

混合均匀设计法优化白芍提取工艺

尹雪^{1*}, 孙萍^{2#}, 温学森³, 姜国萍¹(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011; 3. 山东大学药学院, 济南 250012)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0089-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.29

摘要 目的: 优化白芍提取工艺。方法: 以芍药苷含量为评价指标, 以提取溶剂、溶剂用量、提取时间、提取次数为考察因素, 采用混合均匀设计法结合二次多项式逐步回归方程制作曲面图, 对白芍提取工艺进行优化并进行验证试验。结果: 白芍的最优提取工艺为以90%乙醇为提取溶剂, 溶剂用量为12倍, 提取时间为150 min, 提取2次; 3次验证试验中芍药苷含量实测值为2.821 4%、2.795 7%、2.841 9% (RSD=0.82%, n=3), 接近预测值2.848 4%。结论: 本法简便、准确, 建立的工艺可用于白芍的提取。

关键词 白芍; 芍药苷; 混合均匀设计; 曲面图; 提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of *Paeonia lactiflora* by Mixed Uniform Design

YIN Xue¹, SUN Ping², WEN Xuesen³, JIANG Guoping¹(1. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China; 3. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of *Paeonia lactiflora*. METHODS: The surface figure made by mixed uniform design combined with the quadratic polynomial stepwise regression equation is adopted to optimize the extraction technology of *P. lactiflora* by using the content of paeoniflorin as index, with extraction solvent, the amount of extraction solvent, extraction time, extraction times as factors. RESULTS: The optimal extraction technology of *P. lactiflora* was as follows as 90% ethanol, 12-folds extraction solvent, extracting for 150 min, extracting for 2 times. The measured value of 3 validation tests were 2.848 4%, 2.795 7%, 2.841 9% (RSD=0.82%, n=3), which was close to the predicted value 2.848 4%. CONCLUSIONS: The method is convenient and accurate, and can be used for the extraction of *P. lactiflora*.

KEYWORDS *Paeonia lactiflora*; Paeoniflorin; Mixed uniform design; Surface figure; Extraction technology

白芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的干燥根, 有抗肿瘤、抗炎、保肝、镇痛、免疫调节等多种药理活性^[1-4], 具有养血调经、敛阴止汗、柔肝止痛、平抑肝阳之功效, 主要用于血虚萎黄、月经不调、自汗、盗汗、胁痛、腹痛、四肢挛痛、头痛眩晕等^[5]。白芍的有效成分为白芍总苷, 其中芍药苷占白芍总苷的90%以上, 为白芍主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、神经保护、免疫调节、降血糖、抗血小板聚集、止痛等作用^[6-11]。2010年版《中国药典》(一部)将芍药苷的含量作为白芍的质量控制指标^[1]。白芍作为常用的大宗药材, 在提取过程中不同的溶剂、提取时间对白芍中芍药苷含量影响不同。传统上白芍常采用水提取, 但是水提取后糊化淀粉粒较多, 过滤困难, 使芍药苷损失严重; 近年来也有使用乙醇提取白芍的, 但不同浓

度的醇对芍药苷提取率不同^[12-15]。

混合均匀设计是在均匀设计的基础上, 选择不同的水平进行试验, 能够以较小的试验次数考察更多的试验水平数, 使得试验均匀分散。但混合均匀设计运用二次多项式逐步回归分析得到的回归方程分析较困难, 若将其回归方程结合曲面图, 所得的三维立体图可以更直观地反映最优的提取水平。

因此, 本试验以白芍中芍药苷含量为考察指标, 在单因素考察的基础上, 采用混合均匀设计法结合二次多项式逐步回归方程, 对水以及不同体积分数的乙醇、溶剂用量、提取时间、提取次数进行优化, 同时将得到的回归方程制成曲面图, 以更直观地获得最优条件, 从而最大限度地优化白芍的提取工艺。

1 材料

- [4] 司晶星, 邵世群, 申有青, 等. 基于环糊精的纳米载药体系的研究进展[J]. 高分子通报, 2013, 175(11): 1.
- [5] 赵珊, 王慧娟, 林冰, 等. 左羟丙哌嗪 β -环糊精包合物的处方工艺优化及鉴定[J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3 496.
- [6] 雍国平, 李光水, 郑飞, 等. β -环糊精包合物的结构研究[J]. 高等学校化学学报, 2000, 21(7): 1 124.
- [7] 孔晓军, 刘希望, 李剑勇, 等. 丁香酚的药理学作用研究进

展[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(3): 508.

