

# 正交试验优选养血接骨胶囊的水提工艺<sup>△</sup>

甄小龙<sup>1\*</sup>,侯守谦<sup>2</sup>,窦霞<sup>1#</sup>(1.甘肃中医药大学附属医院中药炮制及质控工程技术研究中心,兰州 730020;2.甘肃省康县中医院中医骨病骨科,甘肃陇南 746500)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2249-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.24

**摘要** 目的:优选养血接骨胶囊水提工艺。方法:以加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素,以阿魏酸含量、淫羊藿苷含量和得膏率的综合评分为考察指标,采用正交试验优选养血接骨胶囊的最佳水提工艺并进行验证试验。结果:养血接骨胶囊最优提取工艺为加10倍量水提取3次,每次1h;验证试验中阿魏酸、淫羊藿苷含量分别为0.38、1.23 mg/g( $n=3$ ),得膏率为28.2%( $n=3$ ),综合评分为97.11(RSD=2.77%, $n=3$ )。结论:优选的提取工艺简便可行、方法准确可靠,可用于养血接骨胶囊的提取制备。  
**关键词** 养血接骨胶囊;正交试验;水提工艺

## Optimization of Water Extraction Technology of Yangxue Jiegu Capsule by Orthogonal Test

ZHEN Xiaolong<sup>1</sup>, HOU Shouqian<sup>2</sup>, DOU Xia<sup>1</sup>(1.The Processing and Quality Control Engineering Technology Research Center, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China; 2.Dept. of Chinese Medicine Orthopedics, TCM Hospital of Gansu Kangxian County, Gansu Longnan 746500, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the water extraction technology of Yangxue Jiegu capsule. METHODS: Using adding amount of water, decoction time and decoction times as investigation factors, ferulic acid content, icariin content and yield rate as investigation indexes, orthogonal test was used to optimize the optimal water extraction technology of Yangxue Jiegu capsule; and verification test was conducted. RESULTS: The optimized extraction technology was 10-fold water, extracting 3 times, 1 h once. Contents of ferulic acid and icariin were 0.38, 1.23 mg/g ( $n=3$ ), yield rate was 28.2% ( $n=3$ ), average comprehensive score was 97.11 (RSD=2.77%,  $n=3$ ). CONCLUSIONS: Optimized extraction technology is feasible, accurate, reliable, and can be used for the extraction and preparation of Yangxue Jiegu capsule.

**KEYWORDS** Yangxue Jiegu capsule; Orthogonal test; Water extraction technology

养血接骨胶囊是甘肃省康县中医院根据多年临床经验方开发研制的中药制剂,目前已完成工艺及质量标准研究,正在申请院内制剂批准文号。该药处方由当归、骨碎补、淫羊藿、川续断、脆蛇、土鳖虫等12味中药组成,共奏补益肝肾、通筋活络、接骨续筋、散瘀消肿之功,临床可达到止痛、活血、促进骨折愈合的作用<sup>[1]</sup>。方中当归补血、活血、行血,淫羊藿补肝肾、强筋骨,还可提高骨细胞的活性和数量、促进骨基质钙化、加速骨痂改造,从而促进骨折愈合<sup>[2]</sup>,二药共为君药。药理研究发现,当归中的主要成分阿魏酸能够抑制血小板的凝聚,从而达到活血的作用<sup>[3-4]</sup>;淫羊藿的主要药效成分为黄酮类;骨碎补主要含黄酮、三萜、酚酸及其苷类成分;川续断主要含三萜皂苷类。因为方中药物的主要化学成分大多溶于水,根据处方中各味药的性质及有效成分的药理活性,确定除脆蛇、土鳖虫等5味药部分打粉外,其余药物均采用水提工艺制备。为更好地控制养血接骨胶囊的质量,本研究以方中君药当归和淫羊藿的主要成分阿魏酸、淫羊藿

苷的含量以及得膏率的综合评分为评价指标,采用正交试验对其水提工艺进行优化,为该制剂的制备提供可靠的参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱(HPLC)仪,包括SIL-20A自动进样器、SPD-M20A二极管阵列检测器、HP-1真空脱气机、CTO-20ASUP柱温箱等(日本岛津公司);BP210S电子分析天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 药品、药材与试剂

