

正交实验法优选妇骨肽软胶囊提取工艺*

★ 官扬¹ 罗晓健¹ 饶小勇² 游剑² 何双凤² 袁亮¹ 林婷婷¹ 龚建平^{2***} (1. 江西中医学院 330009
2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心 330006)

摘要:目的:优选妇骨肽软胶囊最佳提取工艺。方法:选择溶媒用量、提取时间、提取次数、乙醇浓度为考察因素,每个因素设计三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交设计法进行实验,以提取液中柚皮苷转移率和浸膏得率为指标对妇骨肽软胶囊提取工艺进行优化筛选。结果:妇骨肽软胶囊最佳提取工艺为用60%乙醇提取3次,每次加溶媒10倍量,每次提取1.5h。结论:确定的提取工艺稳定、经济、可行。

关键词:正交实验;妇骨肽;软胶囊;提取工艺

中图分类号:R 284.2 文献标识码:A

Optimum the Extraction Process for Fu Gutai soft gelatin capsule by Orthogonal Design

GUAN Yang¹, LUO Xiao-jian¹, RAO Xiao-yong¹, YOU Jian¹, HE Shuang-feng¹, YUAN Liang¹, LIN Ting-ting¹, GONG Jian-ping²

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004;

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, NanChang 330006

Abstract: Objective: To explore the optimal extraction technique of Fu Gutai soft gelatin capsule. Method: Choose four factors; ethanol consumption, extraction time, extraction times, ethanol concentration, and each factor have three levels. The orthogonal design is used to optimize extraction process of Fu Gutai soft gelatin capsule with the content of Naringin, extracta sicca yield as markers. Result: The result shows that the optimum extraction condition is: adding 10 times of 60% ethanol boiling for 1.5 hours each time, extracting three times in all. Conclusion: The optimized process is stable, economic and feasible.

Key words: Orthogonal experiment; Fu Gutai; Soft gelatin capsule; Extraction process

妇骨肽软胶囊是针对中老年女性生理特征而开发的健骨类保健食品,能很好地预防和改善中老年女性骨质疏松症。处方主要由骨碎补、杜仲叶、碳酸钙、大豆油等组成,其中方中骨碎补总黄酮能促进骨组织的形成、抑制骨细胞细胞吸收、提高血钙的含量,具有抗骨质疏松功效^[1]。骨碎补为水龙骨科植物系水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎^[2],始载于《本草拾遗》,为历代常用

中药,具补肾、活血、止血、续伤之功用。柚皮苷是骨碎补中黄酮类成分之一,在预防骨质疏松方面起主要作用^[3],故采用方中有效成分柚皮苷为指标来考察妇骨肽软胶囊提取工艺。因此,本文采用正交设计试验法对影响有效成分提取的溶媒用量、提取时间、提取次数、溶媒浓度四个因素进行筛选优化,为妇骨肽软胶囊制剂成型奠定基础。

1 实验材料与仪器

* 基金项目:2009年江西省火炬计划(2009CHA00500)

** 通讯作者:龚建平,男,教授,硕士生导师,E-mail:gjp@jzjt.com

Agilent1100 型液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);ODS C₁₈ 色谱柱(大连依利特 4.6 mm × 250 mm);AL104/01 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);

柚皮苷对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:20050701);骨碎补药材购自江西樟树中药饮片厂,经鉴定为水龙科植物系水龙骨科植物槲蕨 *Drynariafortunei*(Kunze)J. Sm. 的干燥根茎。杜仲叶药材购自江西樟树中药饮片厂,经鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides*Oliv 的干燥叶。

MILLIPORE 超纯水;乙腈(色谱纯,山东禹王试剂有限公司);甲醇(色谱纯,上海振兴化工厂);其他试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 柚皮苷含量测定方法研究

2.1.1 样品溶液制备 按处方比例称取药材,按照正交设计表 3 进行正交试验提取,滤过,即得正交提取样品溶液,备用。

2.1.2 供试品溶液制备 精密吸取样品溶液(相当于药材 0.5 g)置 50 ml 量瓶中,加甲醇 30 ml,超声处理 30 min,放冷,滤过,滤液置 50 ml 量瓶中,用少量甲醇分数次洗涤容器,洗液滤入同一量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.1.3 对照品溶液制备 精密称取柚皮苷 6.00 mg 于 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取 1 ml 到 2 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每 ml 中含柚皮苷 60 μg)对照品溶液。

