

响应面分析法优化复方补乌糖浆微波提取工艺

陈莉^{1,2*},王盛^{1,2},魏良兵^{1,2},孟楣^{1,2},冯艺戎^{1,2},石金友¹
(1. 安徽中医学院第一附属医院,合肥 230031;
2. 国家中医药管理局中药制剂三级实验室,合肥 230031)

[摘要] 目的:优选复方补乌糖浆的微波提取工艺参数。方法:通过响应面分析法对复方补乌糖浆微波工艺参数进行优选。结果:加水量、提取时间、微波功率对补骨脂素得率具有显著性影响,其最佳提取工艺为加药材 10 倍量的水,在 40% 微波功率下提取 26 min,补骨脂素得率达到极大值,该条件下补骨脂素得率的预测值为 36. 33%,验证值为 36. 38%。结论:与原提取工艺相比,优化的微波提取工艺简便、节能、提取率高且重现性好。
[关键词] 复方补乌糖浆;补骨脂素得率;微波提取法;响应面分析法
[中图分类号] R283. 6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903 (2012)02-0025-04

Optimization of Microwave Extraction Technology Parameters for Fufang Buwu Syrup by Response Surface Analysis Method

CHEN Li^{1,2*}, WANG Sheng^{1,2}, WEI Liang-bing^{1,2}, MENG Mei^{1,2}, FENG Yi-rong^{1,2}, SHI Jin-you¹
(1. First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China;
2. State Administration of National Chinese Drugs Medicament Laboratory of Grade 3, Hefei 230031, China)

[Abstract] Objective: To optimize microwave extraction technology parameters of Fufang Buwu syrup. Method: Optimization of microwave extraction technology parameters for Fufang Buwu syrup by response surface analysis method. Result: Ratio of material-liquid, extraction time and microwave power had significant impact to yield of psoralen, optimum extraction conditions were as follow: ratio of material-liquid 1: 10, microwave power 40%, extraction time 26 mins. Under this technology, yield of psoralen reached maximum, with estimated value and verified value being of 36. 33%, 36. 38%. Conclusion: This process was simple energy saving and high extraction ratio to old process, and had good reproducibile.
[Key words] Fufang Buwu syrup; yield of psoralen; microwave extraction method; response surface analysis method

复方补乌糖浆(安徽中医学院第一附属医院院内制剂)处方由补骨脂、红花、当归等 11 味中药组成,具有养血活血、祛风消斑之效,专治白癜风。该制剂在临床使用 10 余年,疗效明显,且无明显不良反应。微波提取法是中药提取法中的一项新技术,与传统工业化生产提取方法(煎煮法和回流法等)相比,具有设备简单、投资较少、提取率高、节时、节能、污染小等优势。因此,该项技术在中药制剂工业生产中具有广泛的应用前景^[1-2]。本文采用响应面分析法,对复方补乌糖浆微波提取工艺参数进行优化研究。与原工艺相比,优化的微波提取工艺简便、节能、提取率高且重现性好,可用于复方补乌糖浆制剂的提取工艺。

1 材料

TCL SCANNER Ⅲ 型扫描仪(瑞士 CAMAG 公司),NANOMAT4 型手动点样仪(瑞士 CAMAG 公司),BP211D 型 1/万天平(德国塞多利斯公司),WD800TL21-3 型微波炉(顺德市格兰仕仪器实业有限公司)。

[收稿日期] 20110831(005)
[基金项目] 安徽中医学院临床科学研究基金项目(2010LC-018A)
[通讯作者] *陈莉,硕士,从事新药制剂研究,Tel: 13856069856, E-mail: wangsheng8570@ 163. com

补骨脂、红花、当归等药材(均由安徽中医学院第一附属医院中药房提供),补骨脂素对照品(批号 110739-200814,中国药品生物制品检定所),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 补骨脂素的含量测定

2.1.1 溶液的制备 样品溶液的制备:按处方比例缩小 20 倍称取药材,按一定的液料比,微波功率和微波时间提取,过滤,滤液浓缩至 25 mL 量瓶中。

供试品溶液的制备^[3-4] 精密量取 10 mL 上述样品,用乙酸乙酯萃取 2 次,每次 7.5 mL,合并乙酸乙酯液,加热蒸干,残渣加乙酸乙酯溶解,定容到 1 mL 量瓶中。

