

正交设计法研究补肾壮骨胶囊醇提工艺

王虎¹, 陈华庭¹, 郑菁² (1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022; 2. 武汉大学药学院 2001 届, 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 优选补肾壮骨胶囊醇提工艺的最佳条件。方法 用正交设计法以补骨脂素含量、异补骨脂素的含量为指标对醇提工艺进行筛选。结果 优选出补肾壮骨胶囊醇提工艺, 重复试验结果满意。结论 补肾壮骨胶囊醇提工艺的最佳条件为 A₁B₂C₂D₂, 即加 10 倍量 60% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次提取 60 min。

关键词: 补肾壮骨胶囊; 正交试验法; 补骨脂素; 异补骨脂素

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2003)06-0471-03

Optimization of alcohol processing technology of Bushen Zhuanggu capsule by orthogonal experimental design

WANG Hu¹, CHEN Hua-ting¹, ZHENG Jing² (1. Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Pharmacy, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the optimum alcohol-processing conditions of Bushen Zhuanggu capsule. **METHOD** The extraction process was studied by orthogonal design with the extract yield of psoralen and isopsoralen as detective markers. **RESULTS** Optimum the alcohol-processing conditions of Bushen Zhuanggu capsule and satisfactory result of repeated examination were obtained. **CONCLUSION** A₁B₂C₂D₂ is the best processing condition, which is as follows: adding 10 times a amount of 60% alcohol and refluxing two times, 60 min each time.

KEY WORDS: Bushen Zhuanggu capsule; orthogonal design; psoralen; isopsoralen

补肾壮骨胶囊是以华中科技大学同济医学院附属协和医院自制制剂补肾密骨液(1998 年获湖北省科技进步三等奖)为基础开发研制的一种纯中药复方制剂。方中含有淫羊藿、黄芪、补骨脂、牛膝等多味中药,具有补肾填精、健脾生髓的功效。主要用于治疗原发性骨质疏松症,临床疗效显著。

据报道,补骨脂中主要含有香豆素和黄酮类成分^[1],脂溶性较强,适于乙醇回流提取。亦有药理实验研究证实,牛膝的醇提物具有促成骨样细胞增殖的作用^[2]。因此处方中的补骨脂、牛膝药材选用醇提工艺,采用可能影响提取效果的因素:乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数进行条件筛选,设计了四因素三水平的 L₉(3⁴) 正交试验,为制备工艺的确立提供了科学的实验依据。

1 仪器与药品

1.1 实验设备

美国 Waters 510 泵、Waters 484 检测器、Baseline 810 处理器;Zorbax ODS 色谱柱(5μm, 4.6mm × 250mm)

1.2 补骨脂素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0739-9907),异补骨脂素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:0738-9605);甲醇(分析纯,上海建新试剂厂),甲醇(一

级色谱纯,邯郸市四友医学生物技术有限公司);95% 医用乙醇(武汉医药股份有限公司酒精分装厂)。所用药材购自武汉中药饮片厂。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

以补骨脂和异补骨脂的含量为指标,确定提取溶剂(乙醇)浓度、溶媒用量、提取时间及提取次数为试验因素,每个因素备选了三个水平。

表 1 正交试验因素水平表

Tab 1 Table of orthogonal factors and levels

水平	因素			
	A 乙醇浓度 (%)	B 乙醇用量 (倍数)	C 提取时间 (min)	D 提取次数
1	60%	8	30	1
2	70%	10	60	2
3	80%	12	90	3

利用 L₉(3⁴) 正交表安排试验,每次水平试验均重复制备 3 次,试验基本方法为:按处方量的 1/5 称取补骨脂和牛膝各 24g,共 27 份,置于 1 000 mL 圆底烧瓶中,按各因素水平的要

作者简介:王虎,33 岁,主管药师。湖北中医学院药学院天然药物化学硕士研究生,现在华中科技大学附属协和医院药剂科从事中药新药研究与开发工作。电话:027-85726073, E-mail: whlzhjwh@sohu.com

求分别进行醇提处理,乙醇提取液过滤,滤液回收乙醇至尽并浓缩至稠浸膏后,置于真空干燥箱中 80℃减压干燥得干浸膏,称重,刮取干浸膏,研磨成细粉,置干燥箱中保存备用。

2.2 补骨脂素、异补骨脂素含量的测定

2.2.1 HPLC 色谱条件 流动相为甲醇-水(45:55);检测波长 245nm;柱温 35℃;流速 1.0mL/min。此条件下样品中补骨脂素与异补骨脂素色谱峰达到基线分离,补骨脂素保留时间为 13.76min,异补骨脂素保留时间为 16.08min。(见图 1)

