

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.001

宝肾方胶囊制备工艺优化*

秦 龙¹, 李 平^{1,2△}, 马克君¹, 王俭勤¹

(1. 兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省消化系统肿瘤重点实验室, 甘肃 兰州 730030)

摘要:目的 优化宝肾方胶囊的水煎提取制备工艺。方法 以浸膏得率、大黄素含量和黄芪多糖含量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选宝肾方胶囊最佳水煎提取制备工艺。结果 水煎提取制备工艺影响因素的影响强度依次为提取次数(C) > 提取时间(B) > 加水倍数(A), 最佳制备工艺条件为加 16 倍量的纯化水, 水煎提取 4 次, 每次 2 h。结论 优选的制备工艺操作简单, 合理可行。

关键词: 宝肾方胶囊; 制备工艺; 大黄素; 黄芪多糖; 正交试验

中图分类号: R932; R283

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)02-0001-04

Optimization of Preparation Process of Baoshenfang Capsules

QIN Long¹, LI Ping^{1,2}, MA Kejun¹, WANG Jianqin¹

(1. Lanzhou University Second Hospital, Gansu, Lanzhou, China 730030; 2. Key Laboratory of Digestive System Tumors, Gansu, Lanzhou, China 730030)

Abstract: Objective To optimize the water extraction process of Baoshenfang Capsules. Methods The extract yield, emodin content and astragalus polysaccharide content were taken as indexes, the extraction process of Baoshenfang Capsules was optimized by the orthogonal test of $L_9(3^4)$. Results The affecting factors of water extraction process were followed as: extracting time(C) > extracting time(B) > added water volume(A). The optimized water extracting conditions were adding 16 times water and boiling extraction 4 times with 2 h each time. Conclusion The optimized preparation process is simple, reasonable and feasible.

Key words: Baoshenfang Capsules; preparation process; emodin; astragalus polysaccharide; orthogonal test

宝肾方胶囊是由大黄 *Rheum palmatum* L.、黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 和藏红花 *Crocus sativus* 组方的医院中药复方制剂, 具有改善肾功能、调节脂代谢、降低尿蛋白、延缓慢性肾病进展的作用^[1]。大黄中的大黄素能调节肾脏固有细胞生长, 减轻肾脏炎症与免疫反应, 调节细胞外基质的合成与降解^[2]。藏红花中的西红花苷可调节免疫和保护肾脏^[3]。黄芪中的黄芪多糖具有免疫调节、抗氧化、保肝护肾和抗肿瘤等作用^[4]。为了保证宝肾方胶囊临床疗效的稳定性和连续性, 本研究在保留其传统中药汤剂特点的基础上, 以浸膏得率、大黄素含量和黄芪多糖含量为考察指标, 对水煎提取制备工艺进行了考察和优选。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); HP8453 型分光光度计(美国惠普公司); ME215S 型电子天平(德国赛多利斯仪器有限公司); 202A-00 型干燥箱(上海新正机械仪器设备厂); RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试剂: 大黄(批号为 20130314), 黄芪(批号为 20140501), 均购自定西市天信药业有限责任公司; 藏红花(Badiee Saffron, 批号为 201210)。以上 3 味中药材均经甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师鉴定为正品。大黄素对照品(批号为 110756-200110), 葡萄糖对照

品(批号为 110833-200904), 均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 大黄素含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸溶液(85:15); 检测波长: 245 nm^[5]; 柱温: 30℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 5.0 μL。理论板数按大黄素峰计应不低于 3 000, 大黄素与相邻峰之间分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

