

强筋健骨方回流提取工艺的优化

李俊芳¹, 肖学凤¹, 于国华², 耿 亚³, 李 慧^{4*}, 许海玉⁴
(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 北京中医药大学, 北京 100700; 3. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的 优化强筋健骨方回流提取工艺。方法 HPLC 法测定淫羊藿苷和柚皮苷含量。在单因素试验基础上, 以提取时间、提取次数、60% 乙醇加入量为影响因素, 淫羊藿苷和柚皮苷转移率为评价指标, 正交试验优化提取工艺。结果 最佳条件为提取时间 3 h, 提取次数 2 次, 60% 乙醇加入量 10 倍, 淫羊藿苷转移率 92.56%, 柚皮苷转移率 66.74%。结论 该方法稳定可行, 可用于回流提取强筋健骨方。
关键词: 强筋健骨方; 淫羊藿苷; 柚皮苷; 回流提取; 正交试验; HPLC
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)02-0301-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.02.013

Optimization of reflux extraction for Qiangjin Jiangu Prescription

LI Jun-fang¹, XIAO Xue-feng¹, YU Guo-hua², GENG Ya³, LI Hui^{4*}, XU Hai-yu⁴
(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

KEY WORDS: Qiangjin Jiangu Prescription; icariin; naringin; reflux extraction; orthogonal test; HPLC

随着人口老龄化进程的加快, 骨质疏松症患者人数不断增加, 2006 年中国 50 岁以上患者约为 6 944 万人, 预计到 2020 年将增至 2.866 亿人^[1-2]。其发病原因主要是由于在骨代谢过程中骨转换的失衡, 导致骨形成减少, 使得骨细胞与破骨细胞之间的耦联发现失衡^[3-4]。

本课题组结合现代研究成果, 遵循“养胜于治”的中医养生精髓, 自主研发增加骨密度保健食品, 并初步命名为强筋健骨方, 其由淫羊藿、骨碎补、大豆异黄酮、山药、牡蛎 5 味药材组成, 具有强筋健骨, 增加骨密度功效, 方中淫羊藿为君药, 骨碎补为臣药。其中, 淫羊藿苷作为淫羊藿的有效药理成分, 被视为植物雌激素, 近年来广泛应用于对骨质疏松症的治疗, 以及成骨和破骨的研究^[5], 该成分促进人成骨细胞骨形成能力的机制是通过提高其增殖能力而实现^[6]。柚皮苷是骨碎补中含有量最为丰富的黄酮类物质, 宋元时期就用

于治疗骨痹症, 迄今仍为伤科常用药^[7], 具有补肝肾, 强筋骨功效, 可以促进人骨髓间充质干细胞的增殖和成骨性分化^[8]。

由于仅以单一指标成分进行工艺优选并不符合中药多组分、多靶点作用的特点^[9-11], 故为了正确评价和控制强筋健骨方质量, 确保其最大限度地发挥药效, 本实验以淫羊藿苷和柚皮苷为评价指标, 采用 HPLC 法同时测定两者含量, 再通过正交试验优化提取工艺, 为进一步开发利用该制剂提供参考。

1 材料

1.1 仪器与试药 Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); KDM (A) 型自动恒温电热套 (江苏省金坛市金祥龙电子有限公司); XS105DU 分析天平 (上海翼控机电有限公司); BK-360B 超声仪 (济南巴克超声波科技有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅 (江苏省常州市华普

收稿日期: 2016-06-07
基金项目: 国家科技支持计划课题 (2011BAI07B00, 2011BAI07B08)
作者简介: 李俊芳 (1991—), 女, 硕士生, 从事中药新剂型给药系统研究。Tel: 13512888387, E-mail: 13512888387@163.com
* 通信作者: 李 慧 (1967—), 女, 研究员, 从事中药新剂型给药系统研究。Tel: 13641365317, E-mail: lihuiyiren@163.com

达仪器有限公司)。淫羊藿苷(批号 MUST-15081811)、柚皮苷(批号 MUST-15091804)对照品(成都曼斯特生物科技有限公司)。淫羊藿(批号 1508033)、山药(批号 1503014)(河北百草康神药业有限公司);骨碎补(批号 141011005)、牡蛎(批号 150315001)(北京仟草中药饮片公司);大豆异黄酮(南京景竹生物科技有限公司,批号 JZ15032001),经中国中医科学院中药所生药标本室何希荣药师鉴定,均符合《中国药典》2015年版一部有关规定。甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 HPLC法测定淫羊藿苷和柚皮苷含量

