 3 份药材所测得膏率分别为 21.197 7%、20.873 0%、20.849 0%, 盐酸麻黄碱提取量分别为 4.9 × 10⁻² g、4.8 × 10⁻² g、4.9 × 10⁻² g, 芍药苷提取量分别为 8.4 × 10⁻² g、8.4 × 10⁻² g、8.4 × 10⁻² g。另取药材 30 g (12 目), 3 份, 用乙醇回流提取(8 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 时间为 2 h, 1 h, 1 h), 测定, 计算结果 3 份药材所测得膏率均值为 20.58%, 盐酸麻黄碱提取量均值为 4.837 4 × 10⁻² g, 芍药苷提取量均值为 7.970 6 × 10⁻² g。

3 讨论

渗漉提取与回流提取相比, 得膏率与盐酸麻黄碱提取率基本一致, 前者芍药苷提取量略优于后者; 另渗漉法提取不用加热, 可避免药材中不宜受热的成分分解, 节省能源, 因此选用渗漉提取更为合适。

测定所用药材麻黄中盐酸麻黄碱含量为 1.04%, 白芍中芍药苷含量为 1.67%, 符合《中国药典》2005 年版一部中麻黄及白芍药材中按干品计算, 含盐酸麻黄碱不得少于 1.0% 的规定^[1], 含芍药苷不得少于 1.6%^[1]。经计算, 优选提取工艺所得盐酸麻黄碱的平均转移率达 78.5%, 芍药苷的平均转移率达 84.1%。

试验参考《中国药典》麻黄及小青龙颗粒项下制备供试品溶液^[1], 纯化效果好。

测定盐酸麻黄碱含量中, 参考文献[2], 适当调整流动相甲醇: 0.1% 磷酸比例为(10: 90), 分离效果好, 并明显缩短出峰时间。测定芍药苷含量中, 试验了甲醇: 0.1% 磷酸溶液、乙腈: 0.1% 磷酸溶液、乙腈: 水等多种流动相和比例, 比较了 Agilent TC-C₁₈ 柱和 ZORBAX SBC₁₈ 柱。发现用 ZORBAX SBC₁₈ 柱, 乙腈: 水(12: 88)洗脱, 效果理想。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部, 北京: 化学工业出版社, 2005: 69, 224, 354, 555.
- [2] 乔明, 韩建伟, 付敏, 等. RP-HPLC 法测定消炎止咳贴中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11): 56-57.