

星点设计-响应面法优化补肾活血胶囊提取工艺

殷佳^{1*}, 殷健², 朱艳², 邢冰琪¹, 傅春升^{1#}(1.山东中医药大学附属医院, 济南 250014; 2.山东鲁南监狱医院, 山东日照 277605)

中图分类号 R285.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2276-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.34

摘要 目的:优化补肾活血胶囊的提取工艺。方法:以加水倍量、煎煮时间为主要因素,以淫羊藿苷、丹酚酸B含量和干浸膏得率的归一化值为综合评价指标,采用星点设计-响应面法优化提取工艺,并进行验证试验。结果:最优提取工艺为药材加15倍量的水,回流提取75 min,提取2次。验证试验实测值与预测值的偏差为0.000 3%。结论:星点设计-响应面法可用于优化补肾活血胶囊的提取工艺,预测性好;所得工艺方法简便、稳定。

关键词 补肾活血胶囊;星点设计-响应面法;提取工艺;淫羊藿苷;丹酚酸B

Optimization of the Extraction Technology of Bushen Huoxue Capsules by Central Composite Design-response Surface Method

YIN Jia¹, YIN Jian², ZHU Yan², XING Bingqi¹, FU Chunsheng¹(1.The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China; 2.Shandong Lunan Prison Hospital, Shandong Rizhao 277605, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Bushen huoxue capsules. METHODS: Central composite design-response surface method was used to optimize the extraction technology with the amount of water and boiling time as main factors using normalized value of the contents of icariin and salvianolic acid B, the yield of dry extract as index. Validation test was also conducted. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 15-fold water, reflux extracting for 75 min, extracting for 2 times. The deviation of measured value and predicted value was 0.000 3% in validation test. CONCLUSIONS: The central composite design-response surface method can be used to optimize the extraction technology of Bushen huoxue capsules with good prediction, and the technology is simple and stable.

KEYWORDS Bushen huoxue capsules; Central composite design-response surface method; Extraction technology; Icariin; Salvianolic acid B

补肾活血胶囊是由淫羊藿、丹参等多味中药组成的复方制剂,有补肝肾、强筋骨、活血止痛的功效,临床上用于治疗激素性股骨头坏死。该处方来源于医院临床验方,以汤剂入药,但携带不便、口感不佳,且熬制过程繁复等。因此,笔者通过中药制剂工艺试验研究将其剂型改为稳定性较高、服用携带便利的胶囊剂。本试验采用星点设计-响应面法^[1-2]优化补肾活血胶囊的提取工艺,为其后续研究提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

CP2250分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司);876-I真空干燥箱(南通科学仪器厂);RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SK5200H超声波清洗器(上海五久自动化设备有限公司);MA45C-000230V1水分测定器(德国Sartorius公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);1260高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 药材、药品与试剂

中药淫羊藿(批号:1206605191)、杜仲(批号:120624)、丹参(批号:130109)、白芍(批号:1301605231)、牛膝(批号:21120621)、鹿角胶(批号:20121008)、茯苓(批号:121112)、香附(批号:20120427)、甘草(批号:1210105201)等均源于山东

中医药大学附属医院,经该院张学顺主任药师鉴定为道地药材,均符合2015年版《中国药典》(一部)有关规定;淫羊藿苷对照品(批号:110737-200415,纯度:>98%)、丹酚酸B对照品(批号:111562-201212,纯度:>98%)均来源于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯(美国Tedia公司),水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 处方

处方:淫羊藿、丹参各3 g,白芍、杜仲各1.5 g,茯苓、牛膝各1.2 g,甘草、香附各0.9 g,出膏4.2 g。

2.2 淫羊藿苷的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(30:70)等度洗脱,流速为1.0 ml/min,柱温为25℃,检测波长为270 nm,进样量为20 μl。理论板数按淫羊藿苷峰计应不低于1 500。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取于105℃干燥至恒质量的淫羊藿苷对照品10.92 mg,置于20 ml量瓶中,加入甲醇适量,超声使溶解,放冷并稀释至刻度,得质量浓度为546 μg/ml的淫羊藿苷对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取干浸膏粉末适量(相当于0.1 g的淫羊藿药材),精密称定,移至50 ml锥形瓶中,精密加入稀乙醇(50%)溶液10 ml,密塞,摇匀,称质量,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min;取出,放冷,称质量,用稀乙醇溶液补足失质量,摇匀;离心(2 500 r/min,离心半径9.5 cm)3

