

响应面法优选清喉利咽口含片的提取工艺

王远¹, 陈良², 刘志雯¹, 虞慧贇², 姜林^{2*}

(1. 新疆医科大学 研究生学院, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学 附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:优化院内制剂清喉利咽口含片的提取工艺。方法:在预试验基础上,以绿原酸、总黄酮(木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芦丁、甘草苷)质量浓度的综合评分为因变量,浸泡时间、加水量、提取时间为自变量,采用响应面法优选清喉利咽口含片的提取工艺。采用 HPLC 测定绿原酸和总黄酮(木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芦丁、甘草苷)的含量,流动相乙腈(A)-0.5%磷酸水(B)梯度洗脱(0~12 min,9% A;12~15 min,9%~15% A;15~40 min,15%~45% A;40~50 min,45%~15% A;50~80 min,15% A),绿原酸和黄酮类成分的检测波长分别为 327,256 nm。结果:最佳提取工艺条件为浸泡时间 89 min,液料比 15.3:1,提取时间 136 min,提取数 2 次。绿原酸、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芦丁、甘草苷平均质量浓度分别为 1 843.537,184.845,93.939,48.898 mg·L⁻¹。结论:建立的数学模型预测性好、稳定可行,可作为清喉利咽口含片的中试生产工艺。

[关键词] 清喉利咽口含片; 绿原酸; 总黄酮; 木犀草素-7-O-葡萄糖苷; 芦丁; 甘草苷; 综合评分

[中图分类号] R283.6;R284.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0020-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040020

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151229.1126.008.html>

[网络出版时间] 2015-12-29 11:26

Optimization of Extraction Process of Qinghou Liyan Buccal Tablets by Response Surface Methodology

WANG Yuan¹, CHEN Liang², LIU Zhi-wen¹, YU Hui-yun², JIANG Lin^{2*}

(1. Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Immediate Hospital, Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Qinghou Liyan buccal tablets, and provide references for its pilot production. **Method:** Based on pre-experiments, effects of soaking time, solvent dosage and extracting time on overall desirability of contents of chlorogenic acid and totale flavonoids (included rutin, liquiritin and luteolin-7-O-glucoside) were investigated and forecasted by response surface methodology. HPLC was used to determine contents of chlorogenic acid and three flavonoids with mobile phase of acetonitrile-0.5% phosphoric acid for gradient elution and detection wavelenghtes of 327 nm and 256 nm. **Result:** Optimal extraction process was as following: soaked 89 minutes and extracted twice with 15.3 times the amount of water for per time of 136 minutes. Concentrations of chlorogenic acid, luteolin-7-O-glucoside, rutin and liquiritin were 1 843.537, 184.845, 93.939, 48.898 mg·L⁻¹. **Conclusion:** This optimized extraction technology is stable and feasible with well prediction, it provides references for pilot production of Qinghou Liyan buccal tablets.

[Key words] Qinghou Liyan buccal tablets; chlorogenic acid; total flavonoids; luteolin-7-O-glucoside; rutin; liquiritin; comprehensive score

中医认为慢性咽炎病因病机常为脏腑虚损、阴分耗伤、虚火上炎于咽喉而致^[1-3]。清喉利咽口含

[收稿日期] 20150701(015)

[第一作者] 王远,在读硕士,从事中药新制剂技术研究,Tel:18116809071,E-mail:295669812@qq.com

[通讯作者] *姜林,硕士,主任药师,教授,硕士生导师,从事中药炮制与中药制剂研究,Tel:15999131684,E-mail:jianglinjjj@126.com