阿魏酸对照品(批号:110773-201313,纯度:>98%)、淫羊藿苷对照品(批号:110737-201302,纯度:>98%)均购自中国食品药品检定研究院;当归、骨碎补、淫羊藿、川续断、脆蛇、土鳖虫等12味药材均购于兰州市安泰堂中药饮片有限公司,经全检,均符合2015年版《中国药典》(一部)相关规定;乙腈为色谱纯;水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 水提液的制备

按处方比例称取药材,共计123.5 g,加入一定量水提取,滤过,浓缩至250 mL,备用。

<sup>△</sup>基金项目:甘肃省中医药管理局科研项目(No.GZK-2014-50)

\*主管中药师,硕士。研究方向:中药鉴定与质量研究。电话:0931-8639269。E-mail:115082774@qq.com

#通信作者:副主任中药师,硕士。研究方向:中药制剂与质量研究。电话:0931-8639269。E-mail:doux125@126.com

## 2.2 阿魏酸含量测定

2.2.1 对照品贮备液的制备 精密称取干燥至恒质量的阿魏酸对照品 11.5 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容, 即得质量浓度为 115  $\mu\text{g/mL}$  的对照品贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取“2.1”项下水提液 5 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇约 15 mL, 超声处理 5 min, 放冷, 甲醇定容, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 即得。

2.2.3 当归阴性对照液的制备 按“2.1”项下方法制备除当归药材外的其他药材的水提液, 按“2.2.2”项下方法制备, 即得当归阴性对照液。

2.2.4 色谱条件 色谱柱: Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸 (15:85, V/V)<sup>[5-6]</sup>; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 316 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。在上述色谱条件下, 取“2.2.1”“2.2.2”项下溶液进样测定, 结果, 理论板数(按阿魏酸计) $\geq 3\ 000$ , 分离度 $>1.5$ 。色谱图见图 1。

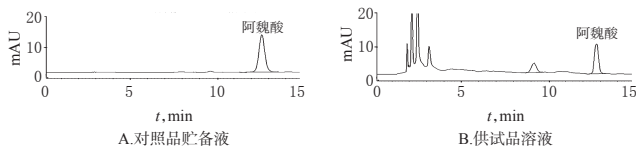


图1 阿魏酸的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of ferulic acid

2.2.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品贮备液 1、4、8、10、25 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得系列对照品溶液。分别精密吸取系列对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  进样测定, 以阿魏酸的质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归, 得回归方程为 $y=9\ 323.2x+7\ 006.6$ ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明, 阿魏酸在 4.6~115  $\mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.2.6 精密度、稳定性、重复性和加样回收试验 按照相关方法进行操作。结果, 精密度试验峰面积的 RSD 为 0.80% ( $n=6$ ); 稳定性试验峰面积的 RSD 为 1.38% ( $n=6$ ); 重复性试验峰面积的 RSD 为 1.48% ( $n=6$ ); 加样回收率为 96.1%~100.4%, 平均值为 98.7% (RSD=1.71%,  $n=6$ )。

2.2.7 样品测定 按照“2.2.4”项下色谱条件, 分别取对照品溶液 (36.8  $\mu\text{g/mL}$ ) 及供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 进样测定, 记录峰面积, 计算样品中阿魏酸含量。

## 2.3 淫羊藿苷含量测定

2.3.1 对照品贮备液的制备 精密称取干燥至恒质量的淫羊藿苷对照品 10.8 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 定容, 即得质量浓度为 108  $\mu\text{g/mL}$  的对照品贮备液。

2.3.2 供试品溶液的制备 分别精密量取“2.1”项下水提液 5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇约 40 mL, 超声处理 5 min, 放冷, 甲醇定容, 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 即得。

2.3.3 淫羊藿苷阴性对照液的制备 按“2.1”项下方法制备除淫羊藿药材外的其他药材水提液, 按“2.3.2”项下

方法制备, 即得淫羊藿苷阴性对照液。

2.3.4 色谱条件 色谱柱: Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-水 (25:75, V/V)<sup>[7]</sup>; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。在此色谱条件下, 取“2.3.1”“2.3.2”项下溶液进样测定, 结果, 理论板数(按淫羊藿苷峰计) $\geq 3\ 000$ , 分离度 $>1.5$ 。色谱图见图 2。

