

混合均匀设计结合响应面法优选枳苓六妙口服液中中药材的提取工艺[△]

李园园*, 石磊#, 张振巍, 白丹丹(解放军第155中心医院, 河南开封 475003)

中图分类号 R284.2;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3685-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.12

摘要 目的: 优选枳苓六妙口服液中中药材的提取工艺。方法: 以加水量、煎煮次数、提取时间为考察因素, 以柚皮苷提取率为评价指标, 采用混合均匀设计结合响应面法优选枳苓六妙口服液中中药材的提取工艺。结果: 优选的工艺为处方量药材加18倍量水提取3次, 每次1 h。结论: 所选工艺合理、可行, 可用于枳苓六妙口服液中中药材的提取。

关键词 枳苓六妙口服液; 柚皮苷; 提取率; 混合均匀设计; 响应面法

Optimization of Extraction Technology of Zhiling Liumiao Oral Solution by Mixed Homogeneous Design and Response Surface Methodology

LI Yuan-yuan, SHI Lei, ZHANG Zhen-wei, BAI Dan-dan(No.155 Central Hospital of PLA, Henan Kaifeng 475003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Zhiling liumiao oral solution. METHODS: The extraction technology of Zhiling liumiao oral solution was optimized by mixed homogeneous design and response surface methodology (RSM) with amount of water, decoction times and extraction time as factors using the extraction rate of naringin as index. RESULTS: The optimal technology was as follows: adding 18 folds of water, extracting for 3 times, 1 h each time. CONCLUSIONS: The technology is reasonable and feasible, and it is suitable for the extraction of Zhiling liumiao oral solution.

KEY WORDS Zhiling liumiao oral solution; Naringin; Extraction rate; Homogeneous design; Response surface methodology

过度的疲劳会损害机体的肌肉系统、心血管系统、神经系统、内分泌系统等多个系统, 导致人体食欲降低、体质量下降、肌肉软弱、精神萎靡或出现过敏、睡眠障碍等症状。目前, 临床上抗疲劳药物的研究多从抗缺血、抗缺氧方面入手, 西药主要有钙通道阻滞剂、自由基清除剂和中枢系统抑制剂, 这些药物虽然效果明显, 但过强的作用或者长期的缺氧应激会给机体带来严重危害, 最终可导致心、脑等重要脏器由于循环障碍能量供应不足而受损。近年来, 人们对中药有效成分和药理作用进行了广泛的研究, 发现许多单味中药及其提取物具有明显的抗疲劳作用, 且作用效果持久、稳定、毒副作用小^[1-2]。枳苓六妙口服液是我院多年使用的临床验方, 由枳实、柴胡、茯苓、白术、干姜等6味中药组成, 在临床上用于治疗各种疾病或免疫力低下等引发的疲劳, 如胸痛胸闷、少气懒言、四肢困倦、周身乏力、入睡困难、失眠多梦等, 效果显著。在此处方中, 枳实为君药, 黄酮类成分为枳实的主要活性成分^[3-4]。因此, 本研究从活性组分和临床用量的角度出发, 对柚皮苷提取率进行分析, 为枳苓六妙口服液的进一步研究提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

AB135-S型双量程电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); LC-2010C HT型高效液相色谱仪、UV-2401PC型紫外-可见分

光光度计(日本岛津公司); AS10200ADT型超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); SHB-3型循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂); DZTW型调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂)。

1.2 试剂

柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110704-200420); 甲醇(郑州派尼化学试剂厂, 批号: 20120703,); 乙腈(天津市德恩化学试剂有限公司, 批号: 20121107)。

1.3 药材

所有药材均购自安徽井泉集团中药饮片有限公司, 经解放军第155中心医院药械科石磊主任药师鉴定均符合2010年版《中国药典》(一部)规定。

2 方法与结果

2.1 柚皮苷含量和提取率的测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Thermo-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(20:80, V/V); 检测波长: 283 nm; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 理论板数按柚皮苷色谱峰计算应不低于3 000; 供试品与对照品在相同保留时间下有相同的色谱峰出现, 且阴性对照无干扰。色谱见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷对照品2.18 mg, 置5 ml棕色量瓶中, 加甲醇制得每1 ml含0.436 mg柚皮苷的贮备液。精密吸取此贮备液1 ml, 加甲醇稀释至10 ml, 制成0.043 mg/ml的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取枳苓六妙口服液5 ml, 置