* 主管护师。研究方向:中医护理及中药制剂在临床中的应用。电话:0531-68617069。E-mail:yinjia1975@163.com

通信作者:副主任药师,硕士生导师。研究方向:中药新制剂、新工艺。E-mail:yfuchunsheng@163.com

min,取上清液,0.22 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取缺淫羊藿的阴性对照样品,照“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性对照溶液各20 μl测定。结果,供试品中的其他成分对淫羊藿苷测定无干扰,色谱图见图1。

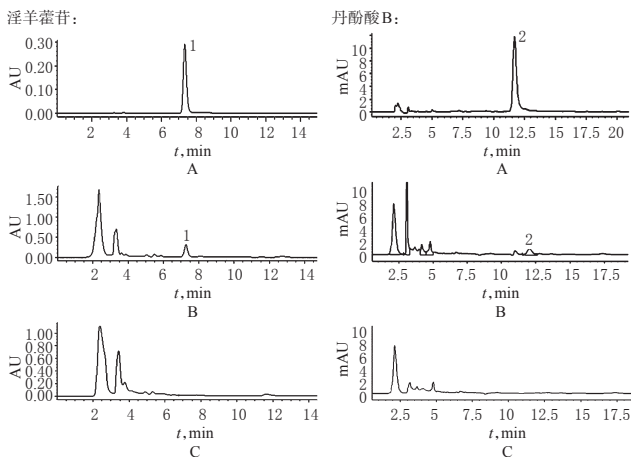


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品(正交试验3号样);C.阴性对照;1.淫羊藿苷;2.丹酚酸B

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. sample (No. 3 sample of orthogonal test); C. negative control; 1. icariin; 2. salvianolic acid B

2.2.6 线性关系考察 按相关方法操作,以淫羊藿苷对照品峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得到回归方程: $y=45\ 041\ 055.08x-84\ 734.89(r=1.000\ 0)$ 。结果表明,淫羊藿苷检测质量浓度线性范围为21.84~152.9 μg/ml,定量限为7.21 ng。

2.2.7 精密度、重复性、回收率试验 按相关方法操作,精密度、重复性试验的RSD分别为0.32%、2.06% (n=6),平均回收率为98.11% (RSD=2.22%, n=6),表明该方法符合要求。

2.2.8 稳定性试验 按相关方法操作,供试品溶液放置10 h时淫羊藿苷峰面积RSD为2.04% (n=6),表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.3 丹酚酸B的含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(25:75)等度洗脱,流速为1 ml/min,柱温为25 ℃,检测波长为286 nm,进样量为20 μl。理论板数按丹酚酸B峰时应不低于2 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取于105 ℃干燥至恒质量的丹酚酸B对照品12.68 mg,置于50 ml量瓶中,加入75%甲醇适量,超声使溶解,放冷并稀释至刻度,得质量浓度为634 μg/ml的丹酚酸B对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取干浸膏粉末适量(相当于10 g的丹参药材),移至50 ml锥形瓶中,其余操作同“2.2.3”项下方法。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 取缺丹参的阴性对照样品,照“2.3.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3.5 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性对照溶液各20 μl测定,结果供试品中的其他成分对丹酚酸B测定无干扰,色谱图见图1。

2.3.6 线性关系考察 按相关方法操作,以丹酚酸B对照品峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得到回归方程: $y=3\ 877.1x+5.518\ 7(r=0.999\ 9)$ 。结果表明,丹酚酸B检测质量浓度线性范围为12.68~380.4 μg/ml,定量限为4.18 ng。

2.3.7 精密度、重复性、回收率试验 按相关方法操作,精密度、重复性试验的RSD分别为0.70%、2.28% (n=6),平均回收率为97.99% (RSD=2.32%, n=6),表明该方法符合要求。

2.3.8 稳定性试验 按相关方法操作,供试品溶液放置10 h时丹酚酸B峰面积RSD为1.08% (n=6),表明供试品溶液在10 h内稳定。

2.4 干浸膏得率的测定

精密吸取供试品溶液50 ml,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,在水浴上蒸干;于105 ℃干燥3 h以上,移至干燥器中,冷却30 min,迅速称质量,直至样品恒质量。计算干浸膏得率=(干膏质量/药材质量)×100%。

2.5 星点设计-响应面法试验

2.5.1 因素与水平的确定 根据传统汤剂的煎煮方法以及预试验的结果,确定水提取法提取药材。影响水提工艺的因素主要有提取次数、提取时间、提取溶剂水的用量。因提取次数为非连续变量^[3-4],所以结合传统汤剂实际煎煮次数及预试验结果,固定提取次数为2次,对加水倍量(X_1)8~16倍、提取时间(X_2)60~150 min进行筛选。分别按照星点设计的因素安排试验,选择淫羊藿苷、丹酚酸B含量以及干浸膏得率为考察指标(淫羊藿苷、丹酚酸B换算成此提取方法下在每1 g单味药材中提取的含量进行比较)。因素与水平见表1。