- [8] 张扬, 周裔彬, 曹胜男, 等. β -和 γ -环糊精与丁酸乙酯包合物的制备及结构表征[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(9): 34.
- [9] 王艳艳, 彭敏. 丁香中挥发油的提取及其 β -环糊精包合物制备工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(5): 49.
- [10] 袁雨婕, 宁德山, 曾荣华, 等. 丁香油的超临界CO₂萃取工艺研究和GC-MS分析[J]. 中国天然药物, 2007, 5(5): 363.

* 硕士研究生。研究方向: 靶向制剂、药物新剂型与新技术。E-mail: yinxue0828@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 靶向制剂、药物新剂型与新技术。电话: 0531-68617919。E-mail: tsunping@163.com

(收稿日期: 2015-03-05 修回日期: 2015-04-24)

(编辑: 刘萍)

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); CP2250 型电子分析天平(精度:1/10万)、AV412 型电子分析天平(精度:1/100)均为奥豪斯国际贸易有限公司产品;KDM 型可调控温电热套(山东鄞华鲁电热仪器有限公司);KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品、药材与试剂

芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110736-201337,纯度:94.9%);白芍(山东中医药大学附属医院中药房,批号:150302,经山东中医药大学附属医院张学顺主任药师鉴定为 *Paeonia-lactiflora* Pall. 的干燥根);甲醇、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 芍药苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Luna-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(35:65),流速:1 ml/min;柱温:25 °C;检测波长:230 nm;进样量:10 μl。在上述色谱条件下,取“2.1.2”“2.1.3”项下芍药苷对照品溶液和供试品溶液进样分析,结果芍药苷与相邻峰分离度>1.5,以芍药苷峰理论板数为 9 599。色谱图见图 1。

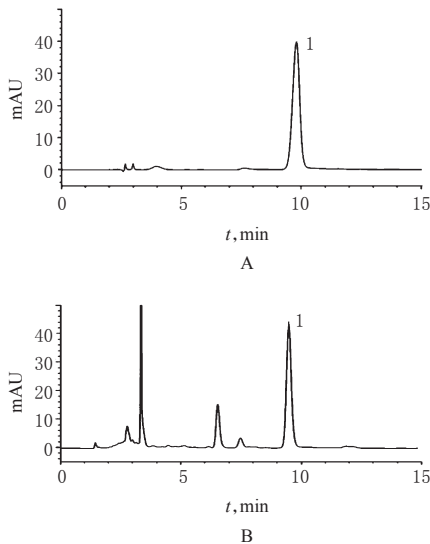


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; 1. 芍药苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test sample; 1. paeoniflorin

2.1.2 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成 207.2 μg/ml 的溶液,得对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取白芍药材 25 g,加入 6 倍量水,浸泡 40 min 后提取 90 min;提取 2 次,合并提取液,定容至 1 000 ml,即得。

2.1.4 线性关系试验 精密量取对照品贮备液 1、3、5、7、9 ml 置于 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别精密吸取 10 μl,注入液相色谱仪测定。以芍药苷的峰面积(y)为纵坐标,以芍药苷质量浓度(x)为横坐标,得回归方程为 $y=12.638x+14.665$ ($r=0.9999$),表明芍药苷检测质量浓度线性范围为 20.72~186.48 μg/ml,定量限为 20.72 μg/ml。

2.1.5 精密度、稳定性、重复性和准确度试验 按相关方法进行。结果,精密度试验中峰面积的 RSD=0.84% ($n=6$);稳定性试验中含量的 RSD=1.17% ($n=6$),表明供试品溶液在

12 h 内稳定;重复性试验中含量的 RSD=0.94% ($n=6$);准确度试验中平均回收率为 100.07% (RSD=1.43%, $n=6$)。

2.1.6 样品中芍药苷的含量测定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪测定,计算样品中芍药苷的含量。

2.2 混合均匀设计优化白芍提取工艺

2.2.1 试验设计 以芍药苷含量为指标,在预试验的基础上选择了影响白芍提取效果的 4 个因素及水平:提取溶剂 X_1 [不同体积分数的乙醇(%),“0”表示水]、溶剂用量 X_2 (药材倍数)、提取时间 X_3 (min)、提取次数 X_4 。采用混合均匀设计表 $U_{10}(10^1 \times 5^2 \times 2^1)$ 进行考察。其中 X_1 选择 10 个水平, X_2 、 X_3 分别选择 5 个水平, X_4 选择 2 个水平,因素与水平见表 2。