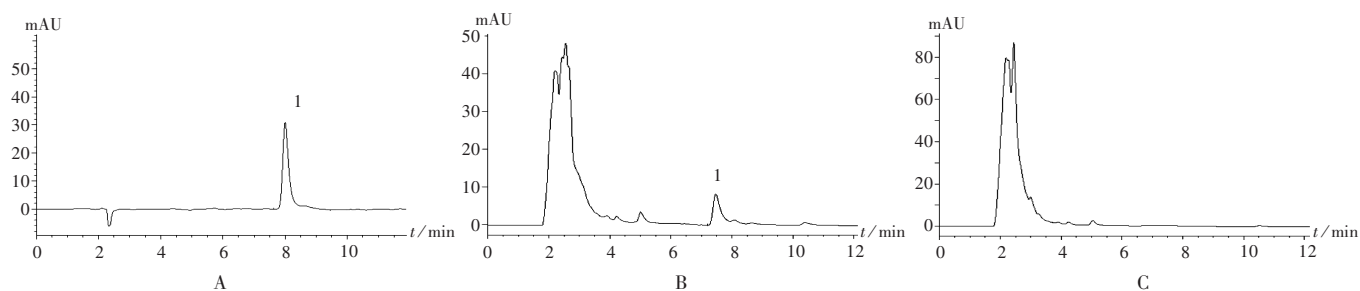
2.1.2 溶液制备

称取大黄素对照品 4.3 mg, 精密称定, 置 10 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇使溶解, 并稀释至刻度定容, 摇匀; 精密量取 1.0 mL, 置 10 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度定容, 摇匀, 配制成每 1 mL 含 43 μg 大黄素的溶液, 即得对照品溶液。分别称取 9 份正交试验项下浸膏样品(各 0.2 g), 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加 30 mL 硫酸溶液(2.5 mol/L)超声处理 5 min, 再加入 30 mL 氯仿, 回流 1.5 h, 冷却至室温, 转移至分液漏斗中, 萃取, 分取氯仿层, 水相再加 30 mL 氯仿萃取 3 次, 分取氯仿层, 合并 4 次氯仿萃取液, 水浴回收氯仿, 置旋转蒸发器上旋蒸至干, 残渣加甲醇 2.0 mL 使溶解, 转移至 50 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1.0 mL 置 5 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度,

*基金项目: 甘肃省兰州市人才创新创业科技计划项目[2014-RC-64]。

第一作者: 秦龙, 男, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为天然产物的研发, (电子信箱) qinl04@163.com。

△通信作者: 李平, 男, 博士研究生, 硕士研究生导师, 主任药师, 研究方向为智能给药系统, (电子信箱) gsliping@163.com。



1. 大黄酒

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

即得供试品溶液。按1/2处方量配制缺大黄的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

标准曲线绘制:精密量取大黄酒对照品溶液0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 mL, 分别置10 mL棕色容量瓶中,加甲醇稀释至刻度定容,摇匀,配制成系列溶液,用0.22 μm 微孔滤膜滤过,移至进样小瓶中,精密量取5.0 μL ,自动进样,记录色谱图(图1),以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X)为横坐标绘制标准曲线,得线性回归方程 $Y=62.0604X-8.6813$, $r=0.9999$ ($n=6$)。结果表明,大黄酒质量浓度在0.43~10.32 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:在拟订色谱条件下,精密量取大黄酒对照品溶液,重复进样6次,测定峰面积。结果的 RSD 为0.16% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:在拟订色谱条件下,精密量取同一供试品溶液,分别于0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h时进样,测定峰面积。结果的 RSD 为0.48% ($n=7$),表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

重复性试验:按1/2处方量称取样品内容物,依法制备供试品溶液,在拟订色谱条件下进样,测定峰面积并计算含量。结果大黄酒平均含量为3.126 mg/g, RSD 为1.21% ($n=6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:称取已知含量的同一批浸膏样品各

0.2 g,精密称定,依法制备供试品溶液,精密量取2.0 mL,置5 mL容量瓶中,再按已知含量的80%, 100%, 120% (低、中、高)3个体积分数,分别精密加入稀释10倍后的对照品溶液(4.3 $\mu\text{g/mL}$)1.0, 1.2, 1.4 mL,加甲醇定容,摇匀,在拟订色谱条件下进样测定峰面积,计算加样回收率。结果见表1。