对照品溶液的制备 精密称取补骨脂素对照品 5.00 mg,加乙酸乙酯溶解并定容到 10 mL 量瓶中,即为 0.50 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.2 最大吸收波长的选择 精密吸取供试品溶液、补骨脂素对照品溶液各 5 μL,点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-二氯甲烷-甲酸(4:1:1:0.1)为展开剂,预饱和 10 min,展开,取出,晾干,置紫外光灯下(365 nm)检视^[4]。然后在 200 ~ 700 nm 进行全波长扫描,结果供试品溶液和对照品溶液都在 300 nm 处均有最大吸收,故确定 300 nm 为测定波长。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 0.5,1,2,3,4,5 μL 点于同一硅胶 G 薄层板上,按 2.1.2 项下方法展开,取出,晾干。在 300 nm 下进行扫描。以峰面积 Y 为纵坐标,点样量 X 为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $Y = 3\,945.440 + 8\,010.521X$ ($r = 0.997\,1$),表明补骨脂素在 0.250 ~ 2.500 μg 有良好的线性关系。

2.1.4 补骨脂素的含量测定 精密吸取供试品溶液、补骨脂素对照品溶液,点于同一硅胶 G 薄层板上,按 2.1.2 项下方法展开,晾干后在薄层扫描仪中进行扫描,扫描波长 300 nm。

补骨脂素得率 = $M_1/M \times 100\%$

M_1 为补骨脂中补骨脂素的质量; M 为补骨脂的质量

2.2 单因素考察

2.2.1 提取时间对补骨脂素峰面积的影响 按处方比例称取药材,分别选定提取时间为 10,20,25,30,35 min,设定功率 20%,料液比 1:8,提取样品(每组 3 份),按供试品溶液的制备方法,制备 1 ~ 5 组供试品溶液,按补骨脂素的含量测定方法进行测定,考察不同提取时间对补骨脂素峰面积的影响,结

果分别为 500,5 600,6 900,4 500,2 600,提取时间为 25 min 时,补骨脂素峰面积最高,之后随着时间的加长而下降,则温度的升高可以促进补骨脂素的溶出,但温度过高补骨脂素的得率逐渐减小。

2.2.2 料液比对补骨脂素峰面积的影响 按处方比例称取药材,分别选定料液比 1:8,1:10,1:12,1:16,1:20,设定功率 20%,提取时间为 25 min,提取样品(每组 3 份),按供试品溶液的制备方法,制备 1 ~ 5 组供试品溶液,按补骨脂素的含量测定方法进行测定,考察不同料液比对补骨脂素峰面积的影响,结果分别为 7 000,8 800,6 300,4 500,2 500。当料液比为 1:10 时,补骨脂素的峰面积最大,之后逐渐降低。

2.2.3 微波功率对补骨脂素峰面积的影响 按处方比例称取药材,分别选定微波功率为 20%,40%,60%,80%,100%,设定提取时间 25 min,料液比为 1:10,提取样品(每组 3 份),按供试品溶液的制备方法,制备 1 ~ 3 组供试品溶液,按补骨脂素的含量测定方法进行测定,考察不同微波功率对补骨脂素峰面积的影响,结果分别为 4500,6800,4750。当微波功率为 40% 时,补骨脂素的峰面积最大。但当微波功率达到 80% 时,样品中水分蒸干,无法测定结果,故放弃 80% 和 100% 的微波功率。

2.3 复方补乌糖浆微波提取工艺条件的优化

2.3.1 响应面实验设计及响应值结果 根据单因素考察的基础上,确定响应面的因素和水平,因素水平见表 1。根据 Box- Behnken 的中心组合实验设计原理确定的实验设计方案及响应值结果,见表 2。

