

铜离子还原能力法结合星点设计-效应面法优选锁阳抗氧化物质的提取工艺^Δ

李 辉^{1,2*}, 王晓飞², 刘铭佩², 韩姗姗^{1,2}, 焦海胜^{2#} (1. 兰州大学药学院, 兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院, 兰州 730030)

中图分类号 R283;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1821-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.29

摘要 目的:优化锁阳中抗氧化物质的提取工艺。方法:以液料比、乙醇体积分数、提取时间为自变量,对锁阳提取物采用铜离子还原能力(CUPRAC)法测得的抗氧化活性为因变量,用星点设计-效应面法预测最优提取工艺。结果:预测的最优提取工艺条件为液料比13:1、乙醇体积分数50%、提取时间1.5 h。经验证,该工艺提取的锁阳提取物抗氧化活性没食子酸量为51.00 mg/g,与预测值49.68 mg/g比较偏差较小。结论:应用CUPRAC法结合星点设计-效应面法能够有效优选锁阳抗氧化物质的提取工艺。
关键词 锁阳;星点设计-效应面法;CUPRAC法;抗氧化活性;提取工艺;优化

Optimal Extraction Process of Antioxidant Substances from *Cynomorium songaricum* by CUPRAC and Central Composite Design-Response Surface Methodology

LI Hui^{1,2}, WANG Xiao-fei², LIU Ming-pei², HAN Shan-shan^{1,2}, JIAO Hai-sheng² (1. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction process of antioxidant substances from *Cynomorium songaricum*. METHODS: With the independent variables of liquid-material ratio, the volume fraction of ethanol and extraction time, the dependent variable of antioxidant activity was determined by Cupric reducing antioxidant power (CUPRAC). Central composite design-response surface methodology was conducted to predict the optimal extraction process. RESULTS: The predicted extraction process of *C. songaricum* was as follows as the liquid-material ratio of 13:1, the volume fraction of ethanol of 50% and extraction time of 1.5 h. It was verified that the amount of antioxidant activity of gallic acid from *C. songaricum* was 51.00 mg/g, which had small deviation when compared with the prediction value of 49.68 mg/g. CONCLUSIONS: The combination application of CUPRAC and central composite design-response surface methodology can effectively optimize the extraction process of antioxidant substances from *C. songaricum* and the optimized extraction process is applicable for the extraction of antioxidant substances from *C. songaricum*.

KEYWORDS *Cynomorium songaricum*; Central composite design-response surface methodology; Cupric reducing antioxidant power method; Antioxidant activity; Extraction process; Optimization

参考文献

- [1] 杨逸卫. 赖诺普利的临床应用进展[J]. 世界临床药物, 2003, 24(10): 629.
- [2] 张丽霞, 赵海燕, 张石革. 血管紧张素转换酶抑制剂的研究与应用进展[J]. 中国药房, 2007, 18(35): 2 784.
- [3] Margus V, Sirje H, Tatjana S, et al. Effect of lisinopril on twenty-four-hour blood pressure in patients with mild to moderate hypertension[J]. *Seminars in Cardiology*, 2005, 11(3): 106.
- [4] 黄荻, 丁莉坤, 丁黎, 等. 复方赖诺普利片人体药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(4): 304.
- [5] 李林芝, 张兴平. 高血压的时间治疗学[J]. 国际心血管病杂志, 2012, 39(5): 282.
- [6] 杜璇, 屠锡德, 周建平. 硝苯地平延迟起释型缓释片的制备及体外释放[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(5): 412.
- [7] 骆快燕, 姚彤炜, 黄安琪. 卡托普利延迟起释型缓释片的研制[J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(3): 224.
- [8] 曹德英. 药物剂型与制剂设计[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 266-268.
- [9] 徐莹莹, 石雷, 潘佩瑶, 等. 一种赖诺普利迟释缓释片剂及其制备方法. 中国: 103006612 [P]. 2012-12-28.
- [10] 潘佩瑶, 石雷, 陈丹丹, 等. 赖诺普利迟释型缓释片体外释放度的测定[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(13): 1 958.
- [11] 纪立伟, 范田园, 陈桂兰, 等. 盐酸地尔硫草延迟释放片的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(3): 155.
- [12] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 431-433.

