

接骨止痛片醇提取工艺优选

易延遼, 邓虹珠, 于洋

(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的:探讨接骨止痛片中骨碎补、续断、红花、土鳖虫醇提取工艺。方法:采用正交试验法,对接骨止痛片主要成分的醇提取条件进行优选。以醇浸膏得率,柚皮苷提取量为考查指标,对乙醇体积分数、加醇量、提取时间进行了优选。结果:最佳醇提取工艺为药材加 80% 乙醇回流提取 2 次,第 1 次加 6 倍量提取 2 h,第 2 次加 5 倍量提取 1.5 h。结论:接骨止痛片的醇提工艺合理,稳定。

[关键词] 接骨止痛片;醇提工艺;正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0042-03

Optimization of Extraction Technology for Jiegu Zhitong Tablet

YI Yan-kui, DENG Hong-zhu, YU Yang

(College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate alcohol extraction technology of *Drynaria fortunei*, *Radix dipsaci*, *Flos carthami*, *Eupolyphaga seu steleophaga* from Jiegu Zhitong tablet. **Method:** Orthogonal method was used to optimize alcohol extraction conditions of main ingredients from Jiegu Zhitong tablet. Took yield of alcohol extracts, extraction of naringin as indexes to optimize ethanol concentration, alcohol volume, extraction time. **Result:** Optimum extraction technology was as follows: reflux extracted 2 times with 80% ethanol, the first time extracted 2 h with 6 times the amount of 80% ethanol, then extracted 1.5 h with 5 times in second time. **Conclusion:** The extraction technology of Jiegu Zhitong tablet was stable and feasible.

[Key words] Jiegu Zhitong tablet; alcohol extraction technology; orthogonal experiment

接骨止痛片处方由《外科十三方考》中接骨散化裁而来,主要由骨碎补、续断等组成,功能活血止痛、去瘀生新。用于跌打损伤,筋骨瘀血肿痛,风湿麻木。接骨止痛片中骨碎补为本品处方中君药,其主要成分为以柚皮苷为代表的黄酮类成分;续断主含多种苷类成分;红花主含红花苷等苷类成分;土鳖虫主含甾醇类成分^[1]。骨碎补、红花、半枝莲、土鳖虫中醇提物与本品功能主治密切相关,故拟进行醇提取,并对其醇提取工艺进行了研究。

1 材料

骨碎补、续断、红花、土鳖虫药材购自广东省药材公司,柚皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号 110721-100512),乙醇为医用乙醇,乙

腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪,伊利特 C₁₈ 色谱柱(HYPERSILBDS 5.0 mm × 200 mm, 5 μm)。

2 方法与结果

2.1 柚皮苷含量测定^[2-4]

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-醋酸-水(35:4:65)流动相,检测波长 283 nm。理论板数按柚皮苷峰计算应不低于 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取在 110 ℃ 干燥至恒重的柚皮苷对照品 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀;精密量取 3 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每 1 mL 中含柚皮苷 60 μg)。

2.1.3 供试品溶液的制备 取样品溶液 2 mL,加甲醇 8 mL,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性溶液的制备 除骨碎补外其他 3 种药

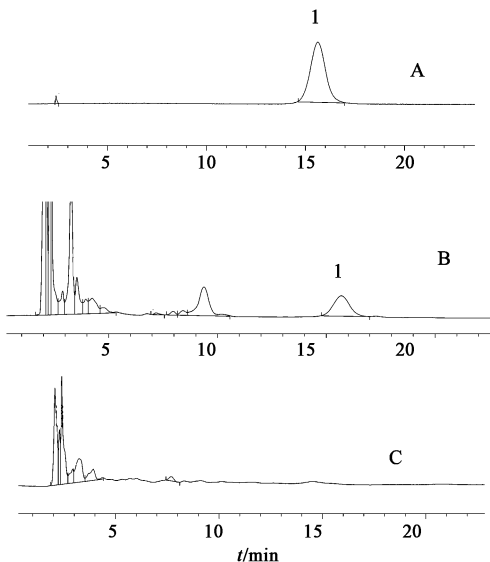
[收稿日期] 20110422(013)

