

Box-Behnken 效应面法优化复方土茯苓颗粒提取工艺

刘伟^{1,2}, 刘志刚¹, 孙维峰¹, 吴新荣^{1*}

(1. 广州军区广州总医院, 广州 510010; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘要] **目的:** 优选复方土茯苓颗粒的提取工艺条件。**方法:** 以落新妇苷、总黄酮提取量和出膏率的总评“归一值”(OD) 为因变量, 通过对提取次数、提取时间、溶媒比各水平进行多元线性回归及二项式拟合, 采用 Box-Behnken 效应面法优选提取工艺。采用 HPLC 测定落新妇苷含量, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水 (20:80), 检测波长 290 nm。**结果:** 最佳提取工艺为加 9.8 倍量水提取 3 次, 每次 1.4 h; 落新妇苷提取量 $1.991 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 总黄酮提取量 $54.436 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 干膏得率 8.558%, OD 实测值与预测值相对偏差 1.54%。**结论:** Box-Behnken 效应面法用于复方土茯苓颗粒提取工艺的优选是可行的。

[关键词] 复方土茯苓颗粒; Box-Behnken 效应面法; 落新妇苷; 总黄酮; 出膏率; 提取工艺

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0016-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100016

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000080.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:49

Optimization of Extraction Technology of Compound Smilacis Glabrae Rhizoma Granules by Box-Behnken Response Surface Methodology

LIU Wei^{1,2}, LIU Zhi-gang¹, SUN Wei-feng¹, WU Xin-rong^{1*}

(1. General Hospital of Guangzhou Military Command of People's Liberation Army, Guangzhou 510010, China;
2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of compound Smilacis Glabrae Rhizoma granules. **Method:** With overall desirability (OD) of extraction rate of astilbin and total flavonoids, dry extract yield as dependent variable, Box-Behnken response surface methodology was employed to optimize extraction technology by taking extraction times, extraction time and solid-liquid ratio as independent variables, each level of independent variables was fitted by multiple linear regression and binomial formula fitting. HPLC was adopted to determine the content of astilbin with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (20:80) and detection wavelength at 290 nm. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 3 times with 9.8-fold the amount of water for 1.4 h each time; under these conditions, extraction rates of astilbin and total flavonoids were 1.991 and $54.436 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, dry extract yield was 8.558%, relative deviation between the observed and predicted values was 1.54%. **Conclusion:** Box-Behnken response surface methodology was suitable for optimizing extraction technology of compound Smilacis Glabrae Rhizoma granules.

[Key words] compound Smilacis Glabrae Rhizoma granules; Box-Behnken response surface methodology; astilbin; total flavonoids; dry extract yield; extraction technology

[收稿日期] 20130903(002)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2011A080300004); 广东省科技计划重大专项(2012A08021012); 广州市科技计划项目(2010GN-E00221)

[第一作者] 刘伟, 在读硕士, 从事降尿酸药物研究, Tel:020-88654670, E-mail: xinlinglingdong@gmail.com

[通讯作者] * 吴新荣, 主任药师, 从事药物筛选及机制研究, Tel:020-88653476, E-mail: gzwrxrong@yahoo.com

复方土茯苓颗粒为广州军区广州总医院院内制剂,由土茯苓、牛膝、王不留行、山慈姑、萆薢组成,具有泄浊祛邪、化湿清热的功效,主要用于治疗高尿酸血症、痛风病。本实验采用 Box-Behnken 效应面法优选该复方的提取工艺,为临床安全用药提供参考。

1 材料

2487 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BP211D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),HWS28 型电热恒温水浴锅(上海恒科有限公司),YPT-337 型紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司),PHS-3D 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

土茯苓(产地广西)、牛膝(产地河南)、王不留行(产地安徽)、山慈姑(产地贵州)、萆薢(产地广州)均购于佛山市南海鹏扬药业有限公司,经广东食品药品职业学院中药与生物系颜仁梁老师鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下规定;落新妇苷、芦丁对照品(批号分别为 111798-201102,100080-200707,中国食品药品检定研究院),乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 干膏得率的测定 按处方比例称取土茯苓、牛膝等 5 味药材共 28 g,加一定量水浸泡一段时间,煎煮提取一定时间,得复方土茯苓颗粒提取液,滤过,精密量取滤液 50 mL,置于恒重的坩埚中,浓缩干燥,于 105 °C 恒重,得干浸膏,计算干膏得率。

