

星点设计-响应面法优化壮骨方煮散的煎煮工艺^Δ

田元春^{1*},李双蕾^{2#},杨婧¹,吴丽如¹,邓紫婷¹(1.广西中医药大学第一附属医院药学部,南宁 530023;2.广西中医药大学第一附属医院内分泌科,南宁 530023)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0954-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.26

摘要 目的:优化壮骨方煮散的煎煮工艺。方法:采用2因素5水平星点设计试验,以加水(倍)量和煎煮时间为自变量,以淫羊藿苷提取量和浸膏得率的总评“归一值”为因变量,进行回归方程拟合,采用响应面法优化壮骨方煮散煎煮工艺并进行验证;将采用优化后煎煮工艺的煮散与传统饮片的煎煮效果进行比较。结果:最优工艺为加16倍量水,煎煮2次,每次20 min;验证试验中“归一值”预测值与理论值的相对误差为2.97%;煮散与饮片经相同条件煎煮后淫羊藿苷提取量分别为1.234 3、1.132 4 μg/g,浸膏得率分别为23.73%、17.84%。结论:星点设计-响应面法优化煎煮工艺方法简便、可靠,优化的煎煮工艺稳定、可行;壮骨方煮散煎出效果优于传统饮片。

关键词 壮骨方;煮散;饮片;星点设计-响应面法;煎煮;工艺优化;淫羊藿苷;浸膏得率

Optimization of Decoction Technology for Zhuanggufang Decoction Powder by Central Composite Design-response Surface Method

TIAN Yuanchun¹, LI Shuanglei², YANG Jing¹, WU Liru¹, DENG Zipin¹ (1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2.Dept. of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the decoction technology of Zhuanggufang decoction powder. METHODS: Central composite design with 2 factors and 5 levels was conducted to design the test, taking water (fold) and decoction time as independent variables, the extraction amount of icariin and extraction yield overall desirability value of as dependent variables, regression equation were fitted; response surface method was used to optimize the decoction technology of Zhuanggufang decoction powder, and was verified. It was compared with the traditional decoction piece effect. RESULTS: The optimized technology was decocted twice with 16-fold water, 20 min each time; relative error of predicted and theoretical value by overall desirability value was 2.97%; after decoction powder and piece decocted in the same conditions, the extraction amounts of icariin were 1.234 3 μg/g and 1.132 4 μg/g, extraction yields were 23.73% and 17.84%, respectively. CONCLUSIONS: Central composite design-response surface method optimizing decoction technology is simple and reliable, the optimized decoction technology is stable and feasible, and the decoction capability of Zhuanggufang decoction powder is better than the traditional pieces.

KEYWORDS Zhuanggufang; Decoction powder; Decoction pieces; Central composite design-response surface method; Decoction process; Technology optimization; Icariin; Extraction yield

中药煮散是指将中药材粉碎成一定粒度与水共煎,去渣取汁制成的中药液体制剂^[1]。其与汤剂一样是中药的传统用药形式,既保持了汤剂的特点,又具有煎出率高、节省药材、煎煮时间短等优势。壮骨方为广西名中医李双蕾多年临床积累的验方,由淫羊藿、黄芪、丹参、杜仲、山药等药材组成,具有益肾填精、活血化瘀、通络止痛之功,对糖尿病性骨质疏松症有较好疗效^[2];可使2型糖尿病模型大鼠血清胰岛素样生长因子1(IGF-1)水平升高、肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平降低,促进骨形成、

抑制骨吸收,改善糖尿病骨代谢进程^[3]。本课题组拟将壮骨方制成煮散剂,以节约中药资源、提高煎出效率、保证临床疗效、降低患者费用。淫羊藿为方中君药,研究表明淫羊藿苷为抗骨质疏松作用的有效成分^[4]。本研究以淫羊藿苷提取量和浸膏得率的总评“归一值”为综合评价指标,采用星点设计-响应面法优化壮骨方煮散的煎煮工艺,为壮骨方煮散的研制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

XFB-400B 小型中药粉碎机(吉首市中诚制药机械厂);GH-252分析天平(广州市艾安得仪器有限公司);LC-20AT型高效液相色谱仪、SPD-20A紫外检测器、LC Solution色谱工作站(日本岛津公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