表 1 复方补乌糖浆微波提取工艺响应面分析因素水平

编码水平	X_1	X_2	X_3
	加水量/倍	提取时间/min	微波强度/%
-1	8	20	20
0	10	25	40
1	12	30	60

2.3.2 模型拟合及预测 根据响应面实验设计方案制备出 15 组供试品(每组 2 份),按照补骨脂素的含量测定方法进行测定,通过计算得出实验数据如表 2。采用 6QA 统计插件对数据进行回归分析。各因素经回归拟合后,解得回归方程 $Y = -563.050\,0 + 61.043\,8X_1 + 17.614\,5X_2 + 308.737\,5X_3 + 0.161\,5X_1 \cdot X_2 + 11.175\,0X_1X_3 - 6.425\,0X_2 \cdot X_3 - 3.424\,4X_1^2 - 0.322\,5X_2^2 - 324.687\,5X_3^2$ ($r = 0.975\,7$)。方差分析结果见表 3。

表 2 复方补乌糖浆微波提取工艺响应面实验设计及响应值

No.	X_1	X_2	X_3	补骨脂素得率 $Y/\%$
1	-1	-1	0	13.27
2	-1	1	0	11.15
3	1	-1	0	14.34
4	1	1	0	18.68
5	0	-1	-1	14.23
6	0	-1	1	6.33
7	0	1	-1	10.96
8	0	1	1	28.76
9	-1	0	-1	10.76
10	1	0	-1	18.53
11	-1	0	1	9.28
12	1	0	1	4.55
13	0	0	0	36.65
14	0	0	0	35.81
15	0	0	0	35.90

表 3 复方补乌糖浆微波提取工艺回归模型方差分析

项目	f	P_i	F	F 临界值	P
X_1	1	432.561 8	25.090 6	6.607 9	0.004 1 ¹⁾
X_2	1	225.105 7	13.057 2	6.607 9	0.015 3 ¹⁾
X_3	1	224.830 7	13.041 2	6.607 9	0.015 4 ¹⁾
X_1X_2	1	10.432 9	0.605 2	6.607 9	0.471 8
X_1X_3	1	79.923 6	4.635 9	6.607 9	0.083 9
X_2X_3	1	165.122 5	9.577 9	6.607 9	0.027 0 ¹⁾
X_1^2	1	692.756 4	40.183 1	6.607 9	0.001 4 ¹⁾
X_2^2	1	240.014 4	13.922 0	6.607 9	0.013 6 ¹⁾
X_3^2	1	622.800 6	36.125 3	6.607 9	0.001 8 ¹⁾
回归	9	1 712.063 1	11.034 2	4.772 5	0.008 3 ¹⁾
剩余	5	86.199 9			
总计	14	1 798.263 0			

注: ¹⁾ $P < 0.05$ 。

根据回归方程分析,表 3 可知,在置信区间 95% 时,方程线性相关系数 $r = 0.975\ 7$ 。证明回归方程真实、可靠,具有统计学意义,可用于替代实验点对实验结果进行分析。方程各自变量 X 方差分析表明,方程一次项对多糖提取得率具有显著性影响,二次项有显著性影响,交互项中 X_2X_3 有显著性影响,而 X_1X_2 与 X_1X_3 无显著性影响,因此各因素与响应值之间不是简单的线性关系。

2.3.3 等高线图和响应面图分析 根据回归分析

结果,用 Origin7.0 软件作出响应曲面图和等高线图,见图 1~3。各图表示 X_1, X_2, X_3 中任意一个变量取零水平时,其余 2 个变量对补骨脂素得率的影响。

