

效应面法优化枳术颗粒的提取工艺

龚建平^{1*}, 刘慧莹², 饶毅¹, 陈笑天², 龚菁², 吴东¹, 金浩鑫¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 优化枳术颗粒的提取工艺条件。方法: 采用 Box-Behnken 效应面分析法, 在单因素试验基础上, 以辛弗林提取率为指标, 考察加水量、提取时间、提取次数对枳术颗粒提取工艺的影响。结果: 最佳提取条件为称取处方量药材, 加 490 mL 水煎煮 3 次, 每次 115 min, 辛弗林提取率达 90.57%。结论: Box-Behnken 法适用于枳术颗粒提取工艺的优选, 建立的数学模型预测值与实验观察值相符。

[关键词] 枳术颗粒; 辛弗林; Box-Behnken 设计; 效应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0019-04

[doi] 10.11653/syfy2013140019

Optimization of Extraction Technology of Zhizhu Granules by Response Surface Methodology

GONG Jian-ping^{1*}, LIU Hui-ying², RAO Yi¹, CHEN Xiao-tian², GONG Jing², WU Dong¹, JIN Hao-xin¹

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Zhizhu granules. **Method:** Based on single factor tests, with yield of synephrine as index, effect of water addition, extraction time and times on extraction technology of Zhizhu granules was investigated by Box-Behnken response surface methodology. **Result:** Optimum extraction technology was as following: took prescription amount of raw materials, reflux extracted 3 times with

[收稿日期] 20121226(006)

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2011BAI04B06)

[通讯作者] * 龚建平, 硕士, 教授, 从事中药制剂研究, Tel: 0791-87119600, E-mail: jxzyxylunwen@163.com

同温度下的稳定性, 结果发现, 百秋李醇含量无明显变化, 表明挥发油与 β -环糊精的包合物质量基本稳定, 达到了理想的包合效果。

[参考文献]

- [1] 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: 附录 X D.
- [2] 秦剑, 李卿, 肖铭玉, 等. 正交试验优选消郁安神胶囊中挥发油包合工艺[J]. 中国药房, 2009, 20(18): 1386.
- [3] 鲍爱娜, 沈敏, 吴丹丹, 等. 广藿香油- β -环糊精包合物胶囊的制备及稳定性研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(11): 2318.
- [4] 徐男, 蔡梅超, 胡言光, 等. 白金妇安颗粒中挥发油 β -环状精包合物制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 36.
- [5] 林国钊, 谢燕, 李国文, 等. 地黄益智颗粒中挥发油提取及包合工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 32.
- [6] 杨群, 张镔. 八角茴香油 β -环糊精包合物胶囊的制备工艺及稳定性研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 606.
- [7] 郑小亮, 井中旭, 冯宇飞. 丁香挥发油的提取及 β -环糊精包合工艺研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(3): 21.
- [8] 张雪梅, 刘中华, 邢国庆, 等. 维生素 D₃ β -环糊精包合物的测定及热稳定性试验研究[J]. 营养学报, 2006, 28(4): 353.
- [9] 武雪芬, 郑晓珂, 姚宏建, 等. 丹皮酚包合物的热稳定性考察和形成常数测定[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 501.

[责任编辑 全燕]

490 mL water, 115 min each time; Average yield of synephrine was up to 90.57%. **Conclusion:** Box-Behnken design was suitable for optimizing extraction technology of Zhizhu granules, the observed value approximated to the predicted value of established mathematical model.

[Key words] Zhizhu granules; synephrine; Box-Behnken design; response surface methodology

枳术颗粒处方源于枳术丸,枳术丸由枳实、白术粉末加荷叶提取液泛丸而成,张元素仿《金匱要略》枳术汤而制,首载于李东垣《内外伤辨惑论》。该方应用历史悠久,具有健脾消食、行气化湿的功效,主要用于治疗脾胃虚弱、食少不化、脘腹痞满等症。目前,对其单味药调节胃肠功能的机制^[1]、枳实-白术药对的药理活性^[2-3]和含量测定^[4]的研究颇多,而提取工艺的报道较为少见。研究表明,在调整脾虚小鼠胃肠功能紊乱方面,枳实白术水煎剂的效果较枳术丸好^[5]。本试验结合单因素试验和 Box-Behnken 效应面法优化枳术颗粒的提取条件,为其实际生产提供科学依据。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津), AB104-N 型 1/万电子天平(梅特勒-托利多公司), AUW2200 型 1/10 万电子天平(日本岛津), Mili-Q 型超纯水仪(美国 Milipore 公司)。

