

# 正交试验法优选补肾益髓颗粒提取工艺

刘起华, 文谨, 孙玉雯

(中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 优选补肾益髓颗粒的最佳提取工艺。方法: 采用正交试验的方法, 以马钱苷、补骨脂素、异补骨脂素的含量为指标, 筛选补肾益髓颗粒中山茱萸、补骨脂的最佳醇提工艺; 以淫羊藿苷含量、干膏率为考察指标, 筛选最佳水提工艺条件。结果: 补肾益髓颗粒中山茱萸、补骨脂的最佳醇提工艺为加入 8 倍量 60% 乙醇, 提取 3 次, 每次 1 h。最佳水提工艺为加 10 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。结论: 优选得到的工艺稳定可行。

[关键词] 补肾益髓颗粒; 山茱萸; 补骨脂; 淫羊藿; 正交试验; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0008-04

## Optimization of Extraction Technology of Bushen Yisui Granule by Orthogonal Test

LIU Qi-hua, WEN Jin, SUN Yu-wen

(Guang'an Men Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction technology of Bushen Yisui Granule. **Method:** An orthogonal test was adopted in this study. The content of loganin, psoralen and isopsoralen was used as index for optimizing the extraction condition with ethanol for *Cornus officinalis* and *Salvia miltiorrhiza*. The content of icaiin and the dried decocting rates was used as index for optimizing the extraction condition with water. **Result:** The best ethanol extraction technology was to extract for 1 h with 8 times of 60% ethanol 3 times. The best water extraction technology was to extract for 1 h with 10 times of water 3 times. **Conclusion:** The optimized extraction technology was rational and can be used for the extraction process of Bushen Yisui Granule.

**[Key words]** Bushen Yisui Granule; *Cornus officinalis*; *Salvia miltiorrhiza*; *Herba Epimedii*; orthogonal test; extraction technology

补肾益髓颗粒是由淫羊藿、山茱萸、补骨脂、黄芪、熟地黄等中药研制而成的中药制剂, 具有温补肾阳, 益髓生血, 补气健脾等功效。为充分提取处方中各药材的有效成分, 依据方中各药材的主要活性成分的理化性质和药理作用, 将处方中药材分为醇提和水提组, 山茱萸、补骨脂为醇提组<sup>[1-3]</sup>, 淫羊藿、黄芪、熟地黄<sup>[4]</sup>等为水提组。本试验采用  $L_9(3^4)$  正交

设计法, 进行醇提工艺及水提工艺的筛选。

### 1 仪器与试剂

Waters 2695 型液相色谱仪 (PAD 检测器, 四元泵, 自动进样, Waters M32 色谱工作站), 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司)。

马钱苷对照品 (批号 111640-200604)、补骨脂素对照品 (批号 110739-200511)、异补骨脂素对照品 (批号 0738-200108), 淫羊藿对照品 (批号 110737-200312), 以上对照品均购于中国药品生物制品检定所; 山茱萸、补骨脂、淫羊藿等药材购于北京市本草方源药业有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯, 蒸馏水 (屈臣氏), 其他试剂均为分析纯。

[收稿日期] 20100402(002)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2010CB530406)

[第一作者] 刘起华, 硕士, 副主任药师, 主要从事中药新制剂的研发。Tel: 010-60214943, E-mail: gam-yaoyan@163.com

## 2 方法与结果

### 2.1 考察指标的测定

**2.1.1 马钱苷的含量测定<sup>[5]</sup>** 色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(12:88); 检测波长 240 nm, 理论塔板数按马钱苷峰计, 应不低于 3 000。

对照品溶液的制备: 取马钱苷对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成每 1 mL 含 40 μg 的溶液。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL 进样, 记录色谱图, 并以峰面积对含量(μg) 进行回归, 得回归方程  $Y = 1\,561\,211.875X - 20\,131.1$ ,  $r = 1.000\,0$ , 线性范围 0.16 ~ 0.8 μg。

供试品溶液的制备及测定: 取干膏粉约 0.2 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算马钱苷的含量。

**2.1.2 补骨脂素、异补骨脂素的含量测定<sup>[5]</sup>** 色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(45:55); 检测波长 246 nm, 理论塔板数按补骨脂素峰计, 应不低于 3 000。

对照品溶液的制备: 取补骨脂素及补骨脂素对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL 含 20.1 μg 和 19.9 μg 的混合溶液。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 4, 8, 12, 16, 20 μL 进样, 记录色谱图, 并以峰面积对含量(μg) 进行回归, 得回归方程。补骨脂素回归方程  $Y = 7\,693\,915.423X - 29\,497.6$ ,  $r = 0.999\,9$ , 线性范围 0.080 4 ~ 0.402 μg。异补骨脂素线性回归方程  $Y = 7\,216\,688.442X - 19\,335$ ,  $r = 0.999\,9$ , 线性范围 0.079 6 ~ 0.398 μg。

供试品溶液的制备及测定: 取干膏粉约 0.2 g, 精密称定, 加甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算补骨脂素和异补骨脂素的含量。