2.2 落新妇苷的含量测定^[1-2]

2.2.1 色谱条件 AgilentHC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水(20:80),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 290 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取落新妇苷对照品适量,加 60% 甲醇制成 0.021 5 g·L⁻¹ 对照品溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 将提取液离心(3 000 r·min⁻¹,10 min)过滤,加甲醇定容至 100 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以对照品进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 218.04X - 1.090 4$ ($r = 0.999 9$),线性范围 0.043 0 ~ 0.430 4 μg。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,计算落新妇苷峰面积的 RSD 1.01%,说明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,室温放置,分别于 0,2,4,8,12,24 h 进样,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算落新妇苷峰面积的 RSD 1.99%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 按 2.2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算落新妇苷峰面积的 RSD 0.66%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的复方土茯苓颗粒 6 份,分别精密加入 21.5 mg·L⁻¹ 落新妇苷对照品溶液 20 mL,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算落新妇苷平均回收率 101.83%,RSD 2.51%。

2.3 总黄酮的含量测定^[3] 精密称定芦丁对照品适量,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 0.228 g·L⁻¹ 对照品溶液。精密量取对照品溶液 0,1,2,3,4,5,6 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,各加水至 6.0 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加氢氧化钠试液 10 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min,照紫外-可见分光光度法于 500 nm 处测定吸光度(A),以芦丁质量为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $A = 0.231 7X + 0.000 5$ ($r = 0.999$),线性范围 0.228 ~ 1.368 mg。精密量取样品溶液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,按上述方法测定 A,计算总黄酮提取率。

2.4 提取工艺优选^[4-5] 在预试验基础上,选取提取时间、加水量和提取次数为考察因素,根据 Box-Behnken 效应面法设计原理,每因素设 3 个水平,用代码值 -1,0,1 表示,因素水平见表 1。根据药材在处方中君臣关系及药理作用,以落新妇苷、总黄酮提取量和干膏得率的总评“归一值”(OD)为评价指标,根据 Hassan 法对各个指标进行归一化处理^[6]。试验安排及结果见表 2。计算公式为 $d_i = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$, Y_i 为实测值, Y_{max} 和 Y_{min} 系指每个指标在不同次试验中测得值中最大和最小值, $OD = (d_1, d_2, \dots, d_n)^{1/n}$ 。

以 OD 为因变量,使用统计软件 Design Expert 7.0.0 对表 2 中数据进行多元回归拟合,得回归方程 $Y = 0.61 + 0.30X_1 + 0.030X_2 + 0.10X_3$ ($R^2 =$

表 1 复方土茯苓颗粒提取工艺 Box-Behnken 试验因素水平

编码水平	X_1 提取数/次	X_2 提取时间/h	X_3 加水量/倍
-1	1	1.0	8.0
0	2	2.0	10.0
1	3	3.0	12.0

表 2 复方土茯苓颗粒提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	落新妇苷 提取量 (Y_1) /mg·g ⁻¹	总黄酮 提取量 (Y_2) /mg·g ⁻¹	干膏得率 (Y_3) /%	OD (Y)
1	-1	0	-1	0.530	15.299	4.131	0.000
2	-1	1	0	0.589	23.169	5.671	0.137
3	1	0	1	1.847	52.421	8.342	0.902
4	1	1	0	1.893	57.404	8.689	0.977
5	0	0	0	1.831	47.087	8.248	0.846
6	0	0	0	1.830	47.087	8.248	0.846
7	0	-1	1	0.917	22.439	6.433	0.256
8	0	-1	-1	0.734	18.570	7.632	0.203
9	0	1	-1	0.812	28.729	6.421	0.375
10	0	1	1	1.370	37.005	7.104	0.578
11	0	0	0	1.832	47.087	8.248	0.846
12	1	-1	0	1.846	50.747	8.021	0.865
13	-1	0	1	1.103	32.233	8.107	0.516
14	0	0	0	1.824	47.087	8.248	0.846
15	1	0	-1	1.642	51.698	8.368	0.849
16	0	0	0	1.834	47.087	8.248	0.846
17	-1	-1	0	1.276	31.944	6.944	0.499

