

# 健骨膏制备中提取工艺的研究

成源<sup>1,2\*</sup>, 魏振平<sup>2</sup>, 冯拉俊<sup>3</sup>, 王桂敏<sup>4</sup>, 何维真<sup>1</sup>

(1. 西安大唐制药集团公司, 陕西 西安 710075; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072;  
3. 西安理工大学, 陕西 西安 710048; 4. 西安市未央区中医医院, 陕西 西安 710016)

**[摘要]** 目的: 研究健骨膏制备中药材的提取工艺。方法: 正交设计试验, 以提取溶剂浓度、提取次数、溶剂用量、提取时间为考察因素, 对提取工艺方案进行优选。结果: 优选的提取工艺为: 处方药材用 3 倍药材量的 75% 乙醇回流 2 次, 每次 2h, 提取脂溶性成分; 再对药渣加 10 倍量水在 80℃ 加热煎煮 2 次, 每次 1h, 提取水溶性成分。结论: 最佳提取工艺的确立为生产提供了理论依据。

**[关键词]** 阿魏酸; 栀子苷; 提取工艺; 正交设计

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)02-0004-03

“健骨膏”是由当归、栀子等药材加工而成的软膏, 用于肝肾不足、风寒湿邪所致慢性关节炎(骨性关节炎、类风湿性关节炎)的治疗。处方中药物既有脂溶性有效成分, 也有水溶性有效成分, 包括有机酸、挥发油、萜类、甙类等。在其制备工艺中, 提取的操作方法对有效成分含量有较大影响。为此, 用乙醇回流提取脂溶性成分, 并对药渣用水进行水溶性成分提取, 以方中重要药材当归的有效成分阿魏酸为脂溶性成分的评价指标<sup>[1]</sup>、栀子中的栀子苷为水溶性成分的评价指标<sup>[2]</sup>, 用高效液相法对提取液中的阿魏酸、栀子苷进行含量测定, 应用正交试验设计<sup>[3,4]</sup>对提取工艺方案进行优选, 以保证提取的有效性。

## 1 仪器与药品

Waters 600E 全自动高效液相色谱仪; Waters 996 型 PDA 二极管阵列检测器; Waters-M32 色谱工作站(美国 Waters 公司); HP-8453 型紫外-可见分光光度计; METTLER AE-240 电子天平(瑞士); 0.45μm 微孔滤膜(上海半岛实业有限公司净化器材厂)。

阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0773-9708); 栀子苷标准品(中国药品生物制品检定所, 批号 753-9003); 水为重蒸去离子水; 除液相色谱仪所用甲醇、乙酸(南开大学精细化工试剂厂)为色谱纯外, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 阿魏酸、栀子苷含量测定方法

**2.1.1 色谱条件** 阿魏酸: 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> 柱(200mm × 4.6mm, 5μm, 大连依波特公司), C<sub>18</sub> 保护柱; 流动相: 甲醇-水-乙酸(46: 53: 1), 流速: 0.6mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 320nm, 柱温: 40℃。在此色谱条件下, 阴性无干扰, 阿魏酸与其他组分可达到基线分离, 保留时间约为 12min。栀子苷: 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> 柱(200mm × 4.6mm, 5μm, 大连依波特公司), C<sub>18</sub> 保护柱, 流动相: 甲醇-水(25: 75), 流速: 1.2mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 240nm; 柱温: 40℃。在此色谱条件下, 阴性无干扰, 栀子苷与其他组分可达到基线分离, 保留时间约为 6min。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取阿魏酸对照品置于棕色量瓶中, 用甲醇-水-乙酸溶液(46: 53: 1)溶解, 使成浓度为 76.0mg·L<sup>-1</sup> 的阿魏酸对照品溶液。精密称取栀子苷对照品置于量瓶中, 加 50% 甲醇溶液溶解, 制得浓度为 113.8μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.1.3 线性关系** 以阿魏酸对照品进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 标准曲线方程为:  $Y = 346011.091X + 1469.3$ ,  $r = 0.9879$ 。线性范围 0.152~0.912μg。以栀子苷对照品进样量(μg)为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y), 进行线性回归, 标准曲线方程为:  $Y = 3012762X - 41272$ ,  $r = 0.9940$ 。线性范围 0.2276~1.7070μg。

