

热痹康胶囊的提取工艺研究

江丽芬 方建康 庞学丰

(广西中医药大学附属瑞康医院药学部, 广西 南宁 530011)

摘要:目的 探讨热痹康胶囊的水提取工艺条件。方法 用薄层色谱法对方中防风、黄柏、桂枝和桑枝进行定性鉴别,以干膏量和龙胆苦苷含量为指标,采用高效液相色谱法测定含量,运用正交试验法对水提的工艺条件进行优化。结果 水提取最佳工艺为:第一次补足吸水量后加 10 倍量水浸泡 0.5 h,其余每次加 10 倍量水,提取 3 次,每次提取 1 h。结论 优选的工艺稳定、可行。

关键词:热痹康胶囊;提取工艺;水煎煮法;正交试验;痹证

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.01.045

文章编号:1672-2779(2019)-01-0114-03

Study on the Extraction Technology of Rebikang Capsule

JIANG Lifang, FANG Jiankang, PANG Xuefeng

(Department of Pharmacy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Guangxi Province, Nanning 530011, China)

Abstract: Objective To optimize the water extraction conditions of Rebikang capsule. **Methods** An extraction procedure was optimized by orthogonal test. The content of rutin which was used as the assessment index was determined by HPLC. **Results** The optimal water extraction process was as follows: using crude drugs in processed pieces with 10 times water, soak for 2 h, extraction 3 times and each time lasts 1 h. **Conclusion** The optimal process is stable and feasible.

Keywords: Rebikang capsule; Extraction Technology; water decocting method; HPLC; arthromyodynia

热痹康汤是庞学丰主任医师研究且运用了十几年的经验方,由秦艽、防风、桂枝、威灵仙、制川乌、地龙、桑枝、葛根、忍冬藤、黄柏、苍术等组成,对类风湿关节炎的治疗或辅助治疗有很好的疗效。在现代类风湿关节炎的治疗上,中医药展现了强力有效的一面,也为类风湿关节炎的治疗描绘了美好的前景^[1]。故本文以龙胆苦苷含量为评价指标,采用正交试验法考察水提影响因素,优化出水提工艺条件,为研究热痹康胶囊治疗类风湿性关节炎的物质基础、探讨其作用机制及其临床应用与开发奠定基础。

1 资料与方法

1.1 材料与仪器 ACS-JZ 高密度计数计重天平(深圳信诺普衡器);AL204 分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);HH-S8 电热恒温水浴箱(北京科伟永兴仪器有限公司);WFH-205B 可见透射紫外反射仪(上海精科实业有限公司);CQ-250 超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);DLSB-5L/10 低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司);SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);LC-20AT 岛津高效液相色谱仪(岛津国际贸易上海有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 防风的定性鉴别 取本品粉末 5 g,加甲醇 30 mL,超声处理 20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 10 mL 使溶解,取滤液浓缩至 1 mL 作为供试品溶液。另取防风对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取阴性粉末 5 g,同法制成阴性溶液。

吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层

板上,以三氯甲烷:甲醇(4:1)为展开剂展开,取出,晾干,置紫外光灯 254 nm 下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。阴性对照试验无干扰。

1.2.2 桂枝的定性鉴别 取本品内容物 5 g,加乙醚 20 mL,振摇 15 min,放置 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣加丙酮 1 mL 溶解,作为供试品。取桂枝药材 1 g,同法制成对照药材。另取缺桂枝的阴性样品,同法制成阴性对照品。吸取供试液、对照药材及阴性对照液各 6 μ L、3 μ L、3 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚 30~60 $^{\circ}$ C-乙酸乙酯(17:3)为展开剂,展开取出,晾干。喷以 2,4-二硝基苯肼甲醇溶液,日光下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色(橙色)的斑点,阴性对照液无此斑点。

1.2.3 黄柏的定性鉴别 取供试样品粉末 1 g 加甲醇 10 mL,超声 20 min,放置,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使溶解,作为供试品黄柏药材 0.1 g,同法制成对照药材。另取缺黄柏的阴性样品 1 g,同法制成阴性对照品。取供试品溶液 10 μ L、药材对照品 5 μ L、阴性对照液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-水(6:3:2:1.5:0.3)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱中,在与药材对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,而阴性对照液与其相应位置无显色斑点。

1.2.4 桑枝的定性鉴别 取本品 2 g,精密称定,加甲醇 20 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲

醇 1 mL, 作为供试品溶液。取桑枝对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。另取缺桑枝的样品 1 g, 同法制成阴性对照。分别吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-乙酸乙酯-甲酸 (5:2:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯 (365 nm) 下观察。供试品溶液色谱中, 在与对照药材溶液色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点。

1.2.5 秦艽的含量测定 (1) 色谱条件: 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 流动相: 乙腈:0.1% 冰醋酸 (8:92); 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 254 nm, 理论板数按龙胆苦苷峰计算应不少于 3000。

(2) 对照品溶液的制备: 精密称取龙胆苦苷对照品适量, 加乙醇制成 1 mL 含 10 μ g 的溶液, 即得。精密吸取 5 μ L, 进样, 测定, 结果见图 1。

