

· 中药工业 ·

伤科凝胶剂提取工艺研究

侯影¹, 张旭^{2*}

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

[摘要] 目的: 优选伤科凝胶剂处方的最佳提取工艺。方法: 选取溶媒浓度、溶媒量、提取次数、提取时间为考察因素, 以土的宁提取量和浸膏收率为指标, 采用正交试验设计法优选伤科凝胶剂处方的最佳提取工艺。结果: 确定伤科凝胶剂处方最佳提取工艺为 10、8、8 倍 60% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液。结论: 该提取工艺稳定可靠, 科学合理, 适合于伤科凝胶剂的工业化提取, 可作为伤科凝胶剂处方质量的评价方法。

[关键词] 伤科凝胶剂; 土的宁; 提取工艺

[中图分类号] R289.57; R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)01-0089-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190612002

Study on Extraction Technology of Shangke gels

HOU Ying¹, ZHANG Xu^{2*}

1. The First Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China;

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

[Abstract] **Objective:** To determine the best of Shangke gels preparation process. **Methods:** The added alcohol quantity, extracting time, extraction times were selected as investigating factors, strychnine concentration and extract yield were used for total extraction quantity index, Orthogonal experimental design method was applied to optimized the extraction technology standard prescription. **Results:** The best extraction technology of Shangke gels was determined that 10, 8, 8 times, by 60% ethanol reflux extraction 3 times, each time 1.5 hours. **Conclusion:** The extraction process is rational and scientific, and stable and reliable, and suitable for the industrialization of the agent gels extraction. And it can be as Shangke gels prescription quality evaluation method.

[Keywords] Shangke gels; strychnine; extraction process

伤科凝胶剂是根据多年临床经验方, 采用现代制药技术开发研制成的外用制剂。伤科凝胶剂处方由红花、马钱子、三七、续断等十味中药组成, 根据药材性质及临床需要, 经实验选择的剂型为凝胶剂, 以卡波姆-940 为基质加工制成。具有止痛消肿、化瘀活血的作用, 主要用于瘀血肿痛、跌打损伤等症。近年来凝胶剂是为满足临床需要而发展起来的一种新的药物剂型, 目前国内外研究开发已很广泛且日渐成熟。常用基质有卡波姆(Carbomer, CBM)、羟甲基纤维素钠、泊洛沙姆(poloxmner)、甲壳胺、琼脂、壳聚糖等。凝胶剂基质可以应用卡波姆-940, 具有制备工艺简单、稳定性优异、对皮肤无刺激性、

外观细腻、无油腻、清爽、干后易清洗等特点, 是优良的外用剂型。凝胶剂自身具有液体和固体的双重特性, 从收缩率、导电性、蒸气压等方面, 可以被看作为液体; 从结构上, 高浓度凝胶所具有的物质状态, 又可以看作是固体。凝胶剂作为一种透皮吸收好、无油腻感、涂展性好、易于清洗的新外用剂型, 可广泛用于控释制剂、缓释制剂及脉冲释放等新型给药途径, 适用于皮肤、黏膜、腔道。传承内病外治的治疗理念, 既可以避免口服药经过酶、酸等作用在胃肠道内产生首过效应, 且可以降低药物自身的毒副作用, 凝胶剂作为外用制剂已成为近几年来局部用药的热点研究方向。

* [通信作者] 张旭, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药炮制工艺和原理解析研究; Tel: (0411)85890140, E-mail: zhangxulnutcm@163.com

方中马钱子为马钱子科马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的成熟种子, 始见于《本草纲目》^[1]。其性温, 味苦, 有大毒, 主要归脾、肝经; 具有消肿散结, 通络止痛之效。临床治疗风湿顽痹、跌打损伤、麻木瘫痪、咽喉肿痛、痈疽疮毒、骨折肿痛等方面具有显著疗效^[2]。土的宁为马钱子主要含有的生物碱的单体成分, 它既是有效成分, 也是有毒成分, 中毒剂量与治疗剂量相当, 口服 30~100 mg 可以达到致死量^[3], 曾有临床报道, 1 名 69 岁男性血样中含有 0.29 mg·L⁻¹ 土的宁导致死亡^[4]。选择土的宁为实验考察的指标, 为判定处方中药品质量的实物标准, 进而保证药品的质量^[5]。本实验采用正交试验设计法, 以土的宁提取量为考察指标对凝胶剂的提取工艺进行研究。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪; 微量进样器(规格: 25 μL, Hamilton 美国); 数控超声波清洗器(型号: KQ-250DB, 昆山市超声仪器有限公司); 旋转蒸发器(型号: RE-52, 上海亚荣生化仪器厂); 电子天平(型号: FA1004B, 上海精密科学仪器有限公司); 十万分之一分析天平(型号: METTLER AE240, 瑞士 METTLER); 酸度计(型号: PHS-2C, 上海伟业仪器厂); 低速大容量多管离心机(型号: LXJ-IIIB, 上海安亭科学仪器厂); 高速粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司)。

