

## 正交设计进行消淤接骨散的醇提工艺\*\*

周钰<sup>1</sup>, 黄国志<sup>1</sup>, 梁东辉<sup>2</sup>, 邓虹珠<sup>3</sup>, 易延途<sup>3</sup>, 曾庆<sup>1</sup>, 吴卫卫<sup>1</sup>, 樊涛<sup>1</sup>

### Ethanol extraction from connecting bones and reducing swelling powder by orthogonal design method

Zhou Yu<sup>1</sup>, Huang Guo-zhi<sup>1</sup>, Liang Dong-hui<sup>2</sup>, Deng Hong-zhu<sup>3</sup>, Yi Yan-kui<sup>3</sup>, Zeng Qing<sup>1</sup>, Wu Wei-wei<sup>1</sup>, Fan Tao<sup>1</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** The drug effect does not show apparently through the method of aqueous extraction for the connecting bones and reducing swelling powder. The reason could be that the effective components cannot be extracted sufficiently.

**OBJECTIVE:** To optimize the ethanol extraction technology from the powder of connecting bones and reducing swelling by orthogonal trial.

**METHODS:** The ethanol extraction rate in prescription and Naringin volume, which is an effective component of principal drug rhizoma drynariae, were taken as the measurement index, for the optimization through  $L_9(3^4)$  orthogonal trial. Naringin content was determined by high-performance liquid chromatography method and the ethanol extraction techniques from connecting bones and reducing swelling powder were optimized. The ethanol extraction rate, Naringin volume, and the rate of alcohol absorption were observed

**RESULTS AND CONCLUSION:** The percentages of ethanol extraction rate and Naringin volume were more than 10% in the third ethanol extraction. The components of Chinese herbal medicine can be completely extracted through three ethanol extractions. The average of alcohol absorption rate was 265.67 mL/g, which means more than 3 times of menstruum would be added in the first ethanol extraction. The result of orthogonal test showed that the dosage of menstruum was the key factor, the ethanol volume fraction was the subordination factor and the time cost in extraction was the most subordination factor, assayed by range R value. The analysis of variance showed that there were significant differences in the effect of the ethanol volume fraction and the dosage of menstruum ( $P < 0.05$ ), so the optimized extraction condition was: 65% ethanol refluxed and extracted for three times, six times of ethanol extracted for 2 hours, five times for 1.5 hours, five times for 1.5 hours respectively. The optimized extraction technique is superior to routine technology regarding extracting drug components, thus avoiding unwanted technology process. The optimized process is repeatable, simply operated and could reach high naringin content.

<sup>1</sup>Department of Rehabilitation Medicine,

<sup>2</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China;

<sup>3</sup>College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Zhou Yu★, Studying for master's degree, Department of Rehabilitation Medicine, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China 1061302248@qq.com

Zhou Y, Huang GZ, Liang DH, Deng HZ, Yi YK, Zeng Q, Wu WW, Fan T. Ethanol extraction from connecting bones and reducing swelling powder by orthogonal design method. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(8): 1433-1436. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

**背景:** 采用传统水提法提取的消淤接骨散药效不明显, 推测可能为有效成分提取不充分所致。

**目的:** 正交实验进行消淤接骨散醇提取工艺设计。

**方法:** 以处方的醇浸膏得率和君药骨碎补有效成分柚皮苷含量为考察指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交实验法进行优选, HPLC 法测定柚皮苷含量, 对消淤接骨散醇提取工艺进行优化筛选。观察醇浸膏得率, 柚皮苷含量及吸醇率。

**结果与结论:** 第3次醇提的醇浸膏得率及柚皮苷提取量所占比率均大于10%, 应进行3次醇提方可完全提取药物成分。药材吸醇率平均值为265.67 mL/g, 表明提取时第1次应多加3倍量溶剂。正交实验结果分析, 由极差R值大小显示, 各因素作用主次为加醇量>乙醇体积分数>提取时间, 方差分析结果表明: 乙醇体积分数、加醇量两因素的影响具有显著性意义( $P < 0.05$ )。最佳优选工艺即药材加乙醇回流提取3次, 第1次加6倍量体积分数65%乙醇提取2 h, 第2次加5倍量体积分数65%醇提取1.5 h, 第3次加5倍量体积分数65%醇提取1.5 h。较以往中药提取工艺可更有效得出药物有效成分、节省不必要的工艺流程, 且该工艺操作简单, 重复性好, 柚皮苷含量高。