片为新疆维吾尔自治区中医医院金洪元的临床经验方,由金银花、甘草、麦冬等 7 味中药组成,功效清咽解毒、养阴生津,本方有效率 >98.3%。方中君药金银花的有效成分为绿原酸及木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷^[4-5],具有抗菌^[6]、抗炎^[7]作用;臣药甘草清热解毒利咽,其含有的甘草苷可治疗咽炎^[8]。金银花、甘草等均含有芦丁,具有抗菌、抗炎作用^[9],生津作用与中药饮片甘味有关,主要存在于臣药麦冬、佐药乌梅和西青果等中。查阅文献发现,对清喉利咽类的方剂剂型大多以颗粒剂、丸剂、口服片剂为主,将传统汤剂开发成口含片的研究较少^[10]。口含片除具有片剂的质量稳定、剂量准确等优点外,还可在局部产生较久的疗效^[11],故拟将清喉利咽方开发成院内制剂。考虑到患者长期以来以汤剂服用最为有效和中试成本,故选择水为提取溶媒,以金银花中绿原酸和总黄酮(以木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、甘草苷、芦丁之和计)质量浓度的综合评分为评价指标,通过响应面法对提取工艺条件进行优化。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(含 2996 型 PAD 检测器,Empower Pro 工作站,美国 Waters 公司),Centra-20 型紫外-可见分光光度计(GBC 科学仪器有限公司),AG-135 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),XYJ80-1 型电动离心机(金坛市医疗仪器有限公司)。绿原酸、甘草苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁及 *D*-葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110753-200413,111610-201106,111720200905,100080-200707,110833-201205),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。金银花、玄参、麦冬等饮片均来自新疆维吾尔自治区中医医院药库,经该院李永和主任药师鉴定均符合 2010 年版《中国药典》相关项下的要求。

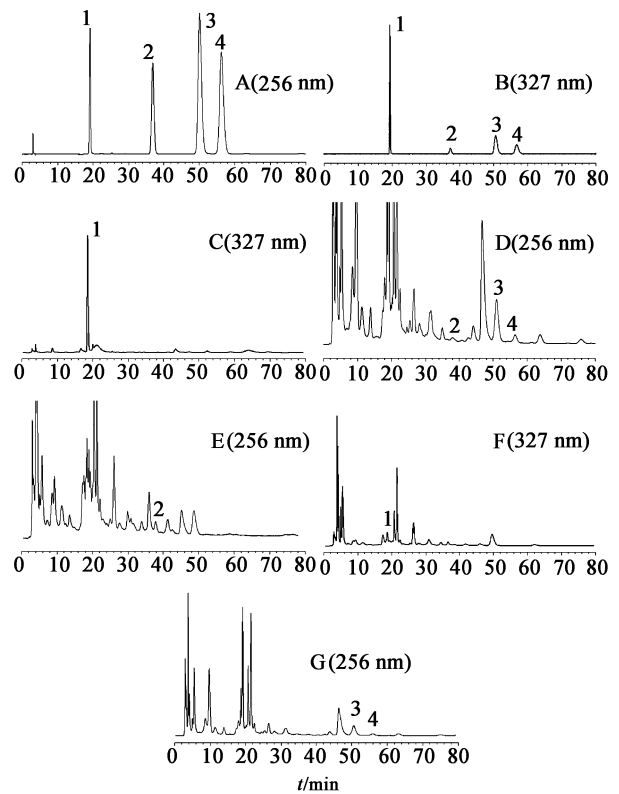
2 方法和结果

2.1 绿原酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、甘草苷、芦丁的含量测定

2.1.1 溶液的制备 精密称取绿原酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、甘草苷、芦丁对照品适量,置于 25 mL 棕色量瓶中,加乙腈配成质量浓度分别为 3.232, 0.713, 0.704, 0.311 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。按处方量称取药材 78 g(*n* = 3),加一定量水浸泡一定时间,加热提取一定时间,经 3 层纱布滤过,滤液于 60 °C 旋转蒸发,转移至 200 mL 量瓶中,加水定容至刻度,精密量取 5 mL 于 4 000 r·min⁻¹ 离心 1 h,得上