枳实、白术均购于江西南昌黄庆仁大药房,经江西中医学院赖学文教授鉴定,枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实,白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。辛弗林对照品(批号 110727-200306,中国药品生物制品检定所),60~90 目聚酰胺粉(浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

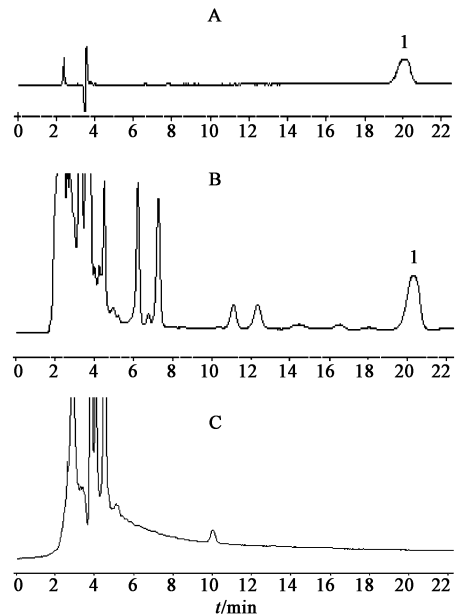
2 方法与结果

2.1 辛弗林的含量测定

2.1.1 色谱条件 伊利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相磷酸二氢钾溶液(磷酸二氢钾 0.6 g, 十二烷基磺酸钠 1.0 g, 加水溶解并稀释至 1 L)-甲醇(50:50),检测波长 275 nm,柱温 25 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。理论塔板数按辛弗林峰计算均不低于 3 000,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取辛弗林对照品 3.43 mg 置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,制得对照品储备液;精密量取该储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加水定容,制成 34.3 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密吸取提取液



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 辛弗林

图 1 枳术提取液 HPLC

10 mL(相当于枳实药材 1 g),通过聚酰胺柱(60~90 目,2.5 g,内径 1.5 cm,干法装柱),用水 25 mL 洗脱,收集洗脱液,转移至 25 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 线性关系考察 分别精密吸取辛弗林对照品溶液 2,5,8,10,20,25,30,40 μL 注入色谱仪,依法测定,以峰面积为纵坐标,辛弗林质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 517\ 576X - 7\ 973.9$ ($R^2 = 0.9999$),表明辛弗林进样量在 0.07~1.37 mg 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4.2 精密度试验 精密量取同一辛弗林对照品溶液,依法连续测定 6 次,结果峰面积的 RSD 1.39%,表明仪器精密度良好。

2.1.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24 h 进样,测定辛弗林含量,结果辛弗林峰面积的 RSD 1.65%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.4.4 重复性试验 取同一批次药材,按处方量称定,按 2.1.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依法测定,结果辛弗林峰面积的 RSD 1.72%,表明

该方法重复性良好。

2.1.4.5 加样回收率试验 量取已知辛弗林质量浓度的提取液 9 份,分别精密加入已稀释 5 倍的对照品储备液 2,2.5,3 mL,按 2.1.3 项下方法制备样品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算回收率,见表 1。

表 1 辛弗林含量测定的加样回收率试验

No.	测得量 /mg	样品中 质量/mg	加入量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.297 7	0.162 5	0.137 2	98.54	100.69	2.03
2	0.291 8	0.155 1	0.137 2	99.66		
3	0.309 7	0.167 2	0.137 2	103.9		
4	0.323 4	0.152 9	0.171 5	99.46		
5	0.325 7	0.152 7	0.171 5	100.93		
6	0.349 1	0.179 2	0.171 5	99.04		
7	0.363 8	0.150 5	0.205 8	103.64		
8	0.369 7	0.160 1	0.205 8	101.85		
9	0.371 7	0.167 7	0.205 8	99.12		

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取时间 称取处方量药材,分别加入 10 倍量水提取 0.5,1,1.5,2,2.5 h,测定辛弗林含量,结果辛弗林提取率分别为 48.32%,54.57%,62.23%,65.14%,69.40%。