0.527 9),说明模型拟合度不高,预测性差。二次项拟合回归方程为 $Y = 0.85 + 0.30X_1 + 0.030X_2 + 0.10X_3 + 0.12X_1X_2 - 0.12X_1X_3 + 0.037X_2X_3 - 0.00664X_1^2 - 0.22X_2^2 - 0.27X_3^2$,以 OD 为分析指标进行方差分析,结果见表 3。表明建立的二次项模型具有高度的显著性,模型决定系数 $R^2 = 0.948 5$,表明模型拟合度良好。通过求解回归方程,得最佳提取工艺为加水量 9.8 mL·g⁻¹,提取数 3 次,每次 1.4 h,此时落新妇苷提取量预测值 1.968 mg·g⁻¹,总黄酮提取量预测值 56.095 mg·g⁻¹,干膏得率预测值 8.687%,OD 预测值 0.976 8。

以 OD 为因变量,采用统计软件 SPSS 13.0 对表 2 中 Y_1, Y_2, Y_3 进行多元二次项回归拟合, $Y = -0.36 + 0.341Y_1 + 0.022Y_2 - 0.059Y_3 - 0.012Y_1Y_3 - 0.019Y_1^2 - 0.0012Y_2^2 + 0.008Y_3^2$ ($R^2 = 0.998$),

表 3 总评“归一值”方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.503	9	0.167	14.314	0.001 0
X_1	0.744	1	0.744	63.767	<0.000 1
X_2	7.435×10^{-3}	1	7.435×10^{-3}	0.637	0.450 9
X_3	0.085	1	0.085	7.305	0.030 5
X_1X_2	0.056	1	0.056	4.830	0.063 9
X_1X_3	0.054	1	0.054	4.594	0.069 3
X_2X_3	5.569×10^{-3}	1	5.569×10^{-3}	0.477	0.511 9
X_1^2	1.856×10^{-4}	1	1.856×10^{-4}	0.016	0.903 2
X_2^2	0.204	1	0.204	17.504	0.004 1
X_3^2	0.314	1	0.314	26.881	0.001 3
残差	0.082	7	0.012	14.314	-
失拟项	0.082	3	0.027	63.767	-
误差	0.000	4	0.000	-	-
总离差	1.585	16	-	-	-

表明模型拟合度良好。根据回归方程,对试验结果进行响应面(A)和等高线(B)分析见图 1,结果显示自变量 X_2 和 X_3 的交互作用对提取工艺的影响最大且极显著。

2.5 验证试验 按最佳提取工艺进行 3 次验证试验,结果显示落新妇苷平均提取量 1.991 mg·g⁻¹,RSD 0.93%,与预测值的相对偏差-1.17%;总黄酮平均提取量 54.436 mg·g⁻¹,RSD 1.66%,与预测值相对偏差 2.95%;平均干膏得率 8.558%,RSD 1.01%,与预测值相对偏差 -1.49%;OD 平均值 0.962,RSD 0.13%,与预测值相对偏差 1.54%,说明建立的数学模型可靠,具有良好的预测性。

3 讨论

复方土茯苓颗粒作为院内制剂,本方给予水煎液,临床疗效明显,故提取工艺考察时直接选择水为溶剂,而未考察醇作为溶剂。刘志刚^[7]等通过 HPLC 测定泄浊除痹方(即复方土茯苓颗粒)中落新妇苷的含量,经方法学验证,可用于复方土茯苓颗粒中落新妇苷含量测定和质量控制。臧路平等^[8]通过药效学研究证明总黄酮是治疗高尿酸血症的主要有效部位。大量文献研究^[9-10]选择干膏得率作为复方提取评价指标之一。综合考虑,本文选择落新妇苷、总黄酮提取量和干膏得率为评价指标并进行综合评分。