清液,经 0.45 μm 滤过,得供试品溶液。按处方量称取除去金银花及甘草的样品,按上述方法制备阴性样品溶液(乌梅中含有绿原酸^[12])。

2.1.2 色谱条件 XTerra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.5% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 12 min, 9% A; 12 ~ 15 min, 9% ~ 15% A; 15 ~ 40 min, 15% ~ 45% A; 40 ~ 50 min, 45% ~ 15% A; 50 ~ 80 min, 15% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,绿原酸检测波长 327 nm,黄酮类成分检测波长 256 nm,进样量 10 μL。见图 1。



A, B. 对照品; C, D. 供试品; E, F. 阴性样品(缺金银花); G. 阴性样品(缺甘草); 1. 绿原酸; 2. 甘草苷; 3. 木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷; 4. 芦丁

图 1 清喉利咽方 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Qinghou Liyan buccal tablets

2.1.3 标准曲线的绘制 取混合对照品溶液,按 2.1.2 项下色谱条件测定,进样量分别为 0.5, 1, 2, 5, 8, 10 μL,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得绿原酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁、甘草苷的回归方程分别为 $Y = 28\ 574X + 530\ 037$ ($r = 0.999\ 3$), $Y = 32\ 785X + 67\ 528$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 21\ 616X + 39\ 302$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 20\ 952X + 24\ 288$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围依次为 1.616 ~ 32.32, 0.356 5 ~ 7.13, 0.155 5 ~ 3.11, 0.352 ~ 7.04 μg。

2.1.4 精密度试验 取混合对照品溶液按 2.1.2 项下色谱条件连续进样 6 次,计算绿原酸、甘草苷、

木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁峰面积的 RSD 分别为 0.7% , 0.2% , 0.3% , 0.3% , 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 计算绿原酸、甘草苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁峰面积的 RSD 分别为 1.1% , 0.3% , 0.5% , 0.3% , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.6 重复性试验 按处方量精密称取药材 6 份, 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 结果绿原酸、甘草苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁的平均质量浓度分别为 2.10, 0.18, 0.07, 0.05 g·L⁻¹, RSD 依次为 2.2% , 1.1% , 1.5% , 0.9% , 表明该方法重复性好。

2.1.7 回收率试验 精密吸取 6 份已知含量的浓缩液, 每份 2 mL, 各精密加入绿原酸、甘草苷、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁 17.3, 1.4, 0.6, 3.2 mg, 加乙腈定容混合至 10 mL, 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.2 项下色谱条件测定, 计算平均回

收率分别为 99.97% , 102.86% , 100.12% , 98.61% , RSD 分别为 2.1% , 2.1% , 1.6% , 2.5% 。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 响应面试验设计 通过预试验确定影响因素为浸泡时间、料液比、提取时间及提取次数, 其中提取次数为非连续变量, 考虑到中试成本, 故将提取次数设置为 2 次。当料液比 < 1:18 时, 浸膏中绿原酸的转移率呈下降趋势, 故选择 1:18 为料液比的上限。按处方量称取各饮片, 每份 78 g, 每个试验平行 3 份, 选择浸泡时间、料液比、提取时间为自变量, 每个因素设置 5 个水平, 编码分别为 -1.682, -1, 0, 1, 1.682。考虑有效成分含量及对功效的贡献度, 确定综合评分 = 绿原酸质量浓度/绿原酸最大质量浓度 × 0.55 + 总黄酮 × 0.15, 总黄酮 = 木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷质量浓度/木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷最大质量浓度 + 芦丁质量浓度/芦丁最大质量浓度 + 甘草苷质量浓度/甘草苷最大质量浓度。试验安排及结果见表 1。

表 1 清喉利咽方提取工艺响应面试验分析

Table 1 Response surface test analysis of extraction process of Qinghou Liyan buccal tablets