1.2 试药

马钱子、三七等处方中药均由大连美罗中药厂有限公司提供。经辽宁中医药大学药学院翟延君教授鉴定为正品。

土的宁对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110706-200505); 乙腈、甲醇(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 庚烷磺酸钠(上海如吉生物科技发展有限公司); 磷酸(天津市大茂化学试剂厂); 磷酸二氢钾(天津市大茂化学试剂厂); 乙醇为分析纯; 水为二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

硅胶柱填料为十八烷基硅烷键合硅胶, 柱温: 室温。流动相: 乙腈-磷酸二氢钾(0.02 mol·L⁻¹) 与

庚烷磺酸钠(0.01 mol·L⁻¹) 等量混合的溶液(pH 值为 2.8, 用 10% 磷酸调节)(21:79)。检测波长: 254 nm, 测定时间: 60 min。

2.2 对照品溶液制备

精密称定土的宁对照品, 置于容量瓶, 用甲醇溶解, 稀释至刻度线, 制成每 1 mL 含 0.004 mg 储备溶液, 即为对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

称取 1/4 处方量马钱子、红花、三七、续断等十味中药共 9 份, 每份质量为 66 g。按照表 2 进行正交试验, 采用加热回流提取的方法, 得乙醇提取液, 量取提取液体积, 取正交设计的 9 份提取液, 每份提取液记录体积, 滤过, 精密吸取续滤液 2 mL, 加入到容量瓶(10 mL)中, 加入甲醇溶液进行稀释, 至标准刻度, 混合均匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得到的续滤液, 作为供试品溶液。

2.4 阴性供试品溶液制备

取除去马钱子以外的其他中药, 按优选出的提取工艺提取制备阴性供试品, 再参照 2.3 项下方法制备, 备用。

2.5 线性范围考察

分别精密吸取土的宁对照品溶液(0.004 012 mg·mL⁻¹) 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 μL, 注入液相色谱器中, 测定色谱峰的峰面积, 分别以进样量为横坐标(X)、色谱峰面积为纵坐标(Y), 绘出对照品溶液标准曲线图, 得到回归方程为: $Y = 1\ 797.5X - 1.133\ 3$, $r = 0.999\ 9$ 。土的宁进样量在 0.010 03~0.060 18 μg 线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密吸取土的宁对照品溶液 10 μL, 重复 6 次进样, 测定土的宁的峰面积。土的宁 RSD 为 0.14%, 显示该方法精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批样品 6 份, 分别精密称定, 按上述 2.1 项下的色谱条件和 2.3 项下供试品溶液制备方法测定含量, 结果土的宁 RSD 为 0.98%, 显示此方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

选取 0、4、8、12、16、20、24 h 进样取同一 2.3 项下供试品溶液进行分析。结果表明: 土的宁

RSD为0.76%。说明在制备后24 h内供试品溶液的稳定性良好。

2.9 回收率试验

同一批样品(已知土的宁含量)精密称取0.1 g,依次精密加入一定量的土的宁对照品溶液,按2.3项下的方法操作,同时制备6份,按上述2.1项下色谱条件进行含量测定,计算样品回收率,土的宁平均回收率为99.75%,RSD为1.19%。

2.10 正交试验法

2.10.1 供试品溶液的含量测定 各精密吸取10 μ L供试品溶液、混合对照品溶液,测定土的宁含量,并计算土的宁提取量。土的宁对照品、土的宁正交提取9#供试品、阴性供试品溶液的色谱图见图1~3。

