

正交法优选复方骨碎补接骨片提取工艺的研究

陶德林(慈溪市第三人民医院, 浙江 慈溪 315324)

摘要: 目的 筛选复方骨碎补接骨片的提取工艺。方法 以提取时间、溶剂量、提取次数、药材粒度为可变因素, 选用 $L_9(3^4)$ 表进行试验。结果 最佳提取工艺为将药材混匀粉碎, 过 20 目筛, 用 10 倍量水提取 2 次, 每次 1 h。结论 该提取工艺经济、可行。

关键词: 复方骨碎补接骨片; 高效液相色谱法; 提取工艺; 正交试验

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2010)05-0409-03

Optimum Extraction on Compound Gusuibujiegu Tablet by Orthogonal Design

TAO Delin (Third Cixi City People's Hospital, Cixi 315324, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select the best extraction process of compound Gusuibujiegu tablet. **METHODS** The time of extract, amount of solvent, times of extract and raw material for medicine granularity were choosed as variable factors. Orthogonal design method $L_9(3^4)$ was used. **RESULTS** The optimum extraction was to smach the mixed raw material and pass through 20 mesh sieve, then extract twice with 10 times as much water, 1 h for each time, 20 items have sieved, withdraws with 10 times of quantity water 2 times, each time 1 h. **CONCLUSION** This method is simple, accurate and controllable.

KEY WORDS: compound Gusuibujiegu tablet; HPLC; extraction; orthogonal design method

我院骨伤专科临床多年使用的协定处方复方骨碎补接骨片在临床治疗中取得较好的疗效, 由于全药材粉入药服用剂量过大限制了临床应用范围, 为方便临床用药需求, 现将其开发成全浸膏片, 以减少服用剂量, 增加患者的顺应性。本试验以柚皮苷含量、浸膏得率为考察指标, 采用正交法试验法考察了不同提取时间、溶剂量、提取次数、药材粒度对考察指标的影响, 以确定优选复方骨碎补接骨片的最佳提取工艺, 为进一步制剂工艺研究奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-20A 色谱仪(日本岛津仪器公司); AE-241 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品); KQ-100DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

柚皮苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 10722-200309, 纯度 >98%); 纯净水(浙江杭州娃哈哈集团有限公司), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 提取溶媒的选择

复方骨碎补接骨片是由骨碎补、续断、三七、木通等药材组成, 其中活性作用比较明确有骨碎补总黄酮、川续断皂苷、木通皂苷、三七皂苷、微量元素等成分, 经查阅文献[1]并进行多次预试验, 确定在不违背中药传统提取工艺的前提下, 为充分提高药材的生物提出利用率, 本品直接采用水作为溶媒进行提取, 具体提取条件采用正交试验方法进行优选。

2.2 正交试验设计

根据实验预试结果和文献[1], 确定以浸膏得率和柚皮苷得率为考察指标, 以提取时间(A)、溶剂

作者简介: 陶德林, 男, 主管中药师 Tel: (0574)63321236 E-mail: suiyijiuba@163.com

量(B)、提取次数(C)、药材粒度(D)为可变因素,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验表。见表1。

表1 正交试验因素水平表

Tab 1 Design for factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A提取时间/h	B溶剂量	C提取次数/次	D药材粒度/目
1	1	8倍量	1	10
2	1.5	10倍量	2	20
3	2	12倍量	3	30

2.3 柚皮苷含量测定

参考中国药典2005年版I部骨碎补药材项下的柚皮苷的含量测定方法与文献[2],采用高效液相色谱法测定样品中柚皮苷的含量,测定方法经验证可行。

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品适量,用甲醇溶解并制成浓度约为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液即得。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取样品细粉约0.5 g,置50 mL量瓶中,加甲醇30 mL超声溶解后,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液即得。

2.3.3 色谱条件与测定方法 安捷伦 ZORBAX 80Å Extend- C_{18} 柱(4.6 m $\times$ 150 mm, 5 μm);以甲醇-6%醋酸水(26:74)为流动相;检测波长:283 nm;流速:1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。理论板数按柚皮苷峰计算应不低于3 000。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各20 μL ,注入液相色谱仪,测定并计算柚皮苷含量。

3 结果

分别按处方量称取9份复方骨碎补接骨片中骨碎补、续断、三七等药材,合计每份总重90 g,照 $L_9(3^4)$ 正交表设计安排试验,用相应目数粉碎后,加水浸泡1 h后,回流提取,滤过,合并提取液,浓缩至近干,移置真空干燥箱中,85 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥48 h,取出,称重。结果见表2~表4。

由表中数据直观和方差分析可知,对于样品中柚皮苷提取得率来说,C、D因素对实验均具有显著影响,影响因素依次为D>C>A>B;对于样品中提出物重来说,B、C、D因素对实验均具有显著影响,影响因素依次为B>D>C>A。

