

星点设计-响应面法优选身痛逐瘀胶囊中药材的提取工艺

马 丁^{1*}, 阮洪生^{1,2}, 刘树民^{1#}(1.黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

中图分类号 R283.65;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0993-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.12

摘要 目的:优化身痛逐瘀胶囊中药材的提取工艺。方法:以乙醇浓度、料液比、提取时间为考察因素,以阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和为指标,采用星点设计-响应面法优选最佳提取工艺。结果:最佳工艺条件为乙醇浓度49%,料液比1:13.7(m/V),提取时间156 min,在此最佳条件下,身痛逐瘀胶囊中阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和的预测值为88.21 mg/g,与试验结果(87.69 mg/g)吻合极好。结论:所选方法简便、合理,预测性较好。

关键词 身痛逐瘀胶囊;星点设计-响应面法;提取工艺

Optimization of Extraction Technology of Chinese Medicinal Material from Shentong Zhuyu Capsules by Central Composite Design and Response Surface Methodology

MA Ding¹, RUAN Hong-sheng^{1,2}, LIU Shu-min¹(1.Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2.Life Science and Technology College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Helongjiang Daqing 163319, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Chinese medicinal material from Shentong zhuyu capsules. METHODS: The extraction technology was optimized by central composite design and response surface methodology with ethanol concentration, ratio of material to liquid and extraction time as factors using the contents of ferulic acid, liquiritin and hydroxysafflor yellow A as index. RESULTS: The optimum technology was as follows: ethanol concentration of 49%, liquid-material ratio of 1:13.7(m/V) and extraction time 156 min. The predicted value of the total content of ferulic acid, liquiritin and hydroxysafflor yellow A was 88.21 mg/g under this condition, which was in line with Results of trial(87.69 mg/g). CONCLUSION: The method is simple, reasonable and highly predictive.

KEY WORDS Shentong zhuyu capsules; Central composite design and response surface methodology; Extraction technology

身痛逐瘀汤出自清代王清任之《医林改错》,由秦艽、川芎、桃仁、红花等12味药组成,具有活血行气、祛风除湿、通痹止痛的功效,主治瘀血痹阻经络证,用于肩痛、臂痛、腰痛、腿痛或周身疼痛经久不愈症的治疗^[1]。身痛逐瘀胶囊由身痛逐瘀汤改变剂型而来。

星点设计-响应面法作为优选工艺的方法之一,弥补了正交设计法和均匀设计法精确度不高的缺陷,已被人们逐步认可及运用^[2-10]。星点设计(Central composite design)采用线性或非线性拟合的试验设计方法,可以减少试验次数,提高试验精密密度。响应面法(Response surface methodology)是采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间函数关系的一种统计方法,通过对响应面等高线的分析以寻求最优工艺参数。本试验以阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和为指标,以乙醇浓度、料液比与提取时间为考察因素,结合响应面法优选提取工艺,为身痛逐瘀胶囊的深入研究提供参考。

1 材料

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础,中药药性理论。E-mail:md2128786@163.com

通信作者:教授,博士研究生导师。研究方向:中药药效物质基础,中药药性理论。电话:0451-87266988。E-mail:keji-liu@163.com

1.1 仪器

2695 高效液相色谱(HPLC)仪,包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、PAD紫外检测器、Empower2 色谱工作站(美国 Waters 公司);FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);FW177 中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药材

桃仁、红花、当归、秦艽、牛膝等药材均购于哈药集团世一堂饮片厂,经黑龙江中医药大学中医药研究院刘树民教授鉴定均符合2010年版《中国药典》(一部)规定。

1.3 试剂

阿魏酸(批号:110773-201012)、甘草苷(批号:111610-201005)和羟基红花黄色素A(批号:111637-200905)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(色谱纯,美国迪马公司);水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件^[11] 色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:乙腈(A)-0.03%磷酸水溶液(B)(梯度洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;进样量:10 μl;检测波长:400 nm(羟基红花黄色素A),289 nm(阿魏酸和甘草苷)。