2.2.2 加水量 称取处方量药材,分别加入 6,8,10,12,14 倍量水(即 270,360,450,540,630 mL 水)提取 1.5 h,结果辛弗林提取率分别为 43.81%,49.29%,54.57%,57.46%,62.48%。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 效应面试验设计 在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 设计对枳术颗粒的提取工艺进行优化。选取加水量、提取时间、提取次数为自变量,每个自变量的低、中、高水平分别以 -1,0,1 进行编码,以辛弗林转移率(Y)为考察指标,效应面分析的因素水平见表 2,试验安排及结果见表 3。

表 2 枳术颗粒的提取工艺优选效应面分析因素水平

水平	A 加水量/mL	B 提取时间/h	C 提取数/次
-1	360	1.5	1
0	450	2.0	2
1	540	2.5	3

2.3.2 模型的建立及显著性检验 用 ANOVA 分析效应面的回归参数,以辛弗林转移率为响应值的方差分析见表 4。结果发现,一次项加水量和提取次数对转移率的线性效应极显著;二次项中各因素对转移率的曲面效应均显著;除 BC 外各因子间的相互作用显著。对表 3 中数据进行多元回归拟合,

表 3 枳术颗粒的提取工艺优选效应面试验安排

No.	A	B	C	辛弗林转移率/%
1	-1	-1	0	60.04
2	1	-1	0	70.99
3	-1	1	0	61.88
4	1	1	0	68.88
5	-1	0	-1	52.58
6	1	0	-1	52.85
7	-1	0	1	67.62
8	1	0	1	88.36
9	0	-1	-1	61.39
10	0	1	-1	63.06
11	0	-1	1	87.12
12	0	1	1	86.87
13	0	0	0	78.38
14	0	0	0	78.96
15	0	0	0	77.87
16	0	0	0	78.09
17	0	0	0	77.57

表 4 二次回归方程方差分析

	SS	f	MS	F	P
模型	2 110.30	9	234.48	590.52	<0.000 1
A	189.74	1	189.74	477.84	<0.000 1
B	0.17	1	0.17	0.42	0.539 3
C	1 252.25	1	1 252.25	3 153.72	<0.000 1
AB	3.90	1	3.90	9.82	0.016 5
AC	104.76	1	104.76	263.82	<0.000 1
BC	0.92	1	0.92	2.32	0.171 5
A ²	508.73	1	508.73	1 281.21	<0.000 1
B ²	12.67	1	12.67	31.90	0.000 8
C ²	14.09	1	14.09	35.49	0.000 6
残差	2.78	7	0.40		
失拟检验	1.65	3	0.55	1.96	0.261 7
纯误差	1.12	4	0.28		
总误差	2 113.08	16			

得二次多项回归模型 $Y = 78.17 + 4.87A + 0.14B + 12.51C - 0.99AB + 5.12AC - 0.48BC - 10.99A^2 - 1.73B^2 - 1.83C^2$ ($R^2 = 0.998 7$),整体模型达到极显著水平,表明该二次方程模型显著。失拟检验 $P = 0.261 7$,说明该方程对试验拟合较好,可代替试验真实点对试验结果进行分析。模型的变异系数 = 0.88%,在允许范围内。

2.3.3 提取条件的效应面分析与优化 采用 Design-Expert8 软件描绘等高线图和三维曲面图,见图 2~4。结果表明加水量与提取时间、加水量与提取次数的交互作用较显著。加水量对辛弗林提取率的影响最大,随加水量增加,辛弗林转移率先增大后减小,加水至约 495 mL 时转移率最大;提取次数对转移率的影响次之,当提取数为 3 次时转移率最高;提取时间对转移率的影响最小,提取 1.5~2.5 h 辛

