

散瘀胶囊研究

刘晓华 黄芳 窦昌贵 熊野娟¹ 卢琴¹ 魏腾云²

(中国药科大学中药研究所 南京 210038)

摘要 研究了散瘀胶囊的制备工艺,并对其关键步骤如加水量、煎煮时间、煎煮次数、醇沉浓度等条件进行优选,确定最佳工艺。对本制剂的质量标准进行方法学研究,以 CS-9000 型薄层扫描仪检测;摸索出主药大黄中有效成分大黄素的提取分离及薄层展开条件,回归方程 $A=66869.272C + 9621.037, r=0.9975$, 回收率 96.91%, $RSR=3.11\%$ 。

关键词 散瘀胶囊; 正交试验; 大黄素; 薄层扫描

散瘀胶囊源于金元医学家李东垣之方。由大黄、当归、柴胡、红花、甘草组成,大黄为主药,主治跌打损伤,去瘀止痛效果佳。但服用携带不便,在保持原方有效成分基本不变的前提下,将其研制成胶囊剂。由于原方药味多、成分复杂难以分离,一直未有质量控制方法的研究报道,本文经数次试验摸索出大黄素的提取分离检测方法,步骤简单,重复性好,既可作为本制剂的检测方法,又可达到缩小剂量,提高疗效的目的。

1 仪器和药品

ZRS-4 型智能溶出仪(天津大学无线电厂);CS-9000 型薄层扫描仪(日本岛津公司);PBQ-1 型薄层自动铺板仪(重庆南岸新力实验电器厂);UV-1 型三用分析仪(上海顾村化学仪器厂);大黄素(中国药品生物制品检定所);硅胶 G(青岛海洋化工厂);散瘀胶囊(本所中药制剂研究室研制);所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 制剂工艺设计

按照传统中药加水煎服的习惯,选择水为提取溶媒,药材加水浸泡后煎煮提取,提取

液用一定浓度乙醇沉淀除杂质,浸膏干粉加辅料制粒,装胶囊包装。

2.2 制剂工艺优选

2.2.1 加水量、煎煮时间、煎煮次数考察按三因素、三水平及正交设计安排试验,对上述三项条件进行考察,以大黄素在浸膏颗粒中的含量为指标,找出各因素最佳工艺条件。

按处方比例称取药材 100 g,共 9 份,分别浸泡 0.5 h,煎煮、过滤、浓缩、醇沉(30% 浓度),离心 5 min,上清液回收乙醇,减压浓缩至稀浸膏状,真空干燥,干粉研磨过 65 目筛,得浸膏干粉共 9 份,每份精密称取 5.00 g,加甲醇 120 ml 于索氏提取器中 80℃ 回流加热 8 h,回收甲醇至干,加蒸馏水 60 ml, HCl 调 pH 2~3,于 90℃ 水解 2 h,乙醚萃取 8 次(60 ml/次),回收乙醚至干,无水乙醇定容于 10 ml 容量瓶中。

在 200 mm × 100 mm × 0.4 mm 硅胶板上分别点上述各样品液 5 μl(板用前 110℃ 活化 2 h),以大黄素对照品对照,用苯-乙酸乙酯-甲醇(30:10:1)为展开剂,展开,取出,晾干,在 CS-9000 型薄层扫描仪上($\lambda_s=420$ nm, $\lambda_r=550$ nm)测定样品的峰面积值。

大黄素标准溶液浓度 $C=0.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

标准曲线 $Y=8928.105X+7146.9275; r$

$=0.9975$ 。

测得峰面积值代入标准曲线计算大黄素

含量。大黄素百分含量 $=0.13/5 \cdot X/W$ 。 L_9

(3)³ 正交试验设计及结果见表 1。

Tab 1. $L_9(3)^3$ Orthogonal design and experiment results

Grp	Test desing			experiment results			
	Add water quantity (times)	Decoction time, h	Decoction times	Weight of Extract, g	Added, μ l	Peak area	emodin, %
1	8	0.50	1	4.8656	5	34862.550	0.0166
2	8	0.75	2	4.6000	5	21633.420	0.0090
3	8	1.00	3	4.7884	5	26992.150	0.0121
4	12	0.50	2	4.7518	5	20440.360	0.0082
5	12	0.75	3	4.5816	5	45296.220	0.0242
6	12	1.00	1	4.9203	5	19683.180	0.0074
7	15	0.50	3	5.0577	5	22662.080	0.0089
8	15	0.75	1	4.8551	5	41439.870	0.0206
9	15	1.00	2	5.1077	5	31342.640	0.0138
composite		\bar{K}_1		0.0126		0.0133	0.0144
mark		\bar{K}_2		0.0112		0.0179	0.0111
		\bar{K}_3		0.0149		0.0157	0.0097
		R		0.0037		0.0046	0.0047

