

星点设计-效应面法优选保肝降脂浸膏水提工艺^Δ

谢华阁*, 谢 辉#, 张兴德, 李昕阳, 顾 娇(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3285-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.07

摘要 目的: 优选保肝降脂浸膏水提工艺。方法: 以加水量与提取时间为自变量, 以多糖质量与浸出物得率为因变量, 通过对自变量各水平多元线性回归及二项式拟合, 采用星点设计-效应面法优选保肝降脂浸膏水提工艺。结果: 优选的最佳工艺条件为加15倍量水提取3次, 每次120 min。结论: 优选的保肝降脂浸膏水提工艺简单可行, 预测性良好。

关键词 星点设计; 黄精; 海藻; 多糖

Optimization of Water Extraction Technology for Lipid-lowering and Protective Liver Extract by Central Composite Design-response Surface Methodology

XIE Hua-ge, XIE Hui, ZHANG Xing-de, LI Xin-yang, GU Jiao (College of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize water extraction technology of Lipid-lowering and protective liver extract. METHODS: The water extraction technology of Lipid-lowering and protective liver extract was optimized by central composite design-response surface methodology through multiple linear regression and binomial fitting of independent variable were conducted using amount of added water and extraction time as independent variables and the content of polysaccharide and the yield of extract as dependent variables. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: adding 15-folds water, extracting time of 120 min and extracting for 3 times. CONCLUSIONS: The optimal water extraction technology of Lipid-lowering and protective liver extract is simple, feasible and highly predictive.

KEYWORDS Central composite design; Sealwort; Seaweed; Polysaccharide

保肝降脂方是临床经验方, 方中主要含黄精、海藻、炙僵蚕等药味, 具有补益肝脾、清热化湿、消痰祛瘀的功效, 临床用于治疗脂肪肝肝肾亏虚、湿热痰瘀互结证。现代药理研究结果表明, 黄精与海藻中多糖类成分具有良好的降血脂、抗动脉粥样硬化、抗病毒等作用^[1-5]。本试验对该浸膏进行了水提工艺研究, 优选合理可行的提取工艺条件。

1 材料

1.1 仪器

752型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); AY220型电子分析天平(日本Shimadzu公司); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验股份有限公司); LXJ-IIIB型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器制造厂)。

1.2 中药饮片

黄精(批号: 111030)、海藻(批号: 110219)、炙僵蚕(批号: 120702)等饮片均购自南京海源中药饮片有限公司, 经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为真品。

1.3 试剂

^Δ 基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(No. yxsk-2010)

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂。电话: 025-85811517。E-mail: xhg641@163.com

通信作者: 副教授。中药制剂。电话: 025-85811517。E-mail: njxh66@163.com

d-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-200904); 硫酸(分析纯, 上海中试化工总公司); 萘酮(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取方法

将黄精、海藻、僵蚕等药材粉碎(过一号筛), 各称取10 g, 置圆底烧瓶中, 加水回流提取3次, 合并滤液, 蒸发浓缩得浸膏。

2.2 浸提液中多糖含量的测定^[6]

2.2.1 溶液的制备 (1) 供试品溶液的制备: 取“2.1”项下水提液于60℃减压浓缩至100 ml, 加入乙醇使含醇量为75%, 静置冷藏, 6 000 ×g离心15 min。沉淀加水溶解并定容至1 000 ml量瓶中, 作为供试品溶液。(2) 对照品溶液的制备: 取经105℃干燥至恒质量的*d*-无水葡萄糖对照品90 mg, 精密称定, 置250 ml量瓶中, 加水溶解并定容, 摇匀, 即得(每1 ml中含*d*-无水葡萄糖0.36 mg)。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 ml, 分别置10 ml具塞刻度试管中, 分别加水定容至2.0 ml, 摇匀。在冰水浴中缓缓滴加0.2%萘酮-硫酸溶液至刻度, 混匀, 放冷后置水浴中保温10 min, 取出, 立即置冰水中冷却10 min, 取出, 以相应试剂为空白对照, 在582 nm波长处测定吸光度。以吸光度(*y*)为纵坐标, 质量浓度(*x*)为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 4.389 3x + 0.005 4$ ($r = 0.999 0$)。结果表明, 对照品检测质量浓度在0.018~0.108 mg/ml范围内