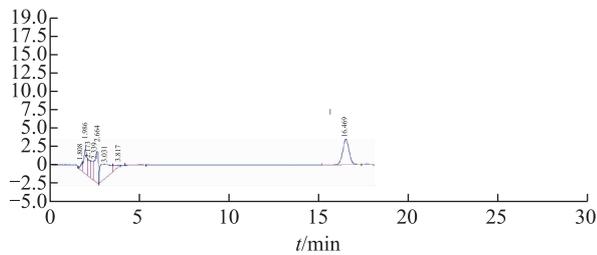


图1 土的宁对照品 HPLC 图

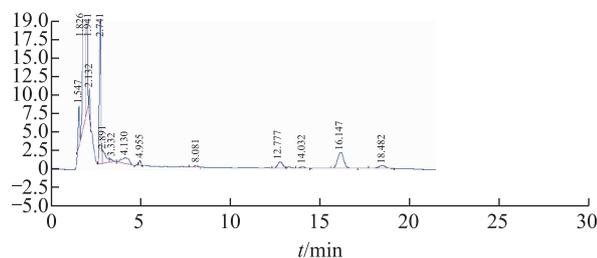


图2 9#伤科凝胶剂供试品溶液 HPLC 图

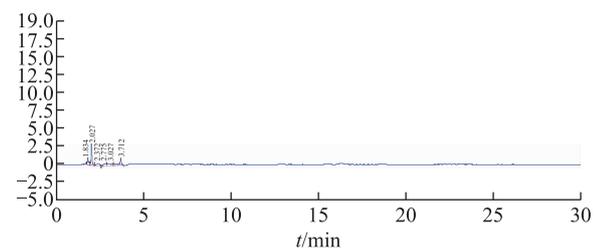


图3 缺的土的宁的阴性供试品溶液 HPLC 图

2.10.2 因素水平的确定与考察指标 方中马钱子主要含有的化学物质有马钱子碱、土的宁、豆甾醇苷、脂肪油、番木鳖苷、棕榈酸及绿原酸等^[6]。其中,生物碱既为其主要有效成分又为其毒性成分。王雪等^[7]的研究结果表明,马钱子碱和土的宁都是具有强烈毒性的物质,其中马钱子碱的毒性是土的

宁毒性的20倍;相关研究^[8-9]表明,口服5~10 mg 土的宁可出现中毒症状,口服30 mg左右可导致死亡。而在使用一定量的马钱子后不仅能导致药源性损伤,还能损害肾小管上皮细胞,继而诱发肾功能衰竭和尿毒症等。依据本方中各中药化学成分的性质,在乙醇中有较好的溶解度,故选择回流提取的方法。在单因素考察的基础上,以乙醇溶媒浓度(A)、溶媒量(B)、提取时间(C)、提取次数(D)为考察因素,以土的宁提取量和浸膏收率为指标,试验按照 $L_9(3^4)$ 正交表进行,提取工艺优选因素水平见表1。

表1 伤科凝胶剂提取工艺因素水平

水平	因素			
	A 溶媒浓度/%	B 溶媒量/倍	C 提取时间/h	D 提取次数
1	30	10、8、8	1	1
2	60	8、6、6	1.5	2
3	90	6、4、4	2	3

2.10.3 正交试验 称取1/4处方量马钱子、红花、三七、续断等十味中药共9份,每份质量为66 g。依据正交试验表2进行实验,进行回流提取,得乙醇提取液,量取提取液体积,测定提取液中土的宁含量,并计算土的宁提取量。以浸膏收率综合评分加权值为0.5,土的宁提取总量综合评分加权值为0.5,两者之和为综合评分,作为考察指标,结果见表2。方差分析见表3。

表2 伤科凝胶剂提取工艺正交表 $L_9(3^4)$ 试验设计及结果

序号	A	B	C	D	考察指标		综合评分
					浸膏收率/%	土的宁提取量/mg	
1	1	1	1	1	24.29	16.8	0.483
2	1	2	2	2	35.40	26.9	0.732
3	1	3	3	3	33.69	24.5	0.683
4	2	1	2	3	46.43	38.3	1.000
5	2	2	3	1	32.17	23.4	0.652
6	2	3	1	2	36.07	29.6	0.773
7	3	1	3	2	37.64	25.6	0.739
8	3	2	1	3	35.64	30.0	0.774
9	3	3	2	1	32.31	16.2	0.559
K_1	1.898 0	2.222 0	2.030 0	1.694 0			
K_2	2.425 0	2.158 0	2.291 0	2.244 0			
K_3	2.072 0	2.015 0	2.074 0	2.457 0			
\bar{K}_1	0.632 6	0.740 6	0.676 6	0.564 6			
\bar{K}_2	0.808 3	0.719 3	0.763 6	0.748 0			
\bar{K}_3	0.690 6	0.671 6	0.691 3	0.819 0			
R	0.175 6	0.069 0	0.087 0	0.254 3			

表3 伤科凝胶剂提取工艺方差分析表

变异来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	0.048 06	2	0.024 03	6.419	> 0.05
B	0.007 48	2	0.003 74	1.000	> 0.05
C	0.013 01	2	0.006 50	1.738	> 0.05
D	0.103 33	2	0.051 66	13.800	> 0.05
误差	0.007 48	2	0.003 74		
总计	0.171 91	8			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