由上可见

$I_3 > I_2 > I_1$ 故 A_3 (加 15 倍水)为佳;

$I_2 > I_1 > I_3$ 故 B_2 (煎煮 0.75 h)为佳;

$I_2 > I_1 > I_3$ 故 C_2 (煎煮两次)为佳。

又 $R_3 > R_2 > R_1$, 故因素主次为 $C > B > A$ 。

2.2.2 醇沉浓度选择 取处方药材 200 g, 加 15 倍量水浸泡, 煎煮两次, 每次 0.75 h, 合并两次滤液浓缩至 800 ml, 分成 4 份, 每份 200 ml, 加入乙醇, 含醇量分别达到 10%、20%、30%、40%, 搅匀, 放置 12 h, 离心(3000

r/min)分离 5 min, 取上清液, 回收乙醇至无醇味, 浓缩, 干燥得浸膏干粉 4 份, 计算浸膏干粉得率。分别精密称取浸膏干粉 5.0 g, 其余步骤同“2.2.1”项, 制备供试样品液 4 份, 分别进行薄层测定, 计算测得大黄素的百分含量。药效以本品凝血时间和致痛潜伏期为指标。抗凝作用采用毛细玻管法作小鼠凝血时间测定, 空白对照组(ig NS)凝血时间为 82.6 ± 14.1 s。镇痛作用采用小鼠热板法试验, 空白对照组的致痛潜伏期为 18.6 ± 6.1 s。结果见表 2。

Tab 2. Test result of alcohol sediment concentration

Concentrations of alcohol, %	Extraction rate (g/g)	Emodin content (g/g)	Pharmacodynamic index	
			C ₁ , s	Threshold of pain, s
10	19.60	0.0123	136.4 + 24.6	28.4 + 7.6
20	16.76	0.0126	141.6 + 28.3	31.5 + 9.2
30	14.71	0.0139	201.7 + 35.6	38.2 + 12.6
40	12.13	0.0141	196.4 + 34.2	34.6 + 14.3
0	22.60	0.0125	135.6 + 22.8	26.3 + 8.2

由以上结果看出, 加入一定量乙醇沉淀杂质, 可使浸膏得率显著降低, 而有效成分含量及药理效应相对升高, 选用含 30% 醇沉淀综合指标较好。

同时本文对药材粒度、浸泡时间, 分别以大黄素含量为指标作考察, 结果以药材碎成粗颗粒, 加水浸泡 0.5 h, 大黄素含量高。

2.3 优选后制剂的制备工艺

取处方药材,碎成粗颗粒,加入15倍量水,浸泡0.5h,加热煎煮0.75h,共两次,合并再次滤液,减压浓缩至相对密度1.0352—1.0421(80℃),放冷。加入乙醇使含醇量达到30%,放置12h,离心过滤,滤液回收乙醇至无醇味后浓缩至浸膏状,80℃真空干燥,得浸膏干粉加入辅料适量,用乙醇湿润制粒,80℃干燥整粒装入胶囊,包装。

上述工艺制备的样品,溶出50%需6min,溶出100%需9min,水份含量4.6%,重量差异3.9%,大黄素含量0.34mg/粒(0.3g),卫生学检查均符合要求,药效指标明显。

2.4 样品提取条件确定

精密称量胶囊内容物2.0g,置于索氏提取器中,加甲醇120ml,于80℃水浴提取6h,回收甲醇至干,加水50ml,滴加HCl调pH至2~3,置沸水浴水解2h,水解液放冷,乙醚萃取8次(50ml/次),蒸去醚层,残渣用无水乙醇溶解并转移入5ml容量瓶中稀释至刻度。

2.5 展开剂选择

用0.5%CMC-Na硅胶G薄层板对数十组展开剂筛选,结果以苯-乙酸乙酯-甲酸(30:10:1)对样品板上分离效果为佳。

2.6 测定条件选择

大黄素标准溶液配制:精密称取大黄素对照品1.0mg,加入无水乙醇溶解并定容于10ml容量瓶中,浓度为0.1μg/ml。

精密吸取上述标准对照液5μl点于硅胶G薄层板上,以苯-乙酸乙酯-甲酸(30:10:1)为展开剂,展开约8cm,取出,晾干,得大黄素清晰黄色斑点,在400~700nm扫描得($\lambda_s=420\text{ nm}$, $\lambda_r=550\text{ nm}$)反射式锯齿扫描。