在此条件下,阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 色谱峰与相邻峰可达到基线分离。色谱见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Procedures of gradient elution

t, min	A, %	B, %
0~8	5→15	95→85
>8~20	15→20	85→80
>20~28	20→22	80→78
>28~40	22→30	78→70
>40~50	30→35	70→65
>50~63	35	65

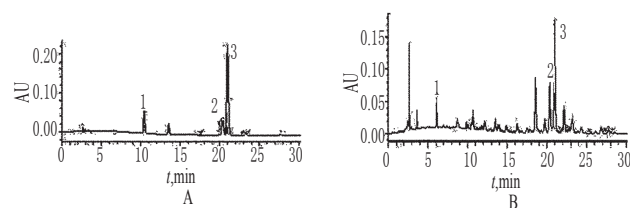


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 羟基红花黄色素 A; 2. 阿魏酸; 3. 甘草苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. hydroxysafflor yellow A; 2. ferulic acid; 3. liquiritin

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 分别含阿魏酸 0.145 mg、甘草苷 0.33 mg 和羟基红花黄色素 A 0.24 mg 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别将桃仁、红花、当归、秦艽、牛膝等药材干燥、粉碎,过 40 目筛后,按原方配比混匀,置于三角烧瓶中,照星点试验设计进行操作。所得乙醇溶液滤过,旋转蒸发至少量溶液,用 95% 乙醇定容至 10 ml 量瓶中,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液,4℃ 冰箱避光,密封保存。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、2、3、4、5 ml,分别置 10 ml 量瓶中,甲醇定容,制成系列对照品溶液。按上述色谱条件测定,分别以阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 的质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 的回归方程分别为 y=700 459x+149 679(r=0.999 4)、y=769 456x+5 797.3(r=0.999 6)、y=109 497x+5 296.55(r=0.999 7)。结果表明,阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 的质量浓度分别在 0.232~2.175、0.528~4.95、0.948~24.69 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.2 星点试验设计

试验中提取次数和药材粒径为非连续变量,回归处理困难,故在前期单因素试验的基础上,确定提取次数为 2 次,药材粒径为通过 3 号筛为宜。根据预试验结果,选择乙醇浓度(X₁)、料液比(X₂)和提取时间(X₃)3 个因素为自变量,每个因素确定 5 个水平,共 20 个试验点(6 个中心点),以阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 含量总和为因变量,采用星点设计-响应面法优选提取工艺。因素与水平见表 2;星点试验设计与结果见表 3(表中 15~20 号为重复试验,试验结果几乎一致,故用平均值表示)。

2.3 数据分析

表 2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

编码水平	因素		
	X ₁ , %	X ₂ (m/V)	X ₃ , min
-1.682	30	8.0	120
-1	38	9.6	132
0	50	12.0	150
+1	62	14.4	168
+1.682	70	16.0	180

表 3 星点试验设计与结果

Tab 3 Results of Central composite design

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	羟基红花黄色素 A 含量, mg/g	阿魏酸, mg/g	甘草苷含量, mg/g	提取物含量总和, mg/g	
							试验值	预测值
1	-1	-1	-1	20.86	11.55	24.52	56.93	55.69
2	+1	-1	-1	29.94	15.51	23.39	68.84	67.74
3	-1	+1	-1	21.50	18.03	26.76	66.28	70.24
4	+1	+1	-1	26.64	20.01	39.47	86.12	85.51
5	-1	-1	+1	12.90	14.13	28.43	55.47	52.93
6	+1	-1	+1	16.71	17.32	35.79	69.83	62.72
7	-1	+1	+1	11.61	19.69	39.78	71.08	69.03
8	+1	+1	+1	26.63	23.09	34.26	83.98	82.07
9	-1.682	0	0	13.02	11.78	26.69	51.50	51.09
10	+1.682	0	0	26.30	15.82	25.18	67.31	72.17
11	0	-1.682	0	16.30	10.90	18.11	45.31	50.92
12	0	+1.682	0	28.84	18.35	33.39	80.57	79.42
13	0	0	-1.682	29.26	21.25	35.42	85.94	83.82
14	0	0	+1.682	32.33	14.96	24.74	72.02	78.60
15	0	0	0	20.90	27.71	25.86	87.47	87.40
16	0	0	0	24.28	21.76	31.34	87.38	87.40
17	0	0	0	30.93	27.65	28.99	87.58	87.40
18	0	0	0	25.46	28.18	23.35	87.99	87.40
19	0	0	0	32.15	21.73	33.51	84.39	87.40
20	0	0	0	28.00	21.55	27.82	87.37	87.40

