

Box-Behnken 设计优化石斛清咽含片提取工艺

刘怀伟, 邹俊波, 张廷模, 邹文俊*

(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选石斛清咽含片的提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定石斛酚含量, 检测波长 278 nm, 流动相乙腈(A)-0.5% 甲酸(B) 梯度洗脱(0~20 min, 27% A; 20~30 min, 27%~40% A; 30~45 min, 40%~65% A; 45~50 min, 65%~27% A)。以石斛酚提取量和干膏率的综合评分为指标, 在单因素试验基础上, 通过 Box-Behnken 试验考察提取时间、料液比、浸泡时间对提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 11 倍量水浸泡 35 min, 提取 3 次, 每次 1 h; 石斛酚提取量 $0.1896 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 干膏得率 41.27%。结论: 通过 Box-Behnken 效应面法及总评“归一值”为评价系统优选的提取工艺合理可行, 为石斛清咽含片的应用提供参考。

[关键词] 石斛清咽含片; Box-Behnken 设计; 总评“归一值”; 桔梗; 叠鞘石斛; 石斛酚

[中图分类号] R283.6; R284.2; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0017-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014210017

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1119.011.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:19

Optimization of Extraction Technology of Shihu Qingyan Lozenges by Box-Behnken Design-response Surface Methodology

LIU Huai-wei, ZOU Jun-bo, ZHANG Ting-mo, ZOU Wen-jun*

(Chinese Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Shihu Qingyan lozenges by Box-Behnken design-response surface methodology. **Method:** HPLC was employed to determine the content of dendrophnol with detection wavelength at 278 nm and mobile phase of acetonitrile (A) -0.5% formic acid (B) for gradient elution (0-20 min, 27% A; 20-30 min, 27%-40% A; 30-45 min, 40%-65% A; 45-50 min, 65%-27% A). On the basis of single factor tests, a three-factor and three-level Box-Behnken experimental design was employed to investigate effects of extraction time, solid-liquid ratio and soaking time on composite score of extracting amount of dendrophnol and dry extract rate. **Result:** Optimum process conditions were as follows: soaked 35 min with 11 times the amount of water, extracted thrice for 1 h each time; extracting amount of dendrophnol was $0.1896 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and dry extract rate was 41.27%. **Conclusion:** This optimized extraction technology is practical and rational by Box-Behnken design-response surface methodology and overall desirability, it provides a reference for application of Shihu Qingyan lozenges.

[Key words] Shihu Qingyan lozenges; Box-Behnken design; overall desirability; Platycodonis Radix; *Dendrobium aurantiacum*; dendrophnol

慢性咽炎为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症,为上呼吸道慢性炎症的一部分^[1]。该病的

[收稿日期] 20140617(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011BAI13B02-8)

[第一作者] 刘怀伟,在读硕士,从事临床中药学研究, Tel:028-62508212, E-mail:liuhuaiwei0616@126.com

[通讯作者] * 邹文俊,教授,硕士生导师,从事临床中药学研究, Tel:028-85403728, E-mail:zouwenjun@163.com

治疗现代医学常采用抗生素类药物,或辅以复方硼砂溶液、呋喃西林漱口液等,但难以根治,容易反复,故近年来人们更多地寻求中医药治疗本病。由叠鞘石斛、麦冬、桔梗、甘草组成的石斛清咽含片,是以《伤寒论》中甘桔汤为基础,增加养阴清热、生津利咽的石斛、麦冬,使养阴清热、利咽之力更佳,适用于慢性阴虚喉痹之咽喉不利者,亦可用于急性咽炎及辛辣厚味食物刺激、言语过度等因素引起的咽部不适者。石斛作为方中君药,具有益胃生津、滋阴清热之功效,用于治疗热病伤津、口干烦渴、病后虚热、目暗不明等证^[2]。叠鞘石斛 [*Dendrobium aurantiacum* Rehb. f. var. *denneanum* (Kerr.) Z. H. Tsi] 为兰科石斛属植物,是中药石斛的来源之一,现代药理学研究表明叠鞘石斛具有抗肿瘤、增强人体免疫力、降血糖、抗氧化、抗衰老等作用^[3-4]。故本产品以叠鞘石斛为原料,有利于对野生石斛资源的保护和新品种的开发。文献报道叠鞘石斛中含有石斛属植物特征性成分——石斛酚^[5],故本实验以石斛酚提取量和干膏率为综合评价指标,采用 Box-Behnken 设计优选石斛清咽含片的提取工艺,以保证该产品更好地发挥临床疗效。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), BT25S 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。叠鞘石斛购于四川万安石斛产业开发有限公司,麦冬 [*Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl.]、桔梗 [*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.]、甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 均购于四川泸州百草堂中药饮片有限公司,经成都中医药大学张廷模教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》及 2010 年版《四川省药材标准》相关项下规定;石斛酚对照品(批号 130916,成都克洛玛生物科技有限公司),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