2.1.4 阴性供试品溶液制备 按处方比例称取药材(去除骨碎补药材),加 60% 乙醇提取 2 次,每次 2 h,滤过,药液合并,精密吸取提取液按“2.1.2”项下同法制备,即得阴性供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱:大连依利特 ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(20:80,以磷酸调节 pH 为 3)。检测波长:283 nm;流速 1 ml/min。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线制备 精密量取柚皮苷对照品储备液 1 ml 五份分别定容至 100、10、5、2、1 ml 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度,摇匀,即得。精密吸取对照品溶液 10 μl 测定。以 C(μg/ml)为横坐标, A 峰面积为纵坐标,进行线性回归,得标准曲线方程为:Y = 13.637X + 14.083, r = 0.999 9 (n = 5),说明柚皮苷在 0.6 ~ 60.00 μg/ml 范围内呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μl,连续进样 6 次,测定峰面积, RSD 值为 0.47%。

2.3.3 重现性试验 取同一批号药材,按“样品含量测定”方法制备供试品溶液 6 份,分别进样 10 μl,记录峰面积, RSD 值为 1.84%。

2.3.4 稳定性试验 取“重现性试验”项下一份样品,精密吸取 10 μl,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样,分别记录样品中柚皮苷的峰面积, RSD 值为 1.92%。表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 加样回收率试验 精密吸取已知含量的提取液 5.0 ml,6 份,精密称取柚皮苷对照品适量(相当于样品含量 80%、100%、120%)分别加入提取液中,按“2.1.2”项下制备方法制备样品。精密吸取 10 μl 进样,测定, RSD 值为 0.97%。

表 1 加样回收实验结果

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测定总量 /mg	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD 值 (%)
1	4.146	4.201	8.312	99.17		
2	4.224	4.321	8.461	98.06		
3	4.212	4.264	8.413	98.52	98.44	0.97
4	4.156	4.012	8.123	98.88		
5	4.343	4.210	8.523	99.29		
6	4.262	4.312	8.432	96.71		

2.3.2 浸膏得率测定 照(中国药典 2005 年版一部附录 X A)浸出物测定法,精密量取提取液 10 ml,置已干燥至恒重的蒸发皿中,在水浴上蒸干后,于 105 °C 干燥 3 h,移置干燥器中,冷却 30 min,迅速精密称定重量,以干燥品计算供试品中浸出物的含量。按下列公式计算浸膏得率。

$$\text{浸膏得率}(\%) = \frac{\text{浸膏重量}}{10\text{ml 药液相当于药材重量}} \times 100\%$$

$$\text{转移率}(\%) = \frac{\text{药材提取液中柚皮苷的含量重量}}{\text{药材柚皮苷的含量}} \times 100\%$$

2.3.3 提取工艺参数的优选 (1)因素水平表。根据预实验,选择加醇量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)和乙醇浓度(D)四个因素进行考察。同时,在每个因素中选出常规的三个水平考察。见表 2。

表 2 因素水平表

水平	A 加醇倍数	B 提取时间 /h	C 提取次数	D 乙醇浓度 (%)
1	8	1	1	60
2	10	1.5	2	70
3	13	2	3	80

(2)正交实验及结果。为保证产品质量的可控性,以浸膏得率和柚皮苷转移率作为指标,考察妇骨肽软胶囊的提取工艺。按处方比例称取骨碎补和杜仲叶,按 L₉(3⁴) 正交实验表安排实验,提取液经合并滤过,测定柚皮苷含量,计算柚皮苷转移率。结果见表 3、表 4、表 5。