2.2 黄芪多糖含量测定^[6]

2.2.1 溶液制备

称取葡萄糖对照品250 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加30 mL纯化水溶解,稀释至刻度定容,摇匀;精密量取1.0 mL,置50 mL容量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀,配制成每1 mL含葡萄糖0.1 mg的溶液,即得对照品溶液。分别称取9份正交试验项下浸膏样品(各0.2 g),精密称定,置50 mL三角瓶中,加30 mL纯化水超声处理30 min,滤过,滤液转移至100 mL容量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀,精密量取20 mL,置50 mL容量瓶中,加纯化水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。精密量取2.0 mL纯化水,置10 mL干燥试管中,依次分别加入5%苯酚溶液1.6 mL,浓硫酸6.0 mL,摇匀,放置30 min,作为空白溶液。

2.2.2 方法学考察

标准曲线绘制:精密量取2.2.1项下对照品溶液0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 mL,分别置10 mL干燥试管中,均加纯化水补足2.0 mL,分别加入5%苯酚溶液

表1 大黄酒加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
5.00	36.1	4.30	30.0	9.36	66.5	101.40	101.33				
5.00	36.1	4.30	30.0	9.38	66.3	101.86	100.67				
5.00	36.1	4.30	30.0	9.41	66.6	102.56	101.67				
5.00	36.1	5.16	40.0	10.20	75.6	100.78	98.75				
5.00	36.1	5.16	40.0	10.22	75.6	101.16	98.75	100.67	100.23	1.23	1.22
5.00	36.1	5.16	40.0	10.19	75.5	100.58	98.50				
5.00	36.1	6.02	50.0	10.97	86.4	99.17	100.60				
5.00	36.1	6.02	50.0	10.99	86.7	99.50	101.20				
5.00	36.1	6.02	50.0	10.96	86.9	99.00	101.60				

注:A为大黄酒,B为黄芪多糖。

1. 6 mL 和浓硫酸 6.0 mL, 摇匀, 室温避光放置 30 min, 以空白溶液为参比溶液, 按分光光度法于 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(C)为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 16.7264C - 0.1114$, $r = 0.9995$ ($n = 6$)。结果表明, 葡萄糖质量浓度在 0.03 ~ 0.055 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 精密量取 2.2.1 项下对照品溶液 6 份, 各 2.0 mL, 分别置 10 mL 试管中, 按标准曲线绘制项下方法测定吸光度。结果的 RSD 为 0.21% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 分别精密量取 2.2.1 项下对照品溶液和供试品溶液各 2.0 mL, 置 10 mL 试管中, 按标准曲线绘制项下方法测定吸光度, 前 1 h 每隔 10 min 测 1 次, 后 1 h 每隔 20 min 测 1 次。结果的 RSD 对照品溶液为 1.39% ($n = 9$), 供试品溶液为 1.55% ($n = 9$), 表明待测溶液在 2 h 内稳定。

重复性试验: 按 1/2 处方量称取样品内容物, 依法制备供试品溶液, 按标准曲线绘制项下方法测定吸光度并计算含量。结果黄芪多糖平均含量为 45.19 mg/g, RSD 为 1.23% ($n = 6$), 表明方法重复性较好。

加样回收试验: 精密称取已知含量的同一批浸膏样品各 0.2 g, 依法制备供试品溶液, 分别精密量取 1.0 mL, 置 10 mL 试管中, 再按 80%, 100%, 120% (低、中、高) 3 个体积分数分别加入葡萄糖对照品溶液 0.3, 0.4, 0.5 mL, 加纯化水补足至 2.0 mL, 按标准曲线绘制项下方法测定吸光度。结果见表 1。

2.3 制备工艺正交试验

因素与水平: 采用正交试验, 以加水倍数(因素 A)、提取时间(因素 B)和提取次数(因素 C)为考察指标, 每个指标选择 3 个水平, 选用 $L_9(3^4)$ 正交表试验。各因素及水平见表 2。