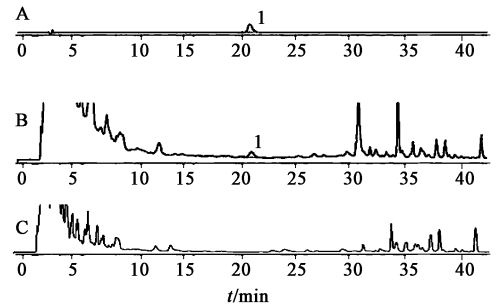
2 方法与结果

2.1 干膏率的测定 按处方比例称取叠鞘石斛、麦冬等 4 味饮片共 20 g,加一定量水浸泡一段时间,煎煮提取一定时间,滤过,合并滤液,减压浓缩至料液比 1:1。精密量取浓缩液适量,置已恒定质量的蒸发皿中,按《中国药典》2010 年版一部附录 IXG 干燥失重测定法测定,计算干膏率。

2.2 石斛酚含量测定^[6-7]

2.2.1 色谱条件 Chromsil ODS2-C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),二极管阵列检测器(DAD),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长

278 nm,进样量 20 μL,流动相乙腈(A)-0.5% 甲酸(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 27% A; 20 ~ 30 min, 27% ~ 40% A; 30 ~ 45 min, 40% ~ 65% A; 45 ~ 50 min, 65% ~ 27% A),见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 石斛酚

图 1 石斛清咽含片提取液 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取石斛酚 8.54 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,精密量取 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 2.1 项下浓缩液,加无水乙醇至体积分数 95%,使醇沉完全。滤过,弃去沉淀,取一定量上清液挥干,用甲醇溶于 10 mL 量瓶中,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 阴性样品溶液配制 除去叠鞘石斛,按处方比例称取其他饮片适量,加一定量水煎煮一定时间,滤过,合并滤液,减压浓缩至料液比 1:1,按 2.2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.5 线性关系考察 精密量取石斛酚对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 15 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得线性回归方程 $Y = 50.623X - 3.131$ ($r = 1$),表明石斛酚在 0.136 6 ~ 1.025 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.6 精密度试验 精密吸取石斛酚对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,石斛酚峰面积的 RSD 0.8%,表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批样品,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样,计算石斛酚含量的 RSD 0.36%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算石斛酚峰面积的 RSD 0.73%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 回收率试验 精密量取 9 份已知石斛酚含

量的提取液 200 mL,等分为 3 组,分别加入 341.6 mg·L⁻¹ 石斛酚对照品储备液 0.45,0.56,0.67 mL,制备低、中、高质量浓度样品,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,计算回收率,见表 1,表明该方法稳定可靠。

表 1 石斛清咽含片中石斛酚含量测定加样回收率试验

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.192	0.154	0.318	94.16		
0.193	0.154	0.361	103.20		
0.192	0.154	0.340	96.10		
0.193	0.191	0.319	93.72		
0.192	0.191	0.311	92.67	97.52	4.9
0.193	0.191	0.364	99.89		
0.191	0.229	0.440	103.90		
0.190	0.229	0.380	91.70		
0.192	0.229	0.426	102.20		

2.3 单因素试验考察 以石斛酚提取量为评价指标,按 2.1 项下方法提取得浓缩液,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。

2.3.1 提取时间 固定料液比 1:10,提取数 1 次,结果提取时间 0.5,1,1.5,2,2.5 h 时,石斛酚提取量分别为 0.058,0.151,0.110,0.077,0.047 mg。表明在 0.5~1 h 内随提取时间的增加石斛酚提取量增加,说明石斛酚需要一定时间才能浸出完全;1 h 后提取时间增加,石斛酚含量开始减少,原因可能是复方中化学成分间的相互作用,也可能是石斛酚化学稳定性导致的。

2.3.2 料液比 固定提取数 1 次,提取时间 1 h,结果料液比为 1:6,1:8,1:10,1:12,1:14 时石斛酚提取量分别为 0.197,0.290,0.516,0.469,0.450 mg。表明当料液比为 1:6~1:10 时,石斛酚含量不断增加,之后增加加水量,石斛酚含量已不再增加。