**关键词:** 消淤接骨散; 正交设计; 柚皮苷; 醇浸膏得率; 提取工艺

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.08.025

Correspondence to: Liang Dong-hui, Chief physician, Professor, Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China dhliang@hotmail.com

Supported by: Science and Technology Plan of Guangdong Province, No. 2006B35802005\*

Received: 2010-08-02 Accepted: 2010-09-25

周钰, 黄国志, 梁东辉, 邓虹珠, 易延途, 曾庆, 吴卫卫, 樊涛. 正交设计进行消淤接骨散的醇提工艺[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8):1433-1436. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

消淤接骨散中含有骨碎补、三七、红花等中药, 具有活血化瘀、续伤止痛、补肾强骨、促进筋骨愈合功效等。常用水煎剂, 但文献显示水提法结果药效不明显, 推测有效成分提取不充分导致<sup>[1]</sup>。方中君药骨碎补主要活性是以柚皮苷为代表的二氢类黄酮化合物<sup>[2]</sup>, 易溶于乙

醇、丙酮等有机溶剂, 本实验旨在探讨醇提浓度、加醇量、时间、次数等因素对提取工艺的影响, 以醇浸膏得率和有效成分柚皮苷含量为指标, 采用正交设计的方法对消淤接骨散醇提取工艺进行优选<sup>[3]</sup>, 为制备工艺提供实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 采用  $L_9(3^4)$  正交实验法进行优选。

南方医科大学附  
属珠江医院, 2 中  
复医学科, 广东  
省广州市医药  
510282; 南方医  
科大学中医药学  
院, 广东省广州  
510515

周钰★, 女, 1985  
年生, 河南省驻  
马店市人, 汉族,  
南方医科大学附  
属珠江医院康复  
医学科在读硕士,  
主要从事超声电  
导经皮透入纳米  
中药的镇痛机理  
和应用基础研究。  
1061302248@  
qq.com

通讯作者: 梁东  
辉, 主任医师、教  
授, 南方医科大学  
附属珠江医院中  
医科, 广东省广州  
市 510282  
dhliang@  
hotmail.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2011)08-01433-04

收稿日期: 2010-08-02  
修回日期: 2010-09-25  
(20110802022/GW  
·Y)

**时间及地点:** 于2008-12/2009-09在南方  
医科大学中医药学院实验室完成。

**材料:**

**主要试剂及仪器:**

主要药品与 仪器	来源
药材	广州市药材公司中药饮片厂, 批号: 090112, 090607, 090918 等。其中 砂烫骨碎补经南方医科大学中药教研室的 专家鉴定确认为水龙骨科植物槲蕨 Drynaria fortunei (Kunze) J.Sm.的干燥 根茎;
三七药材	广州市药材公司中药饮片厂, 批号: 090315, 090628, 090820 等。
红花药材	广州市药材公司中药饮片厂, 批号: 090224, 090607, 090918 等。
柚皮苷 对照品	中国药品生物制品检定所, 批号 110753-200212
甲醇	色谱纯, 上海振兴化工一厂, 批号 200802006
Agilent1200 型高效液 相色谱仪	美国安捷伦公司
UV-2401PC 紫外可见分 光光度仪	Shimadzu, Japan
SK1200H 型超声波 清洗器	上海科导超声仪器有限公司

### 实验方法:

#### 柚皮苷含量测定:

供试品溶液制备<sup>[4]</sup>: 按处方比例称取药材,  
加体积分数65%乙醇回流提取3次, 分别为2.0,  
1.5, 1.5 h, 加醇量依次为6, 5, 5倍量, 滤过,  
滤液合并。用旋转蒸发器蒸发乙醇, 100 °C 恒  
温水浴锅蒸发水分, 置于65 °C 恒温干燥箱浓缩  
干燥, 将干浸膏粉碎后取约1 g, 精密称定, 置  
50 mL容量瓶中, 加甲醇约40 mL, 超声处理(功  
率: 240 W, 频率: 45 Hz)30 min, 放冷, 加甲  
醇至刻度, 摇匀, 离心, 取上清液用0.45 μm微  
孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

