

Box-Behnken 设计-效应面法 优化荆防止痒颗粒中挥发油提取工艺

郭宜城, 谭志江, 丁志军, 肖丽丽, 罗美兰*
(江西省皮肤病专科医院, 南昌 330001)

[摘要] 目的: 优化荆防止痒颗粒中挥发油的提取工艺, 为该制剂的临床应用提供参考。方法: 采用 HPLC 测定胡薄荷酮的含量, 流动相甲醇-水(80:20), 检测波长 252 nm。以挥发油提取量和挥发油中胡薄荷酮含量为指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法考察浸泡时间、提取时间及液料比对荆防止痒颗粒中挥发油提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为浸泡时间 2 h, 提取时间 6.5 h, 料液比 9 mL·g⁻¹。挥发油提取量 0.69 mL, 胡薄荷酮质量浓度 38.17 g·L⁻¹, 与预测值的偏差较小。结论: 优选的提取工艺合理可行, 可有效保留荆防止痒颗粒中挥发性成分。

[关键词] 荆防止痒颗粒; 挥发油; 胡薄荷酮; 防风; 荆芥

[中图分类号] R283.6; R284.2; R944.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0032-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110032

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150414.1122.005.html>

[网络出版时间] 2015-04-14 11:22

Optimization of Extraction Process of Volatile Oil from Jingfang Zhiyang Granules by Box-Behnken Design Response Surface Methodology GUO Yi-cheng, TAN Zhi-jiang, DING Zhi-jun, XIAO Li-li, LUO Mei-lan*
(Jiangxi Province Dermatitis Special Hospital, Nanchang 330001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of volatile oil from Jingfang Zhiyang granules. **Method:** HPLC was employed to determine the content of pulegone with mobile phase of methanol-water and detection wavelength at 252 nm. Taking yield of volatile oil and the content of pulegone as indexes, Box-Behnken design-response surface methodology was adopted to optimize extraction process of volatile oil with soaking time, extraction time and solid-to-liquid ratio as factors. **Result:** Optimum extraction process was as follows: soaked 2 h and extracted 6.5 h with 9 times the amount of water. Yield of volatile oil was 0.69 mL with the content of pulegone was 38.17 g·L⁻¹, these values were similar to their predictive values. **Conclusion:** This optimized extraction process is reasonable and feasible, which can effectively retain volatile ingredients in Jingfang Zhiyang granules.

[Key words] Jingfang Zhiyang granules; volatile oil; pulegone; Saposhnikovia Radix; Schizonepetae Herba

荆防止痒颗粒为自主研发的医院制剂, 拥有自主知识产权(专利号 ZL200410033921.4)^[1], 由荆芥、防风、蝉蜕、白鲜皮、苦参、甘草、地黄等 13 味中药组成, 功效疏风养血、清热除湿。临床主要用于治疗湿疹、瘙痒等风热或湿热之皮肤病, 临床疗效较好。现代药理研究表明该方对豚鼠亚急性接触性湿

疹有明显抑制作用^[2]。方中荆芥和防风为传统中药药对, 二者作为君药, 功效发散风寒、祛风止痒^[3], 二者均富含挥发油类成分^[4-5]。荆防挥发油具有抗炎、抗过敏和抗病毒等药理作用^[6]。单味药材中挥发油的提取工艺研究报道较多, 主要提取方法包括水蒸气蒸馏法、微波法和超声法等^[7-9], 而关

[收稿日期] 20140903(024)

[基金项目] 江西省科技计划项目(赣科发计字[2007]189号)

[第一作者] 郭宜城, 硕士, 初级药师, 从事天然活性成分研究, Tel:15879034804, E-mail:guoyicheng2013@163.com

[通讯作者] *罗美兰, 副主任药师, 从事医院制剂方面研究, Tel:0791-85210774, E-mail:1433658399@qq.com

于中药复方中挥发油的提取工艺研究报道较少^[10]。荆防止痒颗粒生产工艺中挥发油的提取对制剂疗效起着关键作用。本实验采用 Box-Behnken 效应面法优选荆防止痒颗粒中荆芥和防风挥发油的提取工艺,以最大程度地保留方中药效成分,为该制剂的工业化生产提供参考。