Δ 基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. lzujbky 2013-46); 兰州大学第二医院院内中医药项目 (No. YJzy2013-30)

* 硕士研究生. 研究方向: 药物新剂型. E-mail: huili2012@lzu.cn
通信作者: 教授, 硕士生导师. 研究方向: 药物新剂型、新技术. 电话: 0931-8942571. E-mail: ldeyjh@sohu.com

(收稿日期: 2014-06-15 修回日期: 2014-08-04)

(编辑: 邹丽娟)

锁阳为锁阳科锁阳属植物锁阳(*Cynomorium songaricum* Rupr.)的干燥肉质茎,俗称“不老药”“沙漠人参”,多生长在干旱及含碱的沙地,主产于内蒙古、宁夏、甘肃、青海等西北地区。其味甘,性温,具有补肾阳、益精血、润肠通便的功能^[1]。现代药理研究表明,锁阳具有抗氧化、提高机体免疫力、抑制人体免疫缺陷、抗病毒等活性^[2-3]。为了充分利用我国丰富的锁阳资源,有必要优化锁阳抗氧化物质的提取工艺。

目前,锁阳抗氧化物质提取工艺的优化多是以提取物中一种或多种抗氧化物质的提取率为评价指标^[4],但由于锁阳成分的复杂性,以此为评价指标并不能全面地反映提取工艺的优劣。如果采用总抗氧化活性为指标进行提取工艺优化,结果可能更为可靠。笔者在本试验中即以采用铜离子还原能力法(CUPRAC法)测得的锁阳提取物的总抗氧化活性为因变量,以液料比、乙醇体积分数、提取时间为自变量,用星点设计效应面法优化锁阳抗氧化物质的最优提取工艺,以为后续的研究利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2450型紫外分光光度仪(日本岛津公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);202A-00型恒温干燥箱(上海新正机械仪器制造有限公司);ME215S型吉尼斯系列电子分析天平(德国赛多利斯仪器有限公司);KS-500E2型超声波清洗机、MH-2000型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

锁阳(饮片,兰州安泰堂中药饮片有限公司,批号:130826);2,9-二甲基-1,10-菲啰啉(新亚铜灵,上海笛柏化学品技术有限公司,批号:484-11-7,分析纯);没食子酸对照品(上海中泰化学试剂有限公司,批号:20130913,纯度:99%,分析纯);氯化铜、醋酸铵均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 抗氧化活性的测定

CUPRAC法抗氧化活性测定参照Bektaşoğlu B等^[5]的方法进行,以Cu(II)-新亚铜灵试剂为检测试剂,采用紫外分光光度法测定,但在本试验中略有改动,具体如下。

2.1.1 检测试剂的制备 精密称取氯化铜90.14 mg置于50 ml量瓶中,加水溶解并定容至刻度;精密称取醋酸铵3 873.14 mg置于50 ml量瓶中,加水溶解并定容至刻度;避光处精密称取新亚铜灵79.06 mg置于50 ml棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度。将制备好的溶液放置在冰箱中,短期保存,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品31.00 mg置于25 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成1.24 mg/ml的对照品贮备液,备用。

2.1.3 样品溶液的制备 精密称量提取物浸膏0.2 g置于50 ml量瓶中,加甲醇溶液超声溶解后定容至刻度,并取适量溶液过滤,精密量取1 ml滤液置于25 ml量瓶中,加甲醇溶液定容至刻度,摇匀,置于4℃冰箱中,备用。

2.1.4 标准曲线的建立 分别吸取0.08、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml对照品贮备液置于10 ml量瓶中,加甲醇溶液定容至刻度得对照品溶液。精密量取1 ml对照品溶液,依次加入氯化铜溶液、新亚铜灵溶液、醋酸铵溶液各1 ml,最后再加入水0.1 ml,即为标样反应溶液;精密量取1 ml对照品溶液,加入3 ml

溶液[甲醇-水(1:2)],最后再加入水0.1 ml,即为空白溶液。分别将充分混匀后的标样反应溶液和空白溶液常温放置反应30 min,之后于450 nm波长处测吸光度,得到 $A_{\text{标样}}$ 、 $A_{\text{空白}}$,则没食子酸的吸光度为 $A_{\text{标样}} - A_{\text{空白}}$ 。以吸光度(y)、没食子酸溶液质量浓度(x)进行回归,得线性方程为 $y = 53.983x + 0.0087$ ($r = 0.9996$),表明没食子酸检测质量浓度线性范围为 $9.92 \times 10^{-3} \sim 1.24 \times 10^{-1}$ mg/ml。

2.1.5 样品活性的测定 精密量取1 ml样品溶液,依次加入氯化铜溶液、新亚铜灵溶液、醋酸铵溶液各1 ml,最后再加入水0.1 ml,即为样品反应溶液;精密量取1 ml样品溶液,加入3 ml溶液[甲醇-水(1:2)],最后再加入水0.1 ml,即为空白溶液。分别将充分混匀后的样品反应溶液和空白溶液常温放置反应30 min后于450 nm波长处测量其吸光度值,得到 $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{空白}}$,则样品的吸光度值为 $A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}$ 。将测量的吸光度值代入标准曲线求得 x ,则样品的抗氧化活性没食子酸量为 $x \times$ 稀释倍数/0.2 \times 总浸膏量/10^[6]。