2.11 实验结果

从方差分析结果看出,各因素影响均不显著。本实验的影响因素主次顺序为 $D > A > C > B$,经综合分析,确定其最佳提取工艺条件为 $A_2B_1C_2D_3$ 。即以60%乙醇为溶媒,提取3次,溶媒为10、8、8倍量,每次1.5 h。

2.12 验证实验

称取1/4处方量的处方中药3份,以10、8、8倍60%乙醇加热回流提取3次,每次1.5 h,合并提取液。得乙醇提取液,量取提取液体积,测定提取液中土的宁含量,并计算土的宁提取量,结果见表4。

表4 伤科凝胶剂提取工艺验证实验结果

序号	土的宁提取总量含量/mg	浸膏收率/%
1	39.437	47.00
2	39.132	46.90
3	38.489	47.30

根据验证结果,土的宁提取量和浸膏收率均略高于正交设计试验中的考察指标最高提取量,说明优选的提取工艺合理可行。

3 讨论

马钱子主要用于治疗类风湿关节炎、风湿关节炎、骨质增生、坐骨神经痛、痛风、骨关节炎、腰肌劳损等疾病,是痹症治疗的主要药物,临床上具有较高的应用价值^[10-11]。马钱子有效成分主要为总生物碱,其中70%~80%为马钱子碱和土的宁,主要作用于心血管系统、中枢系统、免疫系统^[12]。研究表明,马钱子碱(称布鲁生)和土的宁(番木鳖碱)又是马钱子的主要毒性成分。其作用机理为对脊髓后角细胞具有高度的选择性兴奋作用,进而使脊髓的运动性反射作用增强,促使感觉器官的敏感性增强,主要作用为延髓血管运动中枢及呼吸中枢的兴奋、骨骼

肌的紧张度增强,进而使大脑皮质感觉中枢的机能得到提高^[13],表现为强直性的惊厥,因而产生呼吸肌的抑制而致死。作为竞争性抑制甘氨酸受体的土的宁,可以阻断激活的甘氨酸受体,过度兴奋齿状回神经元使其产生惊厥。同时还具有阻止乙酰胆碱被胆碱酯酶破坏的作用,进而促进胃肠的蠕动,产生腹痛泻痢。另外,马钱子具有损害肾小管的上皮细胞的作用,进而破坏氨基酸代谢、脂质的代谢和糖酵解的过程,长期使用可损害人体肝肾功能^[14]。临床目前应用的马钱子多作为复方制剂,用于镇痛、抗炎作用多为马钱子有效成分及其单方外用制剂。

凝胶膏剂是指饮片细粉、提取物、化学药物和亲水性基质(相适宜的)混和均匀后,选择性地涂布于相适宜的背衬材料,进而制成的贴膏剂。复方马钱子凝胶膏剂是以卡波姆为基质,制成凝胶膏剂外用,用于治疗软组织炎症产生的疼痛损伤,具有良好的镇痛和抑制炎症作用^[15]。外用凝胶膏作为经皮给药的一种新型制剂,具有保湿性良好、载药量大、对皮肤无刺激及过敏反应、可反复粘贴、给药剂量可以控制,生产过程中对环境无污染等优点,符合中药大剂量、多组分的用药特点,是近年来研究经皮给药的复方中药新剂型的热点^[16]。

凝胶剂是一种极具发展潜力的新剂型。适用于皮肤、腔道及黏膜给药,可避免口服给药存在的首过效应,使药物不良反应减少,遵循“内病外治”的中医理念。同时具有使用方便、舒适、易于涂布、外形美观、不污染衣物、生物相容性好、透皮吸收好等多种优点。近年来,出现的新制药技术,如包合物凝胶制备技术、壳聚糖凝胶剂制备技术、脂质体凝胶制备技术等,使凝胶剂的应用范围扩大,而且多种新技术相结合,使凝胶剂质量更稳定、作用更持久,提高生物利用度,并具有皮肤靶向性作用。因此,凝胶膏剂作为一种新剂型,可制成不同的给药途径,正得到广泛的重视和应用。综上所述,实验中处方中药提取工艺考察,以处方中土的宁提取量和浸膏收率为指标,通过正交试验,确定处方中药最佳提取工艺为以10、8、8倍60%乙醇回流提取3次,每次1.5 h。结果表明,该提取工艺科学合理、稳定可靠,适合于伤科凝胶剂的工业化提取。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:1250.