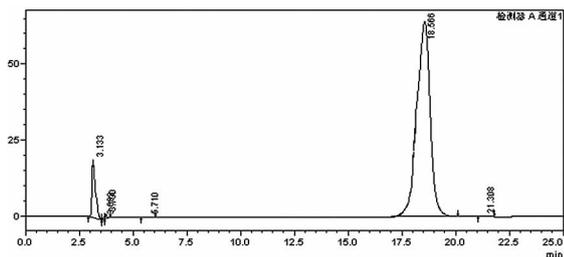


图1 对照品图谱

(3) 供试品溶液的制备: 取本品约 1 g, 研细, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 20 mL, 密塞, 超声处理 30 min, 放冷, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。精密吸取 5 μ L, 进样, 测定, 结果见图 2。

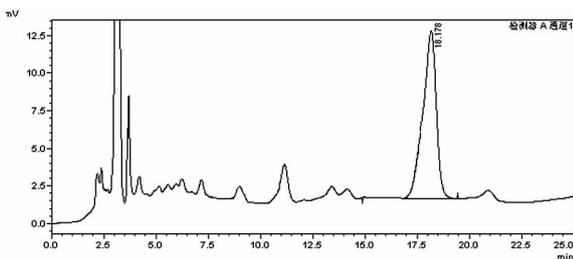


图2 供试品图谱

(4) 阴性干扰试验: 按照处方中药味的比例, 配制不含葛根的群药, 按其工艺制成阴性制剂, 再按照上述供试品溶液的制备方法制成阴性液, 精密吸取 5 μ L, 进样, 测定, 见图3。结果阴性液在龙胆苦苷对照品相同的保留时间处未显色谱峰, 表明无干扰, 方法专属性良好。

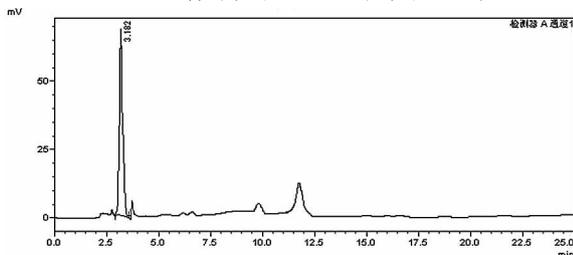


图3 阴性液图谱

(5) 线性关系考察: 精密吸取龙胆苦苷 10、20、30、40、50、60 μ g/mL 的对照品溶液 20 μ L 分别注入液相色谱仪, 测定龙胆苦苷色谱峰面积依次为 320778、500334、673179、867796、1058561、1246075, 以龙胆苦苷进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程: $y=185590x+128209$, 结果表明龙胆苦苷在 0.2075~1.2047 μ g 具有良好的线性关系, 见图4。

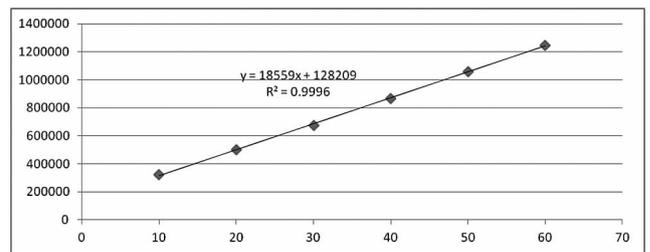


图4 龙胆苦苷色谱峰面积与进样量线性关系图

(6) 稳定性试验: 取同一批样品, 制备供试品溶液, 在室温下放置 0、1、2、4、8、12 h 后分别进样, 测定峰面积, 结果峰面积平均值为 653079, RSD 为 1.0%, 表明待测组分浓度在 12 h 内无明显变化, 化学性质稳定。

(7) 精密度试验: 取同一浓度对照品溶液, 按照上述色谱条件, 分别精密吸取 5 μ L, 连续进样 6 次, 测定峰面积。结果峰面积平均值为 958834, RSD 为 0.03% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

(8) 重复性试验: 取同一浓度供试品溶液, 依法平行制备 5 份供试品溶液并测定其含量, 结果求得龙胆苦苷平均含量为 0.786 mg/g, RSD 为 0.9% ($n=5$)。

(9) 回收率试验: 取已知龙胆苦苷含量的样品 6 份, 研细, 取约 1 g, 精密称定, 分别精密加入葛根素对照品约 0.8 mg, 照供试品溶液的制备方法制备溶液并依法测定峰面积, 计算回收率。结果见表1。

表1 回收率试验 ($n=6$)

样品含量 (mg)	对照品加入量 (mg)	测得总含量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.8775	1.0237	1.8703	96.89		
0.9803	1.0237	1.9613	95.82		
0.8932	1.0237	1.8659	95.01	96.03	0.74
0.8705	1.0237	1.8533	96.00		
0.8991	1.0237	1.8865	96.45		