**2.1.3 淫羊藿苷的含量测定<sup>[4]</sup>** 色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(54:46); 检测波长 270 nm, 理论塔板数按淫羊藿

苷计, 应不低于 1 500。

对照品溶液的制备: 取淫羊藿苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液。

线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μL 进样, 记录色谱图, 并以峰面积对含量(μg) 进行回归, 得回归方程  $Y = 1\,984\,168.029X - 12\,453.333$ ,  $r = 1.000$ , 线性范围 0.1 ~ 2.0 μg。

供试品溶液的制备及测定: 吸取药液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算淫羊藿苷的含量。

**2.2 醇提工艺正交试验设计** 补肾益髓颗粒中山茱萸主要含有马钱苷、熊果酸、齐墩果酸等成分; 补骨脂主要含有香豆素类成分, 因此选用乙醇回流提取。按处方比例称取山茱萸药材、补骨脂药材共 9 份, 混合均匀以乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数为 4 个因素, 每个因素 3 个水平, 按表 1 的因素水平, 选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验。提取液浓缩, 真空干燥, 制成干膏粉, 分别测定马钱苷含量和补骨脂素、异补骨脂素含量。采用综合评价(综合评价 = 马钱苷含量 × 0.5 + 补骨脂素含量 × 0.25 + 异补骨脂素含量 × 0.25) 为指标, 得出最优工艺, 正交试验结果见表 2。

表 1 醇提工艺因素水平

水平	A 乙醇用量/倍	B 提取次数/次	C 提取时间/h	D 乙醇体积分数/%
1	6	1	1	60
2	8	2	1.5	70
3	10	3	2	80

由直观分析, 以综合评价为标准, 在所选因素水平范围内, 各因素作用主次顺序为  $B > D > A > C$ 。同时考虑到缩短生产周期, 减少能耗, 最终确定最佳提取工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>, 即用 8 倍量 60% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。

**2.3 醇提工艺验证试验** 取处方组成比例的山茱萸、补骨脂药材 3 份, 按醇提最佳工艺进行重复性验证试验, 测定结果见表 3。

验证结果表明, 该优选醇提工艺稳定可行。

**2.4 水提工艺正交试验设计** 根据补肾益髓颗粒中淫羊藿、黄芪、熟地黄等药材所含成分的性质及特点, 采用水煎煮法进行提取, 将其与山茱萸和补骨脂的醇提后的药渣共煎, 提取液过滤, 收集滤液, 定容

表 2 醇提工艺正交试验结果

No	A	B	C	D	马钱苷 /mg·g <sup>-1</sup>	补骨脂素 /mg·g <sup>-1</sup>	异补骨脂素 /mg·g <sup>-1</sup>	综合评价
1	1	1	1	1	6.10	1.53	1.32	3.762
2	1	2	2	2	6.92	2.35	2.08	4.568
3	1	3	3	3	6.63	2.57	2.21	4.51
4	2	1	2	3	6.07	1.37	1.15	3.665
5	2	2	3	1	7.43	3.05	2.66	5.142
6	2	3	1	2	7.48	2.65	2.29	4.975
7	3	1	3	2	6.05	2.07	1.78	3.988
8	3	2	1	3	7.25	1.98	1.65	4.532
9	3	3	2	1	7.72	2.98	2.61	5.258
K <sub>1</sub>	4.280	3.805	4.423	4.721				
K <sub>2</sub>	4.594	4.747	4.497	4.510				
K <sub>3</sub>	4.593	4.914	4.547	4.236				
R	0.314	1.109	0.124	0.485				

表 3 醇提取工艺验证试验 mg·g<sup>-1</sup>

No	马钱苷	补骨脂素	异补骨脂素
1	7.61	3.12	2.69
2	7.78	3.09	2.65
3	7.82	3.18	2.74

表 4 水提工艺因素水平

水平	A 加水量 / 倍	B 提取次数 / 次	C 提取时间 / h
1	10	1	1
2	8	2	1.5
3	6	3	2

至 500 mL, 备用。以淫羊藿苷含量及干膏率为考察指标, 选定加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验, 见表 4。采用综合评价(综合评价 = 淫羊藿苷含量 × 0.7 + 干膏率 × 0.3) 为指标, 得出最优工艺。正交试验结果见表 5, 方差分析见表 6。

干膏得率测定方法: 按处方称取一定量的药材, 按正交表进行试验。量取 25 mL 提取液, 置已干燥至恒重的蒸发皿中, 水浴浓缩至干, 于 105 °C 干燥 3 h, 取出, 移至干燥器中, 冷却至室温, 迅速称定, 计算干膏得率。测定结果见表 5。

