

烫骨碎补配方颗粒的提取工艺优选及其含量测定

周滢, 曾志华*
(重庆医科大学, 重庆 400016)

[摘要] 目的: 优选烫骨碎补配方颗粒的提取工艺, 建立柚皮苷的含量测定方法, 为有效控制该制剂的质量提供参考。
方法: 以柚皮苷提取量和出膏率为综合评价指标, 采用正交试验考察加水量、提取时间和提取次数对烫骨碎补配方颗粒提取工艺的影响。采用 HPLC 测定柚皮苷含量, 流动相甲醇-乙酸-水 (35: 4: 65), 检测波长 283 nm。**结果:** 最佳提取工艺为浸泡 0.5 h, 加 10, 8 倍量水提取 2 次, 每次 0.5 h; 柚皮苷质量分数 0.77%, 出膏率 12.6%。柚皮苷在 0.063 ~ 1.575 μg 与峰面积呈良好线性关系, 平均加样回收率 100.70%, RSD 1.2%; 暂定本品配方颗粒每 1 g 含柚皮苷 ≥ 5.0 mg。**结论:** 该提取工艺和含量测定方法稳定可行, 有效成分提取效率高, 为烫骨碎补配方颗粒的生产和质量控制提供参考。

[关键词] 烫骨碎补配方颗粒; 柚皮苷; 浸膏得率; 质量标准

[中图分类号] R283.6; R284.1; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0054-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015050054

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150112.1450.005.html>

[网络出版时间] 2015-01-12 14:50

Extraction Process and Determination of Burning Drynariae Rhizoma Formula Granules ZHOU Ying, ZENG Zhi-hua* (Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of burning Drynariae Rhizoma formula granules and establish determination of naringin in this preparation. **Method:** Taking extracting amount of naringin and yield of dry extract as a comprehensive evaluation index, orthogonal test was adopted to optimize extraction process with the amount of water, extraction time and extraction times as factors. Naringin in this formula granules was determined by HPLC, mobile phase was methanol-acetic acid-water (35: 4: 65) and detection wavelength was 283 nm. **Result:** The best extraction technique was as follows: soaked 0.5 h, extracted 2 times with 10, 8 times the amount of water for 0.5 h per time. The mass fraction of naringin was 0.77% and yield of dry extract was 12.6%. Calibration curve of naringin was linear in the range of 0.063-1.575 μg, average recovery was 100.70% with RSD of 1.2%. Tentatively per 1 g of this formula particle contained ≥ 5 mg of naringin. **Conclusion:** This extraction process and determination are stable and feasible with high extraction efficiency of naringin, which can be scientific basis for production and quality control of burning Drynariae Rhizoma formula granules.

[Key words] burning Drynariae Rhizoma formula granules; naringin; extract yield; quality standards

烫骨碎补味苦, 性温, 归肝、肾经, 具有补肾强骨、养伤止痛之功效, 主要用于治疗跌扑闪挫、筋骨折伤、肾虚腰痛、筋骨痿软、耳鸣耳聋等证, 外治斑秃、白癜风等^[1]。最能体现骨碎补特征的成分为黄酮类化合物, 其中新北美圣草苷和柚皮苷的含量较高, 是骨碎补的主要成分^[2-4]。2010 年版《中国药典》规定柚皮苷为骨碎补药材质量控制的指标成

分^[1]。烫骨碎补配方颗粒是在结合 2010 年版《中国药典》和《全国中药炮制规范》^[5]对骨碎补规定的基础上, 将烫骨碎补饮片经现代制药工艺提取、浓缩、干燥、制粒而成的单位颗粒剂。目前有关烫骨碎补配方颗粒的工艺及质量标准研究尚未有报道, 但中药配方颗粒现已逐步被市场接受, 研究具有参考意义。故本实验选择烫骨碎补配方颗粒为研究对

[收稿日期] 20140512(006)
[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技计划项目(2011-2-148)
[第一作者] 周滢, 博士, 副教授, 从事中药炮制与方剂研究, Tel:15723056096, E-mail:meiren129129@163.com
[通讯作者] * 曾志华, 硕士, 讲师, 从事临床研究, Tel:13527588518, E-mail:925007954@qq.com

象,以柚皮苷和干浸膏得率为评价指标,采用正交试验优选烫骨碎补配方颗粒的提取工艺,参考 2010 年版《中国药典》一部“骨碎补”含量测定方法并加以改进,建立了 HPLC 测定该制剂中柚皮苷含量的方法,为该颗粒剂的质量评价提供实验依据,同时为中药配方颗粒质量标准的规范化研究提供参考。