2.7 线性关系、稳定性和精密度考查

回归方程 $A = 66859.272C + 9621.037$, $r = 0.9975$,线性范围0.26~1.82μg,直线不过圆点,用两点法求算。

大黄素在30 min内稳定,但实际工作中

即刻测定误差小。

大黄素精密度同板($n=6$) $RSR=1.12\%$ 异板($n=6$) $RSR=1.33\%$,表明精密度良好。

2.8 重复性试验

精密称取胶囊内容物2.0g 6份,按“2.4”项方法制备样品液,按“2.5”项,“2.6”项方法进行薄层展开,扫描测定,标准品同板外标两点法计算,方程为 $Y = 87550X - 5962$,大黄素% = $1/10 \cdot X/W$,结果见表3。

2.9 回收率试验

精密称取胶囊内容物2.0g 共5份,每份精密加入大黄素标准品125μg,按“2.8”项方法操作,制备样品液,薄层展开,扫描测定,标准品同板外标两点法计算,方程为 $Y = 51856X + 2650$,回收率 = $(C - A)/B \times 100\%$ 。

C (测得量) = $1 \times 10^3 X$, A (样品中含被测成分量) = $0.0138 \times 10^4 \times W$, B (加入标准量) = 125,结果见表4。

Tab 3. Result of repetition experiment

Weight, g	Peak area	Founded μg/μl	Emodin, %
2.1223	21776.830	317.09	0.0149
1.9924	18598.880	280.79	0.0141
2.0413	21784.460	317.19	0.0133
2.1803	19459.570	290.63	0.0133
1.9652	16918.380	261.61	0.0133
2.0124	18151.535	275.70	0.0137

$$x = 0.0138\% \quad s = 6.87 \times 10^{-4} \quad RSD = 4.97\%$$

Quantity of dropped sample is 5 μl.

Tab 4. The result of recovery

Weight, g	Peak area	Added, μg	Founded, μg	Emodin, %
2.1003	23943.02	125	410.60	96.63
2.1836	24769.15	125	426.55	100.17
1.9987	23359.68	125	399.37	98.84
1.9561	22913.74	125	390.77	96.66
2.2347	24879.78	125	428.68	96.24

$$x = 96.91\% \quad s = 2.0126 \quad RSD = 3.11\%$$

Quantity of dropped sample is 5 μl.

2.10 样品含量测定

本次试验共测10批样品,方法同前,结果见表5。

Tab 5. Determination result for content of sample

No.	weight, g	Peak area	Emodin% (g/g)
1	2.1223	21776.830	0.0149
2	1.9924	18598.880	0.0141
3	2.0413	21784.460	0.0135
4	2.1803	19459.570	0.0133
5	1.9652	16918.380	0.0133
6	2.0413	16709.710	0.0129
7	1.9923	17604.500	0.0137
8	2.0862	16654.070	0.0126
9	1.9242	10151.220	0.0168
10	2.0383	18482.140	0.0163

Quantity dropped sample is 5 μ l.

3 讨 论

1) 样品提取和用乙醚萃取时,应严格控制提取液和萃取液至无色,此时以薄层检测基本无大黄素检出,以此判断其提取完全。

2) 薄层色谱中操作环节多,如制板、活

化、点样、展开等试验条件对结果都有很大影响,因此,每步必须严格控制操作条件,以减少误差,获得重现性好的分析效果。

参 考 文 献

- 1 阴 健,郭力弓主编. 中药现代研究与临床应用(1). 北京:学苑出版社, 1994, 61~85, 285~295, 330~335, 540~547
- 2 谢香琼主编. 中药制剂开发与应用. 北京:人民卫生出版社, 1994, 265~284, 428~432
- 3 何丽一,罗淑荣等. 中草药中蒽醌衍生物分析方法的研究. 中国大黄属植物成分的分离及含量测定. 药学学报, 1980, 15(9): 555
- 4 罗文毓,江 萍等. 大黄中五种蒽醌衍生物的 HPLC 测定. 药物分析杂志, 1989, 9(5): 259
- 5 蓝琪田,罗国安,吕方军等. 薄层扫描法测定防风通圣丸中大黄素和黄芩甙的含量. 中国药科大学学报. 1989, 20(2): 106
- 6 顾明娟,蔡定国,吴建林等. 大黄蒽醌甙元的 TLC 展开剂改进. 中成药, 1990, 12(8): 31

A Study On San Yu Capsule

Liu Xiaohua, Huang Fang, Dou Changgui, Xiong Yiejuan, Lu Qing, Wei Tengyuen

Institute of Chinese Materia, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract Manufacturing process of San Yu capsule was studied and the main technological parameters were decided, including water volume, decocting hours, decocting times and concentration of alcohol sediment. Then, TLC method was used to determine the content of emodin, which was the effective ingredient in this preparation. Its regression equation was $A=66859.2720 \pm 9621.037$, the related coefficient was 0.9975, the percentage of recovery was 96.91% and the coefficient of variation was 3.11%.

Key words San Yu capsule; Orthogonal experiment design; Emodin; Thin layer scanning.