△基金项目: 济南军区后勤科研计划项目(No.CJN10L067)

*药师, 硕士研究生。研究方向: 天然药物活性与安全性评价。

电话: 0378-3958759。E-mail: xiaoyou2008beijing@163.com

#通信作者: 主任药师, 教授。研究方向: 中药制剂与医院药学。

E-mail: 155SL@163.com

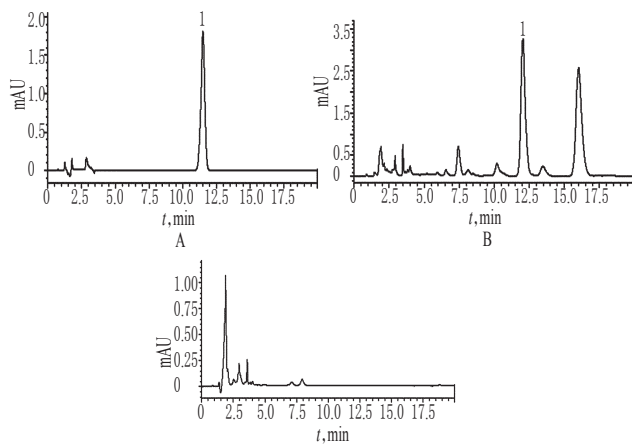


图1 高效液相色谱图

A. 柚皮苷对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 柚皮苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. naringin control; B. test sample; C. negative control; 1. naringin

100 ml 棕色量瓶中, 加入甲醇适量, 超声(功率: 800 W, 频率: 40 kHz)提取 15 min, 放至室温, 甲醇定容, 摇匀, 取上清液 5 ml, 置 250 ml 棕色量瓶中, 甲醇定容, 取上清液 1 ml 至 10 ml 棕色量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 精密量取除枳实外的处方药材适量, 按“2.1.3”项下方法制备阴性对照溶液, 即得。

2.1.5 标准曲线的制备 分别精密吸取 0.017 mg/ml 的对照品溶液 1、3、5、7、9、11、13 μl, 按上述色谱条件进样测定。以柚皮苷峰面积积分为横坐标(x), 柚皮苷进样量为纵坐标(y), 进行线性回归, 得回归方程为 $y=4.943 \times 10^{-7}x+4.1021$ ($r=0.9998$)。结果表明, 柚皮苷进样量在 0.017~0.221 μg 范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.6 柚皮苷提取率的测定 取“2.1.3”项下供试品溶液适量, 按上述色谱条件测定柚皮苷质量, 并按下式计算提取率: 提取率=供试品中柚皮苷质量/药材中柚皮苷质量×100%。

2.2 药材最大吸水量试验

取单个处方量的药材(即 64 g), 加入 1 000 ml 水浸泡 24 h, 使其充分吸水溶胀, 过滤溶液至药材不再滴水为止, 称此时药材质量, 按下式计算最大吸水量: 最大吸水量=吸水后药材质量-干燥药材质量。

2.3 混合均匀试验结合响应面法优选提取工艺

2.3.1 试验设计 根据预试验和笔者经验, 选择对提取工艺影响较显著的加水量(X_1)、煎煮次数(X_2)、提取时间(X_3)为考察因素。称取处方量药材适量, 水浸泡 30 min 后按照试验安排进行提取, 并按“2.1”项下方法测定柚皮苷提取率。因素与水平见表 1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	X_1 , 倍	X_2 , 次	X_3 , h
1	8	1	1
2	10	2	2
3	12	3	3
4	14		
5	16		
6	18		

2.3.2 混合均匀试验设计及响应面分析结果 由于各因素水平数不相同, 故采用混合均匀试验设计结合响应面法。经过 DPS7.05 数据处理软件对均匀试验设计进行中心化偏差分析 ($CD=0.3634$), 采用优化后的混合均匀设计表进行提取工艺分析 ($CD=0.1786$), 优化过程主要是降低各因素水平间的相关性, 以降低数据分析误差^[5-6]。数据采用 DPS7.05 和 SPSS18.0 软件进行统计、分析, 建立数据模型, 优化参数, 并绘制三维效应面图和二维等高线图。混合均匀试验结果见表 2; 数据模型因素的相关性分析见表 3; 三维效应面图见图 2; 二维等高线图见图 3。