No.	A 浸泡时间 /min	B 液料比 /倍	C 提取时间 /min	绿原酸 /mg·L ⁻¹	黄酮类成分/mg·L ⁻¹			综合评分
					甘草苷	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	芦丁	
1	70	12	180	1 716.590	192.958	124.652	44.492	0.846
2	70	18	105	1 727.608	140.984	112.330	55.692	0.828
3	70	6	105	1 182.817	78.014	215.564	22.209	0.610
4	100	8.4	60	1 563.522	101.038	84.795	35.831	0.681
5	40	15.6	60	1 295.372	62.924	72.035	26.147	0.540
6	40	15.6	150	1 861.490	116.484	144.912	41.951	0.836
7	40	8.4	150	1 767.089	156.750	64.354	34.781	0.767
8	40	8.4	60	1 391.669	59.686	74.694	6.816	0.520
9	100	15.6	150	1 712.191	137.730	120.153	19.603	0.737
10	20	12	105	1 670.043	134.992	103.571	24.011	0.722
11	120	12	105	1 681.831	163.273	88.539	51.551	0.805
12	100	8.4	150	1 578.511	145.676	83.079	37.226	0.722
13	70	12	30	1 787.120	128.567	112.593	43.864	0.806
14	100	15.6	60	1 890.010	146.369	115.756	60.880	0.894
15~20	70	12	105	1 878.595	114.090	112.308	46.045	0.827

注: 1~14 号为析因试验, 15~20 号为中心点试验。

2.2.2 数学模型的拟合 通过 SAS 9.0 软件拟合, 分析 3 个因素对综合评分 (Y) 的影响, 得多元二次回归方程 $Y = 0.828 + 0.081A + 0.103B + 0.081C + 0.101AB - 0.174AC + 0.006BC - 0.084A^2 - 0.129B^2 - 0.022C^2$ 。对该模型的进行统计分析, 见表 2。

2.2.3 回归分析 由方差分析可知, 该模型复相关系数 (R^2) 0.89, 表明该模型拟合程度良好, 试验失拟项程度小, 可用于提取工艺的优化, 而 A, B, C,

AC, A², B² 的 P 均 < 0.05, 表明 3 个自变量对提取工艺均具有显著性影响, 影响程度排序为 B > C > A。根据回归分析结果, 绘制三维曲面图, 见图 2。结果显示因素 A 和 C, 因素 B 和 C 具有交互作用, 说明响应值与自变量之间并非简单的线性关系。

2.2.4 工艺参数的优化及验证 采用 SAS 9.2 中的预测刻画器得出最大意愿, 最佳提取工艺为浸泡时间 89.20 min, 液料比 15.34 倍, 提取时间 136.21 min, 结合实际情况, 调整为浸泡时间 89 min, 液料比

表 2 综合评分回归方程的方差分析

Table 2 ANOVA of regression equation of comprehensive score

方差来源	<i>f</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	9	0.194	9.289	0.000 9
<i>A</i>	1	0.031	13.617	0.004 2
<i>B</i>	1	0.051	21.860	0.000 9
<i>C</i>	1	0.032	13.734	0.004 1
<i>AB</i>	1	0.010	4.387	0.062 6
<i>AC</i>	1	0.030	12.979	0.004 8
<i>BC</i>	1	0.000 04	0.018	0.896 0
<i>A</i> ²	1	0.013	5.535	0.041 0
<i>B</i> ²	1	0.030	12.984	0.004 8
<i>C</i> ²	1	0.000 8	0.372	0.555 7

