

通络祛痛软膏提取工艺优选

张璇¹, 云奇², 聂继红¹, 卢勇¹, 秦莉³, 高晓黎^{3*}

(1. 新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆特丰药业股份有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830054)

通络祛痛软膏含有生草乌、白芷、冰片等 6 味中药, 具有活血化瘀、消肿止痛三功效, 主要用于治疗跌打损伤等骨伤科疾病。由于组方中的有效成分大多为脂溶性成分, 故本实验选用乙醇回流提取, 并同时建立 RP-HPLC 法测定其中次乌头碱和欧前胡素的含量方法, 通过单因素考察和正交优选, 考察了回流时间、加醇量、回流次数、乙醇浓度的影响, 结合浸膏得率作为指标, 获得最佳提取工艺。

1 仪器与材料

岛津 10A V P 高效液相色谱仪, SPD—10A V P 检测器, SCL—10A V P V er5. 33 色谱工作站。

生草乌 *Aconitum kusnezoffii* Reichb., 白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f., 红花 *Carthamus tinctorius* L., 汉城细辛 *Asarum sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai, 白芥 *Sinapis alba* L., 冰片均购自新疆医药公司, 由本院李永和主任中药师鉴定。次乌头碱(0798-9403), 欧前胡素(0826-9502)对照品均由中国药品生物制品检定所提供, 所用试剂除流动相中甲醇为色谱纯外, 其余均为分析纯, 水为重蒸馏水。

2 预试验考察

2.1 提取方法: 准确称量组方中除冰片以外的各味药, 用乙醇加热回流, 滤过, 合并, 浓缩至浓缩液含生药量为 1.5 g/mL。冷藏放置。

2.2 单因素考察: 通过试验对加醇量(5, 8, 10, 12 倍)、煎煮时间(1, 1.5, 2, 2.5, 3 h)、煎煮次数(1, 2, 3 次)、乙醇浓度(55%, 65%, 75%, 85%, 95%)进行考察。结果加 8 倍量醇明显优于 5 倍量, 而加醇量增加, 各指标几乎无变化, 故加醇量选择 8 倍; 煎煮时间对各指标几乎无影响, 故煎煮时间为 1 h; 乙醇浓度对欧前胡素含量影响大, 而对次乌头碱含量影响较小, 故需进行正交优选, 综合考察; 煎煮次数对次乌头碱含量影响较大, 而对欧前胡素含量影响小, 故需进行正交优选, 综合考察。

2.3 因素水平的确定: 根据单因素考察结果确定主要的影响因素和水平见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素	
	A 煎煮次数	B 乙醇浓度
1	1	65%
2	2	75%

3 方法与结果

3.1 浸膏得率测定^[1]: 精密量取等量的提取液(m), 置已干燥至恒重的蒸发皿中(m_0), 水浴浓缩至干, 于 105℃ 干燥 3 h, 移置干燥器中, 冷却至室温, 迅速精密称定质量(m_1), 按公式 $(m_1 - m_0) / m \times 100\%$, 计算浸膏得率。

3.2 次乌头碱含量测定

3.2.1 色谱条件^[2]: 色谱柱为 XDB C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-氯仿-三乙胺(70:30:2:0.1), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 35℃。

3.2.2 线性关系考察: 精密称取次乌头碱对照品 3.04 mg, 加二氯甲烷制成 0.304 mg/mL 的溶液, 取对照品溶液分别进样 2, 4, 6, 8, 10 μL, 以进样量对测得的峰面积进行线性回归, 得线性方程: $Y = 7.59395 \times 10^{-7}X - 0.01258$, $r = 0.9997$ 。次乌头碱在 0.608~3.040 μg 线性关系良好。

3.2.3 精密度试验: 精密吸取对照品溶液, 重复进样 9 次, 测定次乌头碱峰面积积分值, 其 RSD 为 1.66%。

3.2.4 加样回收率试验: 取已知含量的供试品, 精密加入一定量的次乌头碱对照品(含次乌头碱约 0.18, 0.26, 0.33 mg), 依法测定, 并计算平均回收率。结果平均回收率为 95.87%, RSD 为 2.62% ($n = 6$)。

3.2.5 供试品溶液的制备: 精密量取各正交组提取的浓缩液 10 mL, 水浴 60℃ 蒸发浓缩至干, 各加

* 收稿日期: 2003-04-27

作者简介: 张璇(1976—), 女, 河南省许昌市人, 药师, 2002 年毕业于新疆医科大学药学院, 取得硕士学位, 研究方向为药物新剂型。
Tel: (0991) 5839327 (O)

2% HCl 溶液 20 mL, 超声提取 20 min, 移入分液漏斗中, 再用 2% HCl 溶液 20 mL 洗涤蒸发皿, 洗液并入分液漏斗中, 用乙醚萃取 2 次, 每次 25 mL, 弃去乙醚液, 水层再用氨试液调 pH 9.0~10.0, 用乙醚萃取 5 次 (25, 25, 20, 20, 15 mL), 合并萃取液, 水浴 50 左右挥干溶剂, 用二氯甲烷定容至 5 mL 量瓶, 摇匀, 即得。