1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BP211D 型电子天平(德国 Sautoris 公司)。柚皮苷对照品(批号 110722-200610,中国食品药品检定研究院),烫骨碎补(重庆天生药业有限公司,经重庆医科大学何先元教授鉴定为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* 的干燥根茎),甲醇、冰乙酸为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取工艺条件筛选 在预试验基础上,固定浸泡时间 0.5 h,选择加水量、提取时间、提取次数为考察因素。取烫骨碎补饮片 9 份,每份 200 g,以柚皮苷含量和出膏率的综合评分为评价指标,权重系数分别为 0.7、0.3。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选烫骨碎补配方颗粒的提取工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 烫骨碎补配方颗粒提取工艺正交试验分析
Table 1 Orthogonal test of extraction process of burning *Drynariae* Rhizoma formula granules

No.	A 加水量 /倍	B 提取时间 /h	C 煎煮数 /次	D (空白)	柚皮苷 / %	出膏率 / %	综合评分 / %
1	8	0.5	1	1	0.67	11.3	83.6
2	8	1.0	2	2	0.75	12.6	93.4
3	8	1.5	3	3	0.69	13.0	89.2
4	10	0.5	2	3	0.81	12.4	98.2
5	10	1.0	3	1	0.76	13.2	95.6
6	10	1.5	1	2	0.69	11.8	86.4
7	12	0.5	3	2	0.72	12.9	91.5
8	12	1.0	1	3	0.68	11.9	85.8
9	12	1.5	2	1	0.78	12.8	96.4

表 2 综合评分方差分析
Table 2 Variance analysis of comprehensive score

方差来源	SS	F	P
A	32.72	10.57	>0.05
B	1.31	0.42	>0.05
C	177.11	57.21	<0.05
D(误差)	3.10	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素影响提取效果的顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明因素 C 对提取工艺具

有显著性影响,其他因素则均影响不明显,考虑大生产节约成本等因素,最佳提取工艺条件为 $A_1B_1C_2$,即加 10,8 倍水量提取 2 次,每次 0.5 h。取烫骨碎补饮片 200 g,按最佳提取工艺进行了 3 次验证试验,结果柚皮苷质量分数分别为 0.77%、0.77%、0.76%,出膏率依次为 12.5%、12.4%、12.8%,说明该工艺稳定可行。

2.2 配方颗粒的制备 按优选的工艺条件提取烫骨碎补饮片,合并煎液,浓缩后干燥,得干浸膏粉,粉碎过 3 号筛,加入适量辅料,混匀,经过制粒、整粒,得烫骨碎补配方颗粒(配方颗粒 1 g 相当于饮片 14 g)。

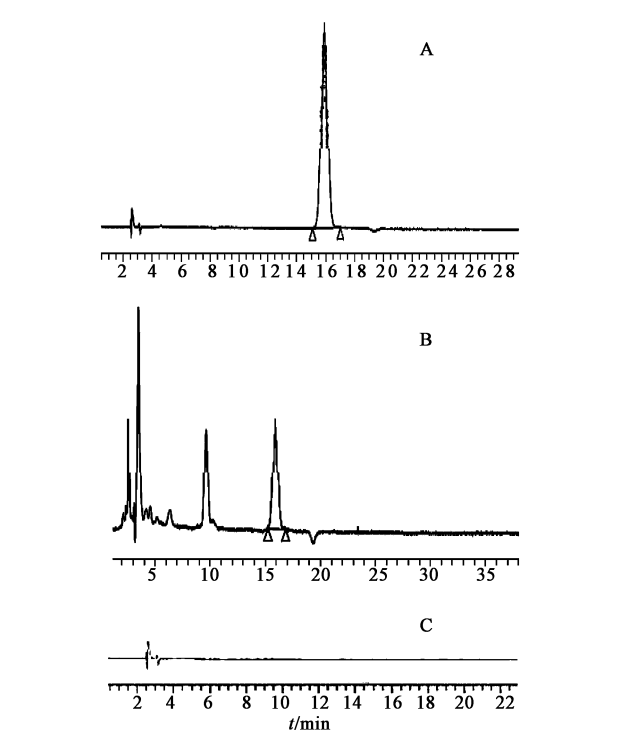
2.3 柚皮苷的含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品适量,加甲醇制成 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 检测波长的选择 取柚皮苷对照品溶液在 200~400 nm 进行全波长扫描,结果显示在 283 nm 处有最大吸收且灵敏度最高,故确定柚皮苷检测波长 283 nm。

2.3.3 色谱条件 迪马公司 Diamonsil ODS- C_{18} 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm),流动相甲醇-乙酸钠水(35:4:65),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 283 nm。理论板数按柚皮苷峰计算应不低于 3 000。在此条件下,烫骨碎补配方颗粒中柚皮苷的分离度好,理论塔板数较高,峰形对称性好,见图 1。

