

骨愈方中总黄酮的提取工艺研究[△]

高 瑛^{1*}, 赵淑慧^{1#}, 陆 洋², 温 然²(1.北京中医医院顺义医院, 北京 101300; 2.北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3125-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.31

摘要 目的:建立骨愈方中总黄酮的最优提取工艺以用于制剂研究。方法:以总黄酮含量为指标,通过 $L_9(3^4)$ 正交试验法考察溶剂乙醇体积分数、溶剂用量、提取次数、提取时间对骨愈方中总黄酮提取的影响,确定各因素的最优水平并进行验证试验。结果:总黄酮的最优提取工艺为10倍药材量的70%乙醇溶剂回流提取3次,每次1h;验证试验得总黄酮的平均含量为62.03 mg/ml (RSD=0.84%, $n=3$),即从100 g处方药材可提取6.20 g总黄酮成分。结论:优选工艺稳定可行,可用于骨愈方中总黄酮的提取,可为骨愈搽剂的制备提供试验依据。

关键词 骨愈方;搽剂;提取工艺;总黄酮;正交试验

Extraction Technology of Total Flavonoids for the Bone Healing Formulation

GAO Ying¹, ZHAO Shu-hui¹, LU Yang², WEN Ran²(1.Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101300, China; 2.School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total flavonoids for Bone healing formulation in order to use it for preparation research. METHODS: With the content of total flavonoids as the index, $L_9(3^4)$ orthogonal test was employed to investigate the effects of volume fraction of the solvent ethanol, the amount of solvent, extraction times and extraction time on the extraction of total flavonoids for Bone healing formulation to determine the optimal levels of the factors, and verification tests were conducted. RESULTS: The optimal extraction technology of total flavonoids was 1 h reflux extraction for 3 times, with 70% ethanol 10 times as much as the amount of medicinal materials. Verification tests showed the average content of total flavonoids was 62.03 mg/ml (RSD=0.84%, $n=3$), that is to say, 6.20 g total flavonoids might be extracted from 100 g medicinal materials for the formulation. CONCLUSIONS: The optimal technology is stable and feasible and can be used for the extraction of total flavonoids for Bone healing formulation and provide a experimental basis for the preparation of Bone healing liniment.

KEYWORDS Bone healing formulation; Liniment; Extraction technology; Total flavonoids; Orthogonal test

骨愈方来源于北京中医医院顺义医院骨外科应用多年的协定处方,由透骨草、鸡血藤、艾叶、红花等6味药组成,具有祛风除湿、活血通络之功,对治疗骨性关节炎具有显著疗效。该方为熏洗方,患者需将药材煮沸后倒入盆内,将患肢放于盆上,用浴巾覆盖熏蒸,待药液温度降低后,再将患肢放进药液中浸泡。然而该用法不但操作不便且无法随时用药,限制了该方的应用。因此,本“骨愈搽剂的制备及临床疗效的初步评价”课题组拟将该方研制成使用与携带方便、药物浓度高、患者顺应性好的外用搽剂,以便更好地满足患者需求,增加患者用药顺应性。根据处方药味中君药透骨草^[1]、臣药红花^[2]所含有效成分为黄酮类,且其他药味鸡血藤^[3]、艾叶^[4]等也以黄酮类成分占绝大多数的情况,选择以总黄酮含量为考察指标、乙醇为提取溶剂,采用正交试验法^[5]优选骨愈方中总黄酮的最优提取工艺,为骨愈搽剂的制备提供试验依据。

[△]基金项目:北京市中医药科技项目(No.JJ2011-36)

*中药师,硕士。研究方向:中药新剂型与新技术。E-mail: gaoying446@163.com

#通信作者:主管药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:010-89413333。E-mail:13601119829@163.com

1 材料

1.1 仪器

TU-1810型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); BS 110S型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ5200DA超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

红花、鸡血藤、透骨草、艾叶等6种饮片(北京盛世龙药业有限公司,批号分别为:1206162、1204132、1206143、1113085、1205118、1202072),经北京中医药大学药教教研室刘春生教授鉴定均为《中国药典》中收载品种;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10080-200707,纯度:90.5%,供紫外含量测定用);乙醇为医用乙醇,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

根据2010年版《中国药典》^[6]及处方药味透骨草^[7]、红花^[8]、鸡血藤^[9]等相关文献报道,选择以芦丁为对照品,采用紫外-可见分光光度法测定骨愈方中总黄酮的含量。