1 材料

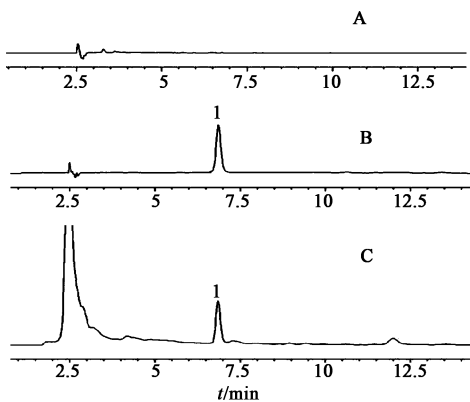
1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AL204 型电子天平(振源厦门工业有限公司),FZ102 型粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司)。荆芥、防风(安徽致和堂药业有限公司,经江西省皮肤病专科医院副主任药师罗美兰鉴定分别为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* 的干燥茎及伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的干燥根),胡薄荷酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111706-201203,纯度 > 98%),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 挥发油的提取 将荆芥、防风分别粉碎过 24 目筛,根据方中 2 种药材比例精密称定荆芥及防风粉末各 52 g,混合,置于圆底烧瓶中,加适量水浸泡一定时间,根据 2010 年版《中国药典》一部附录 X D 挥发油测定甲法提取挥发油至规定时间,读取挥发油体积。

2.2 胡薄荷酮的含量测定^[11]

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(80:20),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 252 nm,柱温室温,进样量 20 μL,见图 1。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 胡薄荷酮

图 1 荆防止痒颗粒中挥发油 HPLC

Fig. 1 HPLC of volatile oil from Jingfang Zhiyang granules

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取胡薄荷酮对

照品 11.24 mg,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液制备 精密量取挥发油 1.0 mL 置于分液漏斗中,加入甲醇 10 mL,充分震荡,分取甲醇层。精密量取萃取液 1.0 mL,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得。

2.2.4 标准曲线的建立 精密量取胡薄荷酮对照品溶液适量,加甲醇按不同比例稀释,得系列对照品溶液。按 2.2.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得线性方程 $Y = 29.006X - 17.472$ ($r = 0.9999$),线性范围 5.62 ~ 112.4 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 精密吸取 22.48 mg·L⁻¹ 胡薄荷酮对照品溶液,按 2.2.1 项下条件重复测定 6 次,计算峰面积的 RSD 1.1%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样,按 2.2.1 项下条件测定,计算峰面积的 RSD 1.3%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密称量已知胡薄荷酮含量的挥发油共 6 份,各精密加入胡薄荷酮对照品 11.24 mg,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,计算平均回收率 97.80%,RSD 1.5%,表明该方法准确可靠。

2.3 挥发油提取工艺优选^[12] 在预试验基础上,选取浸泡时间、提取时间及液料比为考察因素,以挥发油提取量和胡薄荷酮质量浓度为指标,按三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计方案,取荆芥及防风粗粉各 52 g,共 17 份,进行挥发油提取,试验安排及结果见表 1。

采用 Design-Expert 8.0.5 软件对试验数据进行拟合分析,得二次多元回归方程分别为 $Y_1 = 0.67 + 0.029A + 0.053B + 0.11C - 0.008AB - 0.005AC + 0.003BC - 0.071A^2 - 0.038B^2 - 0.051C^2$ ($R^2 = 0.9848$, 校正 $R^2 = 0.9654$, $P < 0.0001$), $Y_2 = 39.31 + 0.70A + 3.22B + 3.19C - 0.45AB - 0.61AC - 1.15BC - 6.36A^2 - 10.85B^2 - 12.93C^2$ ($R^2 = 0.9979$, 校正 $R^2 = 0.9952$, $P < 0.0001$),说明这两个模型拟合程度良好,可对挥发油提取工艺进行分析与预测,各指标回归系数的显著性检验见表 2,3。结果显示模型 Y_1 中各因素的一次项、二次项都达到显著水平,交互项则均不显著。模型 Y_2 中各因素的一次项、二次项和交互项 BC 都达到了显著水平,其他项则不显著。删除对指标无显著性影响的项,得二项式方程 $Y_1 = 0.67 + 0.029A + 0.053B + 0.11C -$

$0.071A^2 - 0.038B^2 - 0.051C^2$ ($R^2 = 0.9848$, 校正 $R^2 = 0.9654$, $P < 0.0001$), $Y_2 = 39.31 + 0.70A + 3.22B + 3.19C - 1.15BC - 6.36A^2 - 10.85B^2 - 12.93C^2$ ($R^2 = 0.9979$, 校正 $R^2 = 0.9952$, $P < 0.0001$)。

表 1 荆防止痒颗粒中挥发油提取工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 1 Box-Behnken analysis of extraction process of volatile oil from Jingfang Zhiyang granules

No.	A 浸泡 时间/h	B 提取 时间/h	C 液料比 /mL·g ⁻¹	挥发油 (Y ₁)/mL	胡薄荷酮 (Y ₂)/g·L ⁻¹
1	1	4	8	0.47	17.45
2	3	4	8	0.54	19.38
3	1	8	8	0.59	25.73
4	3	8	8	0.63	25.86
5	1	6	6	0.41	15.66
6	3	6	6	0.48	18.67
7	1	6	10	0.62	22.59
8	3	6	10	0.67	23.16
9	2	4	6	0.41	8.09
10	2	8	6	0.51	15.91
11	2	4	10	0.64	17.45
12	2	8	10	0.75	20.66
13	2	6	8	0.64	39.59
14	2	6	8	0.66	39.27
15	2	6	8	0.67	39.72
16	2	6	8	0.70	38.69
17	2	6	8	0.66	39.27