应用 Design-Expert7.0.0 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,得到乙醇浓度(X₁)、料液比(X₂)、提取时间(X₃)与阿魏酸、甘草苷、羟基红花黄色素 A 含量总和之间的二次多项回归方程: Y=87.40+6.27X₁+8.47X₂-1.55X₃+0.81X₁X₂-0.56X₁X₃+0.39X₂X₃-9.11X₁²-7.86X₂²-2.19X₃²(r=0.973 8)。由回归方程可知,模型能解释 97.38% 响应值的变化,表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确的预测实际情况。其校正决定系数为 0.902 0(r=0.949 7),表明此模型能解释 94.97% 效应值变化,因此该模型拟合度良好。

对上述回归模型进行显著性检验,结果回归方程的 P<0.000 1。回归方差显著性检验表明,一次项中乙醇浓度和料液比对阿魏酸、甘草苷、羟基红花黄色素 A 含量总和的线性效应极显著(P<0.01);二次项中乙醇浓度和料液比对阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 含量总和的曲面效应显著(P<0.05);乙醇浓度和料液比的交互项、乙醇浓度和提取时间的交互项、料液比和提取时间的交互项对阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 含量总和没有显著性影响,说明各因素间的交互作用不显著。回归模型方差分析见表 4。

依据回归方程,在保持一个因素编码值为 0 时,借助 Design-Expert7.0.0 软件绘制其他两个因素与响应值关系的三维响应面图(见图 2)。由图可知,乙醇浓度和料液比对阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素 A 含量总和的影响较为显著,且

表4 回归模型方差分析

Tab 4 Results of variance analysis of regression model

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
X_1	536.52	1	536.52	28.48	0.000 3
X_2	980.03	1	980.03	52.03	<0.000 1
X_3	32.97	1	32.97	1.75	0.215 3
$X_1 X_2$	5.23	1	5.23	0.28	0.609 6
$X_1 X_3$	2.52	1	2.52	0.13	0.722 2
$X_2 X_3$	1.22	1	1.22	0.065	0.803 9
X_1^2	1 196.24	1	1 196.24	63.51	<0.000 1
X_2^2	890.56	1	890.56	47.28	<0.000 1
X_3^2	69.12	1	69.12	3.67	0.084 4
模型	13 465.41	9	385.05	20.44	<0.000 1
残差	188.37	10	18.84		
失拟项	188.08	5	37.62	659.02	<0.000 1
误差	0.29	5	0.057		
总离差	3 653.78	19			
拟合度	0.948 4		展望拟合度	0.604 8	
矫正拟合度	0.902 0		信噪比	11.887	