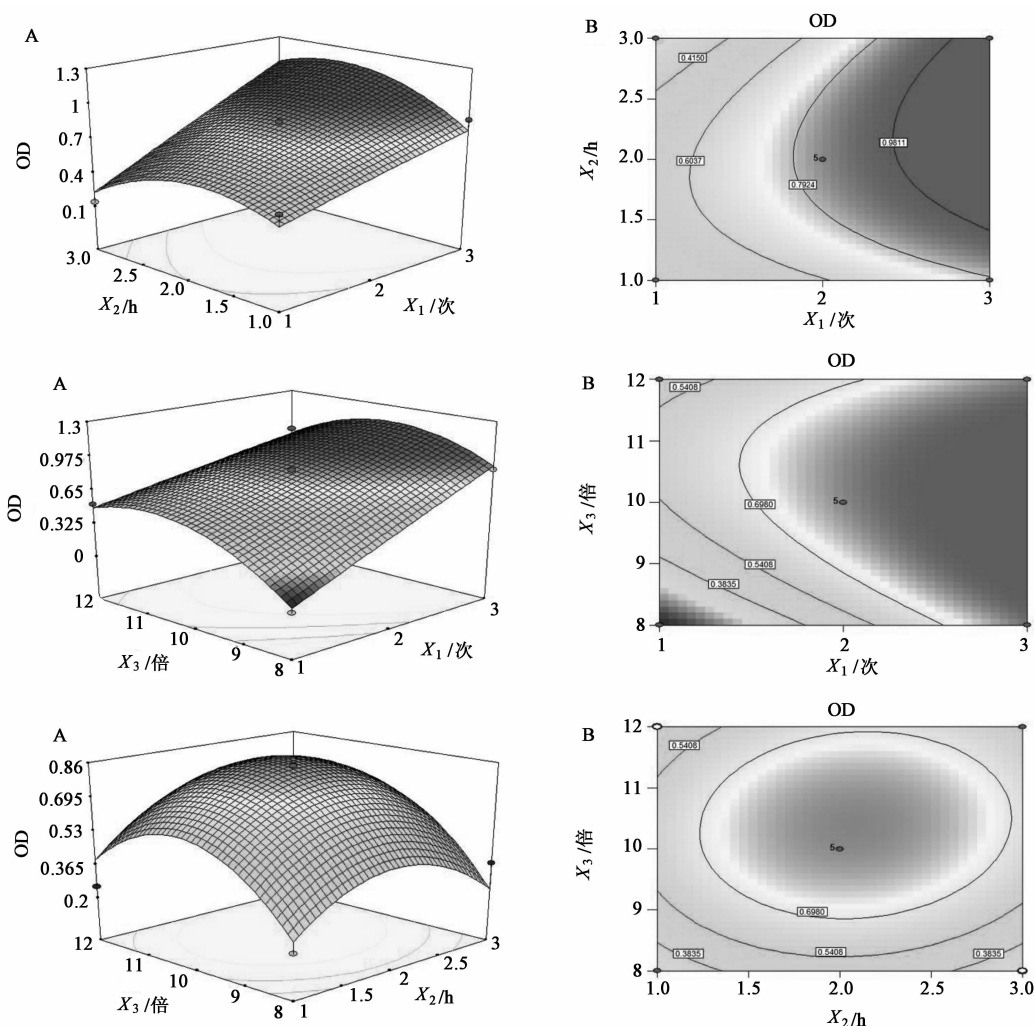


图1 提取时间、加水量和提取次数对总评“归一值”的响应面(A)和等高线(B)

[参考文献]

[1] 吴新荣, 刘志刚, 颜仁梁, 等. 高效液相色谱法同时测定土茯苓中落新妇苷、黄杞苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(10): 886.

[2] 蔡果, 龚春燕, 申国庆. HPLC法同时测定复方土茯苓胶囊中落新妇苷和芦丁的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4486.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 333.

[4] 刘志刚, 邓伟杰, 郑鹏成, 等. 复方土茯苓颗粒提取、醇沉工艺研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1594.

[5] 张霞, 王荣, 王文萃, 等. 复方芸归颗粒制备工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(3): 222.

[6] 刘颖新, 刘利利, 喻祖文, 等. 星点设计-响应面法优化厚朴提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 29.

[7] 刘志刚, 颜仁梁, 孙维峰, 等. HPLC测定泄浊除痹方中落新妇苷含量[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2528.

[8] 臧路平, 刘志刚, 吴新荣. 泄浊除痹方总黄酮体外对尿酸吸收的影响及分子机制探讨[J]. 中药材, 2011, 34(11): 1763.

[9] 林小玲, 田成旺, 张铁军. 星点设计-效应面法优选参芪消岩颗粒渗漉提取工艺[J]. 中草药, 2013, 44(4): 430.

[10] 陶箭飞, 陈立娜, 都述虎. Doehlert设计优化利咽颗粒中水提工艺[J]. 中药材, 2007, 30(11): 1439.

[责任编辑 刘德文]