2.2 提取方法考察

称取10 g锁阳,共3份,加入90%乙醇溶液100 ml,分别采用加热回流、超声、浸泡方式提取,各提取2次,每次提取1 h,合并提取液,减压回收溶剂至少量,然后转移至蒸发皿真空干燥。平行3次,按“2.1.5”项下测定方法测定锁阳提取物的抗氧化活性。结果以90%乙醇提取2次,每次提取1 h,以加热回流提取方法效果最优,详见表1。

表1 不同方法提取锁阳的总抗氧化活性(mg/g)

Tab 1 Total antioxidant activity of *C. songaricum* by different extraction methods(mg/g)

编号	提取方法		
	加热回流	超声	浸泡
1	18.163	16.514	9.765
2	21.837	17.178	9.722
3	19.760	15.024	9.649
平均值	19.920	16.239	9.712

2.3 星点试验设计

提取时间、液料比、提取次数、乙醇体积分数和提取方法是影响提取率的重要因素,由“2.2”项结果可知加热回流提取方法较好。根据生产实际,提取周期一般不宜过长,因此将提取次数确定为2次。按照星点设计原理,取锁阳10 g,加热回流提取,以乙醇体积分数(X_1 ,%)、提取时间(X_2 ,h)、液料比(X_3)为自变量,以抗氧化活性为因变量进行试验。因素与水平见表2,星点试验设计及结果见表3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

因素	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
X_1	20	33	50	67	80
X_2	0.5	0.92	1.5	2.07	2.5
X_3	6:1	7.8:1	10:1	12.2:1	14:1

2.4 模型拟合

以锁阳提取物总抗氧化活性为因变量,用SPSS软件对各因素进行多元线性回归和二次多项式拟合。多元线性回归方程: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$,二次多项式拟合方程: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1^2 + b_8X_2^2 + b_9X_3^2$ 。

根据结果分析,多元线性回归结果为 $Y = 36.614 -$

表3 星点试验设计及结果

Tab 3 Design and results of central composite test

试验号	X_1	X_2	X_3	抗氧化活性*, mg/g
1	-1	-1	-1	32.180
2	+1	-1	-1	22.447
3	-1	+1	-1	35.357
4	+1	+1	-1	30.516
5	-1	-1	+1	47.180
6	+1	-1	+1	22.150
7	-1	+1	+1	36.917
8	+1	+1	+1	26.138
9	-1.732	0	0	32.362
10	+1.732	0	0	13.000
11	0	-1.732	0	40.363
12	0	+1.732	0	58.389
13	0	0	-1.732	38.058
14	0	0	+1.732	48.853
15~20	0	0	0	51.098 [#]

注：“*”为3次测得的平均值；“#”为试验号15~20测定的平均值

Note: “*” means the average value of 3 times of measurement; “#” means the average value of measurement in No.15-20

$34.533X_1 + 4.405X_2 + 0.939X_3$ ($r=0.547$), 拟合度低; 二次多项式为 $Y = -154.882 + 343.91X_1 + 24.54X_2 + 20.369X_3 + 25.608 X_1X_2 - 6.685X_1X_3 - 1.775X_2X_3 - 349.938X_1^2 - 5.076X_2^2 - 0.672X_3^2$ ($r=0.925$), 拟合度较好。对后一种模型进行方差分析, 结果见表4。

表4 回归模型方差分析结果

Tab 4 Variance analysis result of regression model

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
模型	2 731.40	9	303.49	11.82	0.000 3
X_1	503.03	1	503.03	19.59	0.001 3
X_2	93.57	1	93.57	3.64	0.085 3
X_3	66.81	1	66.81	2.60	0.137 8
X_1X_2	45.81	1	45.81	1.78	0.211 2
X_1X_3	56.37	1	56.37	2.20	0.169 2
X_2X_3	38.37	1	38.37	1.49	0.249 5
X_1^2	1 826.61	1	1 826.61	71.15	<0.000 1
X_2^2	55.13	1	55.13	2.15	0.173 5
X_3^2	232.77	1	232.77	9.07	0.013 1
残差	256.72	10	25.67		
失拟项	256.71	5	51.34	1 7576.19	<0.000 1
纯误差	0.015	5	0.002 921		
总变异	232.77	19			