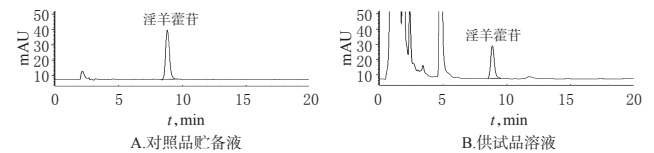


图2 淫羊藿苷的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of icariin

2.3.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.3.1”项下对照品贮备液 2、4、8、10、25 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得系列对照品溶液。分别精密吸取系列对照品溶液 10  $\mu\text{L}$  进样测定, 以淫羊藿苷的质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归, 得回归方程为 $y=326.6x+128.2$ ( $r=0.999\ 8$ )。结果表明, 淫羊藿苷在 8.64~108  $\mu\text{g/mL}$  范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.3.6 精密度、稳定性、重复性和加样回收试验 按照相关方法进行操作。结果, 精密度试验峰面积的 RSD 为 0.65% ( $n=6$ ); 稳定性试验峰面积的 RSD 为 1.22% ( $n=6$ ); 重复性试验峰面积的 RSD 为 1.89% ( $n=6$ ); 加样回收率为 95.7%~99.1%, 平均值为 97.0% (RSD=1.18%,  $n=6$ )。

2.3.7 样品测定 按“2.3.4”项下色谱条件, 分别取对照品溶液 (43.2  $\mu\text{g/mL}$ ) 及供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 进样测定, 记录峰面积, 计算样品中淫羊藿苷含量。

## 2.4 得膏率测定

精密吸取“2.1”项下水提液 25 mL, 置于干燥至恒质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105  $^{\circ}\text{C}$  干燥 3 h, 置干燥器中冷却 30 min, 迅速精密称定质量, 计算得膏率[得膏率(%)=干膏质量/水提液质量 $\times 100\%$ ]。

## 2.5 正交试验优选水提工艺

2.5.1 水提工艺正交试验设计 结合文献[8-12]报道及预试验, 以加水量(A, 倍)、煎煮时间(B, h)、煎煮次数(C)为考察因素, 以阿魏酸含量、淫羊藿苷含量及水提液得膏率的综合评分为考察指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交法对提取工艺进行考察。因素与水平见表 1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(加水量), 倍	B(煎煮时间), h	C(煎煮次数)
1	8	0.5	1
2	10	1.0	2
3	12	1.5	3

2.5.2 正交试验结果与分析 采用多指标综合评分,其中阿魏酸含量和淫羊藿苷含量分别占40%,得膏率占20%,综合评分=阿魏酸含量/最大阿魏酸含量×100×0.4+淫羊藿苷含量/最大淫羊藿苷含量×100×0.4+得膏率/最大得膏率×100×0.2。正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	因素				阿魏酸含量,mg/g	淫羊藿苷含量,mg/g	得膏率, %	综合评分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	0.17	0.61	15.45	48.90
2	1	2	2	2	0.31	0.95	23.32	78.03
3	1	3	3	3	0.34	1.01	27.15	85.73
4	2	1	2	3	0.31	1.08	24.21	82.60
5	2	2	3	1	0.38	1.29	28.08	99.09
6	2	3	1	2	0.20	0.65	18.42	53.87
7	3	1	3	2	0.24	0.94	26.97	72.96
8	3	2	1	3	0.18	0.64	17.25	50.63
9	3	3	2	1	0.33	1.24	26.47	91.17
$K_1$	70.89	68.15	51.13	79.72				
$K_2$	78.52	75.91	83.93	68.29				
$K_3$	71.58	76.92	85.93	72.98				
R	7.63	8.77	34.80	11.43				

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

差异来源	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	106.870	2	53.44	1.000	>0.05
B	138.151	2	69.08	1.293	>0.05
C	2290.840	2	1145.42	21.436	<0.05
D	198.162	2	99.08	1.854	>0.05
误差	106.870				