结果表明, 本方法回收率较好。

(10) 样品含量测定: 分别取九份样品 1 g, 依法制备成相同的浓度并测定其龙胆苦苷的含量, 结果见表2。

表2 9份样品含量测定

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
含量(μ g)	0.3	0.38	0.63	0.35	0.44	0.84	0.40	0.98	0.59

1.3 正交试验——工艺条件优选 (1) 因素水平: 根据传统的中药制剂的常规方法及生产的实际经验, 选用水

煎煮提取工艺的主要因素即加水量,第一次煎煮前浸泡时间,煎煮时间(h),煎煮次数,每个因素各选三个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验安排试验因素水平^[3],见表1。

表1 因素水平表

因素	A	B	C	D
水平	加水量(倍)	煎前浸泡时间(min)	煎煮时间(h)	煎煮次数(次)
1	8	0	1.0	1
2	10	30	2.0	2
3	12	60	3.0	3

(2) 试验方法:按处方比例称取秦艽、防风、桂枝、威灵仙、制川乌、地龙、桑枝、葛根、忍冬藤等各种药材共9份,每份160g,分别按 $L_9(3^4)$ 正交试验安排9次试验,合并煎煮液,精滤,浓缩,置已干燥恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,残渣在105℃干燥4h,放置干燥器内冷却30分钟,迅速称定重量,干膏固体总量分别为14.32、21.97、33.21、33.77、17.67、30.52、24.79、32.17、18.07g。

表2 正交试验表

试验号	A	B	C	D	试验结果
1	1	1	1	1	14.62
2	1	2	2	2	22.35
3	1	3	3	3	33.84
4	2	1	2	3	34.12
5	2	2	3	1	18.11
6	2	3	1	2	31.36
7	3	1	3	2	25.19
8	3	2	1	3	33.15
9	3	3	2	1	18.66
K_1	23.60	24.64	26.38	17.13	
K_2	27.86	24.54	25.04	26.30	
K_3	25.67	27.95	25.71	33.70	
R	4.26	3.42	1.33	16.57	

结果: $D > A > B > C$, 最佳工艺: $A_2 B_3 C_1 D_3$
从上表的实验数据进行方差分析结果见表3。

表3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	F值	P值	显著性
A	27.23	2	10.21	0.089	
B	22.64	2	8.49	0.105	
C	2.67	2	1.00	0.500	
D	413.57	2	155.09	0.006	**
误差	2.67	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$, $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

(3) 正交试验优选结果:通过正交试验直观分析和方差分析结果表明:ABCD各因素对本品提取物总固体总量都有不同程度的影响。从分析结果表明煎煮次数D对本品影响最大,其次是加水量A,煎前浸泡时间B因素和煎煮时间,影响顺序为 $D > A > B > C$, $A_2 B_3 C_1 D_3$ 为最佳

工艺,即加10倍量水,第一次先浸泡60min,煎煮提取3次,每次1h。

(4) 验证试验:按优选的最佳提取工艺制备3批样品,测定样品的总固体量和龙胆苦苷含量,实验结果如下表4。

表4 水提取工艺验证结果

方案	实验量	总固体量	RSD(%)	龙胆苦苷含量	RSD(%)
$A_2 B_2 C_2 D_3$	1	30.49	0.01	0.8329	0.04
	2	30.44		0.8217	
	3	31.04		0.8874	
	均值	30.66		0.8473	

验证结果表明,按水提取工艺 $A_2 B_2 C_2 D_3$ 所提取的总固体量接近正交试验的最大值(33.77),表明此工艺稳定合理可行。

2 结果

采用正交设计,确定了水提取工艺的最佳条件,即称取提取的药材,加入药材量10倍体积的水,加热煎煮提取3次,每次2h,其中第一次提取前先将药材浸泡30min。验证试验结果表明此提取工艺稳定合理可行,可进行规格生产。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
 - [2] 宋小妹. 中药化学成分提取分离与制备[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:31-36.
 - [3] 刘定远. 医药数理统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:170-180.
- (本文编辑:李海燕 本文校对:梁国成 收稿日期:2018-08-24)

防葵(处方用名前胡) 药材(饮片)鉴别要点

药材鉴别 白花前胡呈不规则的圆柱形、圆锥形或纺锤形,稍扭曲,下部常有分枝,长3~15cm,直径1~2cm。表面黑褐色或灰黄色,根头部多有茎痕及纤维状叶鞘残基,上端有密集的细环纹,形如“蚯蚓头”,下部有纵沟、纵皱纹及横向皮孔。质较柔软,干者质硬,易折断,断面不整齐,淡黄白色,皮部散有多数棕黄色油点,形成层环纹棕色,射线放射状。气芳香,味微苦、辛。

饮片鉴别 前胡呈类圆形或不规则形薄片。外表皮黑褐色至灰黄色,有时可见残留的纤维状叶鞘残基。饮片切面黄白色至淡黄色,皮部散有多数棕黄色油点,可见一棕色环纹及放射状纹理。气芳香,味微苦、辛。

——摘自祝之友教授《神农本草经药物解读——从形味性效到临床(3)》,人民卫生出版社,2018.