淫羊藿(批号:20151226)、黄芪(批号:20151223)、

Δ 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科攻14124004-1-26);广西名老中医民族医传承工作室建设项目[No.桂卫中(2014)9号]

* 主任药师。研究方向:临床药学、医院药学。电话:0771-5840015。E-mail:tianyc1989@163.com

通信作者:主任医师,教授。研究方向:内分泌及代谢性疾病。电话:0771-5848628。E-mail:lslei66@126.com

丹参(批号:20151211)、杜仲(批号:20151205)、山药(批号:20151217)、三七(批号:20151226)均购自柳州神农中药饮片厂,经广西中医药大学第一附属医院黄权芳副主任中药师鉴定均为2015年版《中国药典》收载相应品种的真品;淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号: MUST-15052801,纯度:99.97%);乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 煮散的制备方法

壮骨方全方饮片总质量为105 g,依据宋代庞安时《伤寒总病论》提出的煮散“一方取半剂”的理论,称取壮骨方全方处方的半剂饮片(饮片总质量52.5 g)。其中山药粗碎,其余药材分别于粉碎机中切割粉碎至过10目筛,并检测能通过80目筛的细粉量<10%,混合均匀,即得煮散。

2.2 淫羊藿苷含量的测定

2.2.1 色谱条件 采用《中国药典》条件^[5]。色谱柱:Plastisil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);保护柱:EasyGuard C₁₈(10 mm×4 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(27:73);柱温:30 ℃;检测波长:270 nm;流速:1.0 mL/min。理论板数按淫羊藿苷峰计应不低于1 500。取“2.2.2”“2.2.3”项下溶液(供试品为正交试验7号)及除淫羊藿外的其余药材制备的阴性样品溶液进样分析,色谱图见图1。

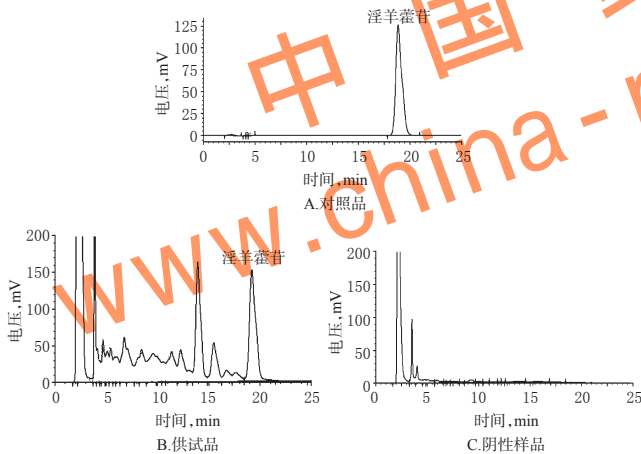


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.2 对照品溶液的制备 取淫羊藿苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成284 μg/mL的溶液,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取壮骨方煮散提取液经过滤后的续滤液浓缩定容至100 mL,得煮散液。精密吸取煮散液5 mL至10 mL量瓶中,加甲醇约4 mL,超声提取30 min,取出,放至室温,加甲醇定容至刻度,离心(3 500 r/min,离心半径为6.5 cm)5 min,取出。精密吸取上清液2 mL至5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制及方法学考察 分别精密吸取对照品溶液0.5、1、3、5、10、15、20、25 μL注入色谱仪,记

录色谱图。以峰面积(A)对进样量(X, μg)进行回归,得淫羊藿苷线性回归方程为 $A=2\ 572\ 064X+27\ 344$ ($r=0.999\ 9$),表明淫羊藿苷进样量线性范围为0.142~7.10 μg。按相关要求方法进行方法学考察,结果均符合规定。

2.3 浸膏得率的测定

精密吸取煮散提取液10 mL,置于已干燥至恒质量的蒸发皿中,水浴蒸干后移至烘箱中105 ℃干燥3 h。蒸发皿移至干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算浸膏得率(%): $(w \times V)/(W \times v) \times 100\%$,w为浸膏质量(g),W为药材质量(g),V为样品溶液的总容积,v为量取样品溶液的体积。