综合实验结果,并考虑到能耗和实际操作问题,确定提取工艺为: $A_1B_2C_2D_2$,即将药材混匀粉碎,过20目筛,用10倍量水提取2次,每次1 h。

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal test

试验号	因素				柚皮苷量/ mg	浸膏量/g
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	1.37	13.21
2	1	2	2	2	4.68	20.89
3	1	3	3	3	5.12	28.54
4	2	1	2	3	5.00	17.89
5	2	2	3	1	1.34	25.13
6	2	3	1	2	2.55	18.83
7	3	1	3	2	3.10	14.64
8	3	2	1	3	2.66	27.54
9	3	3	2	1	1.88	21.35
K_1	62.64	45.74	59.58	59.69		
K_2	61.85	73.56	60.13	54.36		
K_3	63.53	68.72	68.31	73.97		
R	0.56	9.27	2.91	6.54		
K_1	11.17	9.46	6.57	4.59		
K_2	8.89	8.68	11.56	10.32		
K_3	7.64	9.55	9.56	12.78		
R	1.18	0.29	1.66	2.73		

表3 方差分析表(柚皮苷量)

Tab 3 Variance analysis of orthogonal test (naringin volume)

方差来源	A	B	C	D
离差平方和	2.14	0.15	4.21	11.77
自由度	2.00	2.00	2.00	2.00
均方(MS)	1.07	0.08	2.11	5.88
F值	13.93	1.00	27.45	76.71

注: $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.01}(2, 2)=99$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.01}(2, 2)=99$

表4 方差分析表(浸膏量)

Tab 4 Variance analysis of orthogonal test (extract volume)

方差来源	A	B	C	D
离差平方和	0.47	147.27	15.94	68.54
自由度	2.00	2.00	2.00	2.00
均方(MS)	0.24	73.64	7.97	34.27
F值	1.00	312.71	33.84	145.54

注: $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.01}(2, 2)=99$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19$; $F_{0.01}(2, 2)=99$

按上述确定的最佳提取工艺,分别按20倍处方量称取3份本品中各药材,合计每份总重1.8 kg,试验结果表明该提取工艺下,柚皮苷提取得率高,浸膏量高。且3批数据接近,工艺稳定可行。

4 讨论

复方骨碎补接骨片是由骨碎补、续断、三七等

十多味中药组成,临床上用于治疗骨折后中后期治疗,有较好和营接骨的功效。骨碎补是复方骨碎补接骨片中主要药味之一,其干重占总配方药材干重的1/9,始载于《本草拾遗》,为历代常用中药,具有补肾强骨、续伤止痛等功效。其为水龙骨科植物槲蕨*Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎。骨碎补的活性成分为柚皮苷等二氢黄酮类化合物。现代研究表明,骨碎补具有调节血脂、降低氨基糖苷类抗生素的毒性和促进骨吸收等作用。骨碎补总黄酮可增加患者的骨密度和改善骨生物力学指标,并可提高患者血中钙的含量,提高血及骨质中的碱性磷酸酶水平,促进骨的生成^[3]。因此采用骨碎补主要活性成分柚皮苷提取得率与全药材浸膏得率作为指标,能客观地考察药材提取工艺的可行性。

通过制备缺骨碎补样品,按拟订的柚皮苷含量测定方法进行阴性干扰试验,结果表明,本品处方中其他药材中不含柚皮苷,阴性空白不干扰测定。

对柚皮苷含量测定方法进行了方法学验证:线性试验结果表明在柚皮苷浓度0.42~5.82 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

内,柚皮苷浓度与峰面积具有良好的线性(线性方程为 $A=78\ 156C+304$, $r=0.999\ 9$)。精密度试验(RSD为0.7%)、重复性试验(RSD为1.4%)表明该含量测定方法精密度高,准确度高。稳定性试验表明在8 h内对照品溶液与供试品溶液均基本稳定。加样回收率试验表明其平均回收率为99.9%, RSD为1.0%,本方法加样回收率良好。复方骨碎补接骨片是在临床应用多年的全粉制剂基础改成全浸膏制剂,本试验为本品提取工艺条件提供了优化依据。

REFERENCES

- [1] ZHANG L, YANG Z L. Comparative study on effects to total flavonoids of drynariae by aqueous extraction and alcohol extraction [J]. Jiangsu Pharm Clin Res (江苏药学与临床研究), 2004, 12(3): 30-31.
- [2] WEI Y J, CHEN N, WANG J, et al. Optimum extraction on *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. by orthogonal design [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2004, 15(11): 750-751.
- [3] WANG Y, LIU Y, YAO G, et al. Study on the determination and extraction of Rhizoma Drynariac [J]. China Pharm (中国药业), 2007, 16(6): 63.

收稿日期: 2009-02-16