**2.1.4 精密度** 精密吸取阿魏酸、栀子苷对照品溶

[收稿日期] 2005-03-28

[通讯作者] 成源, Tel: (029) 87320672; E-mail: rsycy@sohu.com

液各 10 $\mu$ L, 重复进样 6 次, 测定色谱峰面积, 结果精密良好, RSD = 1.40% ( $n = 6$ , 阿魏酸), RSD = 1.71% ( $n = 6$ , 栀子苷)。

**2.1.5 稳定性** 精密吸取阿魏酸、栀子苷对照品溶液各 3 $\mu$ L 分别在 0、1、2、4、6、8 和 12h 进样测定。结果表明, 阿魏酸在 8h 保持稳定, RSD = 1.72% ( $n = 6$ ), 栀子苷在 12h 内稳定性良好, RSD = 1.67% ( $n = 7$ )。

**2.1.6 加样回收率试验** 量取已测得含量的提取液 5 份, 分别精密加入阿魏酸对照品溶液和栀子苷对照品溶液适量, 按上述色谱条件进行测定。阿魏酸平均回收率 100.72, RSD = 1.59% ( $n = 5$ ), 栀子苷平均回收率 99.80, RSD = 1.78% ( $n = 5$ )。

## 2.2 脂溶性成分提取工艺

**2.2.1 正交表的设计** 以乙醇浓度、提取次数、溶剂用量、每次回流时间为因素, 各设 3 个水平, 作  $L_9(3^4)$  正交试验, 见表 1。

表 1 脂溶性成分提取工艺因素水平表

水 平	因 素			
	提取次数	乙醇浓度	溶剂用量	每次回流时间
	(次)	(%)	(倍)	(h)
	A	B	C	D
1	1	50	3	0.5
2	2	90	4	1
3	3	75	5	2

**2.2.2 得率测定** 将药材按处方量称取, 根据表 1 设计的不同条件, 用乙醇加热回流提取, 过滤, 得 9 份滤液。将滤液减压回收至相对密度 1.38~ 1.40 (40 $^{\circ}$ C), 干燥, 得浸膏。称取浸膏约 1g, 置具塞 25mL 棕色量瓶中, 精密加入甲醇-水-乙酸(46: 53: 1) 溶液至刻度, 摇匀, 称定重量, 超声处理 30min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 经 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 精密吸取滤液 10 $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 测定浸膏中阿魏酸的含量。结果见表 2、表 3。

实验结果表明, 脂溶性成分提取工艺的最佳因素水平组合应为  $A_2B_3C_1D_3$ 。即粉碎过的药材加 3 倍 75% 乙醇, 加热回流 2h, 共提取 2 次, 过滤。滤渣进行水溶性成分提取, 合并滤液减压回收至相对密度 1.38~ 1.40(40 $^{\circ}$ C) 的稠膏, 干燥, 即得。

## 2.3 水溶性成分提取工艺

**2.3.1 正交表的设计** 以提取次数、水用量、提取时间、提取温度为因素, 各设 3 个水平, 作  $L_9(3^4)$  正

交试验, 具体安排与结果见表 4。

表 2 脂溶性成分提取工艺实验安排及结果

编号	A	B	C	D	阿魏酸的含量(mg·g <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	0.58
2	1	2	2	2	0.64
3	1	3	3	3	0.72
4	2	1	2	3	0.62
5	2	2	3	1	0.71
6	2	3	1	2	0.75
7	3	1	3	2	0.52
8	3	2	1	3	0.63
9	3	3	2	1	0.59
$K_1$	1.94	1.72	1.96	1.88	$G = 5.76$
$K_2$	2.08	1.98	1.85	1.91	$CT = G^2/N = 3.6864$
$K_3$	1.74	2.06	1.95	1.97	
R	0.11	0.11	0.04	0.03	

表 3 脂溶性成分提取工艺方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.0195	2	0.0097	19.4	$P < 0.05$
B	0.0211	2	0.0105	21.0	$P < 0.05$
C	0.0025	2	0.0013	2.6	
误差	0.0009	2	0.0005		

注:  $F_{1-0.05(2,2)} = 19$ ;  $F_{1-0.10(2,2)} = 9$ 。

表 4 水溶性成分提取工艺因素水平表

水 平	因 素			
	提取次数(次)	水用量(倍)	提取时间(h)	提取温度( $^{\circ}$ C)
	A	B	C	D
1	1	6	0.5	80
2	2	8	1	90
3	3	10	2	100

