

清补通络浓缩丸提取工艺优化研究*

王 林¹, 王婷媛¹, 邱远金^{1△}, 林芳花², 周卫刚³, 刘纪杉³, 李江涛³, 朱国强¹, 高 辉³

(1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 惠州学院生命科学院, 广东 惠州 516007; 3. 新疆维吾尔自治区第六人民医院, 新疆 乌鲁木齐 830013)

摘要:目的 优选清补通络浓缩丸提取工艺。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芩苷含量,以黄芩苷含量及出膏率为考察指标,正交试验优选最佳提取工艺。结果 最佳提取工艺为料液比1:10,提取2次,每次1h;在此条件下,黄芩苷含量为4.49 mg/g,出膏率为4.84%。结论 优选的清补通络浓缩丸提取工艺合理、稳定、效果良好,可为清补通络浓缩丸及其他中药新药的生产提供试验依据。

关键词:清补通络浓缩丸;黄芩苷;高效液相色谱法;提取工艺;优化

中图分类号:TQ460.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)04-0010-03

Study on Extraction Process of Qingbutongluo Concentrated Pills

Wang Lin¹, Wang Tingyuan¹, Qiu Yuanjin¹, Lin Fanghua², Zhou Weigang³, Liu Jishan³, Li Jiangtao³, Zhu Guoqiang¹, Gao Hui³

(1. Xinjiang Institutes of Traditional Chinese Medicine and Ethical Materia Medica, Urumqi, Xinjiang, China 830002; 2. School of Life Science, Huizhou University, Huizhou, Guangdong, China 516007; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Sixth People's Hospital, Urumqi, Xinjiang, China 830013)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of Qingbutongluo Concentrated Pills. **Methods** The content of baicalin was determined by HPLC, and the optimum extraction process was optimized by orthogonal test with the content of baicalin and the yield of extraction as the indexes. **Results** The optimum extraction process was as follows: the ratio of material to liquid was 1:10 with 2 times of extraction, 1 h each time. Under this condition, the content of baicalin was 4.49 mg/g, and the yield of extraction was 4.84%.

Conclusion The optimized extraction process is reasonable, stable and effective, which can provide the experimental basis for the production of Qingbutongluo Concentrated Pills and other new medicines of traditional Chinese medicine.

Key words: Qingbutongluo Concentrated Pills; baicalin; HPLC; extraction process; optimization

清补通络浓缩丸是新疆维吾尔自治区第六人民医院的纯中药制剂,由黄芩、党参、丹参、赤芍、柴胡、黄芪、枳壳、防己、当归、独活、川芎、川牛膝、元胡、地龙、甘草等中药组方,具有补气扶正、活血化瘀、清热祛湿、通络止痛的功效,主要用于治疗布鲁氏杆菌病,症见乏力、神疲倦怠、发热、关节肿胀疼痛、肌肉酸痛等。该药起初为水丸,后为方便患者携带和服用,以及减少服用剂量,改为浓缩丸。本研究中将清补通络丸中除丹参、赤芍、枳壳、元胡外的其他11味药进行提取,纳入每次提取时间、提取次数、料液比等多个因素,设计正交试验,并以浸膏得率和浸膏中的黄芩苷含量为考察指标,探讨清补通络浓缩丸最佳提取工艺,为其制剂试生产和质量控制标准的研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:LC20-10A型高效液相色谱仪(日本岛津公司);KQ5200DA型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-3000型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);FA2204型电子秤(常州市幸运电子设备有限公司);WS70-1型红外干燥箱(巩义市英峪予仪器厂);优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司);AS265-

S型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);AP-01P型真空泵(天津欧特塞恩斯仪器有限公司)。

试药:蒸馏水;色谱甲醇(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司);乙醇(天津市致远化学试剂有限公司,分析纯);甲醇(分析纯)、磷酸均购自天津市百世化工有限公司;黄芩苷对照品(批号为110715-201318,中国食品药品检定研究院);当归(批号为16030401-3)、黄芪(批号为15082801-8)、党参(批号为16033302-5)、丹参(批号为16070101-1)、赤芍(批号为15082901-5)、柴胡(批号为16032501-2)、黄芩(批号为15121502-2)、防己(批号为16010501-3)、独活(批号为16042702-1)、川芎(批号为16051001-4)、枳壳(批号为15111201-5)、川牛膝(批号为16011101-5)、元胡(批号为15061402-4)、地龙(批号为15121105)、甘草(批号为16021701-4)中药材均购于新疆奇康哈博中维药饮片有限公司。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流

*基金项目:新疆维吾尔自治区中医民族医药管理局新疆地产中药民族药新药研发培育项目[2016-02-07]。

第一作者:王林(1992-),女,汉族,大学本科,实习研究员,主要从事中药制剂相关工作,(电子信箱)1043250727@qq.com。

△通信作者:邱远金(1981-),男,汉族,硕士研究生,助理研究员,研究方向为天然药物化学,(电子信箱)153094778@qq.com。

动相:甲醇-水-磷酸(47:53:0.2);检测波长:280 nm^[5];流速:1 mL/min;柱温:30 ℃。色谱图见图1。可见,阴性对照品溶液在黄芩苷出峰位置处未出现吸收峰,表明处方中其他药材对黄芩苷的含量测定无干扰。