与吸光度呈良好线性关系。

2.2.3 多糖提取率的计算 取“2.2.1”项下供试品溶液,精密量取1 ml,置10 ml具塞干燥试管中,照“2.2.2”项下方法,自“加水至2.0 ml”起,依法测定吸光度,根据标准曲线计算供试品溶液中d-无水葡萄糖的质量(mg),计算多糖提取率。多糖提取率=供试品溶液中d-无水葡萄糖质量/饮片质量×100%。

2.3 浸出物得率的测定

精密吸取“2.1”项下溶液适量,于恒质量的蒸发皿中水浴蒸干,并于烘箱中105℃干燥3 h,迅速取出置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量,计算浸出物得率。

2.4 单因素试验

2.4.1 提取次数对多糖提取率的影响 固定提取时间为90 min,加水量为10倍,分别提取1、2、3、4次,测定多糖提取率。结果,提取第1次为1.14%,第2次为0.29%,第3次为0.19%,第4次为0.075%。由以上数据可知,提取3次时,多糖提取率已达到95%以上,故提取次数选为3次。

2.4.2 加水量对多糖提取率的影响 固定提取时间为90 min,提取次数为3次,加水量分别为10、15、20、25倍,测定多糖提取率。结果表明,适当增加加水量可以提高多糖提取率。加水量对多糖提取率的影响见图1。

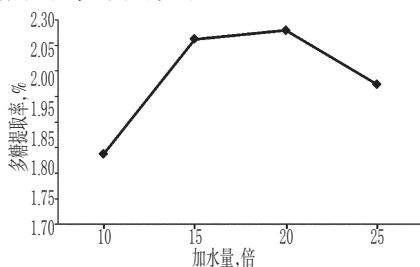


图1 加水量对多糖提取率的影响

Fig 1 Effects of the amount of added water on the extraction rate of polysaccharide

2.4.3 提取时间对多糖提取率的影响 固定加水量为10倍,提取次数为3次,提取时间分别为30、60、90、120、150 min,测定多糖提取率。结果表明,延长提取时间可以提高多糖提取率。提取时间对多糖提取率的影响见图2。

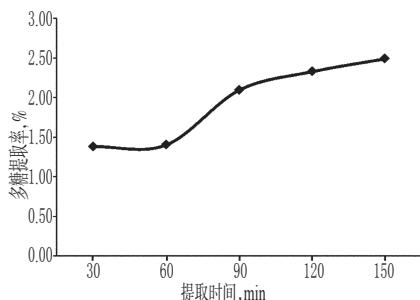


图2 提取时间对多糖提取率的影响

Fig 2 Effect of extraction time on the extraction rate of polysaccharide

2.5 星点设计-效应面试验

2.5.1 星点设计试验安排 根据星点设计原理,综合上述单因初步考察结果,将加水量(X_1)与提取时间(X_2)作为主要考察因素,根据预试验分别设定其范围,即 X_1 在9~20倍范围内, X_2

在60~150 min范围内。提取次数为非连续变量,难以进行回归分析,提取次数定为3次,以多糖质量(Y_1)与浸出物得率(Y_2)为指标,采用二因素五水平的星点设计-效应面法优选处方最佳提取工艺。因素与水平见表1;星点设计-效应面试验安排与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素	
	X_1 , 倍	X_2 , min
-1.414	9.00	60.00
-1	10.61	73.18
0	14.5	105.00
1	18.39	136.82
1.414	20.00	150.00

表2 星点设计-效应面试验安排与结果

Tab 2 Experimental arrangement and results of central composite design-response surface methodology

序号	X_1	X_2	Y_1	Y_2
1	14.50	105.00	802.684 6	40.87
2	14.50	105.00	793.183 5	37.38
3	14.50	105.00	1 039.326 7	34.29
4	18.39	73.18	971.148 4	31.16
5	10.61	136.82	910.535 7	35.58
6	18.39	136.82	998.063 8	41.20
7	14.50	60.00	501.150 9	31.84
8	20.00	105.00	821.093 0	38.42
9	9.00	105.00	917.924 2	33.77
10	14.50	105.00	861.509 8	38.75
11	14.50	105.00	735.568 7	32.82
12	14.50	150.00	1045.152 3	32.56
13	10.61	73.18	577.749 2	35.36