弗林的转移率变化不大。

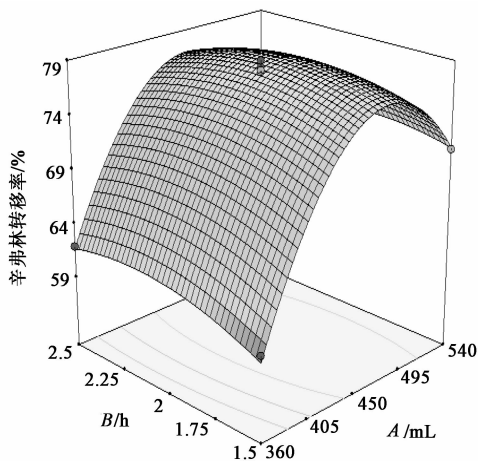


图 2 加水量与提取时间对辛弗林转移率的等高线和曲面

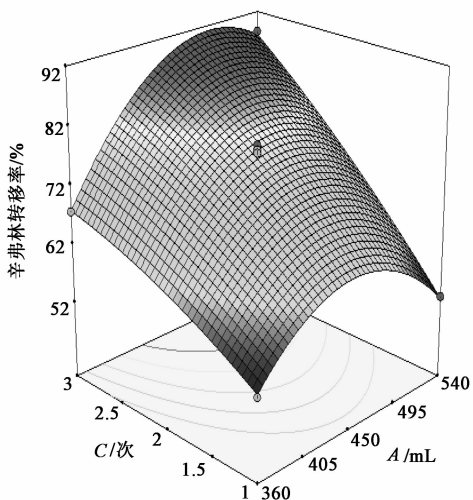


图 3 加水量与提取次数对辛弗林转移率的等高线和曲面

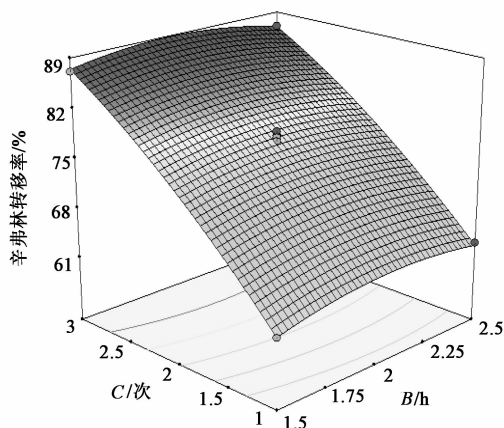


图 4 提取时间与提取次数对辛弗林转移率的等高线和曲面

2.4 验证试验 确定枳术颗粒的最佳提取条件为加 491.82 mL 水提取 3 次,每次 1.89 h,结合生产实际,拟调整为加 490 mL 水提取 3 次,每次 115 min,辛弗林的理论转移率 91.2%。称取处方量药

材 3 份,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,结果辛弗林的平均转移率 90.57%,与理论值吻合较好,说明该模型可靠、具有实用价值。

3 讨论

传统的数理统计往往采用正交设计或均匀设计来寻求最佳的因素水平组合,其均不能在给出的整个区域上找到因素和效应值之间一个明确的函数表达式,从而无法找到整个区域上的最佳因素组合和响应最优值。Box-Behnken 效应面法是统计设计和试验技术的合成,以回归方程作为函数估算的工具,将多因子试验中因素与结果的关系用多项式拟合,将因子与结果的关系函数化。研究因子与响应值间、因子与因子间的相互关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法。

效应面法在药学研究中不仅适用于提取^[6],还被广泛应用于处方筛选^[7-8]、制备工艺优选等方面。本实验在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理安排枳术颗粒的提取方案并优化条件,建立起二次多项式的回归模型,拟合度良好。实测值与预测值相近,优选的工艺条件稳定性好、重复性高,为枳实白术药对的加工利用和生产提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 钟熊,王梦月,彭颖,等.白术、茯苓多糖的体外胃肠道代谢研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):132.
- [2] 王喜军,陈曦,曹洪欣,等.口服枳术丸后人体内橙皮苷、柚皮苷的药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(8):18.
- [3] 范一宏,徐国萍,冯雯,等.枳术通便汤对慢传输型便秘大鼠结肠墨汁推进率、GDNF 及 NOS mRNA 表达的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(4):486.
- [4] 张俐,王玉.枳术颗粒质量标准研究[J].中成药,2011,33(12):2088.
- [5] 麻晓慧,商亚珍.枳术丸与枳术汤对胃肠运动影响的实验研究[J].时珍国医国药,2005,16(7):599.
- [6] 范成杰,江道封,凌宗士.响应面法优化黄芩中黄芩苷闪式提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):48.
- [7] 董银卯,林楠,孟宏.响应面法优化油腻型痤疮方中药配比[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):69.
- [8] 张艳,李永哲.响应面法及其在药学领域中的应用[J].吉林化工学院学报,2012,29(7):21.

[责任编辑 全燕]