2.1.2 溶液制备

取黄芩苷对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加甲醇制成质量浓度为94.6 μg/mL的溶液,即得对照品溶液。按处方比例取11味中药材,粉碎,过3号筛,称取5 g,精密称定,置圆底烧瓶,加入50 mL蒸馏水,回流提取1 h,提取1次,滤过,滤液蒸干,残渣加入70%乙醇50 mL,称定质量,超声30 min,再称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,滤过,取续滤液2.5 mL,置25 mL容量瓶中,加入70%乙醇定容至刻度,摇匀,即得供试品溶液。取样品适量,加入相应量对照品溶液,摇匀,即得混合对照品溶液。按处方比例取除黄芩以外所有药材,按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察:精密量取对照品溶液0.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。按2.1.1项下条件测定,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 33\,894X - 1\,614.2$, $r = 0.999\,9$ ($n = 5$)。结果表明,黄芩苷质量浓度在3.78~75.68 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液,重复连续进样6次,每次10 μL。结果峰面积平均积分值为3 109 045, RSD 为2.63% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:称取6份样品,依法制备供试品溶液并测定。结果平均含量为4.21 mg/g, RSD 为2.71% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

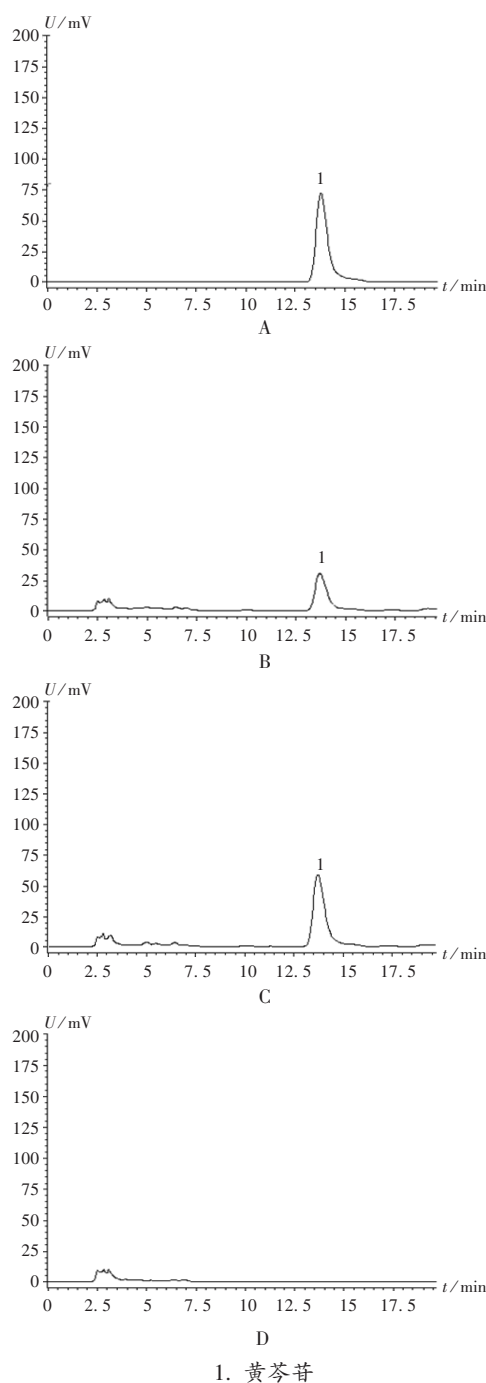
稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 h时精密吸取并进样,依法测定。结果平均峰面积为1 459 199, RSD 为2.07% ($n = 7$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:称取已知黄芩苷含量的清补通络浓缩丸适量,精密称定,按供试品溶液制备方法制备6份供试品溶液,分别精密加入含黄芩苷3.259 2 mg对照品溶液,依法测定,计算回收率。结果见表1。

2.2 正交试验优选

本试验中,以因素A(料液比, $V:V$),因素B(每次提取时间),因素C(提取次数)为考察因素进行正交试验,具体设计及结果见表2至表4。

由表3可见,料液比及提取次数对检测指标影响较大,各因素对提取中黄芩含量的影响程度依次为提取次数>料液比>提取时间,因素A中 $K_3 > K_2 > K_1$,故选择水



1. 黄芩苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
C. 混合对照品溶液 D. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

平3,即料液比为1:10($V:V$);因素C中 $K_2 > K_3 > K_1$,应选择水平2,即提取2次;每次提取时间对检测指标影响不大,为方便起见,选择每次提取1 h。由表4可见,料液比和提取次数在黄芩苷含量测定中具有显著性。综合考虑,确定最佳提取工艺为料液比为1:10,提取2次,每次提取1 h。对优选的提取工艺进行验证,测得黄芩苷含量为4.49 mg/g,出膏率为4.89%,基本合格。