3.3 欧前胡素含量测定

3.3.1 色谱条件: 色谱柱为 XDB C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (70:30), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 248 nm, 柱温为 35 。

3.3.2 线性关系考察: 精密称取欧前胡素对照品 0.96 mg, 加甲醇制成 9.6 μg/mL 的对照品溶液。取对照品溶液分别进样 1, 3, 5, 7, 9 μL, 测定峰面积。以进样量对峰面积进行线性回归, 得线性方程: $Y = 1.1969 \times 10^{-4}X + 0.2066$, $r = 0.9999$ 。欧前胡素在 9.6~86.4 ng 与峰面积线性关系良好。

3.3.3 精密度试验: 精密吸取欧前胡素对照品溶液, 重复进样 9 次, 测定欧前胡素峰面积, 其 RSD 为 1.03%。

3.3.4 加样回收率试验: 取已知含量的供试品, 精密加入一定量的欧前胡素对照品 (含欧前胡素约 0.003, 0.007, 0.011 mg), 依法测定, 并计算平均回收率。结果平均回收率为 96.91%, RSD 为 1.66% ($n = 6$)。

3.3.5 供试品溶液的制备: 精密量取各正交组提取浓缩液 2 mL, 置 60 干燥箱中烘干, 加入甲醇 20 mL, 超声振荡 20 min, 滤过。再用 10 mL 甲醇洗滤器, 合并洗滤液, 水浴 50 左右挥干溶剂, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀。再精密吸取 1 mL 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

3.4 测定结果: 见表 2, 方差分析见表 3。由方差分析结果看出, 对于欧前胡素含量和浸膏率来说, 提取次数和乙醇浓度对优选试验综合指标影响差异都具有显著意义; 而对次乌头碱含量来说, 提取次数对其影响差异具有显著性, 而乙醇浓度对其影响差异不显著。

3.5 验证试验: 按上述优化筛选确定的工艺, 加 8 倍量 75% 乙醇, 回流提取两次, 每次 1 h, 测定次乌头碱含量、欧前胡素含量和出膏率, 结果分别为 0.136 mg/mL, 8.350 μg/mL 和 14.51% ($n = 3$)。验证试验结果与正交试验结果一致。

4 讨论

表 2 L₄(2³) 正交试验结果

Table 2 Results of L₄(2³) orthogonal test

试验号	A	B	C	浸膏得率 /%	次乌头碱 / (mg · mL ⁻¹)	欧前胡素 / (μg · mL ⁻¹)
1	1	1	1	15.82	0.140	6.015
2	1	2	2	13.49	0.129	6.613
3	2	1	2	20.20	0.149	7.014
4	2	2	1	17.96	0.164	7.409
浸膏得率	K ₁	29.31	36.02	33.78		
	K ₂	38.16	31.45	33.69		
	k ₁	14.66	18.01	16.89		
	k ₂	19.08	15.73	16.85		
次乌头碱	R	4.42	2.28	0.04		
	K ₁	0.269	0.289	0.304		
	K ₂	0.313	0.293	0.278		
	k ₁	0.135	0.145	0.152		
欧前胡素	k ₂	0.157	0.147	0.139		
	R	0.022	0.002	0.013		
	K ₁	12.628	13.029	13.424		
	K ₂	14.423	14.022	13.627		
欧前胡素	k ₁	6.314	6.515	6.712		
	k ₂	7.212	7.011	6.814		
	R	0.898	0.496	0.102		

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
浸膏得率	A	58.697754	1	58.697754	170.1529 < 0.01
	B	15.732422	1	15.732422	45.6051 < 0.01
	误差 Se	3.104736	9	0.344971	
次乌头碱	A	0.001474	1	0.001474	9.9693 < 0.05
	B	0.000010	1	0.000010	0.0683
	误差 Se	0.001331	9	0.000148	
欧前胡素	A	2.416321	1	2.416321	90.0432 < 0.01
	B	0.738403	1	0.738403	27.5163 < 0.01
	误差 Se	0.241516	9	0.026835	

$$F_{0.05}(1, 9) = 5.12 \quad F_{0.01}(1, 9) = 10.6$$

由于组方中生草乌的有效成分乌头碱、中乌头碱、次乌头碱均为双酯型生物碱; 白芷的有效成分欧前胡素为脂溶性成分, 故选用乙醇回流提取。生草乌的 3 种成分中, 中乌头碱含量较高, 但稳定性差; 乌头碱含量最低且最不稳定, 而次乌头碱含量最高且稳定性好, 所以选用次乌头碱含量作为评价指标^[3]。加上臣药白芷的有效成分欧前胡素并结合浸膏得率作为综合评定指标, 初步优选出对通络祛痛软膏提取工艺影响最显著的因素。