2.3.3 浸泡时间 固定料液比 1:10,提取数 1 次,提取时间 1 h,结果浸泡时间为 20,30,40,60 min 时石斛酚提取量分别为 0.250,0.613,0.600,0.507 mg。表明浸泡 20~30 min 时,石斛酚浸出量不断增加;浸泡 40~60 min,石斛酚浸出量增加不明显。

2.3.4 提取次数 固定料液比 1:10,提取时间 1 h,结果提取数 1,2,3,4 次时,石斛酚提取量分别为 0.052,0.120,0.192,0.181 mg,说明提取 3 次已基本提取完全。

2.4 Box-Behnken 效应面法优选

2.4.1 模型建立及显著性检验 在单因素试验基

础上,选取提取时间、料液比和浸泡时间为考察因素,由于提取次数为非连续变量,3 次能基本提取完全,故将提取次数确定为 3 次。以石斛酚提取量和干膏率的总评“归一值”(overall desirability, OD)为评价指标,根据 Hassan 法对各个指标进行均一化处理^[8-9],计算公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$,式中 Y_i 为实测值, Y_{\min} 和 Y_{\max} 系指每一指标在不同次试验中测得的最小值和最大值, $A = (d_1 \times d_2 \cdots \times d_k)^{1/k}$, k 为指标数。试验安排及结果见表 2。

表 2 石斛清咽含片提取工艺 Box-Behnken 试验设计与响应值

No.	X_1 提取 时间 /h	X_2 料液比 /倍	X_3 浸泡 时间 /min	石斛酚 /mg	干膏率 /%	A
1	1.0	8	20	0.165	42.30	0.039
2	1.5	8	40	0.412	45.70	0.349
3	1.0	11	40	0.379	43.20	0.262
4	1.0	11	40	0.338	45.00	0.279
5	1.0	11	40	0.254	45.70	0.213
6	1.0	8	60	0.161	44.00	0.026
7	0.5	11	60	0.290	39.50	0.092
8	1.5	14	40	0.474	48.50	0.458
9	1.0	11	40	0.243	46.10	0.207
10	0.5	14	40	0.289	41.20	0.154
11	1.0	14	60	0.191	43.50	0.104
12	1.5	11	20	0.238	47.40	0.217
13	1.0	14	20	0.273	42.70	0.178
14	0.5	11	20	0.159	40.40	0
15	1.0	11	40	0.207	43.70	0.129
16	0.5	8	40	0.179	38.50	0
17	1.5	11	60	0.161	46.90	0.035

以 A 为因变量,利用 Design Expert V8.0.6 软件对各因素进行二次多元回归拟合,得拟合模型方程 $Y = -1.001 + 0.474X_1 + 9.124 \times 10^{-3} X_2 + 0.037X_3 - 7.550 \times 10^{-3} X_1X_2 - 6.858 \times 10^{-3} X_1X_3 - 2.563 \times 10^{-4} X_2X_3 + 0.043X_1^2 + 1.303 \times 10^{-3} X_2^2 - 3.570 \times 10^{-4} X_3^2$ ($R^2 = 0.8323$, $P < 0.05$),说明该方程拟合效果较好,模型方程显著,失拟度无显著性差异 ($P = 0.1612$),说明该方程能充分反映实际情况。

2.4.2 效应面法分析 依据二次多项式模型方程拟合结果,作出 A 的效应曲面图及等高线见图 2。结果显示 X_1 和 X_2 交互作用微弱, X_3 和 X_1, X_2 间均具有一定的交互作用,得回归模型的最大值点,即 $X_1 = 0.95$ h, $X_2 = 11$ 倍, $X_3 = 38.92$ min,考虑到试验操作的科学性,确定最佳提取工艺为提取时间 1 h,