对照药材溶液的制备及阴性度试品溶液的  
制备<sup>[4-5]</sup>: 取骨碎补药材约0.25 g, 精密称定及  
按处方比例称取药材(去除骨碎补), 按“供试品  
溶液制备”项下同法制备, 即得对照药材溶液  
及阴性度试品溶液。

对照品溶液的制备<sup>[6]</sup>: 精密称取在五氧化二磷  
减压干燥器中干燥36 h至恒质量的柚皮苷对照品  
5 mg, 置25 mL量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作  
为对照品储备液; 精密量取3 mL, 置10 mL量瓶

中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 4 °C 以下冷藏备用。

色谱条件<sup>[7]</sup>: Polaris 色谱柱 C18(4.6 mm×  
200.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(35 : 65);  
流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温:  
25 °C; 理论板数按柚皮苷峰计算应不低于3 000。

#### 方法学考察<sup>[8]</sup>:

标准曲线制备: 精密吸取浓度为60 mg/L的  
柚皮苷对照品溶液2.5, 5, 10, 15, 20, 30 μL  
分别注入液相色谱仪, 测定其峰面积, 进行线  
形回归, 求标准曲线方程。

精密度试验: 精密吸取同一批号供试品溶液  
10 μL, 连续进样6次, 测定其峰面积, 求RSD值。

重现性试验: 取同一批号供试品溶液6份,  
分别进样10 μL, 记录其峰面积, 求RSD值。

稳定性试验: 同一批号供试品溶液分别于  
0, 3, 6, 9, 15, 24 h进样10 μL, 测定其峰  
面积, 求RSD值。

加样回收率试验<sup>[9]</sup>: 精密称取已知含量为  
2.56 mg/g柚皮苷的样品1 g约6份, 分别精密加  
入柚皮苷对照品溶液(0.54 mg/L)10 mL, 后定  
容至50 mL容量瓶内, 加甲醇至刻度。精密吸  
取10 μL进样, 测定其峰面积, 求RSD值。

吸醇率的考查: 按处方比例称取药材, 加入5  
倍量的体积分数65%乙醇, 浸泡24 h, 过滤,  
量取滤液体积, 按吸醇率(%)=[乙醇加入量-滤  
液量(mL)]/药材量(g)×100%计算吸醇率。

醇提次数的选择试验: 按处方比例称取药材,  
加体积分数65%乙醇回流提取3次, 分别为2.0,  
1.5, 1.5 h, 加醇量依次为6, 5, 5倍量, 滤过,  
浓缩, 定容至一定体积250 mL。分别测定第1,  
2, 3次的醇浸膏得率及柚皮苷提取量。

醇浸膏得率的测定<sup>[10]</sup>: 按照(中国药典2005  
年版一部附录X A)浸出物测定法, 精密吸取已  
定容的溶液20 mL, 置已干燥至恒质量的蒸发  
皿中, 在水浴上蒸干后, 于105 °C干燥3 h,  
置干燥器中冷却30 min, 迅速精密称质量, 以  
干燥品计算供试品中浸出物的含量法。按醇浸  
膏得率(%)=浸膏质量/20 mL药液相当于药材质  
量×100%, 计算醇浸膏得率。

正交试验设计的方法及结果: 称取一定量药  
材, 回流提取3次, 滤过, 滤液合并, 浓缩, 定  
容至500 mL。以处方的醇浸膏得率和有效成分  
柚皮苷含量为考察指标, 采用正交试验对乙醇  
体积分数(A)、加醇量(B)、提取时间(C)3个因  
素进行考察。每个因素有3个水平, 考察处方的  
提取工艺。按表1安排实验, 滤液合并滤过, 测定  
柚皮苷含量, 计算柚皮苷转移率。