表 2 因素水平表

水平	因素 A(倍)	因素 B(h)	因素 C(次)
1	12	2.0	2
2	14	2.5	3
3	16	3.0	4

注: 因素 A 为加水倍数, 因素 B 为提取时间, 因素 C 为提取次数。表 4 同。

正交试验结果: 按 1/2 处方量称取大黄 5.0 g, 黄芪 10.0 g, 共 9 份, 按 $L_9(3^4)$ 正交表进行水煎提取试验, 水煎液过滤, 合并滤液, 浓缩, 移至蒸发皿中, 置烘箱中 60 °C 烘至恒定质量, 分别加入西红花 1.0 g, 研细, 混匀。依法测定浸膏得率、大黄素含量和黄芪多糖含量, 计算这 3 种指标的综合评分并进行方差分析。结果见表 3 和表 4。由表 3 可见, 水煎提取工艺影响因素的影响强

度依次为 $C > A > B$, 即提取次数(C) > 加水倍数(A) > 提取时间(B)。由表 4 可见, 因素 C 的影响较大($P < 0.05$), 因素 A 和因素 B 的影响不大($P > 0.05$)。故选定水煎工艺的最佳制备条件为 $A_3B_1C_3$, 即按处方量称取大黄和黄芪, 加 16 倍量的纯化水, 水煎提取 4 次, 每次 2 h, 水煎提取液合并, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为 1.25 ~ 1.30 的浸膏, 置烘箱中 60 °C 烘至恒定质量, 取出, 粉碎, 加入粉碎的藏红花, 混匀, 制粒, 过 80 目筛, 装入 1 号胶囊, 即得。

表 3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

序号	因素				浸膏得率	大黄素含	黄芪多糖含	综合
	A	B	C	D	(%)	量(mg/g)	量(mg/g)	指标
1	1	1	1	1	39.69	2.5294	43.82	89.28
2	1	2	2	2	44.06	2.8698	43.77	95.61
3	1	3	3	3	45.31	2.9222	44.32	97.33
4	2	1	2	3	44.31	2.8557	44.90	96.53
5	2	2	3	1	45.56	2.9846	44.24	98.18
6	2	3	1	2	40.81	2.5838	44.15	90.78
7	3	1	3	2	45.38	3.0632	45.14	99.92
8	3	2	1	3	44.13	2.6301	44.43	93.08
9	3	3	2	1	43.94	2.8295	44.86	95.99
K_1	282.21	285.73	273.14	283.45				
K_2	285.49	286.87	288.13	286.30				
K_3	288.99	284.09	295.42	286.94				
R	2.26	0.94	7.43	1.16				

注: 浸膏得率(y_1) = 浸膏得率/最大浸膏得率 × 20, 大黄素含量(y_2) = 含量/最大含量 × 40, 黄芪多糖含量(y_3) = 含量/最大含量 × 40; 综合指标 = $y_1 + y_2 + y_3$; D 为干扰项。

表 4 正交试验方差分析表

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
加水倍数	7.642	2	3.314	19.000	$P > 0.05$
提取时间	1.292	2	0.560	19.000	$P > 0.05$
提取次数	86.093	2	37.334	19.000	$P < 0.05$
误差	2.31	2			

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

2.4 最佳工艺验证

为了考察最佳工艺的稳定性, 在最佳制备工艺条件下分别对 3 批宝肾方胶囊样品进行验证, 分别测定浸膏得率、大黄素含量和黄芪多糖含量, 结果见表 5。结果显示, 优选制备工艺合理可行、稳定, 可用于控制制剂的质量。

表 5 最佳工艺验证试验结果($n = 3$)

批号	浸膏得率(%)	大黄素含量(mg/g)	黄芪多糖含量(mg/g)
20160720	45.56	3.126	45.19
20160721	45.01	3.109	45.24
20160722	44.86	3.114	45.26

3 讨论

宝肾方是在现代研究的基础上, 借鉴古代医家扶