表 2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

因素	水平									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
X_1 , %	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
X_2 , 倍	6	8	10	12	14					
X_3 , min	60	90	120	150	180					
X_4 , 次	1	2								

2.2.2 试验方法 取白芍,净选,称取 25 g,按混合均匀设计表 $U_{10}(10^1 \times 5^2 \times 2^1)$ 进行均匀试验。将混合均匀设计得到的 10 组提取液放至室温,定容至 1 000 ml,测定含量,平行操作 3 次取平均值。试验设计结果见表 3,10 个提取液样品色谱图见图 2。

表 3 混合均匀设计试验安排及结果

Tab 3 Design and result of mixed uniform design experiment

水平	因素				Y(芍药苷含量), %
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	0	6	90	2	1.762 7
2	10	8	150	2	2.314 0
3	20	10	60	2	2.398 7
4	30	12	120	2	2.496 9
5	40	14	180	2	2.607 5
6	50	6	60	1	2.113 8
7	60	8	120	1	2.223 3
8	70	10	180	1	2.379 9
9	80	12	90	1	2.507 4
10	90	14	150	1	2.471 3

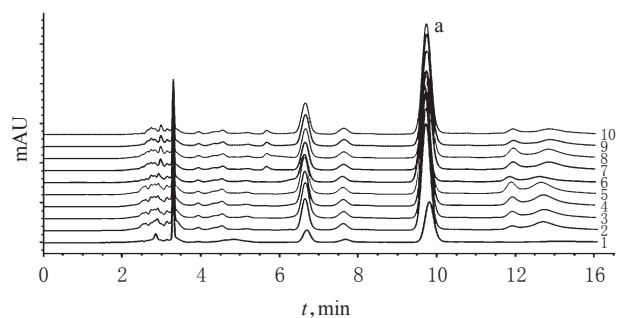


图 2 混合均匀设计 10 个样品重叠色谱图

a. 芍药苷

Fig 2 Overlap chromatogram of 10 samples by mixed uniform design

a. paeoniflorin

经 DPS(7.05) 软件进行二次多项式逐步回归分析处理,得回归方程: $Y=0.73550+0.29757X_2-0.00035X_3-0.01087X_2^2+0.00003X_3^2-0.00006X_1X_3+0.00710X_1X_4-0.01726X_2X_4$, $r=$

0.985 6, $P=0.076 5 < 0.1$, $S=0.088 1$, $R_a=0.933 5$, 决定系数为 0.980 83, 剩余通径系数为 0.138 45, 表明拟合度良好。