表1 因素与水平表

Tab 1 Factors and levels

因素	水平				
	-1.414	-1	0	+1	+1.414
X_1 (加水倍量)	8	9.2	12	14.8	16
X_2 (提取时间,min)	60	73.2	105	136.8	150

2.5.2 归一值的计算 响应面法的数据处理办法为归一化法,每个指标标准化为0~1之间的归一值D;各指标归一值求算几何平均数,得总评归一值OD。其中归一值的计算为对取值越小越好的干浸膏得率计算 $D_{\min}=(Y_{\max}-Y)/(Y_{\max}-Y_{\min})$,对取值越大越好的淫羊藿苷和丹酚酸B含量计算 $D_{\max}=(Y-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$, $OD=(D_1 \cdot D_2 \cdot \dots \cdot D_n)^{1/n}$,n为指标数^[5], D_1 、 D_2 、 D_3 分别为干浸膏得率和淫羊藿苷、丹酚酸B含量的归一值。在该系统评价中,因几个指标取值或大或小较好,故将其归一为一个总OD值再代入Design-expert软件进行筛选。

2.5.3 星点设计试验结果 测得每个样品的淫羊藿苷、丹酚酸B含量及干膏率,计算其D值及OD值,结果见表2,方差分析见表3。

由表2、表3可见,应用Design-expert软件以OD值^[5]进行多元非线性拟合,二次多项式拟合总评 $OD=0.4+0.058 X_1+0.053 X_2-0.17 X_1 X_2-0.16 X_1^2-0.054 X_2^2-0.12 X_1^2 X_2+0.014 X_1 X_2^2$ 。该模型 $P<0.000\ 1$,有显著性差异,失拟项 $P=0.324\ 1>0.05$,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,OD值与 X_1 、 X_2 回归方程关系良好。通过Design-expert软件绘制响应面三维图^[6],见图2,从而在响应面最优区域上选取OD值来作为试验条件。

表2 星点设计试验结果

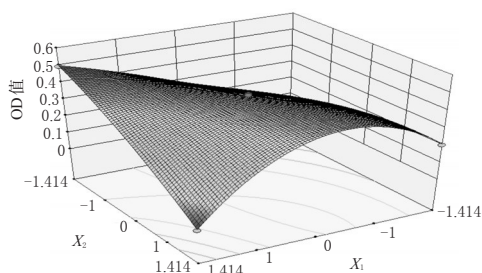
Tab 2 Results of central composite design

试验号	X_1	X_2	干浸膏得率, %	淫羊藿苷含量, mg	丹酚酸B含量, mg	D_1	D_2	D_3	OD值
1	-1	-1	25.76	6.015 45	0.087 251	1	0	0.457 3	0
2	+1	-1	28.20	8.039 34	0.091 896	0.542 2	0.365 5	0.605 4	0.493 2
3	-1	+1	28.13	7.070 00	0.075 477	0.555 3	0.189 2	0.081 7	0.204 7
4	1	1	31.09	11.589 20	0.104 264	0	1	1	0
5	0	+1.414	29.80	8.523 10	0.087 606	0.242 0	0.449 9	0.468 6	0.370 9
6	0	-1.414	27.87	6.776 41	0.077 035	0.609 8	0.136 5	0.131 4	0.222 0
7	+1.414	0	31.02	9.257 74	0.090 906	0.013 1	0.581 7	0.573 9	0.163 5
8	-1.414	0	26.11	6.251 75	0.072 917	0.934 3	0.424 0	0	0
9	0	0	29.80	8.654 96	0.092 345	0.242 0	0.473 6	0.619 8	0.414 2
10	0	0	30.02	8.852 23	0.091 045	0.167 0	0.509 0	0.578 3	0.366 3
11	0	0	29.90	8.693 72	0.092 564	0.223 3	0.480 5	0.626 8	0.406 7
12	0	0	30.00	8.786 21	0.092 784	0.204 5	0.497 1	0.633 8	0.400 9
13	0	0	30.10	8.742 32	0.093 981	0.185 7	0.489 2	0.672 0	0.393 8