2.5.2 模型拟合 采用Statistica 7.0软件对试验结果进行多元线性回归及二项式拟合。多元线性回归方程为: $Y_1 = 257.591 + 15.647X_1 - 2.621X_2$ ($r=0.863 2$), $Y_2 = 34.769 - 0.287X_1 + 0.042 5X_2$ ($r=0.776 4$)。二元多项式方程为: $Y_1 = -933.495 + 118.206X_1 - 3.337X_1^2 + 12.302X_2 - 0.042X_2^2 - 0.055X_1X_2$ ($r=0.984 1$), $Y_2 = 14.372 + 1.152 25X_1 - 0.076 1X_1^2 + 0.273X_2 - 0.001 6X_2^2 + 0.007 32X_1X_2$ ($r=0.854 2$)。由此可知,二项式拟合的相关系数均优于多元线性回归方程,并且拟合度良好。

2.5.3 方差分析和显著性检验 采用二项式拟合方程,其相关系数说明模型拟合度良好。 $P < 0.05$ 表示该项指标影响显著, $P < 0.01$ 表明加水量与提取时间均对多糖的提取影响显著,而对浸出物得率影响不显著。方差分析结果见表3、表4。

2.5.4 效应面优化与预测 根据拟合方程作效应面和等高线(见图3、图4),由两幅等高线图可知,指标不同则最优条件的区域不同,因此用Statistica 7.0软件对两幅等高线图进行重叠处理(见图5)。通过直观分析可见,加水量在14~17倍,提取时间在110~130 min时,两种指标均达到高值。

2.6 工艺验证试验

根据上述最佳工艺条件,结合单因素考察结果和实际可操作性,确定降脂保肝浸膏水提工艺的最优提取条件为:加水量为15倍,提取时间为120 min,提取3次。按照此工艺平行进行3次验证试验,结果见表5[表中偏差=(预测值-实际值)/

预测值×100%]。

表3 多糖质量方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
X_1	29 629.3	1	29 629.35	56.628 5	0.000 134
X_1^2	17 726.5	1	17 726.50	33.879 4	0.000 650
X_2	55 634.1	1	55 634.07	106.329 5	0.000 017
X_2^2	12 759.7	1	12 759.66	24.386 7	0.001 678
X_1X_2	185.9	1	185.93	0.355 4	0.569 864
误差	3 662.6	7	523.22		
总离差	116 137.3	12			

表4 浸出物得率方差分析结果

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
X_1	9.999 0	1	9.999 0	3.594 8	0.099 80
X_1^2	9.225 5	1	9.225 5	3.316 8	0.111 4
X_2	14.662 9	1	14.662 9	5.271 6	0.055 31
X_2^2	18.342 6	1	18.342 6	6.594 6	0.037 12
X_1X_2	3.279 4	1	3.279 4	1.179 0	0.313 5
误差	19.470 3	7	2.781 5		
总离差	72.006 9	12			

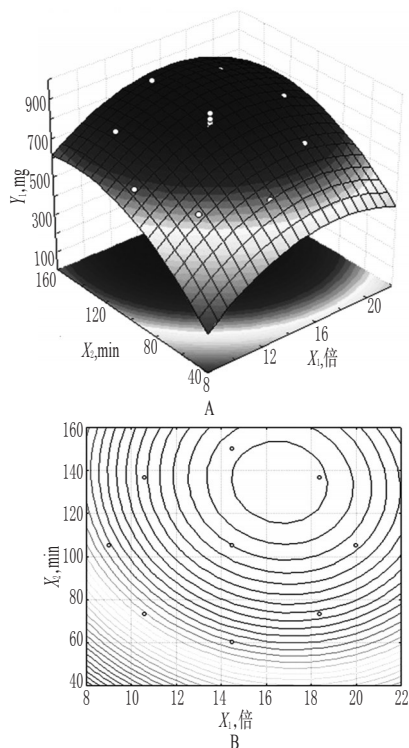


图3 加水量与提取时间对多糖质量影响的三维效应面与等高线图

A.加水量与提取时间对多糖质量影响的三维效应面图;B.加水量与提取时间对多糖质量影响的等高线图

Fig 3 3D response map and contour map of the effects of the amount of added water and extraction time on polysaccharide content