2.2.3 试验优化 根据二次多项式逐步回归方程得到的回归模型绘制曲面图, 见图 3。

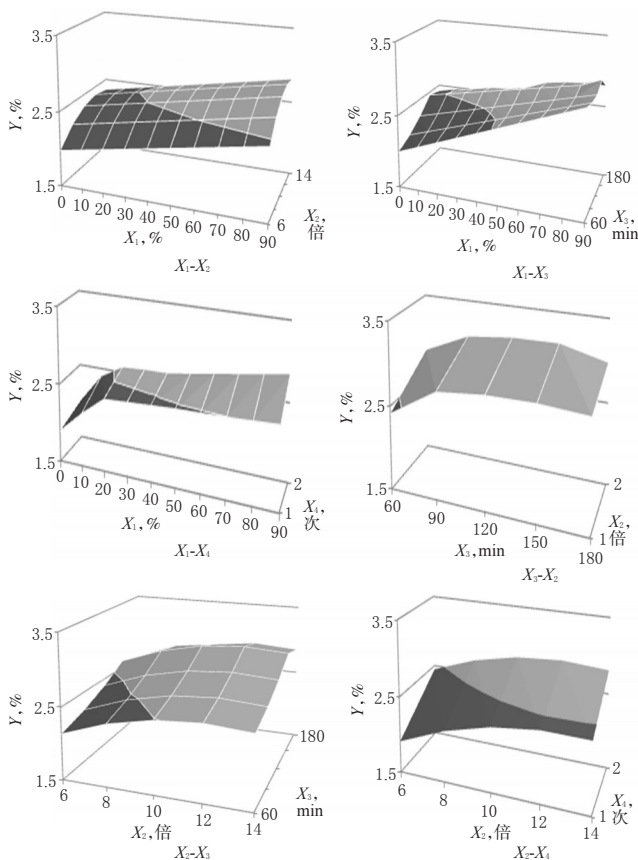


图 3 各因素交互作用曲面图

Fig 3 Surface figure of each factors interaction

从图 3 可知, 随着提取溶剂(乙醇)体积分数的增加, 芍药苷含量逐渐增加, 当使用 90% 乙醇时含量达最大值; 溶剂用量从 6~12 倍量时芍药苷含量也呈增加趋势, 12 倍量之后芍药苷含量基本保持平稳; 提取时间对芍药苷也有一定的影响, 提取时间从 60~150 min 时芍药苷含量不断增加, 150 min 之后芍药苷含量呈下降趋势; 此外, 提取 2 次比提取 1 次所得芍药苷的含量高。因此, 白芍的最优提取工艺为 12 倍 90% 乙醇, 提取 150 min, 提取 2 次; 含量预测值为 2.848 4%。

2.3 工艺验证试验

按所得最优工艺条件进行 3 次平行验证, 得到芍药苷含量实测值, 分别为 2.821 4%、2.795 7%、2.841 9% ($RSD=0.82\%$, $n=3$), 与预测值接近。

3 讨论

通过混合均匀设计试验, 对比水以及不同体积分数的乙醇在提取过程中对芍药苷含量的影响, 发现醇提取白芍比水提取的芍药苷提取率更高。故采用乙醇提取, 以便最大限度地提高芍药苷提取率。

混合均匀设计是采用混合均匀设计表安排试验, 用二次多项式逐步回归分析进行数据分析的一种试验设计方法。其最大的优点是用较少的试验次数考察更多的试验水平数, 均

匀分散。本试验采用混合均匀设计对白芍的提取工艺进行优化筛选, 各因素水平不尽相同, 以确保找出最优提取条件。本试验设计中提取溶剂选择 10 个水平, 溶剂用量、提取时间分别选用 5 个水平, 提取次数选择 2 个水平, 共进行 10 次试验, 明显减少了多因素试验的试验次数; 同时, 运用二次多项式逐步回归分析得到回归方程绘制曲线图, 以更直观的方式找到最优提取方案, 是优化白芍提取工艺的有效方法。

本试验在与正交试验水平相当的情况下, 考察了更多的因素与水平对白芍提取工艺的影响, 更具有科学性与合理性。

参考文献

- [1] 杨加城, 谭旭霞, 谭淑敏, 等. 白芍醇提取液超滤膜分离药效部位体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药房, 2009, 20(36): 2 819.
- [2] 王瑞, 李颖伟, 胡月娟, 等. 赤芍与白芍的药理作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 112.
- [3] 李文艳, 黄山君, 王瑞. 中药白芍的药理作用和质量控制研究进展[J]. 药学服务与研究, 2012, 12(2): 118.
- [4] 陈四平, 张浩, 李相坤, 等. 中药白芍的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2008, 25(3): 293.
- [5] 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: 97.
- [6] 孙丽荣, 曹雄, 侯凤青, 等. 芍药苷研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2 028.
- [7] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100.
- [8] 胡难, 许惠玉, 陈志伟, 等. 芍药苷的药理学研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(9): 1 093.
- [9] Wu D, Chen J, Zhu H, et al. UPLC-PDA determination of paeoniflorin in rat plasma following the oral administration of Radix Paeoniae Alba and its effects on rats with collagen-induced arthritis[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1): 209.
- [10] Xie WK, Yu WZ, Zhao M, et al. Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium in vitro[J]. *Mol Vis*, 2011, 17(29): 3 512.
- [11] Liu DZ, Xie KQ, Ji XQ, et al. Neuroprotective effect of paeoniflorin on cerebral ischemic rat by activating adenosine A1 receptor in a manner different from its classical agonists[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146(4): 604.
- [12] 于定荣, 顾雪竹, 张村, 等. 白芍中芍药苷提取工艺的对比研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 49.
- [13] 陶巧凤. 白芍中芍药苷提取工艺的优选[J]. 中药材, 1999, 22(2): 94.
- [14] 刘芳, 杨广德. 白芍中芍药苷的提取方法研究[J]. 中成药, 2003, 25(10): 792.
- [15] 吴巧凤, 严云良, 楼小红. 白芍中芍药苷的提取工艺研究[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1 379.

(收稿日期: 2015-03-27 修回日期: 2015-06-12)

(编辑: 刘 萍)