表 2 挥发油提取量二项式回归模型系数显著性检验

Table 2 Significance test of second order regression model coefficients of yield of volatile oil

方差来源	f	SS	MS	F	P
模型	9	0.17	0.02	50.56	<0.0001
A	1	6.61 × 10 ⁻³	6.61 × 10 ⁻³	18.19	0.0037
B	1	0.02	0.02	60.65	0.0001
C	1	0.10	0.10	260.23	<0.0001
AB	1	2.25 × 10 ⁻⁴	2.25 × 10 ⁻⁴	0.62	0.4573
AC	1	0.0001	0.0001	0.28	0.6162
BC	1	0.25 × 10 ⁻⁴	0.25 × 10 ⁻⁴	0.07	0.8007
A ²	1	0.02	0.02	57.56	0.0001
B ²	1	6.08 × 10 ⁻³	6.08 × 10 ⁻³	16.72	0.0046
C ²	1	0.01	0.01	29.53	0.0010
残差	7	2.55 × 10 ⁻³	3.64 × 10 ⁻⁴		
失拟检验	3	6.25 × 10 ⁻⁴	2.08 × 10 ⁻⁴	0.43	0.7406
纯误差	4	1.92 × 10 ⁻³	0.48 × 10 ⁻³		
总误差	16	0.17			

表 3 胡薄荷酮质量浓度二项式回归模型系数显著性检验

Table 3 Significance test of second order regression model coefficients of the content of pulegone

方差来源	f	SS	MS	F	P
模型	9	1 691.16	187.91	368.81	<0.0001
A	1	3.98	3.98	7.80	0.0268
B	1	83.14	83.14	163.18	<0.0001
C	1	81.47	81.47	159.91	<0.0001
AB	1	0.81	0.81	1.59	0.2478
AC	1	1.49	1.49	2.92	0.1312
BC	1	5.31	5.31	10.43	0.0145
A ²	1	170.06	170.06	333.78	<0.0001
B ²	1	495.47	495.47	972.46	<0.0001
C ²	1	704.24	704.24	1 382.21	<0.0001
残差	7	3.57	0.51		
失拟检验	3	2.93	0.98	6.17	0.0556
纯误差	4	0.63	0.16		
总误差	16	1 694.73			

采用 Design-Expert 8.0.5 软件绘制效应曲面图,见图 2。结果表明挥发油提取量与各因素都呈非线性正相关,且均呈现先快后慢的趋势;胡薄荷酮含量随各因素的增加而先增后降。按 Y₁ 和 Y₂ 最大值设定目标,得最佳工艺条件为浸泡时间 2.1 h,提取时间 6.54 h,液料比 8.76 mL·g⁻¹。结合实际操作及生产要求,将最佳工艺参数修正为浸泡时间 2 h,提取时间 6.5 h,液料比 9 mL·g⁻¹。取荆芥和防风粗粉各 52 g,依据该工艺进行 3 次重复试验。模型对 Y₁, Y₂ 的预测值分别为 0.71 mL 和 38.56 g·L⁻¹。实测值分别为 (0.69 ± 0.04) mL 和 (38.17 ± 0.29) g·L⁻¹,表明该模型的预测性良好,优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

课题组前期考察了荆防止痒颗粒的水提工艺^[13],但方中君药荆芥和防风需提取挥发油入药。而传统的水提法是将全部药材一起水提,会造成挥发油成分的损失,影响药效。荆芥和防风单味药材的挥发油提取工艺已有报道^[14-15],本文采用将荆芥和防风中挥发油共同提取的方法,优化 2 味药材的提取工艺,能较大幅度地保证该制剂中挥发油的含量,选择胡薄荷酮为指标,以评价挥发油中有效成分的含量。结果表明将荆芥和防风同时提取时,浸泡时间、提取时间和液料比对总挥发油提取量及挥发油中胡薄荷酮的含量均有显著影响,随着浸泡时间和提取时间的延长及液料比的增加,挥发油提取量增加,而胡薄荷酮的含量先增后减。