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈₍₂₎ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 mm);流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~8 min, 25% A; 8~20 min, 25%~30% A; 20~30 min, 30%~90% A; 30~40 min, 90% A);体积流量 1 mL/min;柱温 30℃;检测波长 270 nm(淫羊藿苷)、283 nm(柚皮苷);进样量 10 mL。HPLC 色谱图见图 1。

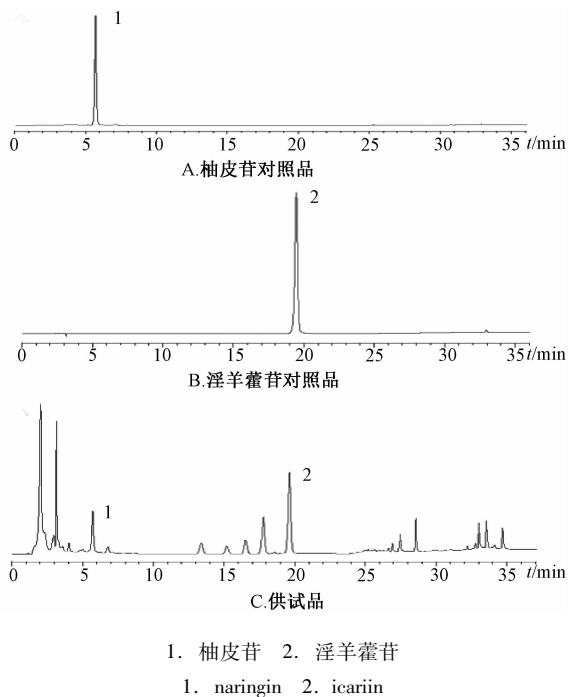


图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.1.2 对照品溶液配制 精密称取淫羊藿苷和柚皮苷对照品适量,加甲醇制成含有量分别为 0.515、0.528 mg/mL 的对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密称取按各提取工艺制备的浸膏(过 40 目筛) 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声(250 W、40 kHz) 30 min,冷却至室温,甲醇补足减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下对照品溶液 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为溶液 1,再从中取 5 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为溶液 2,依次稀释成 5 个质量浓度,在“2.1.1”项色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标(Y),淫羊藿苷质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得到淫羊藿苷回归方程为 $Y = 21\,466X + 42.689$ ($r = 0.999\,9$),在 0.016~0.515 mg 范围内呈良好的线性关系。同法得到柚皮苷回归方程为 $Y = 10\,140X + 22.035$ ($r = 0.999\,9$),在 0.016~0.528 mg 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,连续 6 次,测得淫羊藿苷和柚皮苷峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 0.38% 和 1.99%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,于 0、2、4、8、12、24 h 进样,记录峰面积,测得淫羊藿苷和柚皮苷峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 1.12% 和 2.36%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液,共 6 份,在“2.1.1”项色谱条件下测定,测得淫羊藿苷和柚皮苷峰面积 RSD ($n = 6$) 分别为 1.04% 和 0.58%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品浸膏 9 份 ($n = 3$),每份 0.5 g,按照淫羊藿苷和柚皮苷含有量的 80%、100%、120% 3 个水平加入“2.1.2”项下对照品溶液,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定,计算回收率,结果见表 1。

2.2 提取工艺优化

2.2.1 单因素试验 文献[12-13]报道,淫羊藿和骨碎补的活性成分均为黄酮类物质,分别以淫羊藿苷和柚皮苷为主。同时,为了充分提高有效成分的溶出率,宜采用乙醇回流提取。因此,固定其他提取因素,以 50%、60%、70%、80% 乙醇为提取溶剂,淫羊藿苷和柚皮苷转移率为评价指标,综

合评分法进行统计分析，以各指标最大值为参照，对数据进行归一化处理，两者权重系数分别设定为 0.6 和 0.4。结果见表 2，最终确定 60% 乙醇作为提取溶剂。

表 1 加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 1 Results of recovery tests (n=9)