2.1.1 对照品溶液的制备 取10 mg芦丁对照品,精密称定,

置于50 ml量瓶中,加适量50%乙醇,超声处理使溶解,放冷,加入50%乙醇定容;精密量取20 ml,置于25 ml量瓶中,加入50%乙醇定容,即得0.16 mg/ml对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取处方药材进行提取,滤过,回收乙醇,浓缩至1 g(生药)/ml;精密移取浓缩液1 ml置于10 ml量瓶中,加50%乙醇稀释至刻度,摇匀,即为供试品溶液。

2.1.3 测定波长的选择及显色方法 精密量取芦丁对照品溶液2.5 ml,置于10 ml量瓶中,加入50 mg/ml NaNO₂溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;加入100 mg/ml Al(NO₃)₃溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;加入100 mg/ml NaOH溶液4.0 ml,再加50%乙醇定容至刻度,摇匀后再静置15 min。同上操作制备不含芦丁的阴性对照溶液为空白。在400~700 nm波长范围内扫描,发现芦丁对照品在511 nm波长处有最大吸收,且供试品溶液也在511 nm波长附近有最大吸收,空白对照不干扰测定。故选择511 nm波长作为测定波长。最终确定以NaNO₂-Al(NO₃)₃为显色剂,采用紫外-可见分光光度法,在碱性(NaOH)条件下,于511 nm波长处测定总黄酮的含量。对照品和供试品溶液的光谱图见图1。

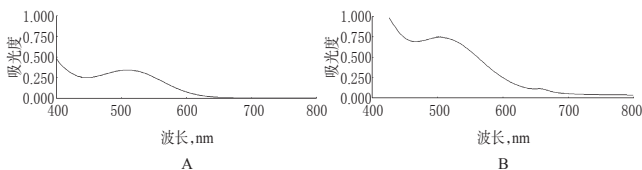


图1 紫外扫描光谱图

A. 芦丁对照品; B. 供试品

Fig 1 UV scanning spectrum

A. rutin reference substance; B. test sample

2.1.4 线性关系的考察 精密量取芦丁对照品溶液(0.16 mg/ml)0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,并分别加50%乙醇至4.0 ml,按“2.1.3”项下方法加入显色剂进行显色反应,以阴性对照溶液为空白,在511 nm波长处测定吸光度。以质量浓度(*c*)为横坐标、吸光度(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=10.552c-0.0037$ ($r=0.9997$),表明芦丁线性范围为0.008~0.064 mg/ml。

2.1.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液0.1 ml,置于10 ml量瓶中,再加入50%乙醇3.9 ml,按“2.1.3”项下方法加入显色剂进行显色反应,以阴性对照溶液为空白,在511 nm波长处测定吸光度,连续测定6次。结果,供试品溶液吸光度的RSD为0.21% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密吸取供试品溶液0.1 ml 6份,分别置于10 ml量瓶中,再加入50%乙醇3.9 ml,按“2.1.3”项下方法加入显色剂进行显色反应,以阴性对照溶液为空白,在511 nm波长处测定吸光度,计算总黄酮含量。结果,总黄酮含量的RSD为0.41% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品溶液0.1 ml置于10 ml量瓶中,加入50%乙醇3.9 ml,按“2.1.3”项下方法加入显色剂进行显色反应,以阴性对照溶液为空白,分别放置0、1、3、5、10、15、20、30 min后在511 nm波长处测定供试品溶液的吸光度。结果,供试品溶液吸光度的RSD为1.4% ($n=6$),表明供试品溶液显色后在30 min内稳定性良好。

2.1.8 回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液0.05 ml 6份,分别精密加入已知质量浓度的芦丁对照品溶液,置于10

ml量瓶中,加50%乙醇至4.0 ml,按“2.1.3”项下方法加入显色剂进行显色反应,以阴性对照溶液为空白,在511 nm波长处测定吸光度,计算回收率。结果回收率符合要求,详见表1。

表1 回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=6$)

试验序号	已知供试品含量,mg	加入对照品含量,mg	测得总含量,mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
1	0.173 5	0.161 9	0.335 6	99.88	99.67	1.10
2	0.173 5	0.161 9	0.338 5	98.12		
3	0.173 5	0.161 9	0.334 7	100.43		
4	0.173 5	0.161 9	0.335 6	99.88		
5	0.173 5	0.161 9	0.333 7	101.06		
6	0.173 5	0.161 9	0.337 6	98.66		