3 讨论

清补通络浓缩丸已广泛用于临床,对治疗布鲁氏杆

表1 黄芩苷加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}(\%)$	RSD(%)
0.3078	2.9442	3.2915	6.3308	102.89	101.73	1.65
0.3078	2.9442	3.2915	6.3291	102.84		
0.3076	2.9423	3.2915	6.3205	102.63		
0.3078	2.9442	3.2915	6.1943	98.74		
0.3075	2.9414	3.2915	6.2561	100.70		
0.3072	2.9387	3.2915	6.3157	102.60		

表2 影响因素与水平表

水平	因素 A(V:V)	因素 B(h)	因素 C(次)
1	1:6	1	1
2	1:8	2	2
3	1:10	3	3

表3 提取工艺正交试验设计及直观分析表

试验号	因素			含量(mg/g)	出膏率(%)
	A	B	C		
1	1	1	1	3.22220	8.37
2	1	2	2	5.59059	7.32
3	1	3	3	4.84680	4.95
4	2	1	2	5.66142	4.31
5	2	2	3	5.17013	3.43
6	2	3	1	5.26385	7.74
7	3	1	3	5.57723	2.45
8	3	2	1	5.37021	7.70
9	3	3	2	9.52066	4.12
K_1	4.553	4.820	4.619		
K_2	5.365	5.377	6.924		
K_3	6.823	6.544	5.198		
R	2.270	1.724	2.305		

表4 方差分析结果表

因素	偏差平方和	自由度	F	F _{临界值}	P
料液比	7.934	2	10.751	9.000	<0.05
时间	4.642	2	6.290	9.000	
次数	8.630	2	11.694	9.000	<0.05
误差	0.740	2	2.9442	3.2915	

菌病起到了积极作用。该病是由布鲁氏杆菌侵入机体后引起的变态反应性传染病^[1],可引起多种局部并发症,如外周关节炎、心力衰竭、流产等,致使布鲁氏杆菌病迁延难愈,成为临床治疗和控制的难点^[2-3]。西医抗菌疗法用于急性期布鲁氏杆菌病,毒副作用较大,复发率较高,不易杀死病菌^[4-7]。中药主要治疗慢性期和部分急性期布鲁氏杆菌病,毒副作用较小、不易产生耐药,可改善机体免疫功能,能达到标本兼治的效果。

黄芩苷为方中黄芩的主要活性成分,具有抗肿瘤^[8]、抗炎^[9]、抗过敏^[10]等作用,尤以抗菌作用最显著^[11]。故本研究中采用高效液相色谱法测定提取液中黄芩苷含量,并

计算浸膏得率,进行浓缩丸提取工艺优化研究^[12-13]。正交试验方差分析结果表明,料液比及提取次数对检测指标影响较大,具有显著性,各因素对黄芩苷提取工艺的影响程度依次为提取次数>料液比>提取时间,得出最佳提取工艺。经验证,在此工艺下黄芩苷含量为4.49 mg/g,出膏率为4.84%,结果满意,且此工艺可操作性强,重复性好,实用性强,可为大生产提供依据。中药新药清补通络浓缩丸制剂工艺的初步研究,为后续其他中药新药的研究开发打下了坚实基础,可更好地服务于布鲁氏杆菌病患者,也有利于维护社会稳定,有显著的经济效益和社会效益,符合国家及新疆当地的民生政策,对推动我国布鲁氏杆菌病的防治工作具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] 王季秋. 布鲁氏杆菌病原学[J]. 中国地方病防治杂志, 2009,24(3):206.
- [2] 吴冬玲. 布鲁氏菌 VirBS-PCR 诊断方法的建立与应用及 Ery 基因的克隆与序列分析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2008.
- [3] 何凤田. 布氏杆菌新型疫苗的构建及保护效果的研究[D]. 重庆:中国人民解放军第三军医大学,2005.
- [4] 王季秋,崔京玉. 布鲁氏菌病治疗研究进展[J]. 中国地方病防治杂志,2007,22(2):104-106.
- [5] 胡剑飞. 布鲁氏菌的分离鉴定及 omp31 基因的克隆和序列分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
- [6] 尚德秋. 布氏菌病研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2004,19(4):204-212.
- [7] 肖东楼,冶森林,王大力,等. 布鲁氏菌病防治手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:9.
- [8] 洪铁,杨振,绳娟,等. 黄芩苷抗肿瘤作用及机制的研究[J]. 中国药理学通报,2008,24(12):1676-1678.
- [9] 侯艳宁,朱秀媛,程桂芳. 黄芩苷的抗炎机理[J]. 药学报, 2000,35(3):161-164.
- [10] 吴梅,闫慧,张春梅. 黄芩苷作为一种抗生物制剂的过敏反应研究[J]. 微生物学免疫学进展,2007,35(4):48-50.
- [11] 陈丽平. 黄芩有效化学成分及抑菌作用的研究分析[J]. 中国实用医药,2011,6(10):167.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:301-302.
- [13] 陈克克,王喆之. 党参多糖的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2007,7(4):635-636.

(收稿日期:2017-08-16;修回日期:2017-11-07)