成分	称样量/	原有量/	加入量/	测得量/	回收率/	平均回收
	g	g	g	g	%	率/% (RSD/%)
柚皮苷	0.501 8	1.225 1	0.976 6	2.202 5	100.08	100.14
	0.499 7	1.220 0	0.976 6	2.223 7	102.78	(2.61)
	0.500 0	1.220 7	0.976 6	2.173 4	97.55	
	0.500 0	1.220 7	1.220 8	2.394 8	96.17	99.28
	0.499 3	1.219 1	1.220 8	2.419 9	98.36	(3.68)
	0.500 7	1.222 5	1.220 8	2.483 6	103.30	
	0.498 7	1.217 6	1.464 9	2.642 8	97.29	97.48
	0.501 3	1.223 9	1.464 9	2.636 4	96.42	(1.19)
	0.499 3	1.219 2	1.464 9	2.665 5	98.73	
	0.501 2	2.371 1	1.892 2	4.250 0	99.30	101.07
淫羊藿苷	0.501 0	2.369 8	1.892 2	4.268 4	100.33	(2.22)
	0.500 7	2.368 7	1.892 2	4.329 0	103.59	
	0.500 0	2.365 5	2.365 3	4.644 6	96.36	97.91
	0.498 4	2.357 9	2.365 3	4.724 9	100.07	(1.98)
	0.501 5	2.372 4	2.365 3	4.673 5	97.29	
	0.501 0	2.369 8	2.838 4	5.190 8	99.39	98.36
	0.501 5	2.372 2	2.838 4	5.124 4	96.96	(1.27)
	0.499 7	2.363 7	2.838 4	5.166 1	98.73	

表 2 单因素试验结果

Tab. 2 Results of single factor tests

乙醇/%	淫羊藿苷转移率/%	柚皮苷转移率/%	综合评分
50	71.80	24.06	94.30
60	79.33	25.75	97.37
70	74.72	15.25	80.20
80	73.20	12.26	74.41

注：综合评分 = (淫羊藿苷转移率/79.33) × 0.6 × 100 + (柚皮苷转移率/25.75) × 0.4 × 100

2.2.2 正交试验

2.2.2.1 试验设计 以提取时间 (A)、提取次数 (B)、60% 乙醇加入量 (C) 为影响因素，淫羊藿苷和柚皮苷转移率为评价指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，筛选最佳提取工艺参数。因素水平见表 3。

表 3 因素水平

Tab. 3 Factors and levels

水平	因素		
	A 提取时间/h	B 提取次数/次	C 60% 乙醇加入量/倍
1	1	1	8
2	2	2	10
3	3	3	12

2.2.2.2 试验结果与分析 按处方比例称取药材

9 份，每份 45 g，采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验，结果见表 4。由表可知，各因素对有效成分转移率的影响程度依次为 $B > A > C$ ，即提取次数 > 提取时间 > 60% 乙醇加入量，最优工艺为 $A_3B_2C_3$ 。

表 4 正交试验结果

Tab. 4 Results of orthogonal tests

试验号	因素				淫羊藿苷 转移率/%	指标 柚皮苷转 移率/%	综合 评分
	A	B	C	D (误差)			
1	1	1	1	1	58.18	25.84	50.20
2	1	2	2	2	92.06	40.18	78.99
3	1	3	3	3	93.88	51.94	87.35
4	2	1	2	3	74.17	24.52	58.77
5	2	2	3	1	95.58	56.61	91.25
6	2	3	1	2	84.07	51.88	81.56
7	3	1	3	2	75.38	37.07	67.27
8	3	2	1	3	97.20	64.45	97.07
9	3	3	2	1	102.19	54.88	94.06
K_1	72.18	58.75	76.28	78.50			
K_2	77.19	89.10	77.27	75.94			
K_3	83.13	87.66	81.96	81.06			
R	13.95	30.36	5.68	5.12			

注：综合评分 = (淫羊藿苷转移率/102.19) × 0.6 × 100 + (柚皮苷转移率/64.45) × 0.4 × 100

2.2.2.3 方差分析 结果见表 5。由表可知，提取次数 (B) 为主要影响因素，对实验结果有显著影响 ($P < 0.05$)，而提取时间 (A) 和 60% 乙醇加入量 (C) 均无显著影响 ($P > 0.05$)。由于提取次数影响较小，考虑到实际生产中溶剂回收、节约成本等因素，最终确定提取工艺为 $A_3B_2C_2$ 。即 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次，每次 3 h。

表 5 方差分析

Tab. 5 Analysis of variance

因素	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	299.753	2	149.876	5.431	0.155
B	1 759.408	2	879.704	31.879	0.03
C	39.373	2	19.686	0.713	0.584
D(误差)	55.189	2	27.595	—	—