表2 混合均匀试验结果

Tab 2 Results of mixed homogeneous design

编号	X_1 , 倍	X_2 , 次	X_3 , h	柚皮苷提取率, %		
				观测值(Y)	预测值	拟合误差
1	1	2	2	62.45	62.06	0.39
2	2	3	3	75.00	75.19	-0.19
3	3	1	1	51.78	51.93	-0.16
4	4	1	3	66.86	67.08	-0.22
5	6	3	1	82.35	82.61	-0.25
6	5	2	2	79.23	78.80	0.43

表3 数据模型因素的相关性分析

Tab 3 Relationship analysis of data model factors

相关因素	偏相关系数	检验值	P
$r(Y, X_1)=$	0.9877	6.3076	0.0242
$r(Y, X_2)=$	0.9986	18.6462	0.0029
$r(Y, X_3)=$	-0.9708	4.0482	0.0559
$r(Y, X_1X_2)=$	-0.9832	5.3847	0.0328

采用 DPS7.05 数据处理系统对试验数据进行高阶拟合。采用二项式拟合时, 数据的相关系数显示模型为线性关系, 故采用带交互作用的线性逐步回归进行拟合分析, 数据模型拟合结果为 $Y=386.7757+192.6307X_3+15.9525X_1X_2-5.0690X_1X_3-34.8547X_2X_3$ ($r=0.9996$), 说明方程线性较好, 可以用于数据模型的拟合; $P=0.042<0.05$, 说明方程具有统计学意义, 可用于数据模型的预测分析。

由表 3、图 2、图 3 可知, 各因素对评价指标的影响程度为 $X_1X_2>X_3>X_2X_3>X_1X_3$, 提取时间和各因素间的交互作用对指标有显著性影响 ($P<0.05$)。通过对拟合方程求极值得出, 当 $X_1=18$ 、 $X_2=3$ 、 $X_3=1$ 时, 方程有最大值, 此时由方程预测出提取率最大值为 90.77%。结合实际生产条件, 笔者选择提取工艺为药材加 18 倍量水, 提取 3 次, 每次 1 h。

2.4 工艺验证试验

取处方量药材, 共 3 份, 每份各加 18 倍量水浸泡 30 min 后, 按上述优选工艺提取, 并测定柚皮苷质量浓度和提取率。结果, 柚皮苷质量浓度分别为 7.15、7.22、7.14 mg/ml, 平均质量浓度为 7.17 mg/ml; 柚皮苷提取率分别为 88.39%、87.86%、89.64%, 平均提取率为 88.63%。柚皮苷提取率均高于混合均匀试验最高值, 表明所选工艺合理、可行。

3 讨论

采用紫外-可见分光光度计对柚皮苷对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶液在 200~400 nm 范围内进行光谱扫描。结果显示, 柚皮苷对照品在 283 nm 波长处有最大吸收, 且阴性对照无干扰, 供试品在此波长处吸收明显, 故确定检测波长为 283 nm。

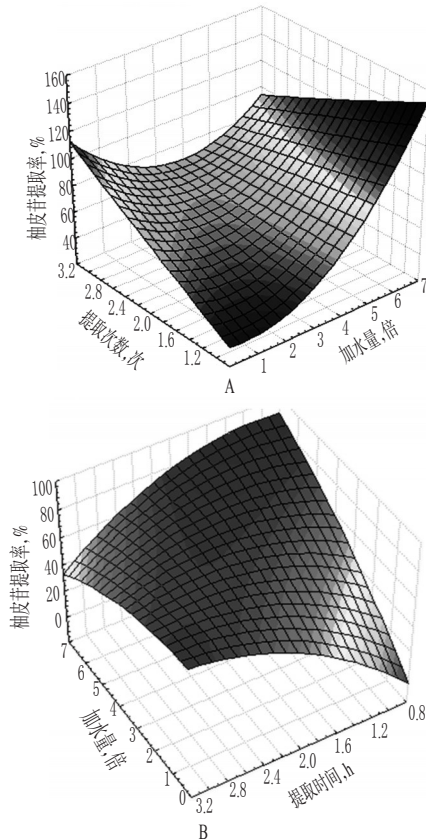


图2 三维效应面图

A.加水量与提取次数对柚皮苷提取率的影响;B.提取时间与加水量对柚皮苷提取率的影响

Fig 2 Three-dimensional response surface

A. effects of amount of water and extraction times on the extraction rate of naringin; B. effects of amount of water and the extraction time on extraction rate of naringin