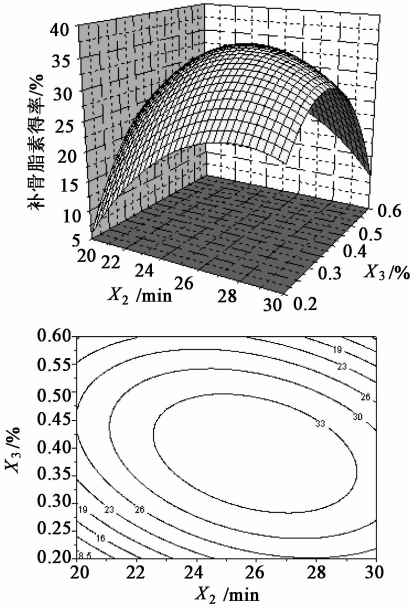


图 1 提取时间和微波功率交互作用对补骨脂素得率影响的响应曲面和等高线

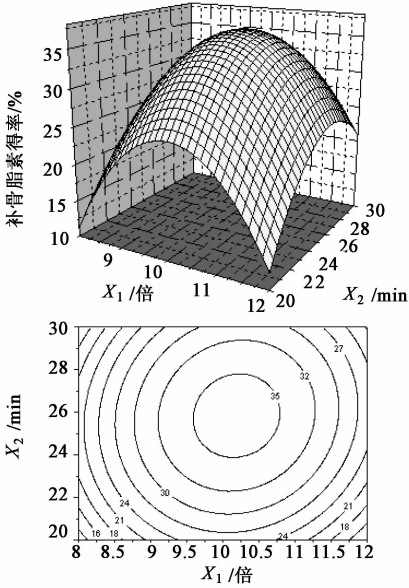


图 2 提取时间和加水量交互作用对补骨脂素得率影响的响应曲面和等高线

根据以上响应面和等高线图,可以判断该实验范围内只有一个稳定点,且为极大值,同时表明本实验设计合理。因此,利用 Excel 中的“规划求解”,得出复方补乌糖浆的最佳微波提取工艺条件为:加水倍数 10.17,提取时间 25.93 min,微波功率 39.38%,理论上补骨脂素的最高得率为 36.45%。

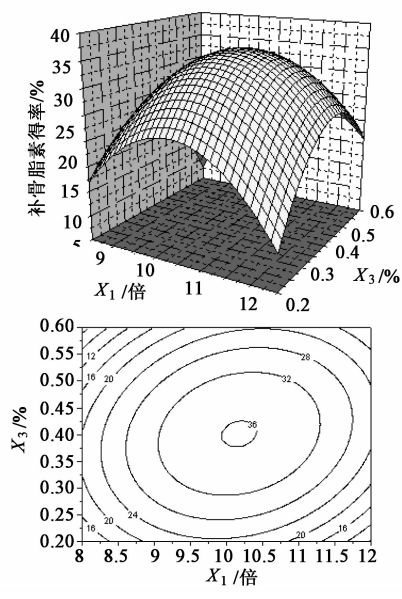


图 3 加水量和微波功率交互作用对补骨脂素得率影响的响应曲面和等高线

结合实际,确定最佳微波提取工艺条件为加药材 10 倍量的水,在 40% 微波频率下提取 26 min,补骨脂素的实际得率应为 36.33%。

2.3.4 验证试验 分别按优化的微波提取工艺和原工艺各提取 3 批样品,分别测定补骨脂素的含量,计算补骨脂素得率。

结果表明在优化的复方补乌糖浆微波工艺的条件下,补骨脂素的平均得率为 36.38%,与响应面预

测结果一致;说明建立的补骨脂中补骨脂素得率与微波时间、液料比及微波功率之间关系的回归模型是合理可靠的。相同的操作水平下,原工艺条件下的补骨脂素得率为 26.49%,比微波工艺少 10.89%;说明响应面法优选后的复方补乌糖浆微波工艺比原工艺好。

3 讨论

在补骨脂素展开条件的选择中,最初选择的是 2010 年版《中国药典》中的补骨脂鉴别项下的展开剂正己烷-乙酸乙酯(4:1),但 Rf 值太低,分离度不好。调整展开剂的比例正己烷-乙酸乙酯(3:1,2:1,5:2),结果也不理想。最终选择文献资料方法^[4],选择展开剂条件为环己烷-乙酸乙酯-二氯甲烷-甲酸(4:1:1:0.1),结果薄层色谱图中供试品溶液在与对照品溶液相应的位置上出现了对应斑点,且阴性无干扰;薄层扫描图中对应峰分离度好。

[参考文献]

[1] 冯青然,陈燕军. 中药提取工艺研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(10):61.
[2] 安建忠,许志惠. 新技术新方法在中草药提取方面的应用[J]. 时珍国医国药, 2001,12(5):465.
[3] 中国药典.一部[S]. 2010:174,124.
[4] 袁旭红,吴燕红. 益肾养元合剂薄层色谱鉴别研究[J]. 中国实验方剂学志,2008,14(1):10.

[责任编辑 全燕]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,304 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com。