[第一作者] 易延遼,博士,讲师,从事药物新剂型新技术研究,
Tel:020-61648263, E-mail: dareyyk@sina.com

材加 80% 乙醇回流提取 2 次,第 1 次加 6 倍量提取 2 h,第 2 次加 5 倍量提取 1.5 h。合并溶液,滤过,取续滤液,即得。

2.1.5 线性关系考查 精密吸取 $54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柚皮苷对照品溶液 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 μL 注入液相色谱仪,测定其峰面积积分值,以进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,其回归方程为 $Y = 71.439X + 46.013$ ($r = 0.9972$),结果表明柚皮苷在 0.135 ~ 1.620 μg 具有良好的线性关系。

2.1.6 测定法 照高效液相色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI D)。分别精密吸取标准品溶液与供试品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,测定。见图 1。



1 对照品;B. 样品;C. 阴性样品;1. 柚皮苷

图 1 接骨止痛片 HPLC

2.2 吸醇率的考察 按处方比例称取骨碎补、续断、红花、土鳖虫 3 批,分别加入 5 倍量的 65% 乙醇,浸泡 24 h,过滤,量取滤液体积,按下式计算出吸醇率,结果平均吸醇率 91.7%,RSD 3.15%。

$$\text{吸醇率} = (\text{乙醇加入量} - \text{滤液量}) / \text{药材量} \times 100\%$$

2.3 提取次数的选择 按处方配比称取药材,第 1 次加 6 倍量 65% 乙醇提取 2 h,第 2 次加 5 倍量 65% 乙醇提取 1.5 h,第 3 次加 5 倍量 65% 乙醇提取 1.5 h,共回流提取 3 次,分别滤过,浓缩,定容至 200 mL。分别测定第 1,2,3 次的醇浸膏得率及柚皮苷提取量,结果见表 1。

试验结果表明,以浸膏得率为指标,第 3 次醇提所占比例为 9.86%;以柚皮苷提取量为考查指标,第 3 次醇提所占比例均小于 10%;说明 2 次醇提已基本提取完全,故采用了醇提 2 次的工艺。

表 1 接骨止痛片醇提次数的考察

| 指标 | 提取次数 | | | 第 3 次所占比例 ¹⁾ /% |
|---------|-------|-------|-------|----------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 醇浸膏得率/% | 9.552 | 3.618 | 0.907 | 6.45 |
| | 8.612 | 4.904 | 2.057 | 13.21 |
| | 9.835 | 4.233 | 1.534 | 9.83 |
| 柚皮苷/mg | 84.77 | 64.73 | 0 | 0 |
| | 86.18 | 60.87 | 9.74 | 6.21 |
| | 87.14 | 70.65 | 0 | 0 |

注: ¹⁾ 指第 3 次醇提取占总醇浸膏量,柚皮苷总提取量的比例。

2.4 正交试验优选醇提工艺 以醇浸膏得率,柚皮苷提取量为考查指标,采用正交试验对乙醇体积分数、加醇量、提取时间进行了探讨。因素水平见表 2。用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,按处方配比称取药材,粉碎成最粗粉,按设定方案进行提取,滤过,滤液合并,浓缩,定容至 300 mL。醇浸膏得率及柚皮苷提取量方法同 2.3 方法。正交试验及结果见表 3,方差分析见表 4,5。

表 2 接骨止痛片醇提工艺正交试验因素水平

| 水平 | A 乙醇体积分数 | B 加醇量 | C 提取时间 |
|----|----------|-------|---------|
| | /% | /倍 | /h |
| 1 | 90 | 7,6 | 2.5,2.0 |
| 2 | 80 | 6,5 | 2.0,1.5 |
| 3 | 70 | 5,4 | 1.5,1.0 |

2 项指标考察结果 A_1 与 A_2 、 B_1 与 B_2 、 C_1 与 C_2 数据均接近,但从大生产中节能省时考虑,宜选择 A_2 、 B_2 、 C_2 ,选择 $A_2B_2C_2$ 组合为优选工艺,即药材加 80% 乙醇回流提取 2 次,第 1 次加 6 倍量提取 2 h,第 2 次加 5 倍量提取 1.5 h。

2.4.4 验证试验 按处方配比称取药材,共 3 份,分别按 $A_2B_2C_2$ 提取,考察浸膏得率分别为 27.88%, 28.00%, 26.97%;柚皮苷的提取量为 162.99, 162.54, 161.49 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,说明工艺基本合理。

3 讨论

接骨止痛片中,骨碎补中最能体现其特征的成分是黄酮类化合物,其中新北美圣草苷和柚皮苷的量较高,是骨碎补主要成分^[5-9]。续断主要含有三萜皂苷、生物碱、环烯醚萜、挥发油等类成分^[10]。红花活血的有效成分主要为红花黄色素 A (Safflower yellow 2A)。红花黄色素 A 为含有多种成分的查耳酮类化合物,有较强药理活性^[11]。土鳖虫具有散