表 5 水提工艺正交试验结果

试验号	A	B	C	D(空白)	淫羊藿苷 /mg·g <sup>-1</sup>	干膏率 / %	综合评价
1	1	1	1	1	3.78	25.49	10.293
2	1	2	2	2	5.51	34.85	14.312
3	1	3	3	3	4.68	39.50	15.126
4	2	1	2	3	4.02	25.05	10.329
5	2	2	3	1	4.52	34.45	13.499
6	2	3	1	2	5.13	37.36	14.799
7	3	1	3	2	3.23	22.88	9.125
8	3	2	1	3	3.97	30.55	11.944
9	3	3	2	1	4.56	34.92	13.667
K <sub>1</sub>	13.244	9.916	12.345	12.486			
K <sub>2</sub>	12.876	13.252	12.769	12.745			
K <sub>3</sub>	11.579	14.531	12.583	12.466			
R	1.665	4.615	0.424	0.279			

表 6 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F
A	4.590	2	2.295	31.655
B	34.063	2	17.032	234.917
C	0.271	2	0.136	1.869
误差	0.14	2	0.07	

由直观分析,以综合评价为标准,在所选因素水平范围内,各因素作用主次顺序为  $B > A > C$ 。方差分析表明,  $B$ (提取次数)对结果有高度显著的影响 ( $P < 0.01$ ),  $A$ (加水量)有显著的影响 ( $P < 0.05$ ),  $C$ (提取时间)无显著性影响,同时考虑到缩短生产周期,减少能耗,选取最佳提取工艺为  $A_1 B_3 C_1$ ,即为加 10 倍水,提取 3 次,每次 1 h。

**2.5 水提工艺验证试验** 取按处方组成比例的药材 3 份,按最佳提取工艺进行重复性验证试验。测定结果见表 7。

表 7 验证试验

No.	淫羊藿苷 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	干膏率 / %
1	5.64	37.02
2	5.60	36.81
3	5.57	37.21

验证结果表明,该优选水提工艺稳定可行。

### 3 讨论

在补肾益髓颗粒提取工艺的筛选试验中,根据药材所含成分理化性质的不同,有针对性地将提取工艺分为醇提和水提,能够使药材的有效成分得以保留,更好地发挥药效。在实验过程中选用了多指

(上接第 7 页)

获得更成熟的提取工艺、更合理砂仁有效成分- $\beta$ -环糊精包合物制备工艺和实现砂仁有效成分- $\beta$ -环糊精包合物更全面的质量控制<sup>[5]</sup>。

$\beta$ -环糊精包合物的稳定性是决定包合物质量的一项重要指标。在后续研究课题中,有必要对砂仁挥发油- $\beta$ -环糊精包合物稳定性进行系统研究(抗光解性试验、挥发性试验、抗热稳定性试验及 Rayleigh 光干涉法试验等),以期建立砂仁挥发油- $\beta$ -环糊精包合物更完善的质量标准。

### [参考文献]

[1] 唐灿,李云鹏,吴仕财,等.砂仁挥发油的提取工艺

标的综合分析进行评价,根据处方配比,醇提试验中山茱萸、补骨脂均为臣药,用量相等,因此马钱苷权重系数设为 0.5,补骨脂素及异补骨脂素权重系数各设为 0.25。水提试验中,方中淫羊藿为君药,因此以淫羊藿苷为评价指标之一,权重系数较大,设为 0.7,干浸膏得率是服用剂量等确定的依据,与疗效无关,故综合评价时权重系数较小,设为 0.3。

本实验采用的流动相通过测试比较,样品中的马钱苷在乙腈-水(12:88)系统中分离较乙腈-水(15:85)好,补骨脂素、异补骨脂素在甲醇-水(45:55)系统中分离较甲醇-水(55:45)好,淫羊藿苷在甲醇-水(54:46)系统中分离较甲醇-水(30:70)好。

本文采用正交试验法对补肾益髓颗粒的提取工艺进行优选,得到了较为理想的提取工艺,为其大生产工艺提供了一定的参考。

### [参考文献]

[1] 郭瑾丽,项乐源,杨祉雯,等.正交试验法优选山茱萸的提取工艺[J].中国临床药学杂志,2009,18(1):37.  
 [2] 陈雯,杜守颖,陆洋.多指标正交试验优选仙灵骨葆胶囊中丹参、补骨脂提取工艺[J].中国药学杂志,2009,34(14):1792.  
 [3] 李德秀,程天贵.正交试验法优选扶正防喘颗粒的提取工艺[J].中国医院药学杂志,2008,28(9):745.  
 [4] 胡润淮,裴广战.RP-HPLC法测定复方仙灵脾注射液中淫羊藿苷含量[J].中成药,2002,24(2):97.  
 [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:20,129.

[责任编辑 仝燕]

[J].华西药理学杂志,2008,23(1):125.

[2] 张彦燕,唐灿,王谦,等. $\beta$ -环糊精包合砂仁乙酸龙脑酯的工艺研究[J].中成药,2009,31(4):625.  
 [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:附录 57.  
 [4] 李晓光,叶富强,徐鸿华,等.砂仁挥发油中乙酸龙脑酯的药理作用研究[J].华西药理学杂志,2001,16(5):356.  
 [5] 万德光.中药品种品质与药效[M].上海:上海科学技术出版社,2007:673.

[责任编辑 仝燕]