笔者曾分别采用超声提取法和索氏回流提取法提取样品。结果,两种方法下柚皮苷含量没有显著性差异,结合实际情况,本试验采用超声提取法处理样品。

流动相采用甲醇-水梯度洗脱时,柚皮苷的系统适用性考察不理想,改为乙腈-水后,色谱参数得到较好的改善,故采用乙腈-水(20:80, V/V)作为流动相。

按照2010年版《中国药典》(一部)枳实药材项下规定,辛弗林为含量测定指标。但是,本处方已在临床上用于治疗疲劳相关疾病多年,疗效确切。且枳实为方中君药,前期试验表明,供试品中柚皮苷的含量远远大于橙皮苷,而黄酮类成分具有体外抗氧化及与抗疲劳相关的药理作用^[7],因此本试验采用柚皮苷作为控制枳苓六妙口服液质量标准的指标成分。

本试验采用混合均匀设计结合效应面法对各影响因素及其交互作用进行考察^[8],发现提取时间对柚皮苷的提取有显著性影响;加水量和提取次数的交互作用明显,而其主效应没有显著性差异。结合实际生产工艺条件,最终选择加18倍量水提取3次,每次1h,以此作为枳苓六妙口服液中药材最佳提取

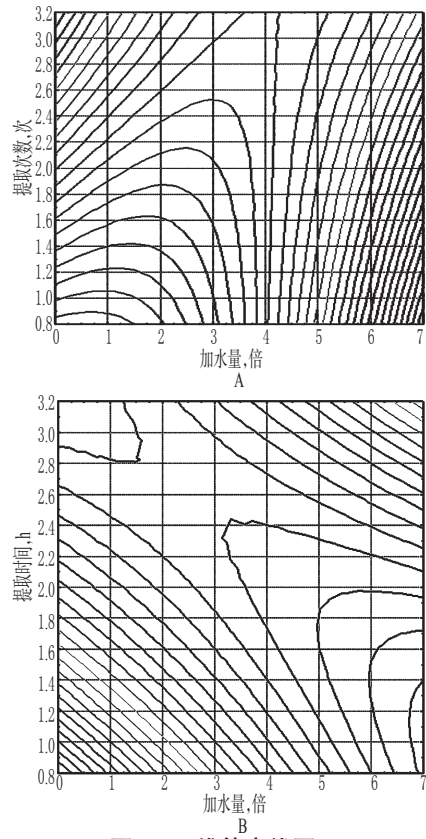


图3 二维等高线图

A.加水量与提取次数对柚皮苷提取率的影响;B.提取时间与加水量对柚皮苷提取率的影响

Fig 3 Two-dimensional contour map

A. effects of amount of water and extraction times on the extraction rate of naringin; B. effects of amount of water and extraction time on the extraction rate of naringin

工艺条件。

参考文献

- [1] 许天新,赵硕.铁皮枫斗晶抗疲劳作用检验[J].浙江预防医学,2002,14(11):80.
- [2] 付成国,文连奎,董然,等.轮叶党参化学成分与药理作用研究进展[J].中药材,2007,30(4):497.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:874.
- [4] 刘振丽,宋志前,张玲,等.枳实饮片中3类化学成分含量测定[J].中国中药杂志,2006,31(17):1425.
- [5] 方开泰.均匀设计与均匀设计表[M].北京:科学出版社,1994:117.
- [6] 石磊,张振巍.二次回归正交设计法优选黄芩苷醇提工艺[J].中药材,2011,34(12):1946.
- [7] 焦士蓉,马力,黄承钰,等.枳实提取物的体外抗氧化作用研究[J].中药材,2008,31(1):113.
- [8] 张振巍,石磊,白丹丹,等.混合均匀试验优选飞龙掌血散剂总生物碱提取工艺[J].中国药房,2012,23(39):2681.

(收稿日期:2013-03-22 修回日期:2013-06-14)