通络祛痛软膏的最佳提取条件为 A₁B₂, 即加 8 倍量 75% 的乙醇回流提取 2 次, 每次提取 1 h。本实验中回流时间设计为 1 h, 是为了配合大生产考虑, 而且白芷回流时间越长, 欧前胡素含量呈下降趋势, 可能是由于欧前胡素分子中酯键水解所致, 提示欧前胡素对热不稳定, 提取时不宜长时间加热^[4]。

References

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed Vol I .
 [2] Zhao L H. Handbook of Components Analysis of Chinese Patent Medicine by HPLC (高效液相色谱法分析中成药成分手册) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1994.
 [3] Gao X L, Yang N F. Determination of hypaconitine in Chuangshangling by high performance liquid chromatography [J]. J Guiyang Med Coll (贵阳医学院学报), 1998, 23(3): 1.
 [4] Liang M J, Yang G D, He L C. Study on extracting methods of imperatorin in Radix Angelicae Dahurica [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2000, 22(12): 12.

HPLC 法测定银杏叶缓释胶囊中总黄酮的含量

王淑君¹, 候 薇², 张天政³, 陈济民¹, 毕殿洲^{*}

(1. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳第一制药厂, 辽宁 沈阳 110023; 3. 盖州市中心医院, 辽宁 营口 115200)

银杏 *Ginkgo biloba* L. 为银杏科银杏属植物。银杏叶入药, 始载于明《本草品汇精要》, 性平, 味苦涩, 敛肺平喘, 止泻, 活血止痛。银杏叶主要成分为黄酮类、内酯类化合物, 能够舒张冠脉, 改善血液循环, 降低心肌耗氧量, 降低钙离子内流, 抑制血小板聚集, 抗血栓, 改善微循环, 降低血液黏稠度。对心脑血管具有保护作用。对老年性痴呆具有良好的预防作用, 长期使用无不良反应^[1,2]。

我国目前有许多厂家对银杏叶制剂进行了开发, 主要有普通片剂、胶囊剂、口服液等。银杏叶制剂作为预防、治疗心脑血管疾病的良药, 需长期反复用药才能达到疗效。普通剂型的频繁给药必将给患者带来不便, 血药浓度的波动也将影响药物的疗效。本实验对制备的银杏叶缓释胶囊建立了 HPLC 法测定其中总黄酮的含量。结果表明本法准确、简便。

1 仪器与试剂

美国 Water 高效液相色谱仪, 484 紫外检测器, 江申色谱工作站。银杏叶缓释胶囊(沈阳药科大学药剂教研室), 槲皮素、山柰素、异鼠李素(中国药品生物制品检定所), 甲醇为色谱纯(山东禹王实业总公司), 磷酸等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

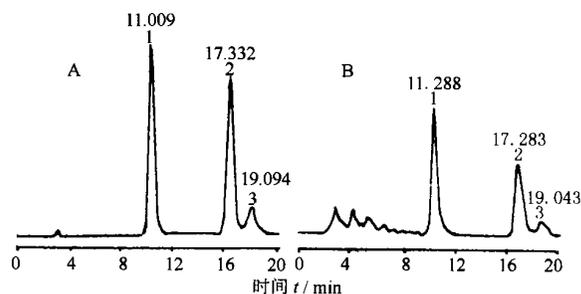
2.1.1 对照品溶液的制备: 分别精密称取经五氧化二磷干燥过夜的槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品适量, 各加甲醇制成 0.03, 0.03, 0.02 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备: 取胶囊 20 粒, 倾出内容物, 研细, 精密称取适量(约 400 mg), 精密加入甲醇 25 mL, 超声处理 20 min。滤过, 弃去初滤液, 精密量

取续滤液 5 mL, 加甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合液 25 mL, 回流 30 min, 放冷, 转移至 50 mL 量瓶中, 并加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 色谱条件: 色谱柱: Spherisorb C₁₈ (4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇-0.4% 磷酸溶液(60:40); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 360 nm。

2.3 专属性试验: 在此色谱条件下, 槲皮素、山柰素和异鼠李素色谱图见图 1。



1-槲皮素 2-山柰酚 3-异鼠李素
 1-quercetin 2-kaempferol 3-isorhamnetin
 图 1 混合对照品(A)和银杏叶缓释胶囊(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Ginkgo Sustained-release Capsule (B)

2.4 标准曲线制备: 分别精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素对照品各 10 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 再分别稀释成浓度为 10, 20, 30, 40, 50 μg/mL 的溶液, 进样 10 μL。以峰面积(A)与浓度(C)做回归曲线, 线性范围为 10~50 μg/mL。回归方程为: 槲皮素: $Y = 135\ 718X - 406\ 491$, $r = 0.999\ 3$; 山柰素: $Y = 91\ 197X + 447\ 751$, $r = 0.999\ 8$; 异鼠李素: $Y = 166\ 038X - 717\ 919$, $r =$

* 收稿日期: 2003-05-01