表 3 接骨止痛片醇提工艺正交试验安排

| No. | A | B | C | D | 浸膏得率 /% | 柚皮苷提取 总量/mg |
|-------------|------------------|--------|--------|--------|------------|----------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 23.84 | 161.55 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 11.66 | 160.45 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 17.89 | 144.51 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 9.69 | 166.47 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 18.04 | 158.00 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 21.17 | 156.37 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 17.83 | 148.53 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 15.32 | 158.78 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 20.54 | 161.55 |
| 浸膏得率 /% | I _j | 65.18 | 63.75 | 67.20 | 62.24 | |
| | II _j | 61.29 | 63.68 | 66.07 | 62.45 | |
| | III _j | 60.56 | 59.60 | 53.76 | 62.16 | |
| | R | 4.62 | 4.15 | 13.44 | 0.29 | |
| 柚皮苷提取 /% | I _j | 466.51 | 476.55 | 476.7 | 481.1 | |
| | II _j | 482.84 | 477.23 | 488.47 | 465.35 | |
| | III _j | 468.86 | 462.43 | 451.04 | 469.76 | |
| | R | 5.40 | 4.93 | 12.48 | 5.25 | |

表 4 浸膏得率方差分析

| 方差来源 | SS | f | MS | F | P |
|-------|----------|---|----------|----------|-------|
| A | 4.112 28 | 2 | 2.056 1 | 242.53 | <0.01 |
| B | 3.763 8 | 2 | 1.881 9 | 221.98 | <0.01 |
| C | 37.049 6 | 2 | 18.524 8 | 2 185.10 | <0.01 |
| D(误差) | 0.016 9 | 2 | 0.008 5 | | |

注: $F_{0.01}(2,2) = 99.0$, $F_{0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{0.10}(2,2) = 9.0$ (表 5 同)。

表 5 柚皮苷提取量方差分析

| 方差来源 | SS | f | MS | F | P |
|-------|---------|---|-------|-------|-------|
| A | 39.377 | 2 | 0.895 | 0.895 | <0.01 |
| B | 46.542 | 2 | 1.057 | 1.057 | <0.01 |
| C | 244.219 | 2 | 5.549 | 5.549 | <0.01 |
| D(误差) | 44.012 | 2 | 1.000 | | |

血瘀、接骨续筋、消肿止痛、下乳通经等功效^[12]。现代研究表明土鳖虫具有溶解血栓、抗凝血、抗肿瘤、促进骨折愈合、调节血脂、抗突变、耐缺氧等十分广泛的药理作用,但是目前得到明确鉴定的有效活性成分并不多,许多活性成分尚待确定^[13]。选择醇提法提取对于有效成分的提取是最合适的。

[参考文献]

[1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1997:10.

[2] 张慕群,格小光,杨京玉,等. 骨胶胶囊质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,9(12):31.

[3] 全红,郭春秋,曲倩文,等. 骨碎补提取工艺的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(12):16.

[4] 张萍,吴月国,刘骅. 健脾消食颗粒提取工艺的研究[J]. 中国现代应用药学,2009(5):375.

[5] 李顺祥,龙勉,张志光. 骨碎补的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2009,9(11):75.

[6] 李顺祥,龙勉,张志光. 不同产地骨碎补的柚皮苷测定[J]. 中南药学,2003,1(2):103.

[7] 李顺祥,张志光,龙勉,等. 骨碎补超微饮片的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2005,36(11):1634.

[8] 徐传河,杨松松. 中药骨碎补化学成分研究(一). 榭蕨根茎化学成分研究[J]. 辽宁中医学院学报,1984,1(1):49.

[9] Li F, Meng Z, Xiong Y, et al. Stimulative activity of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. Extracts and two of its flavonoids on the proliferation of osteoblastic like cells [J]. Pharmazie, 2006, 61:962.

[10] 钟美英,申玉华. 川续断的研究现状[J]. 中医药导报,2008,14(6):137.

[11] 蔡薇,黄罗生,金雪锋,等. 红花提取工艺探讨[J]. 海峡药学,2009,19(2):50.

[12] 肖汉扬,李刚,吴骏. 土鳖虫药理作用最新研究进展[J]. 医学信息,2005;18(8):1029.

[13] 王凤霞,吉爱国. 药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2009,30(1):61.

[责任编辑 仝燕]