料液比 1:11, 浸泡时间 35 min。

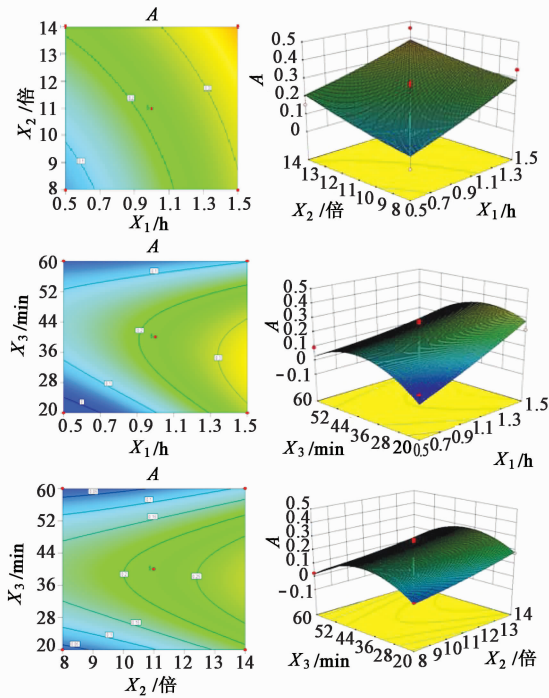


图 2 提取时间、料液比、浸泡时间对石斛清咽含片提取工艺的等高线和响应面

2.4.3 验证试验 按处方比例称取叠鞘石斛、麦冬等 4 味饮片共 20 g, 共 3 份, 按优选的工艺条件进行验证试验, 按 2.1 和 2.2.1 项下方法分别测定, 结果 A 分别为 0.253 8, 0.276 9, 0.274 5, 与 A 预测值 0.297 5 偏差分别为 3.09%, 1.46%, 1.62%, 表明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

本配方由叠鞘石斛、麦冬、桔梗、甘草等组成, 完全基于中医经方和临床经验方, 具有较好的实践基础, 符合中医药理论对咽炎病因病机、治法和组方用药的要求。配方中石斛为产自四川夹江县麻柳乡仿野生种植的叠鞘石斛, 该品种为 2013 年版《江苏省药材标准》收录品种, 《四川省药材标准》2010 年版也予以增列。目前野生石斛国内已极度濒危, 2010 年版《中国药典》将石斛的基源植物重新定义为“栽培品及其同属植物近似种”^[2]。本产品以四川道地药材叠鞘石斛为主要原料, 体现了对野生资源保护和中药的可持续发展, 同时又拥有叠鞘石斛的规范仿野生种植基地, 可保证原料质量。

本文选择石斛酚含量为评价指标之一, 采用 HPLC 测定, 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.4% 磷酸、乙腈-0.4% 磷酸、乙腈-0.5% 甲酸共 5 个流动相系统, 最终以乙腈-0.5% 甲酸作为流动相时色谱峰

的分离度较好且基线平稳, 有利于特征峰的分析。

在试验设计中, 对于多指标的处理方法常采用打分制的综合评分法, 但该权重值的确定存在主观性。而 A 能使所有指标均能量化体现, 客观地综合所有指标, 使多指标模型具有更好的预测性^[9]。Box-Behnken 设计常用于分析在非线性影响条件下因素与指标间的关系^[10], 与基于线性模型设计的正交试验及均匀设计相比, 该方法能同时进行线性、各因素的交互作用、二次多项式或更高次项的模型拟合, 所得结果更加直观, 便于分析, 同时提高了试验精确度^[11-13]。

【参考文献】

- [1] 刘惠如. 中西医综合护理对慢性咽炎临床效果的研究[J]. 中外医学研究, 2014, 12(2): 90.
- [2] 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: 85.
- [3] 贾芳, 夏厚林, 黄萍, 等. 叠鞘石斛联苕类化合物的大孔树脂纯化工艺优选及抗氧化活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 25.
- [4] 戴一, 孙隆儒. 植物中联苕类化合物研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(11): 1753.
- [5] 杨莉, 谷丽华, 栾洁, 等. 叠鞘石斛中联苕类成分的定性定量分析[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(21): 1620.
- [6] 杨莉, 张光浓, 王峥涛, 等. HPLC 测定不同采收期球花石斛中酚类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 1.
- [7] 周婧, 许志良, 孔宏伟, 等. 不同石斛枫斗中酚酸类活性成分的比较及杓唇石斛素和石斛酚含量的测定[J]. 色谱, 2010, 28(6): 567.
- [8] 叶陈丽, 贺帅, 康迎波, 等. Box-Behnken 效应面法优化金翘热毒清复方中绿原酸和连翘酯苷 A 的提取工艺[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(7): 543.
- [9] 滕亮, 马桂芝, 孙殿甲, 等. 采用三种综合指标量化法优选三越麻黄颗粒的处方[J]. 中成药, 2009, 31(5): 707.
- [10] 曾锐, 任桂友, 王爽, 等. Box-Behnken 设计及正交设计优选复方龙砂颗粒提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(5): 1091.
- [11] 沈秀娟, 周倩, 孙立立, 等. Box-Behnken 设计效应面法优选黄芪切片工艺[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(13): 2498.
- [12] 刘泽玉, 苏柘僮, 杨明, 等. 联用 Plackett-Burman 与 Box-Behnken 设计控制青黛制备过程中靛玉红的生成[J]. 中国药学杂志, 2010, 35(19): 2551.
- [13] 邹俊波. 养血逐瘀胶囊的药学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[责任编辑 刘德文]