2.1.9 样品溶液的含量测定 精密吸取供试品溶液0.1 ml置于10 ml量瓶中,再加入50%乙醇3.9 ml,以NaNO₂-Al(NO₃)₃为显色剂显色:加入50 mg/ml NaNO₂溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;加入100 mg/ml Al(NO₃)₃溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;加入100 mg/ml NaOH溶液4.0 ml,再加50%乙醇定容至刻度,摇匀后再静置15 min。以阴性对照溶液为空白,在511 nm波长处测定吸光度,根据线性回归方程计算样品中总黄酮含量。

2.2 提取工艺考察

根据黄酮类成分的溶解特性及工业生产条件的许可^[10],结合预试验结果,发现以乙醇为溶剂对总黄酮具有良好的提取效果,且溶剂体积分数、溶剂用量(药材量的倍数)、回流时间和回流次数为影响总黄酮提取率的主要因素。故以此4个主要因素为考察对象,每个因素设定3个水平,按L₉(3⁴)正交表安排试验,每组试验平行操作2次,计算平均值,以总黄酮含量为指标优选提取制备工艺。称取60 g处方药材,按正交试验表回流提取,提取液回收乙醇,浓缩至1 g(生药)/ml供含量测定。因素与水平见表2;正交试验设计结果见表3;将试验数据代入SPSS 17.0软件进行统计分析,方差分析^[11]结果见表4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(乙醇体积分数), %	B(溶剂用量), 倍	C(提取时间), h	D(提取次数)
1	30	8	1	1
2	50	10	1.5	2
3	70	12	2	3

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Orthogonal test design and its results

序号	因素				总黄酮含量, mg/ml		
	A	B	C	D	试验1	试验2	平均值
1	30	8	1	1	39.520	41.226	40.373
2	30	10	1.5	2	51.080	50.597	50.839
3	30	12	2	3	54.300	55.235	54.768
4	50	8	1.5	3	60.677	58.906	59.792
5	50	10	2	1	46.218	44.736	45.477
6	50	12	1	2	53.141	51.370	52.256
7	70	8	2	2	55.943	54.913	55.428
8	70	10	1	3	63.189	62.287	62.738
9	70	12	1.5	1	41.838	43.191	42.515
K ₁	48.660	51.864	51.789	42.788			
K ₂	52.508	53.018	51.048	52.841			
K ₃	53.560	49.846	51.891	59.099			
R	4.900	3.172	0.843	16.311			

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	79.856	2	39.928	44.387	<0.01
B	30.932	2	15.466	17.193	<0.01
C	2.538	2	1.269	1.411	>0.05
D	812.527	2	406.264	451.632	<0.01
误差	8.096	9	0.900		

注: $F_{0.05}(2,9)=4.26, F_{0.01}(2,9)=8.02$

Note: $F_{0.05}(2,9)=4.26, F_{0.01}(2,9)=8.02$

通过直观分析,因素C的极差最小,故可将此列作为误差项进行方差分析。由表3结果可知,影响因素的大小顺序为D>A>B>C,即提取次数>乙醇体积分数>溶剂倍数>提取时间,得最优提取工艺为A₃B₂C₁D₃。方差分析结果表明因素A、B、D对提取工艺具有显著影响,C因素无显著影响,故考虑以工艺A₃B₂C₁D₃和A₃B₂C₃D₃进行验证比较,对比两者的提取效率。分别按照A₃B₂C₁D₃和A₃B₂C₃D₃进行2次验证比较试验,结果总黄酮的平均含量分别为62.062、62.996 mg/ml,两者差别不大。考虑到节约能耗、提高生产效率,故确定总黄酮的最优提取工艺为A₃B₂C₁D₃,即加入10倍药材量的70%乙醇回流1 h,提取3次。

2.3 验证试验

称取处方药材按以上A₃B₂C₁D₃工艺提取,提取液回收乙醇至1 g(生药)/ml后,按样品溶液的含量测定方法测定总黄酮含量。结果表明,3次试验中总黄酮含量分别为62.094、62.513、61.482 mg/ml,平均含量为62.03 mg/ml(RSD=0.84%, n=3),平均质量分数为6.20%,即100 g处方药材可提取6.20 g总黄酮成分。因此表明,该工艺稳定、合理、可行,可用于骨愈方中总黄酮的提取。