2.4 星点设计-响应面法优化提取工艺

2.4.1 因素、水平及指标的确定 本课题组前期采用单因素法考察了影响壮骨方煮散煎煮效率的因素,结果提示加水量及煎煮时间是影响煎煮效率的主要因素,故本研究以加水量(X_1)及煎煮时间(X_2)为因素进行考察。根据预试验分别设定其范围为 X_1 :10~20倍; X_2 :10~30 min。因煎煮次数为非连续变量,结合临床补益类中药方剂煎煮2次的实际情况,煎煮次数定为2次。以淫羊藿苷提取量(Y_1)、浸膏得率(Y_2)为考察指标,每个指标用Hassan法转化为0~1的总评“归一值”(OD)^[6]: $OD=(d_1 \times d_2)^{1/2}$, $d=(Y_i - Y_{min})/(Y_{max} - Y_{min})$ (其中,i为第i个样品, Y_i 为选定的第i个样品某个评价指标的实测值, Y_{min} 为该评价指标实测值中的最小值, Y_{max} 为该评价指标实测值中的最大值),OD越大表明提取效果越好。

2.4.2 试验设计与结果 采用2因素5水平星点设计-响应面法优化煎煮工艺。因素与水平见表1,试验安排与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1 ,倍	10	11.46	15	18.54	20
X_2 ,min	10	12.93	20	27.07	30

表2 试验设计与结果

Tab 2 Test design and results

试验号	X_1	X_2	$Y_1, \mu\text{g/g}$	$Y_2, \%$	OD
1	1	1	1.240 0	24.03	0.784 5
2	1	-1	1.216 1	21.70	0.671 5
3	-1	1	0.795 7	18.99	0.243 8
4	-1	-1	0.687 3	14.10	0.000 0
5	1.414	0	0.955 7	23.56	0.533 7
6	-1.414	0	0.793 6	21.92	0.305 4
7	0	1.414	0.932 8	20.57	0.422 1
8	0	-1.414	0.709 2	16.22	0.072 1
9	0	0	1.585 3	20.86	0.824 9
10	0	0	1.202 4	23.17	0.724 0
11	0	0	1.169 3	22.23	0.662 9
12	0	0	1.214 7	19.06	0.541 4
13	0	0	1.405 8	19.77	0.675 9

2.4.3 模型拟合与方差分析 采用Matlab 7.0.1软件对试验数据进行拟合。首先对各因素进行多元线性模型

拟合后发现拟合度不好,故又采用二次多项式模型拟合,得回归方程为 $OD=0.344 6X_1-4.374 4+0.191 8X_2-0.001 3X_1X_2-0.008 8X_1^2-0.003 9X_2^2$ ($r=0.903 2$, $P=0.016 6<0.05$),提示该煎煮工艺各项指标采用二次多项式模型较合适。在此基础上再对模型进行进一步的优化,得到简化的二次多项式方程为 $OD=0.318 5X_1-3.982 4+0.172 2X_2-0.008 8X_1^2-0.003 9X_2^2$ ($r=0.900 4$, $P=0.005 4<0.01$),此方程可信度较高,故以此二次多项式模型作为预测模型。对此模型采用 F 检验进行方差分析,结果显示各因素对淫羊藿苷及浸膏得率的影响大小顺序为 $X_2>X_1$,模型达到极显著水平,详见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Variance analysis results

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
X_1	0.121 2	1	0.121 2	5.894 0	0.041
X_2	0.313 7	1	0.313 7	15.260 0	0.005
X_1^2	0.084 4	1	0.084 4	4.107 7	0.077
X_2^2	0.268 3	1	0.268 3	13.053 0	0.007
误差	0.164 5	8	0.020 6		

2.4.4 工艺优化结果 根据上述二次多项式模型,绘制因变量随自变量变化的三维响应面图,详见图2。

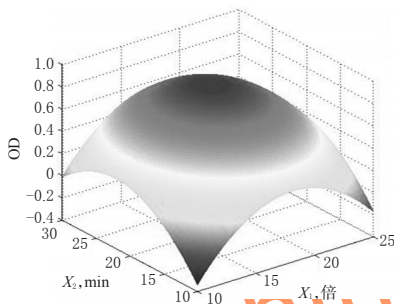


图2 响应面图

Fig 2 Response surface map

由图2可知,随着加水(倍)量和煎煮时间的增加,OD增加。最优区域 $OD>0.7$,选取较优范围 X_1 为14.7~21.5倍、 X_2 为17.0~27.2 min。结合生产实际考虑,选定最优工艺为加水量为16倍,煎煮时间为20 min,煎煮2次。