表1 实验因素水平表  
Table 1 Design for factors and level of orthogonal test

Level	Factor		
	Ethanol concentration (%)	Amount of solvent (times)	Extraction duration (h)
1	85	7, 6, 6	2.5, 2.0, 2.0
2	65	6, 5, 5	2.0, 1.5, 1.5
3	50	5, 4, 4	1.5, 1.0, 1.0

柚皮苷含量为衡量醇提工艺的主要指标, 权重系数定为0.7<sup>[11]</sup>。浸膏得率在实际生产中具有重要意义, 将浸膏得率作为次要指标, 权重系数定为0.3<sup>[11]</sup>。

$$\text{综合评分} = 70 \times (\text{柚皮苷含量} / \text{柚皮苷含量max}) + 30 \times (\text{浸膏得率} / \text{浸膏得率max})$$

**主要观察指标:** 醇浸膏得率, 柚皮苷含量及吸醇率。

**统计学分析:** 数据由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理。结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间差异性比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 方法学考察结果** 标准曲线方程为:  $Y = 72.008X + 18.041$ ,  $r = 0.999$   $4(n=6)$ 。结果表明, 柚皮苷在0.135~1.620 mg/L范围内具有良好的线性关系; 精密密度试验测得RSD值为0.86%; 重现性试验测得RSD值为1.46%; 稳定性试验测得RSD值为1.04%, 表明供试品溶液在24 h内基本稳定; 加样回收率试验结果见表2。

表2 加样回收率测定结果  
Table 2 Results of coefficient of recovery (n=6)

Number	Sampling volume (μL)	Naringin volume (mg)	Amount of adding naringin (mg)
1	10	2.56	0.54
2	10	2.56	0.54
3	10	2.56	0.54
4	10	2.56	0.54
5	10	2.56	0.54
6	10	2.56	0.54

Number	Determination of naringin content (mg)	Recovery rate (%)	Average recovery (%)	RSD (%)
1	3.089	99.64	102.46	2.31
2	3.127	100.89		
3	3.122	100.69		
4	3.243	104.63		
5	3.208	103.50		
6	3.268	105.42		

**2.2 吸醇率考察结果** 吸醇率平均值为265.67 mL/g, RSD为1.48% 表明提取时第1次应多加3倍量溶剂<sup>[12]</sup>。对照品、对照药材、供试品及阴性供试品溶液色谱图见图1, 2。

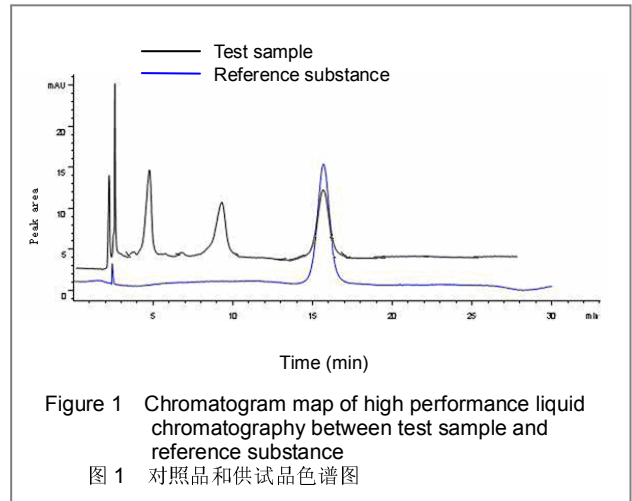


Figure 1 Chromatogram map of high performance liquid chromatography between test sample and reference substance