2.2.2 线性关系的考察 精密称取补骨脂素对照品及异补骨脂素对照品各约 9mg,置于同一 100mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品溶液 A;精密吸取对照品溶液 A 各 3,6,9,12,15mL 于 25mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,依次进样,记录峰面积。以峰面积 X 对对照品进样量 Y(μg) 进行回归处理,得回归方程:补骨脂素: $y = 1.264 \times 10^{-7}x - 7.713 \times 10^{-4}$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), 线性范围为 0.216 μg ~1.08 μg ;异补骨脂素: $y = 1.313 \times 10^{-7}x - 3.008 \times 10^{-4}$, $r = 0.9998$ ($n = 5$), 线性范围为 0.228 μg ~1.14 μg 。

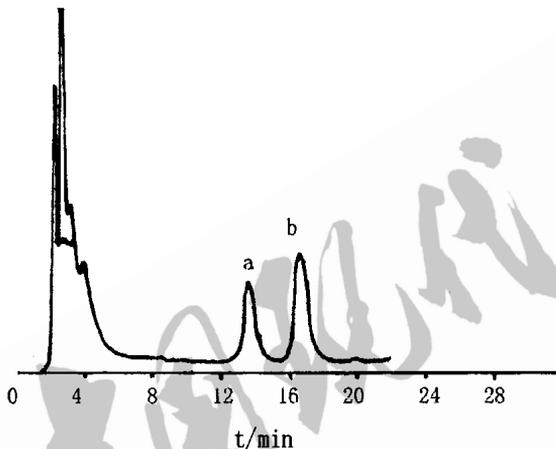


图 1 补骨脂素及异补骨脂素对照品 HPLC 谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of psoralen and isopsoralen
a. 补骨脂素对照品; b. 异补骨脂素对照品
a. psoralen; b. isopsoralen

2.2.3 样品液的制备 精密称取各工艺下的干浸膏粉各 3 份,每份约 0.5g,置 100mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声提取 30min,放冷至室温,加甲醇补足至刻度,滤过,取续滤液 1mL 于 10mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得样品液。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取样品溶液 20 μL 按上述色谱条件试验,结果补骨脂素的 $RSD = 0.71\%$ ($n = 5$),异补骨脂素的 $RSD = 2.28\%$ ($n = 5$)。

2.2.5 精密度试验 分别精密吸取同一样品溶液 20 μL 按上述色谱条件试验,连续测定 5 次,补骨脂素与异补骨脂素峰面积积分值的 RSD 分别为 1.54% 和 2.36%。

2.2.6 重现性考察 对同一批正交试验样品,按上述色谱条件,从取样开始,平行重复测定 3 次,补骨脂素总量的平均值为 81.67mg, RSD 为 3.19%;异补骨脂素总量的平均值为 118.24mg, RSD 为 2.42%。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品适量,分别精密加入一定量的补骨脂素、异补骨脂素对照品(加入

的补骨脂素与异补骨脂素对照品的总量与供试品中补骨脂素与异补骨脂素的总量基本相当),按样品供试液的制备方法进行处理,依法测定其含量并计算其回收率:补骨脂素对照品平均回收率为 99.8%, $RSD = 1.47\%$;异补骨脂素对照品平均回收率为 99.6%, $RSD = 1.63\%$ ($n = 5$)。

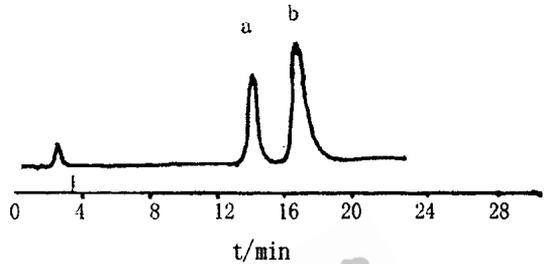


图 2 补肾壮骨胶囊 HPLC 谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of Bushen-zhuanggu capsule
a. 补骨脂素; b. 异补骨脂素
a. psoralen; b. isopsoralen

2.2.8 样品液的含量测定 精密吸取上述各工艺所制样品液 20 μL 进样,在上述色谱条件下分别测定补骨脂素及异补骨脂素的含量,再计算干浸膏粉中补骨脂素、异补骨脂素的总量。样品的高效液相色谱图见图 2。