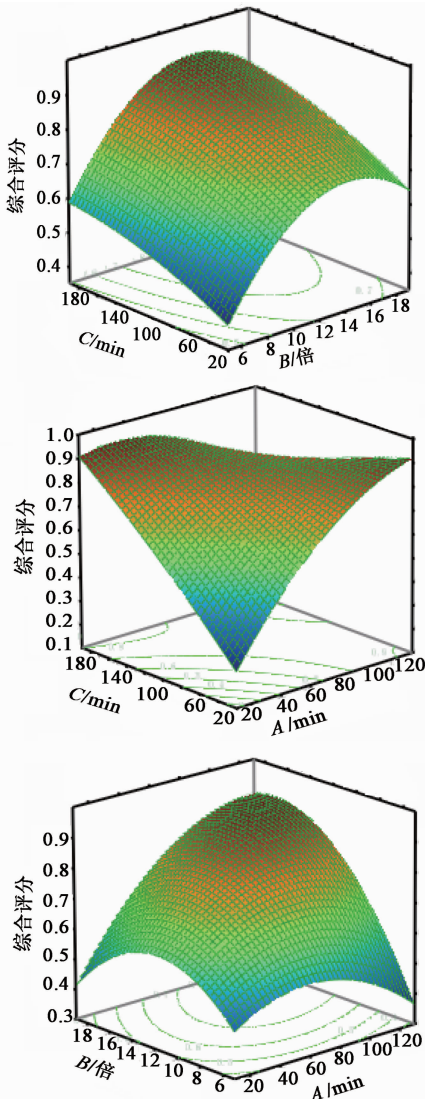


图 2 浸泡时间、料液比、提取时间交互作用对清喉利咽方提取工艺影响的响应面

Fig. 2 Response surfaces of effects between soaking time, solvent dosage and extracting time on extraction process of Qinghou Liyan buccal tablets

15.3 倍, 提取时间 136 min。按处方量称取药材 78 g, 按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果绿

原酸、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芦丁、甘草苷平均质量浓度分别为 1 843.537, 184.845, 93.939, 48.898 mg·L⁻¹, 综合评分与预测值的偏差 1.5%, 表明该二项式模型拟合效果良好, 可信度高。

3 讨论

总黄酮的定量分析常采用紫外分光光度法检测, 虽然能准确定量总黄酮, 但无法对总黄酮中各成份进行评价, 为了更好地控制组方中的成分, 本文采用 HPLC 分别检测 3 种黄酮成分。而在色谱条件的考察中, 发现在短时间内木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷与芦丁较难分离, 因为二者的母核相同, 均为 2-苯基色原酮, 且 3 位上无含氧基团取代, 故需通过所连的糖基的不同所致极性不同, 通过不断的提高流相极性, 以达到良好的分离效果。

预试验考察了不同质量分数的磷酸及冰乙酸对结果的影响, 结果发现 0.5% 磷酸对各种化合物均能达到良好的分离效果, 并且响应值较大。实验采用 PAD 检测器能对 4 种成份同时检测, 大大节约了时间与成本, 对样品进行全波长扫描, 得出 3 种黄酮类成分在 256 nm 处均有较强吸收, 故选择 256 nm 为检测波长。

[参考文献]

- [1] 左志文, 来向阳, 王翠梅. 中西医结合治疗慢性咽炎疗效观察[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2005, 13(1): 41-42.
- [2] 胡连生, 李凡成. 中医耳鼻喉科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004: 236-237.
- [3] 陆寿康. 中医症状治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 320-346.
- [4] 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: 205-206.
- [5] 张毅, 田广永, 李婷. 清咽合剂治疗慢性咽炎 150 例临床观察[J]. 山西中医, 2004, 20(3): 19.
- [6] 唐敏. 金银花黄酮活性成分分离纯化与生物学效应研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [7] 管仁伟, 曲永胜, 顾正位, 等. 木犀草苷的药理作用研究[J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(1): 1-3.
- [8] 苏国林, 刘刚, 刘育辰, 等. 甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2011, 13(10): 48-51.
- [9] 臧志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-760.
- [10] 宋民宪, 杨明. 新编国家中成药[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 256-307.
- [11] 杨明. 中药药剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 356-358.
- [12] 吴贤波, 董培智, 周海, 等. 基于 HPLC-MS 和主成分分析的乌梅血清药物化学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 118-122.

[责任编辑 刘德文]