图1 对照品和供试品色谱图

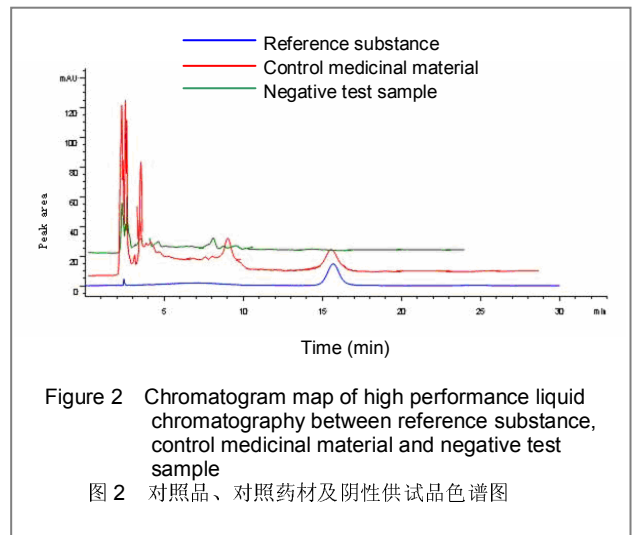


Figure 2 Chromatogram map of high performance liquid chromatography between reference substance, control medicinal material and negative test sample

图2 对照品、对照药材及阴性供试品色谱图

**2.3 醇提次数的选择试验结果** 见表3。

表3 醇提次数的选择实验  
Table 3 Results of selection experiment of ethanol extraction times

Decoction frequency	Extraction rate (%)	Naringin volume (mg)
First	11.017, 10.808, 10.950	105.623, 96.301, 120.880
Second	8.958, 9.467, 7.600	59.606, 64.504, 57.166
Third	4.542, 4.309, 4.725	23.809, 23.345, 26.376
The ratio of the third*	18.520, 17.530, 20.300	12.595, 12.677, 12.903
$\bar{x} \pm s$	18.78±1.40	12.73±0.16

\*the third ethanol extraction to total ethanol extraction volume, naringin extraction volume

第3次醇提的醇浸膏得率及柚皮苷提取量所占比率均大于10%, 应进行3次醇提方可完全提取药物成分。

**2.4 正交实验表及结果** 见表4, 方差分析见表5。

由表4极差R值大小显示, 各因素作用主次为加醇量 > 乙醇体积分数 > 提取时间, 方差分析结果表明: 乙醇体积分数、加醇量两因素的影响具有显著性意义( $P < 0.05$ ), 以 $A_2B_2C_2$ 为好; 选择 $A_2B_2C_2$ 组合为优选工艺。

表4 正交试验表及结果  
Table 4 Results of orthogonal test

Serial number	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1
K1	87.197	90.607	86.282	87.123
K2	91.789	91.828	87.241	85.476
K3	81.367	77.917	86.829	87.753
R	10.422	13.911	0.959	2.277

Serial number	Extraction rate (%)	Naringin volume (mg)	Synthetic score
1	24.017	232.538	90.857
2	22.117	242.078	91.390
3	18.550	212.779	79.344
4	27.100	242.552	97.038
5	24.583	253.270	97.217
6	21.700	206.56	81.112
7	22.633	213.008	83.927
8	23.817	218.943	86.878
9	18.950	189.292	73.295
K1			
K2			
K3			
R			

A: Ethanol fraction; B: amount of solvent; C: extraction time; D: error

表5 方差分析结果  
Table 5 Variance analysis of orthogonal test

Sources of variation	Deviation averages	Freedom	F ratio	Significance
A	163.704	2	19.738	< 0.05
B	356.061	2	42.930	< 0.05
C	1.388	2	0.167	> 0.05
D (error)	8.290	2		

A: Ethanol fraction; B: amount of solvent; C: extraction time; D: error  
F<sub>0.01</sub>(2, 2)=99.0, F<sub>0.05</sub>(2, 2)=19.0, F<sub>0.10</sub>(2, 2)=9.0

### 3 讨论

骨碎补活性成分是以柚皮苷为主的二氢黄酮类化合物, 若以柚皮苷一种物质(且容易受热破坏)为指标有失偏颇, 故建议以后以黄酮类化合物含量、醇浸膏得率及柚皮苷转移率为考察指标<sup>[4]</sup>。

本实验最后确定色谱条件: Polaris 色谱柱 C18 5 μm(4.6 mm×200.0 mm); 流动相: 甲醇-水(35 : 65); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 283 nm; 柱温: 25 °C; 理论板数按柚皮苷峰计算应不低于3 000。此时柚皮苷无其他杂质干扰, 保留时间适中, 峰形好。