2.3.4 供试品溶液的制备 取本品颗粒(批号 090801)4 份,每份 0.2 g,研细,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,分别精密加入甲醇,70% 甲醇,乙醇及 70% 乙醇 25 mL,称定质量,超声(200 W,25 kHz,下同)30 min,取出,放冷,加相应溶剂补足质量,滤过,取续滤液按 2.3.3 项下色谱条件测定,结果柚皮苷提取量分别为 6.5、6.1、6.1、6.0 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,故确定提取溶剂为甲醇。取本品颗粒 2 份,每份 0.2 g,研细,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,分别超声和回流 30 min,取出,放冷,加甲醇补足质量,滤过,取续滤液按 2.3.3 项下色谱条件测定,结果柚皮苷提取量分别为 6.3、6.1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,故选择超声提取法。取本品颗粒 4 份,每份 0.2 g,研细,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,分别超声 10、20、30、40 min,取出,放冷,加甲醇补足减失质量,取续滤液按 2.3.3 项下色谱条件测定,结果柚皮苷提取量分别为 5.9、6.1、6.2、6.2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,故确定提取 30 min。精密称取本品颗粒约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,按优选的方法进行提取,取续滤液,得供试品溶液。



A. 对照品;B. 供试品;C. 阴性样品;1. 柚皮苷
图 1 烫骨碎补配方颗粒 HPLC
Fig.1 HPLC of burning Drynariae Rhizoma formula granules

2.3.5 阴性样品溶液的制备 取本品缺烫骨碎补的样品 0.5 g,按 2.3.4 项下方法制成阴性样品溶液。

2.3.6 标准曲线绘制 精密吸取 0.063 g·L⁻¹柚皮苷对照品溶液 1,2,5,10,20,25 μL,按 2.3.3 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y=3 \times 10^6 X+7\ 183.1$ ($R^2=0.999\ 7$),线性范围 0.063 ~ 1.575 μg。

2.3.7 精密度试验 精密吸取 0.063 g·L⁻¹对照品溶液 10 μL,按 2.3.3 项下色谱条件连续进样 6 次,计算峰面积的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.3.8 重复性试验 精密称取同一批样品,按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液,共 6 份,按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD < 2.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.9 稳定性试验 精密吸取 0.063 g·L⁻¹柚皮苷对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,室温放置,分别于 0,2,4,6,8,10 h 按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD 分别为 0.7%,< 2.0%,表明对照品溶液和供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密称取已知柚皮苷含量(6.2 mg·g⁻¹)的样品 0.25 g,共 6 份,各精密加入 0.063 g·L⁻¹柚皮苷对照品溶液 25 mL,按 2.3.4 项

下方法制备供试品溶液,按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算回收率,结果平均加样回收率 100.70%,RSD 1.2%,表明样品回收率良好,见表 3。

表 3 柚皮苷含量测定的加样回收试验

Table 3 Recovery test of determination of naringin					
称样量 /g	柚皮苷 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.255 47	1.583 9	3.153 8	99.68	100.70	1.2
0.260 18	1.613 1	3.199 3	100.71		
0.254 91	1.580 4	3.144 5	99.36		
0.255 11	1.581 7	3.198 7	102.67		
0.269 84	1.673 0	3.255 8	100.49		
0.250 15	1.550 9	3.146 7	101.32		

注:柚皮苷对照品加入量均为 1.575 mg。

2.3.11 样品测定 精密称取不同批号的烫骨碎补配方颗粒各约 0.5 g,按 2.3.4 项下方法制备供试品溶液,取 10 μL 按 2.3.3 项下色谱条件测定,计算柚皮苷质量分数分别为 6.2,5.9,6.3 mg·g⁻¹,故暂定本品配方颗粒每 1 g 含柚皮苷($C_{27}H_{32}O_{14}$)≥ 5.0 mg。

3 讨论

烫骨碎补配方颗粒的水提工艺直接关系到配方颗粒的质量,以干膏率和柚皮苷提取量作为衡量指标,初步评价了工艺的提取效果,结果表明煎煮时间和加水量对工艺的影响较小,而煎煮次数对柚皮苷的含量和出膏率有显著的影响,是该饮片提取工艺的重要因素。由于条件有限,烫骨碎补配方颗粒样品数量较少,有待于后续试验数据的积累,制定了柚皮苷的限量范围,使该制剂的质量更加稳定可靠,为有效控制烫骨碎补配方颗粒的质量提供保证。配方颗粒的制备工艺是以水为提取溶剂,只能将大部分水溶性成分提出来,极性小的成分不易溶于水,保留在药渣中。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:239.

[2] 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,2002,9(11):75-78.

[3] 李顺祥,张志光,龙勉. 不同产地骨碎补的柚皮苷测定[J]. 中南药学,2003,1(2):103-104.

[4] 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):1634-1637.

[5] 卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:78.

[责任编辑 刘德文]