2.3 实验结果分析

表 2 正交实验结果分析

Tab 2 Arelsis of the results of orthogonal test

实验号	A	B	C	D	补骨脂素 总量均值 (mg)	异补骨脂 素总量均 值(mg)	综合分 (mg)
1	1	1	1	1	37.73	50.23	87.96
2	1	2	2	2	89.28	122.53	211.81
3	1	3	3	3	81.67	118.34	200.01
4	2	1	2	3	63.20	78.64	141.84
5	2	2	3	1	61.21	62.13	123.34
6	2	3	1	2	68.27	74.61	142.88
7	3	1	3	2	53.99	50.13	104.12
8	3	2	1	3	59.06	54.46	113.63
9	3	3	2	1	40.72	33.24	73.96
I_j	499.78	333.92	344.47	285.26			
II_j	408.06	448.78	427.61	458.81			
III_j	291.71	416.85	427.47	455.48			
R_j	208.07	114.86	83.14	173.55			

表 3 试验结果分析

Tab 3 Variance analysis of experimental result

方差来源	平方和	自由度	均方	F	因素影响
A	7249.23	2	3624.62	42.55	**
B	2343.31	2	1171.66	13.75	**
C	1533.48	2	766.74	9.00	**
D	6562.28	2	3283.64	38.54	**
误差	1533.485	18	85.19		

$F_{0.05(2,18)} = 3.55$ $F_{0.01(2,18)} = 6.01$

从表 2 得知,以补骨脂素、异补骨脂素总量为综合评定指标时,A、D 因素影响较 B、C 因素显著,尤以 A 因素为最 ($R_A > R_D > R_B > R_C$)。

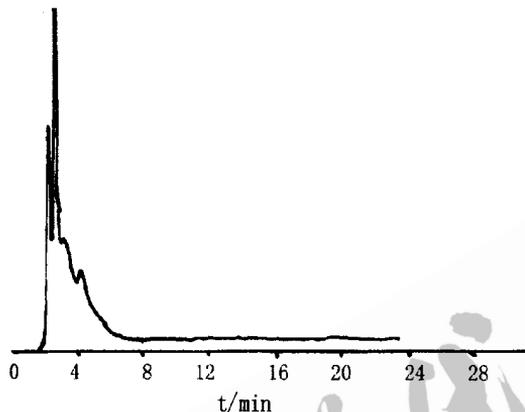


图 3 补肾壮骨胶囊阴性对照品 HPLC 谱图

Fig 3 Chromatogram of Bushen-zhuanggu capsule without psoralen and isopsoralen

综上所述,以补骨脂素、异补骨脂素总量为指标时,最佳提取工艺为 $A_1 B_2 C_2 D_2$,即加 10 倍量 60% 浓度乙醇,回流提取 2 次,每次 60 min。

3 讨论

3.1 曾经以氯仿、乙醇、甲醇作为提取溶剂超声制备样品溶液进行 HPLC 分析。结果显示:氯仿提取液的杂质较多,补骨脂素与异补骨脂素的分离效果不佳,而乙醇提取液虽然分离效果较好,但在相同条件下其提取不完全,甲醇提取液不仅提取效率高,而且杂质少,补骨脂素与异补骨脂素的分离度亦达到 1.5,故最终选用甲醇作为提取溶液。

3.2 补骨脂素和异补骨脂素的对照品溶液在 190 ~ 400 nm

波长范围内进行光谱扫描,结果表明补骨脂素和异补骨脂素在 245.6 nm 处有最大吸收,最终确定其检测波长为 245 nm。

3.3 补骨脂和异补骨脂素为同分异构体,理化性质颇为相似,较难分离,现在多以不同比例的甲醇/水为流动相进行分离^[3-5],通过试验可发现水的比例增加,可使分离度增大,但保留时间亦延长。为此,选择甲醇:水(45:55)的配比,同时提高柱温到 35℃,流速 1.0 mL/min,测定可在 20 min 以内完成。

3.4 在本实验所选定的色谱条件下,制备补骨脂阴性对照液,依照上述方法操作,记录色谱图,见图 3。在补骨脂素与异补骨脂素相应出峰的位置无其他成分干扰。

参考文献

- [1] 吕娟,林东海,李仲然,等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,1996,13(3):220.
- [2] 高晓燕,王道维,李发玫,等. 牛膝提取物对成骨样细胞增殖的作用[J]. 沈阳药科大学学报,2000,17(3):210.
- [3] 陈玉敏,刘玉. 高效液相色谱法测定壮骨关节丸中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 药物分析杂志,1999,19(6):391.
- [4] 方子季,季松刚,林静,等. 白苻中补骨脂素和异补骨脂素的 HPLC 测定[J]. 中草药,1999,30(9):665.
- [5] 方子季. 高效液相法测定片剂中补骨脂素和异补骨脂素含量[J]. 中国医院药学杂志,1998,18(11):501.
- [6] 吕圭源. 中药新产品开发学. 北京:人民卫生出版社,1997.

收稿日期:2002-06-06