注:  $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note:  $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表2和表3可知,因素C(提取次数)对阿魏酸含量、淫羊藿苷含量及得膏率的综合评分结果有显著性影响,因素B(煎煮时间)、因素A(加水量)对于试验结果影响不大,影响因素大小排序依次为C>B>A。综合考虑,可确定最优水提工艺为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即加10倍量水煎煮3次,每次煎煮1h。

2.5.3 验证试验 按处方比例称取药材,按照上述试验优选的最优工艺提取,合并提取液,浓缩至250 mL。测定提取液中阿魏酸、淫羊藿苷的含量,并计算得膏率和综合评分,结果见表4。

表4 验证试验结果(n=3)

Tab 4 Results of verification test(n=3)

试验号	阿魏酸含量,mg/g	淫羊藿苷含量,mg/g	得膏率, %	综合得分	RSD, %
1	0.36	1.22	27.6	94.52	
2	0.40	1.24	28.2	99.77	2.77
3	0.37	1.24	28.8	97.04	
平均值	0.38	1.23	28.2	97.11	

### 3 讨论

本研究处方药味多达12种,需要采用多指标成分对

工艺路线进行全面研究。当归和淫羊藿同为君药,共同起到促进骨骼生长愈合的作用<sup>[13]</sup>。阿魏酸为当归的主要有效成分,淫羊藿苷为淫羊藿的主要药效成分,因此以阿魏酸和淫羊藿苷的含量作为主要评价指标;方中其余药味也多以水溶性成分为活性成分,故以得膏率为辅助评价指标;权重系数分别为阿魏酸和淫羊藿苷的含量各占40%,得膏率占20%。

笔者在预试验中分别提取了3次和2次<sup>[14]</sup>,发现提取3次和2次的出膏率分别为28%、24%,故正交试验设计中提取次数进行考察。结果显示,提取3次为最优提取次数,这可能是由于提取3次得膏率较高。而且有研究报道,以水煎法提取淫羊藿中的淫羊藿苷时,提取3次转移率较高<sup>[15]</sup>,故提取3次综合评分较高。

### 参考文献

- [1] 侯守谦.内服养血接骨散治疗骨折延迟愈合52例[J].甘肃中医,2009,22(12):34-35.
- [2] 李婍,王学美.淫羊藿苷药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2008,33(23):2727-2732.
- [3] 李曦,张丽宏,王晓晓,等.当归化学成分及药理作用研究进展[J].中药材,2013,36(6):1023-1028.
- [4] 李福龙,李继红,刘艳凯,等.川芎嗪、当归注射液对DIC大鼠血小板功能和器官血流量的影响[J].基础医学与临床,2006,26(8):909-910.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:281.
- [6] 窦霞,靳子明,狄留庆.党参超微粉碎工艺优选及溶出度考察[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(9):23-25.
- [7] 马慧,王淑君,蒋艳霞,等.HPLC法测定骨力颗粒中淫羊藿苷的含量[J].南方医科大学学报,2009,29(12):2543-2544.
- [8] 唐勇琛,梁学政,陈惠红,等.正交试验优选五子补肾胶囊水提醇沉工艺[J].中国医院药学杂志,2013,33(23):2002-2004.
- [9] 卢泓,庄珂.正交设计优选淫羊藿提取工艺研究[J].长春中医药大学学报,2004,20(3):36-37.
- [10] 王庆阳,林红,韩琳.紫荆挥发油提取工艺研究[J].中国医院药学杂志,2012,32(15):1191-1193.
- [11] 李玲,王冰,张彤,等.正交试验法优选左归丸的醇提和水提工艺[J].中药材,2015,38(8):1724-1727.
- [12] 王瑜,洪育萍.复方淫羊藿颗粒提取工艺的研究[J].中国医药导报,2009,6(19):90-91.
- [13] 侯守谦,冯彦斌.浅谈淫羊藿在骨科临床治疗中的应用体会[J].中国医药指南,2013,33(11):217-218.
- [14] 陈剑平,张尚斌,郑平,等.正交试验优化健脾益肾丸的水提工艺[J].中国药房,2016,27(34):4833-4835.
- [15] 王欣,王婷婷,王海军,等.淫羊藿中淫羊藿苷提取工艺研究[J].中国药房,2009,20(9):670-671.

(收稿日期:2016-08-18 修回日期:2017-04-01)

(编辑:刘明伟)