表3 正交实验结果

所在列	因素				柚皮苷转移浸膏得率	
	a	b	c	d	率(%)	(%)
1	1	1	1	1	22.63	8.17
2	1	2	2	2	32.19	9.74
3	1	3	3	3	33.28	10.22
4	2	1	2	3	28.70	6.99
5	2	2	3	1	41.49	14.62
6	2	3	1	2	25.20	7.93
7	3	1	3	2	30.10	11.08
8	3	2	1	3	20.91	6.90
9	3	3	2	1	36.78	12.73
K ₁	29.367	27.143	22.913	33.633		
K ₂	31.797	31.530	32.557	29.163		
K ₃	29.263	31.753	34.957	27.630		
R	2.534	4.610	12.044	6.003		
K ₁	9.377	8.747	7.667	11.840		
K ₂	9.847	10.420	9.820	9.583		
K ₃	10.237	10.293	11.973	8.037		
R	0.860	1.673	4.306	3.803		

表4 浸膏得率方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
a	1.113	2	1.000	19.000	
b	5.208	2	4.679	19.000	
c	27.821	2	24.996	19.000	P<0.01
d	21.950	2	19.721	19.000	P<0.01
误差	1.11	2			

表5 柚皮苷转移率方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
a	12.333	2	1.000	19.000	
b	40.545	2	3.288	19.000	
c	243.796	2	19.768	19.000	P<0.01
d	58.372	2	4.733	19.000	
误差	12.33	2			

从表3中R值的大小可以看出,各因素对柚皮苷提取量和浸膏得率的影响程度依次为:C>D>B>A,其中因素C中的R值最大,说明提取次数对柚皮苷的提取含量和浸膏得率影响最大;由k值可知,根据对柚皮苷转移率影响可知选用A₂B₃C₃D₁为最佳提取工艺参数,对浸膏得率可知选用A₃B₂C₃D₁为最佳提取工艺参数。从方差分析表4可知,因素c、d对浸膏得率有显著性影响;因素a、b对浸膏得率没有显著性影响;由表5可知,因素c对柚皮苷转移率有显著性影响,因素a、b、d对柚皮苷转移率没有显著性影响。

综合以上实验结果,以柚皮苷转移率为主要指

标,同时考虑生产成本,可得最佳提取工艺为A₂B₂C₃D₁。即10倍量60%乙醇,煎煮3次,每次1.5h。

(3)验证实验。按处方比例称取骨碎补和杜仲叶,照优选出的工艺条件进行实验,结果柚皮苷转移率平均值41.92%,RSD值为0.5%;浸膏得率均值为15.2%,RSD值为0.9%。证明确定的提取工艺合理、稳定、可行。

3 结果与讨论

骨碎补的活性成分为柚皮苷等二氢黄酮类化合物。现代研究表明,骨碎补具有促进骨细胞形成、抑制骨吸收、补肾等作用。骨碎补总黄酮可增加患者的骨密度和改善骨生物力学指标,并可提高患者血中钙的含量,提高血及骨质中的碱性磷酸酶水平,促进骨的生成^[4]。

本实验不考虑以紫外-可见分光光度法测定总黄酮进行工艺优选。主要原因是方中主药骨碎补中虽含有大量的黄酮类成分。但是,杜仲叶中含有绿原酸具有强紫外吸收,如加入铝离子络合,进行显色反应测定总黄酮,仍存在干扰,且尉芹等人的“杜仲叶总黄酮含量测定方法研究^[5]”报道中表明测定杜仲叶中总黄酮时,绿原酸呈线性干扰情况,采用UV法直接测定总黄酮含量存在严重干扰。故采用高效液相法测定柚皮苷的含量,本方法具有高效、稳定、准确性,为柚皮苷含量测定的研究提供了可靠性参考。

参考文献

- [1] 谢雁鸣,鞠大宏,赵晋宁. 骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨密度和骨组织形态计量学影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 25(7): 685-687.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 179-180.
- [3] 李军,王振海等. 骨碎补的研究概况[J]. 中药材, 1999, 22(5): 22(5): 263-266.
- [4] 谢雁鸣,赵晋宁,张丈军,等. 骨碎补胶囊抗维甲酸所致大鼠骨质疏松症的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(4): 217-219.
- [5] 尉芹,王冬梅,马希汉,等. 杜仲叶总黄酮含量测定方法研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(5): 119-123.

(收稿日期:2009-10-09)

欢迎投稿! 欢迎行阅!