2.4.5 验证试验 称取壮骨方煮散(饮片总质量52.5 g),按优化的煎煮工艺进行验证试验,重复3次。结果淫羊藿苷提取量分别为1.226 1、1.161 2、1.315 7 $\mu\text{g/g}$,平均值为1.234 3 $\mu\text{g/g}$;浸膏得率分别为23.91%、23.79%、23.47%,平均值为23.73%;计算OD分别为0.770 1、0.717 7、0.812 9,平均值为0.766 9,与预测值0.744 8的相对误差为2.97%。以上表明建立的数学模型预测性较好,优化的工艺条件稳定、可行。

2.5 壮骨方煮散与传统饮片煎煮效果比较

取半量壮骨方传统饮片(饮片总质量52.5 g),加16倍水,煎煮2次,每次20 min,滤过,续滤液定容至100 mL,参照“2.2”“2.3”项下方法测定淫羊藿苷提取量和浸膏得率。重复3次,对比壮骨方煮散和传统饮片煎出效率。结果壮骨方煮散煎液淫羊藿苷提取量(1.234 3 $\mu\text{g/g}$)

是传统饮片中淫羊藿苷提取量(1.132 4 $\mu\text{g/g}$)的1.09倍,煮散煎液浸膏得率(23.73%)是传统饮片浸膏得率(17.84%)的1.33倍。因此,基于淫羊藿苷提取量和浸膏得率这两个指标,可认为壮骨方煮散煎出效率优于传统饮片。

3 讨论

据文献报道,大多数淫羊藿药材中朝藿定C含量较淫羊藿苷含量高^[7-9]。本试验采用的淫羊藿药材在稀乙醇提取液中朝藿定C含量也较淫羊藿苷含量高。但笔者另外在预试验中发现,在加水量相同的情况下,随着煎煮时间的延长和煎煮次数的增加,煎煮液中朝藿定C提取量呈逐渐下降的趋势、淫羊藿苷提取量呈小幅上升的趋势;煮散煎煮40 min后,淫羊藿苷提取量大于朝藿定C提取量,这可能与朝藿定C结构不稳定有关。故本试验最终选择淫羊藿苷提取量为工艺考察指标。

由于工艺优化需考虑多个指标,而单个指标受因素的影响,不一定呈现相同的线性关系,指标之间也存在相互影响,最终选择条件需要依据各项指标的综合效应^[6]。因此,本文采用OD表达最终效应,并建立数学模型进行优化与预测分析。

在同时考察多个因素对结果的影响的工艺筛选研究中,采用较多的方法有均匀设计和正交试验设计,但这2类设计存在各因素间的交互作用考察不灵敏、试验精度不够、不能精确找到最佳点等问题^[10]。因此,本文选用星点设计-响应面法,以二项式建立模型,此法精确度更高,试验预测值更接近真实值。

煮散药材的粉碎粒度并不是越小越好。壮骨方煮散中含有山药,山药富含淀粉,粒度过小易产生糊化作用,包裹在其他药材的外层而不利于其他药材有效成分的煎出。故本试验采用山药粗碎、其他药材细碎的粉碎方法,结果较好。本课题组后续将侧重研究壮骨方中每味药材的最优粉碎粒度。

参考文献

- [1] 仝小林,张家成,穆兰澄,等.恢复煮散节省药材[J].中国新药杂志,2012,21(5):470-474.
- [2] 李双蕾,李巧云,罗广波.壮骨方联合钙剂治疗2型糖尿病合并骨质疏松症疗效观察[J].辽宁中医杂志,2008,35(2):234-236.
- [3] 粟麟,李双蕾,陈文辉,等.壮骨方对糖尿病大鼠骨质疏松的防治及其对血清IGF-1、TNF- α 水平的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(4):428-432.
- [4] 贾晓斌,兰雪莲,陈彦,等.淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J].中国药房,2010,21(3):269-270.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:327.
- [6] 吴伟,崔光华,陆彬.实验设计中的多指标优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J].中国药学杂志,2000,35(8):530-533.
- [7] 李晓龙,刘虹宇,曹佩雪,等.HPLC同时测定21种淫羊

三黄益肾方的纯化工艺研究^Δ

吴小斌^{1*}, 王洛临^{2#}, 李洁环¹, 钟如帆¹, 袁柳萍¹, 郭 鸣¹(1.广州中医药大学, 广州 510405; 2.广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室, 广州 510095)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)07-0957-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.07.27