2.2.2.4 验证试验 按照优化工艺进行 3 批验证试验，测得淫羊藿苷转移率为 92.56%，RSD ($n = 3$) 为 2.29%；柚皮苷转移率为 66.74%，RSD ($n = 3$) 为 0.6%，表明该工艺稳定、合理、可行。

3 讨论和结论

药理研究表明，淫羊藿苷具有补肾阳、强筋骨、祛风湿^[14]等功效，柚皮苷有抗氧化、抗炎、促骨形成、抑制骨破坏等作用^[15]，并且前者对骨质疏松模型大鼠有明显增加股骨和椎骨的骨密度的

作用^[16]，而后者通过雌激素信号通路促进骨形成活动^[3]，具有显著的镇痛抗炎的效果^[17]。因此，由淫羊藿和骨碎补组成的处方中具有能够强筋健骨的物质基础。《保健食品配方组方规律研究》^[18]记载，394 个配方中含淫羊藿的配方有 51 个，骨碎补和淫羊藿原料组合频次为 26。

在单因素试验中，选择 4 种不同体积分数的含醇量，从而能更好地筛选出适合的提取溶剂。本实验以提取时间、提取次数、60% 乙醇加入量为影响因素，淫羊藿苷和柚皮苷转移率为评价指标，综合评分法（方中淫羊藿属于君药，骨碎朴属于臣药，故将两者权重系数分别设定为 0.6 和 0.4）得到最优提取工艺为 10 倍量 60% 乙醇提取 2 次，每次 3 h，并且验证试验表明该方法操作性强，稳定性好，为该制剂后续开发奠定基础。

参考文献：

[1] 吴 晶, 刘新灵, 贺小宁, 等. 骨质疏松疾病负担与治疗现状[J]. 中国医疗保险, 2015(11): 57-60.

[2] 胡 军, 张 华, 牟 青. 骨质疏松症的流行病学趋势与防治进展[J]. 临床荟萃, 2011, 26(8): 729-731.

[3] 翟远坤, 牛银波, 潘亚磊, 等. 柚皮苷对体外培养乳鼠颅骨成骨细胞增殖和分化成熟的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 105-111.

[4] 赵咏芳, 詹红生, 徐 宇, 等. 补肾益精中药调控体外培养成骨细胞 IGF-I 分泌与表达的研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(12): 4-6.

[5] 吴 涛, 徐俊昌, 南开辉, 等. 淫羊藿苷促进羊骨髓间充质

干细胞的增殖和成骨分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(19): 3725-3729.

[6] 郭海玲, 赵咏芳, 王 翔, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖及 OPG 蛋白表达的实验研究[J]. 中国骨伤, 2011, 24(7): 585-588.

[7] 陈 顺, 关延彬. 骨碎补药理作用的研究进展[J]. 医药导报, 2006, 25(7): 685-687.

[8] 邓展生, 张 璇, 邹冬青, 等. 骨碎补有效成分柚皮甙对人骨髓间充质干细胞的影响[J]. 湘南学院学报: 自然科学版, 2005, 7(4): 5-7.

[9] 周 军, 秦向阳, 孙晓莉. 多指标综合评分法优化花芪通脉颗粒的提取工艺[J]. 医药导报, 2006, 25(4): 330-332.

[10] 李 丽, 周 军, 张 莹, 等. 多指标综合评分法优化痛风宁颗粒提取工艺[J]. 中成药, 2007, 29(2): 281-283.

[11] 郝旭亮, 张永文. 中药质量标准中建立多指标含量测定的必要性浅析[J]. 中国执业药师, 2009, 6(9): 31-33.

[12] 葛淑兰, 田景振. 淫羊藿及其有效成分的药理研究进展[J]. 中国药师, 2005, 8(6): 462-464.

[13] 朱慧锋, 王唯佳, 王珠美. 骨碎补研究进展[J]. 中国骨伤, 2009, 22(1): 66-67.

[14] 曾庆岳, 王云山. 淫羊藿药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2012, 31(4): 462-465.

[15] 殷方明, 肖涟波, 张 昀. 骨碎补柚皮苷对炎症及骨作用的相关研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(2): 182-186.

[16] 崔新颖, 崔新羽. 淫羊藿苷对实验大鼠骨质疏松症的影响[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2008, 9(2): 121-122.

[17] 谢仁峰, 文双娥, 李 洋, 等. 柚皮苷抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2011, 8(4): 5-8.

[18] 唐仕欢, 卢 朋, 杨洪军. 保健食品配方组方规律研究[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2016.