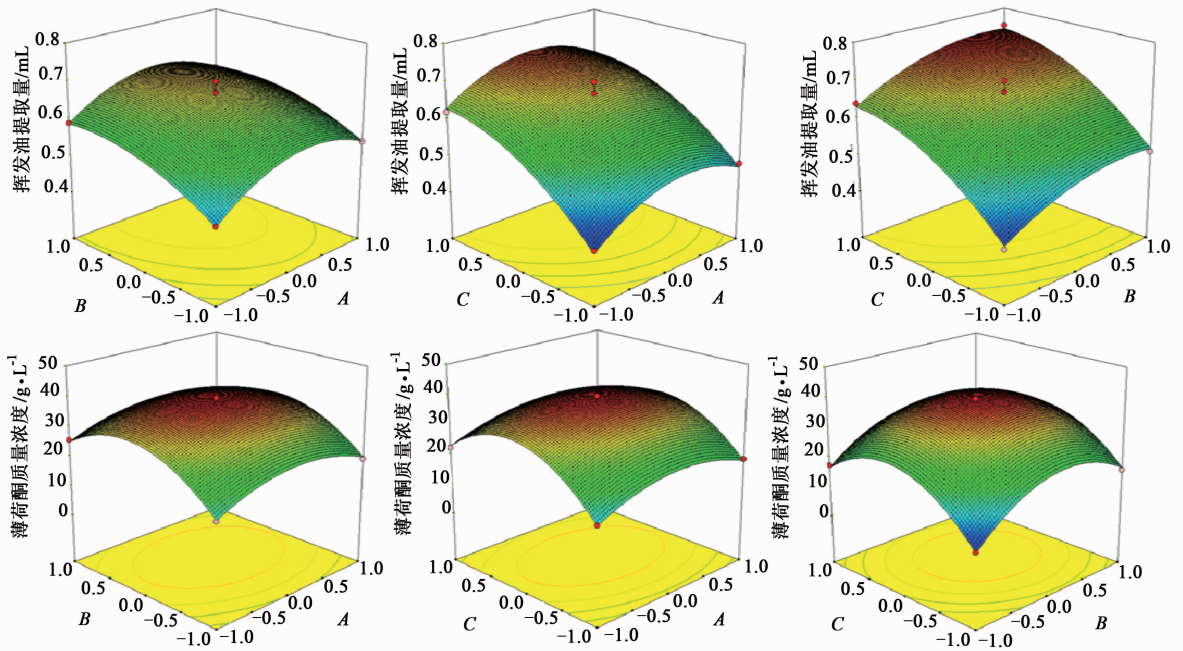


图 2 浸泡时间、提取时间及液料比对荆防止痒颗粒中挥发油提取工艺影响的三维效应曲面

Fig. 2 3D respond surface plots of soaking time,extraction time,solid-to-liquid ratio and their mutual interactions on extraction process of volatile oil from Jingfang Zhiyang granules

这可能是因为 3 个因素增加到一定程度,荆芥中胡薄荷酮提取趋于完全,不再增加,而挥发油提取量还在增加,导致胡薄荷酮含量下降。

[参考文献]

[1] 邵丹. 一种治疗皮肤病的中药制剂: 中国, ZL200410033921. 4[P]. 2005-01-12.
[2] 杜铁良, 赵自明, 陈玉兴, 等. 荆防止痒颗粒对豚鼠急性接触性湿疹的影响[J]. 中成药, 2011, 33(4): 685-687.
[3] 李晓如, 邹桥, 周涛, 等. 药对荆芥-防风挥发油成分的分析[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(18): 1373-1376.
[4] 蔡双飞, 程康华, 令狐荣钢. 荆芥挥发油的超临界 CO₂ 萃取分离及 GC-MS 分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(5): 25-28.
[5] 梁巨艳, 覃洁萍, 陈玉萍, 等. 不同产地防风挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 80-83.
[6] 刘晓帅, 曾南, 赵璐, 等. 荆防散抗炎、抗过敏作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 158-160.
[7] 马斌. 微波辅助提取植物中挥发油的方法研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2010.

[8] 李超, 杨日福, 傅雪峰, 等. 超声强化超临界 CO₂ 萃取复方丁香肉桂挥发油术[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2008, 36(7): 67-70.
[9] 柳俊, 张建军. Box-Behnken 效应面法优化白芍配方颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 9-13.
[10] 谢予朋, 李平华, 闫荟, 等. 正交试验优选超临界 CO₂ 流体法萃取藿香正气方中挥发油的工艺[J]. 中国药房, 2008, 19(27): 2111-2112.
[11] 杨建平, 包贝华, 张丽, 等. 荆芥饮片中胡薄荷酮的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 669-670.
[12] 许海燕, 郑伶俐, 多本加, 等. 响应面法优化秦岭龙胆有效成分的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 31-34.
[13] 廖银根, 丁志军, 罗美兰, 等. 正交试验优选荆防止痒颗粒提取工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(39): 3673-3675.
[14] 蔡双飞. 荆芥挥发油的提取研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
[15] 钟才宁, 陈永辉, 杨再波, 等. 防风挥发油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(16): 6795-6796.

[责任编辑 刘德文]