摘要 目的:研究三黄益肾方的纯化工艺。方法:以纯化后澄清液中总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率和除杂率为指标,分别考察水提醇沉法(50%、60%、70%乙醇)和澄清剂法(101果汁澄清剂、ZTC天然澄清剂、壳聚糖澄清剂)的纯化效果,以筛选三黄益肾方纯化方法;设计正交试验对最优纯化方法的工艺参数(药液质量浓度、澄清剂用量和药液pH)进行优化,并进行验证试验。结果:纯化方法中以壳聚糖为澄清剂时纯化效果较优,综合评分为98.62;优化后工艺参数为药液质量浓度1 g/mL、1%壳聚糖溶液用量2 mL/g、pH 5.1;验证试验中总多糖、黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷保留率和除杂率平均值分别为79.56%、78.11%、79.46%、32.18%(RSD分别为1.24%、0.97%、1.03%、1.16%, $n=3$)。结论:采用壳聚糖为澄清剂对三黄益肾方纯化效果较好,且操作简单,优化后工艺稳定、可行。

关键词 三黄益肾方;纯化工艺;正交试验;黄芪甲苷;总多糖;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;壳聚糖;澄清剂

Study on the Purification Technology of Sanhuang Yishen Formula

WU Xiaobin¹, WANG Luolin², LI Jiehuan¹, ZHONG Rufan¹, YUAN Liuping¹, GUO Ming¹(1.Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2.Guangdong Province Engineering and Technology Research Institute of Chinese Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the purification technology of Sanhuang yishen formula. METHODS: Using retention rate and impurity rate of purified total polysaccharide, astragaloside and calycosin glucoside as index, the purification effects of water extraction and alcohol precipitation method (50%, 60%, 70% ethanol) and clarifying agent method (101 juice clarifying agent, ZTC natural clarifying agent, chitosan clarifying agent) were respectively detected to screen the purification method; orthogonal test was used to optimize the technology parameters (mass concentration of liquid, amount of clarifying agent and pH of liquid) by the optimized purification method, and the verification test was conducted. RESULTS: The purification was better when using chitosan as clarifying agent with comprehensive score of 98.62; the purified technology parameters were mass concentration of liquid 1 g/mL, 1% chitosan solution amount of 2 mL/g, pH 5.1; the average value of retention rate and impurity rate of purified total polysaccharide, astragaloside and calycosin glucoside in verification test were 79.56% (RSD=1.24%, $n=3$), 78.11% (RSD=0.97%, $n=3$), 79.46% (RSD=1.03%, $n=3$) and 32.18% (RSD=1.16%, $n=3$), respectively. CONCLUSIONS: Using chitosan as clarifying agent shows good purification effect for Sanhuang yishen formula, which is simple. The optimized technology is stable and feasible.

KEYWORDS Sanhuang yishen formula; Purification technology; Orthogonal test; Astragaloside; Total polysaccharide; Calycosin glucoside; Chitosan; Clarifying agent

三黄益肾方是广东省第二中医院临床用方剂,由熟地黄、黄芪、大黄、茯苓等药材组成,具有补益气血、活血化瘀、泻下祛浊等功效,主要用于慢性肾病的早期治疗,

原剂型是煎剂,现计划开发成服用方便的颗粒剂。方中主要活性成分为多糖,如黄芪多糖、熟地黄多糖和茯苓多糖等。现代中药药理研究表明,中药多糖具有补益气

藿中朝藿定C和淫羊藿苷的含量[J].药物分析杂志, 2011,31(5):931-934.

[8] 陈彦,赵艳红,贾晓斌,等. RP-HPLC法同时测定不同品

Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.2014A020210017)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂。电话:020-83501292。E-mail: wxbzhongyao@163.com

通信作者:主任中医师,硕士生导师。研究方向:中药制剂。电话:020-83501292。E-mail: luolin_w@163.com

种淫羊藿药材中5种主要黄酮类成分的含量[J].中国药房, 2008,19(6):431-433.

[9] 黄朝情,彭玉德,黄文华,等. 12种中成药中淫羊藿组分的质量考察[J].中国药房, 2011,22(43):4086-4088.

[10] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学, 2007,24(6):455-457.

(收稿日期:2016-06-10 修回日期:2016-08-12)

(编辑:刘 萍)