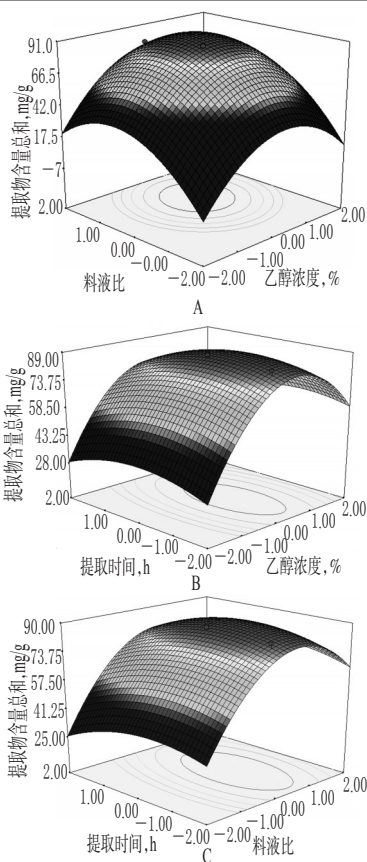


图2 三维响应面图

A.乙醇浓度、料液比对提取物含量总和的影响;B乙醇浓度、提取时间对提取物含量总和的影响;C.料液比、提取时间对提取物含量总和的影响

Fig 2 Graphic model of response surface

A.effect of ethanol concentration and ratio of material to liquid on extract content; B. effect of ethanol concentration and extraction time on extract content; C. effect of ratio of material to liquid and extraction time on extract content

响应曲面陡峭。

为确定自变量的最佳取值,通过 Design- Expert7.0.0 软件

分析,得出回归模型存在最大值点,(X)的代码值分别为-0.06、0.75、0.36,与之对应的实测值乙醇浓度为49%,料液比为1:13.7,提取时间为156 min,此时身痛逐瘀胶囊中阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和的最大估计值为88.21 mg/g。

2.4 模型的验证

为了验证上述模型方程的适用性,在乙醇浓度、料液比、提取时间最优的水平上,重复试验3次。结果,在最优水平下,阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和为87.69 mg/g (RSD=0.17%),与预测值88.21 mg/g吻合极好,说明用此模型指导实践具有较好的效果。

3 讨论

本试验曾分别考察了回流提取、超声提取及超声-微波协同萃取3种不同提取方法,结果回流提取法提取率高,且操作简便、省时,有利于在大规模生产中应用,故选择回流提取法。

本试验曾先后考察了柱温25、30、35、40℃对色谱分离的影响,结果显示,柱温为30℃时出峰时间适中,待测成分色谱峰分离效果较好,且峰形良好,所以选择30℃为本试验的柱温。

本试验采用响应面法确定了星点设计优化的身痛逐瘀胶囊中药材的提取工艺:乙醇浓度为49%,料液比为1:13.7(m/V),提取时间为156 min,在此条件下,身痛逐瘀胶囊中阿魏酸、甘草苷和羟基红花黄色素A含量总和的最大估计值为88.21 mg/g,与试验结果(87.69 mg/g)相符。

参考文献

- [1] 段富津.方剂学[M].上海:上海科学技术出版社,2007:198.
- [2] 张海燕,陈晓燕,万娜,等.星点设计-效应面法优化栀子苷表面修饰纳米粒的制备工艺[J].中成药,2011,33(5):245.
- [3] 陈卫卫,何炜玲,冯看,等.星点设计-效应面法优选抗炎退热颗粒剂的成型工艺[J].中成药,2011,33(9):1 610.
- [4] 肖莉,张韵慧.星点设计-效应面法优选南五味子的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):22.
- [5] 吴云娟,沙先宜,李婵,等.星点设计效应面法优化三七总皂苷鼻腔用粉雾剂[J].中成药,2005,7(1):10.
- [6] 颜廷旭,杨星钢,高永生,等.星点设计-效应面法优化四逆散渗透泵片处方[J].中国新药杂志,2010,19(21):1 986.
- [7] 陈海亭,尹蓉莉,陈金玉,等.星点设计-效应面法优化山楂叶中总黄酮微孔渗透泵控释片处方[J].中成药,2011,33(10):1 688.
- [8] 伍勇,贺福元,曹燕,等.星点设计-效应面法优化四物汤提取工艺[J].中国药房,2009,20(36):2 830.
- [9] 苏丹,唐丽琴,陈象青,等.星点设计-效应面法优化熊果苷乳膏配方[J].中国药房,2011,22(19):1 771.
- [10] 简晓顺,程国华,赵鑫,等.星点设计法优化汉防己甲素壳聚糖微球的处方[J].中国药房,2008,19(16):1 231.
- [11] 宋金春,刘红,刘薇芝.当归、川芎、红花不同组合方式提取物的指纹图谱比较[J].中国药学杂志,2006,41(15):1 136.

(收稿日期:2012-03-27 修回日期:2012-05-30)