由表4可知, 模型的 $P=0.000 3$, 表明该模型极显著; 失拟项 $P<0.000 1$, 表明该模型拟合度非常好。回归方差显著性检验表明, 一次项乙醇体积分数和二次项乙醇体积分数对总抗氧化活性的线性效应极显著 ($P<0.01$); 液料比对总抗氧化活性的曲面效应显著 ($P<0.05$); 乙醇体积分数和提取时间的交互项、乙醇体积分数和液料比的交互项、提取时间和液料比的交互项对总抗氧化活性没有显著性影响, 说明各因素间的交互作用不显著。

本试验以二次多项式作为分析和预测模型, 固定3个自变量之一为中值, 以抗氧化活性为因变量, 绘制相对于2个自变量的效应面三维图。根据效应面图可知, 当乙醇体积分数为50%、回流提取时间为1.5 h、液料比为13:1时, 提取物中的总抗氧化活性最大。各因素的效应面三维图见图1。

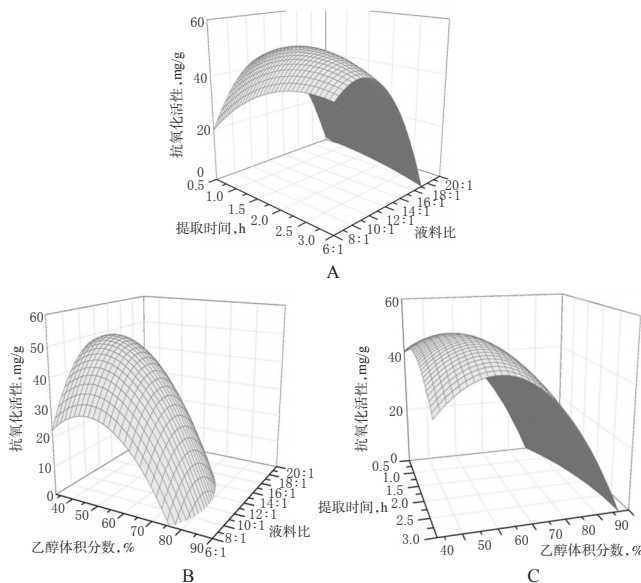


图1 乙醇体积分数、提取时间和液料比对总抗氧化活性的效应面三维图

A. 液料比和提取时间; B. 乙醇体积分数和液料比; C. 乙醇体积分数和提取时间

Fig 1 Three-dimensional diagram of response surface of ethanol volume fraction, extraction time and liquid-material ratio with total antioxidant activity

A. liquid-material ratio and extraction time; B. ethanol volume fraction and liquid-material ratio; C. ethanol volume fraction and extraction time

2.5 最优工艺的验证

根据上述结果可知, 最优提取工艺为乙醇体积分数50%、提取时间1.5 h、液料比13:1。在此条件下进行3次验证试验, 结果显示, 总抗氧化活性没食子酸量为51.00 mg/g, 与预测值49.68 mg/g比较, 偏差较小, 说明本试验确定的最优提取工艺合理, 且具有较好的稳定性和重现性。

3 讨论

在各种测定抗氧化物质活性的方法中, 2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)及1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(DPPH)由于其廉价易得, 常作为体外抗氧化活性检测的检测试剂。然而, 由于DPPH溶于亲脂性溶剂, 其只可以用于检测亲脂性抗氧化剂的抗氧化活性; ABTS虽然既溶于亲水性溶剂又溶于亲脂性溶剂, 但由于其是以氮为中心的自由基, 空间位阻较大, 与抗氧化活性物质酚类聚合物反应的速率较慢^[7]。此外, DPPH和ABTS在溶液中对光、空气中的氧及pH敏感, 不能很好地反映抗氧化物质的活性^[8]。而本研究采用的Cu(II)-新亚铜灵试剂, 与DPPH和ABTS相比较, 前者具有以下优点: (1)Cu(II)-新亚铜灵试剂既溶于亲水性溶剂又溶于亲脂性溶剂, 可同时评价亲水性和亲脂性抗氧化剂的抗氧化活性; (2)Cu(II)-新亚铜灵试剂与抗氧化活性物质的反应机制为电子转移, 不存在空间位阻效应, 且Cu(II)-新亚铜灵/Cu(I)-新亚铜灵具有较低的氧化还原电位, 因此选择性较高; (3)Cu(II)-新亚铜灵试剂化学性质相对稳定, 在溶液中对光、空气中氧及pH稳定^[9]。基于以上优点, 该方法可单独用于评价多组分混合物的总抗氧化活性。

星点设计是国外常用的试验设计方法, 国内也有用于优

铝碳酸镁咀嚼片的制备方法改进及其质量控制

王薇*,刘祖雄,陶志强,杨小松(广州军区武汉总医院药剂科,武汉 430070)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1824-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.30