**2.3.2 得率测定** 将乙醇回流所得滤渣, 根据表 4 设计的不同条件, 用水加热提取, 过滤, 得 9 份滤液。减压浓缩至相对密度 1.38~ 1.40(60 $^{\circ}$ C), 干燥, 得浸膏。称取浸膏约 0.7g, 置具塞 25mL 量瓶中, 精密加入甲醇溶液至刻度, 摇匀, 称定重量, 超声处 30min, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 经 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 精密吸取滤液 10 $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 测定浸膏中栀子苷的含量。结果见表 5、6。

实验结果表明, 水溶性成分提取工艺的最佳因

素水平组合应为  $A_2B_3C_2D_1$ 。即将乙醇回流所得滤渣,加 10 倍量水在  $80\text{ }^\circ\text{C}$  加热煎煮,每次 1h,共提取 2 次,合并滤液,浓缩至相对密度 1.38~ 1.40( $60\text{ }^\circ\text{C}$ ) 的稠膏,干燥,即得。

表 5 水溶性成分提取工艺实验安排及结果

实验号	因 素				栀子苷的含量 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.77
2	1	2	2	2	1.64
3	1	3	3	3	1.87
4	2	1	2	3	2.10
5	2	2	3	1	1.96
6	2	3	1	2	2.54
7	3	1	3	2	1.45
8	3	2	1	3	1.20
9	3	3	2	1	2.35
$K_1$	5.28	5.32	5.51	6.08	$G = 16.88$
$K_2$	6.0	4.80	6.09	5.63	$CT = G^2/N = 31.66$
$K_3$	5.00	6.76	5.28	5.17	
R	0.53	0.65	0.27	0.30	

表 6 水溶性成分提取工艺方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	0.480	2	0.240	4.14	
B	0.686	2	0.343	5.91	
D	0.137	2	0.069	1.19	
误差	0.116	2	0.058		

注:  $F_{1-0.10(2,2)} = 9$ 。

### 3 讨论

阿魏酸的含量测定方法主要有双波长薄层扫描法、薄层层析比色法和高效液相色谱法<sup>[5,6,7]</sup>。调整流动相中甲醇的浓度,既可使其他杂质峰分离,又可使保留时间适当,而加入少量乙酸可使峰形良好,不拖尾。

滤渣用水加热提取水溶性成分,各因素之间无显著性差异,利用极值才可判断出最佳因素水平组

合。原因可能是在脂溶性成分提取过程中,75% 乙醇对栀子苷溶解性较好,滤渣中栀子苷含量较低,影响结果判断。使用 HPLC 测定栀子苷含量时,水提取效果不佳<sup>[8]</sup>,选择甲醇-水(25: 75)为流动相后,栀子苷的分离效果好,也可为上述判断的佐证。

我们采用正交试验,提取的每一步骤均由试验结果确定最终方案,按此条件操作,有效成分提取率高,工艺合理。同时,实验中的其他因素如浸泡时间、静置时间、过滤方法及其它操作力求一致,以减少操作误差。

健骨膏的开发坚持“在继承中发展,在借鉴中创新”的道路,以中医药理论为指导,保持和发扬中医药特点和优势,针对中药复方制剂化学成分的复杂性,利用化学测定方法,以主要有效成分的含量作为质控指标,研究提取方法,有利于“健骨膏”生产工艺定量化和保证临床疗效,是推进中药现代化的一次尝试。

### [参考文献]

- [1] 王芳,李东. 当归的化学及药理研究进展[J]. 中国药房, 2003, 14(10): 630.
- [2] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1993. 47.
- [3] Begenna, Jilibaiyi, BAI Xia, et al. Study on extracting technology of total flavones of Mongolian medicine fructus choerospondiatis with orthogonal design [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2000, 22(4): 253.
- [4] HE Qun, GUO Guohua, GUO Yu, et al. Studies on extraction process for preparation of ECIEMA SPRAY [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2001, 32(6): 506.
- [5] 赵陆华. 高效液相色谱法分析中药成分手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 315.
- [6] 王宝棨. 中成药质量标准与标准物质研究[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994. 324.
- [7] 顾民,张亮,张正行. HPLC 测定逍遥散及当归中阿魏酸的含量[J]. 中成药, 2000, 22(5): 342.
- [8] 刘燕,吕东,林瑞起,等. 关于测定栀子中栀子苷含量方法的探讨[J]. 中国药学标准, 2002, 3(1): 55.