表3 拟合回归方程的方差分析结果

Tab 3 Variance analysis results of fitting regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.38	7	0.054	150.42	<0.000 1	显著
X_1	0.013	1	0.013	37.47	0.001 7	显著
X_2	0.011	1	0.011	31.07	0.002 6	显著
X_1X_2	0.12	1	0.12	341.32	<0.000 1	显著
X_1^2	0.18	1	0.18	505.28	<0.000 1	显著
X_2^2	0.020	1	0.020	56.07	0.000 7	显著
$X_1^2X_2$	0.031	1	0.031	87.27	0.000 2	显著
$X_1X_2^2$	0.000 04	1	0.000 04	1.15	0.332 7	
残差	0.001 8	5	0.001 8			
失拟项	0.000 43	1	0.000 43	1.26	0.324 1	
总差	0.38	12				

图2 X_1 、 X_2 对OD值的效应面三维图Fig 2 Three-dimensional graph of X_1 and X_2 to OD value

采用 Design-expert 软件对最优结果进行预测, $X_1=14.8$, $X_2=73.2$, OD 值预测值为 0.500 5。综合考虑各方面因素, 最优工艺确定为 15 倍量的水回流提取 75 min, 提取 2 次。

2.6 验证试验

根据上述工艺条件再提取 10 倍量补肾活血胶囊样品 3 份, 每份处方量为淫羊藿、丹参各 30 g, 白芍、杜仲各 15 g, 茯苓、牛膝各 12 g, 甘草、香附各 9 g。测得各指标结果见表 4。

表4 验证试验结果

Tab 4 Results of validation test

批次	淫羊藿苷, mg	丹酚酸B, mg	干浸膏得率, %	实测OD值	预测OD值	偏差, %
1	80.692 1	1.122 37	28.1	0.496 1	0.500 5	+0.000 3
2	82.016 3	1.150 21	27.9	0.508 2		
3	80.827 8	1.121 75	28.4	0.498 7		
平均值	81.178 7	1.098 11	28.1	0.501 0		
RSD, %	0.90	1.44	0.89	1.27		

结果表明, 验证试验结果与预测值基本相符, 偏差为 0.000 3%。

3 讨论

3.1 试验考察指标的选择

经文献[7-8]得知, 本试验君药淫羊藿中的淫羊藿苷以及丹参中的丹酚酸B为治疗股骨头坏死的有效成分, 可对抗骨质疏松, 促进骨细胞分化增殖, 故将二者含量作为考察指标。

3.2 试验优选方法的选择

本试验采用星点设计-响应面法对水提取工艺进行筛选。该方法与正交设计法和均匀设计法相比, 试验精度更高, 预测值也更接近真实值, 且操作简便^[9-12]。星点设计-响应面法通过多元线性回归及多元非线性拟合, 得出相应的数学方程及试验模型, 再根据该模型绘制响应面图, 从而找出最优的区域。

3.3 试验因素的选择

在水提取试验中选取了提取次数、加水倍量以及提取时间为试验因素。但由于提取次数为不连续因素, 无法在星点设计中体现, 故而进行了预试验, 确定了提取次数为 2 次。所以在星点设计试验中只体现了后 2 个因素的考察。

参考文献

- [1] 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): 293.
- [2] 范林乾, 刘晓, 蔡皓, 等. 中药汤剂现代研究中常用的实验设计方法[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(20): 3 105.
- [3] 陈卫卫, 冯看, 彭晶蕊, 等. 星点设计-效应面法优选抗炎退热颗粒剂的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 41.
- [4] 周绍春, 王志萍, 邓家刚, 等. 星点设计-效应面法优选解酒泡腾片的提取工艺[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 1 819.
- [5] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 530.
- [6] 刘雪梅, 王志萍, 韦慧鲜. 星点设计-效应面法优选妇雅净泡腾片提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 37.
- [7] 林绵辉, 史占军. 淫羊藿苷对钛颗粒作用下的成骨细胞增殖和表型的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(10): 1 548.
- [8] 孙宇, 崔燎, 吴铁. 盐酸水提法制备丹参水溶性有效部位群及其对成骨细胞活性测定[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 377.
- [9] 刘惠英. 响应曲面法优化参芪颗粒的提取工艺[J]. 中药材, 2012, 35(5): 807.
- [10] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455.
- [11] 刘逊, 陈俭清, 李明雁, 等. 星点设计-效应面法优化连翘颗粒剂的制备工艺研究[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(6): 130.
- [12] 薛桂蓬, 宋选宗, 满尔哈巴·海如拉, 等. 星点设计-响应面法优化维药刺山柑果生物碱提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(1): 96.

(收稿日期: 2016-02-04 修回日期: 2016-03-02)

(编辑: 刘 萍)