- [2] 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,2015:47.
- [3] PRAT S,HOIZEY G,LEFRANCQ T,et al. An unusual case of strychninepoisoning[J]. J Forensic Sci,2015,60(3):816-817.
- [4] 王雅君,赵宗阁,肖新月. 国家药品标准物质标签及其说明书管理规范的建立与探讨[J]. 中国药事,2016,30(9):895-899.
- [5] 黄韶清,周玉淑,刘仁树. 现代急性中毒治疗学[M]. 北京:人民军医出版社,2002:354.
- [6] YUAN L M, ZI M, VERSATILE P A, et al. Two-phase solvent system for alkaloid separation by high-speed counter-current chromatography[J]. J Chromatogr A,2001,27(9):91-96.
- [7] 王雪,金朗,王炳强. HPLC法测定接骨丸中马钱子士的宁含量[J]. 河南中医,2016,36(6):1102-1104.
- [8] 耿琴,王丽. 固相微萃取-高效液相色谱联用测定马钱子中士的宁、马钱子碱含量[J]. 中国药师,2016,19(5):994-996.
- [9] 刘君. 马钱子传统炮制方法不同炮制品中士的宁和马钱子碱含量比较研究[J]. 医学信息,2017,30(12):108-109.
- [10] 梁晓东. 马钱子治疗痹症的研究进展[C]//中华中医药学会. 中华中医药学会第六次临床中药学学术年会暨临床中药学学科建设经验交流会论文集. 郑州:中华中医药学会,2013:563-566.
- [11] 张文华,莫成荣. 马钱子临床应用浅谈[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(6):76-77.
- [12] 解宝仙,唐文照,王晓静. 马钱子的化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学研究,2014,33(10):603-606.
- [13] 吴小娟,马凤森,郑高利,等. 马钱子喹啉类生物碱毒性研究进展[J]. 中药药理与临床,2016,32(6):231-235.
- [14] FAN Y F, LIU S F, CHEN X D, et al. Toxicological effects of Nux Vomica in rats urine and serum by means of clinical chemistry, histopathology and ¹HNMR-based metabonomics approach[J]. J Ethnopharmacol,2018,10(2):242-253.
- [15] 何凯. 复方马钱子凝胶镇痛及对IL-6、SP影响作用的研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2011.
- [16] 朱静娟. 马钱子凝胶膏的研制及对大鼠骨癌痛疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学,2017.

(收稿日期:2019-06-12 编辑:王笑辉)

(上接第88页)

定了砂仁提取物的混合工艺条件,确保最终产品中各组分分布的均匀性,实现药品均一性,同时可实现砂仁水提浸膏粉与挥发油包合物混合的在线均匀度检测,提高药品质量的可控性。

随着分析仪器的不断改进、计算机的快速发展以及数据处理方法的应用,近红外光谱凭借其独特的优势,发展成为了一门独立的分析技术,广泛应用于各个领域。近红外光谱分析技术在制药过程主要环节也均有应用研究,包括原料药的质量控制、化学反应过程监测、制剂过程监测等^[6-8]。而其中药配方颗粒领域应用还鲜有报道,本研究将近红外光谱分析技术应用于配方颗粒制备过程中混合工艺的质量控制,为今后近红外光谱技术在配方颗粒领域的应用提供参考,对提高配方颗粒生产以及质量控制效率具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] 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,2015:253.
- [2] 陆山红,赵荣华,么晨,等. 砂仁的化学及药理研究进展[J]. 中药药理与临床,2016,32(1):227-230.
- [3] 徐广通,袁洪福,陆婉珍,等. 现代近红外光谱技术及应用进展[J]. 光谱学与光谱分析,2000,20(2):134-142.
- [4] 王耀鹏,顾志荣,孙宇靖,等. 近红外光谱快速定量技术在中药分析中的最新应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):223-226.
- [5] 刘丽萍,陈向东,朱德全. NIRS技术应用于赤芍配方颗粒多指标成分的快速测定[J]. 湖南中医杂志,2018,34(4):145-149.
- [6] 曲佳,陈卓,刘小瑞,等. 近红外光谱法快速鉴别不同厂家的补肾强身片[J]. 天津药学,2018,30(3):11-16.
- [7] 战皓,柳梦婷,方婧,等. 近红外分析技术在中药鉴定和含量测定中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(12):231-234.
- [8] 匡艳辉,唐海娇,王德勤,等. 基于近红外光谱判定复方丹参片生产过程中冰片的混合均匀性[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):7-11.

(收稿日期:2018-12-27 编辑:王笑辉)