该处方的吸醇率较高, 吸醇率与药物性质、药材粒

空隙的数量和大小、颗粒相互排列的方式有关, 推测可能药材粒径太小反而消耗过多乙醇, 为节约成本, 故投料时仍以原药材粗粉为宜。在以往的正交实验中, 往往会出现诸如用14倍量的乙醇回流提取3次, 2 h/次等情况, 对提取过的药渣依然加相同倍数的乙醇, 提取相同时间, 显然是没必要的, 反而会造成大量的浪费<sup>[5]</sup>。通过查阅大量的文献及结合实际情况, 将加醇量和提取时间设立梯度, 即使其随着提取次数的增多而减少, 结果表明: 此设计工艺稳定, 节约成本, 切实可行。

### 4 参考文献

- Zhai H, Wu XT. Xiandai Zhongyao Yanjiu yu Shijian. 2007; 21(6): 55-57. 瞿慧, 吴旭彤. 复方骨碎补胶囊提取工艺的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(6): 55-57.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005年版一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 179-180.
- Geng Y, Zhao QM, Jia TZ. Shizhen Guoyi Guoyao. 2007; 18(10): 2501-2502. 耿妍, 赵启苗, 贾天柱. 正交法优选盐炙骨碎补的最佳炮制工艺[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2501-2502.
- Gong JP, Guan Y, Rao XY, et al. Jiangxi Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2009; 21(6): 50-52. 龚建平, 官扬, 饶小勇, 等. 正交实验法优选妇骨肽软胶囊提取工艺[J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(6): 50-52.
- Quan H, Guo CQ, Qu QW, et al. Liaoning Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2009; 11(12): 16-17. 全红, 郭春秋, 曲倩文, 等. 骨碎补提取工艺的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(12): 16-17.
- Wu Y, Jiang XH, Jiang ML, et al. Hunan Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2010; 30(3): 48-50. 伍奕, 蒋晓煌, 蒋孟良, 等. 骨碎补中柚皮苷含量测定方法的优化研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(3): 48-50.
- Jiang F, An CH, Yang Y. Guiyang Zhongyi Xueyuan Xuebao. 2008; 30(4): 77-78. 江帆, 安崇惠, 杨义. HPLC法测定橘红痰咳糖浆中柚皮苷的含量[J]. 贵阳中医学院学报, 2008, 30(4): 77-78.
- Liu MM, Lai ZH, Huang L. Zhongguo Yaoshi. 2007; 10(8): 58-60. 刘敏敏, 赖志辉, 黄亮. 舒筋活血定痛丸质量标准研究[J]. 中国药师, 2007, 10(8): 58-60.
- Han LP, Liang D, Liu ZH. Jiefangjun Yaoxue Xuebao. 2009; 25(2): 145-147. 韩丽萍, 梁达, 刘志刚. 补骨壮骨颗粒质量标准的研究[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(2): 145-147.
- Du ZQ, Du TX, Wang ZD, et al. Zhongguo Zhongyao Zazhi. 2003; 28(1): 32-34. 杜志谦, 杜天信, 王中东, 等. 展筋剂提取工艺的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 32-34.
- Yu XL, Guan Y, Yu JP. Gongyi Yanjiu. 2006; 17(5): 366-367. 俞忻璐, 管燕, 俞建平. 正交试验优选胃宁舒胶囊的提取工艺[J]. 工艺研究, 2006, 17(5): 366-367.
- Liu HA, Wang BC, Jia Y, et al. Shengwu Jishu Tongxun. 2006; 7(1): 43-45. 刘火安, 王伯初, 贾芸, 等. 葛根总黄酮提取工艺的研究[J]. 生物技术通讯, 2006, 7(1): 43-45.

#### 来自本文课题的更多信息一

**基金资助:** 广东省科技计划项目(2006B35802005), 课题名称: “纳米中药功能材材的实验和应用研究”。

**作者贡献:** 设计为第一、三作者, 实施为第一、五作者, 统计学处理由第一作者完成。第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** ①消淤接骨散采用醇提工艺。②正交设计法对消淤接骨散的提取工艺优选。③对消淤接骨散进行了方法学考察。