3 讨论

黄酮类化合物作为中药的主要有效成分之一,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗阿尔茨海默病、免疫调节、镇痛等^[12]多方面的药理活性,被广泛用于骨科疾病的治疗^[13]。在本处方中,黄酮类成分为主要有效成分且占据绝对比重,可用乙醇进行提取,而其他有效成分如生物碱、萜类、挥发油类等,在乙醇中也具有良好的溶解性能^[14],故本方可用乙醇提取出骨愈方的有效成分。

对骨愈方总黄酮提取物进行全波长扫描,结果显示提取物与芦丁对照品在511 nm波长处均有最大吸收,故采用芦丁为对照品。铝盐显色法^[15]是《中国药典》收录的常见总黄酮测定方法,其原理是在碱性条件下,利用其与黄酮物质生成的红色铝螯合物在511 nm波长处有最大吸光度,以芦丁为对照,从而测得待测物质总黄酮的含量^[16]。

总黄酮为一大类有效成分,并非结构明确的单一化学成分,而骨愈方中除红花外均无明确的指标黄酮成分,因此为考证骨愈剂提取工艺的完善合理性,本课题组还对处方中所含明确的单体黄酮羟基红花黄色素A进行了提取工艺的考察^[17]。结果显示,单以羟基红花黄色素A为考察指标,最优提

取工艺为12倍药材量的70%乙醇回流提取2次,每次1.5 h,得羟基红花黄色素A质量分数为0.25%。而本试验以总黄酮为指标确定的提取工艺中,经检测羟基红花黄色素A含量也较高,质量分数为0.22%,仅比上述质量分数低0.03%。因此,经综合考虑,为保证处方中黄酮类成分提取的全面性,确定骨愈方中总黄酮的提取工艺为采用10倍药材量的70%乙醇回流1 h,提取3次。

参考文献

- [1] 赵卫星,姜红波,王艳,等.透骨草化学成分的研究进展[J].应用化工,2011,40(4):696.
- [2] 扈晓佳,殷莎,袁婷婷,等.红花的化学成分及其药理活性研究进展[J].药学实践杂志,2013,31(3):161.
- [3] 符影,程悦,陈建萍,等.鸡血藤化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2011,42(6):1229.
- [4] 唐生安,孙亮,翟慧媛,等.艾叶化学成分的研究[J].天津医科大学学报,2011,17(4):461.
- [5] 徐仲安,王天保,李常英,等.正交试验设计法简介[J].科技情报开发与经济,2002,12(5):148.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:30.
- [7] 王丹,孙佳明,王贵金,等.紫外分光光度法测定珍珠透骨草中总黄酮的含量[J].世界科学技术:中医药现代化,2007,9(6):61.
- [8] 高文昊.市售红花中总黄酮含量分析[J].中国实用医药,2011,6(31):243.
- [9] 黄锁义,罗建华,张丽丹,等.鸡血藤总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(9):2337.
- [10] 刘璐,付明哲,王侠,等.植物黄酮类化合物提取及测定方法研究进展[J].动物医学进展,2011,32(6):151.
- [11] 王政,魏莉.利用SPSS软件实现药学实验中正交设计的方差分析[J].数理医药学杂志,2014,27(1):99.
- [12] 刘星雨,周敏,孙体健.天然黄酮类化合物的药理活性及分离提取[J].中国药物与临床,2014,14(5):621.
- [13] 许晓林,柳蔚,李世刚,等.黄酮类化合物治疗类风湿性关节炎作用机制的研究进展[J].中药材,2013,36(8):1367.
- [14] 杨云,张晶,陈玉婷.天然药物化学成分提取分离手册[M].2版.北京:中国中医药出版社,2003:336.
- [15] 郑杭生,李计萍,韩炜,等.紫外可见分光光度法测定总黄酮含量的方法学考察要点[J].中成药,2008,30(9):1364.
- [16] 孔燕芳,周艳梅,闫艳仓,等.正交试验优选野菊花中总黄酮的提取工艺[J].中国药房,2013,24(43):4068.
- [17] 温然,高瑛,陆洋,等.正交试验法优选骨愈搽剂的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):39.

(收稿日期:2015-01-09 修回日期:2015-05-05)

(编辑:刘 萍)