摘要 目的:改进铝碳酸镁咀嚼片的制备工艺,以简化制备流程、降低污染,并对其进行质量控制。方法:将原湿法制粒压片法改进为粉末直接压片法,采用单因素方法对铝碳酸镁原料厂家、填充剂甘露醇厂家、润滑剂硬脂酸镁用量、助流剂微粉硅胶用量进行筛选。采用络合滴定法测定所制片剂含量,并对其性状、鉴别、片重差异、脆碎度、制酸力等进行检测。结果:1 000片铝碳酸镁咀嚼片的优选处方为铝碳酸镁545 g、甘露醇447 g、0.1%薄荷干粉0.5 g、微粉硅胶4 g、硬脂酸镁4 g;所制片剂为类白色片,规格为每片0.5 g,表面光滑美观,鉴别、硬度、片重差异、脆碎度、制酸力等指标均符合咀嚼片的质量要求。结论:铝碳酸镁咀嚼片制备工艺简单,质量可控。

关键词 铝碳酸镁咀嚼片;制备工艺;改进;粉末直接压片法;质量控制

Improvement and Quality Control of Preparation Method of Hydrotalcite Chewable Tablets

WANG Wei, LIU Zu-xiong, TAO Zhi-qiang, YANG Xiao-song (Dept. of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To improve the preparation process of Hydrotalcite chewable tablets to simplify the preparation process, reduce pollution and control the quality. METHODS: Original wet granulation compression method was improved to direct powder compression method. Univariate method was used to screen the hydrotalcite raw materials manufacturers, fillers mannitol manufacturers and the dosage of lubricant magnesium stearate and glidant aerosil. Complexometric titration was used to determine the content and detect the characters, identification, weight differences, friability and acid strength, etc. RESULTS: The optimal formulation of 1 000 pieces of Hydrotalcite chewable tablets was hydrotalcite 545 g, mannitol 447 g, 0.1% peppermint powder 0.5 g, aerosil 4 g and magnesium stearate 4 g. The prepared tablet was almost white (specification of 0.5 g each tablet) with smooth and aesthetic surface. The identification, weight differences, friability and acid strength were all in line with the quality requirements of chewable tablets. CONCLUSIONS: The formulation process of Hydrotalcite chewable tablets is easy with controlled quality.

KEYWORDS Hydrotalcite chewable tablets; Preparation process; Improvement; Direct powder compression method; Quality control

化处方或成型工艺的报道^[9-10],在优化中药的提取工艺方面也逐渐开始使用^[11]。本试验采用星点设计-效应面法优化提取工艺,与正交试验设计相比具有更高的方法精密性^[12],试验值与预测值偏差较小,可以更好地预测最优点。

参考文献

- [1] 林佳.锁阳的研究进展[J].国外医学中医中药分册,2003,25(6):332.
- [2] 李立,刘晔玮,李红兵,等.锁阳提取物对小鼠体内抗氧化体系的影响[J].时珍国医国药,2011,22(9):2 093.
- [3] Nakamura N. Inhibitory effects of some traditional medicines on proliferation of HIV-1 and its protease [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2004, 124(8):519.
- [4] 朱芸,白晓光,李鹏,等.正交试验优选锁阳总黄酮超声提取工艺[J].中国药房,2011,22(15):1 376.
- [5] Bektaşoğlu B, Çelik SE, Özyürek M, et al. Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC

method[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1 194.

- [6] 齐迪.不同品种石榴多酚提取工艺及其抗氧化活性的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2011:11.
- [7] Lee JH, Ozcelik B, Min DB. Electron donation mechanisms of beta-carotene as a free radical scavenger[J]. *J Food Sci*, 2003, 68(3):861.
- [8] Özyürek M, Güçlü K, Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement[J]. *Trend Anal Chem*, 2011, 30(4):652.
- [9] 阮佳,岑菁,袁志翔,等.星点设计-效应面法优化水飞蓟宾双层片的处方[J].华西药学杂志,2013,28(4):378.
- [10] 蔡郁,刘新颜.星点设计-效应面法优化依普利酮双层渗透泵片处方[J].中国药房,2011,22(13):1 200.
- [11] 杨涛,盛欢欢,李岩,等.星点设计-效应面法优化穿心莲提取工艺[J].中国药学杂志,2011,46(3):208.
- [12] 吴伟,崔光华.星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J].国外医学药学分册,2000,27(5):292.

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:027-50772881。E-mail:whzyylzx@163.com

(收稿日期:2014-07-03 修回日期:2014-12-10)

(编辑:刘 萍)