A.3D response map of the effects of the amount of added water and extraction time on polysaccharide content; B.Contour map with cumulative dissolution of the effects of the amount of added water and extraction time on polysaccharide content

3 讨论

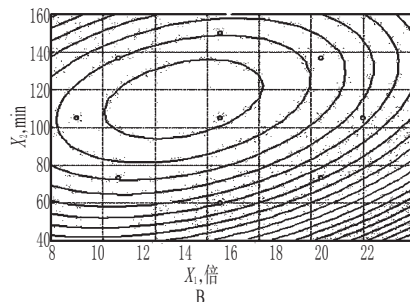
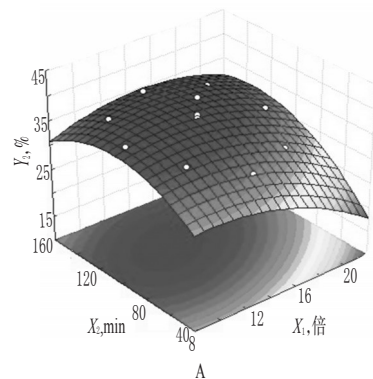


图4 加水量与提取时间对浸出物得率影响的三维效应面与等高线图

A.加水量与提取时间对浸出物得率影响的三维效应面图;B.加水量与提取时间对浸出物得率影响的等高线图

Fig 4 3D response map and contour map of the effects of the amount of added water and extraction time on polysaccharide content

A.3D response map of the effects of the amount of added water and extraction time on the yield of extract; B.Contour map with cumulative dissolution of the effects of the amount of added water and extraction time on the yield of extract

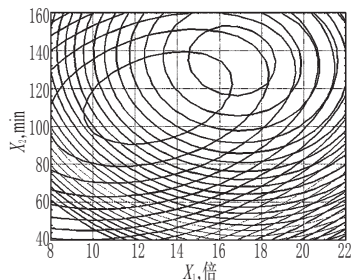


图5 多糖质量与浸出物得率等高线重叠图

Fig 5 Contour overlap map of the polysaccharide content yield of extract

表5 验证试验结果

Tab 5 Results of validation tests

编号	多糖质量,mg	浸出物得率,%
1	857.796 3	38.25
2	863.200 6	36.73
3	859.372 1	37.26
平均值	860.123 0	37.41
预测值	861.21	37.45
RSD,%	0.32	2.06
偏差,%	0.13	0.10

星点设计又称中心组合设计,是一种多因素五水平的试验设计,它是在二水平析因设计的基础上加极值点、中心点组

正交试验优选正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺[△]

蔡小玲*, 秦贻强, 莫庆优, 陈越(桂林医学院附属医院药学部, 广西 桂林 541001)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3288-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.08

摘要 目的: 优选正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺条件。方法: 以丹皮酚含量为评价指标, 加水量、煎煮时间、煎煮次数为考察因素, 通过正交试验对正骨洗剂中丹皮酚的提取工艺进行优选。结果: 优选的最佳工艺条件为加12倍的水煎煮提取2次, 每次2 h。结论: 优选的提取工艺稳定可行、操作方便, 为正骨洗剂的制备提供了试验依据。

关键词 正骨洗剂; 提取工艺; 丹皮酚; 正交试验

Optimization of the Extraction Technology of Paeonol in Bonesetting Lotion

CAI Xiao-ling, QIN Yi-qiang, MO Qing-you, CHEN Yue (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guangxi Guilin 541001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Paeonol in Bonesetting lotion. METHODS: The extraction technology of Paeonol in Bonesetting lotion was optimized by orthogonal test with paeonol content as the index, using the amount of added water, decocting time and decocting times as factors. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows: 12-fold water, decocting for 2 times, 2h every time. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is feasible and easy in operation, and can provide reference for the preparation of Bonesetting lotion.

KEYWORDS Bone setting lotion; Extraction technology; Paeonol; Orthogonal test

成的。按星点设计表安排试验后, 对试验结果借助计算机统计软件SPSS、SAS、Statistic等进行多元回归和非线性估计, 以建立拟合度好、相关性高的回归模型, 并结合效应面法描绘三维效应面或二因素的等高线图, 从中获得最佳工艺参数范围^[7-8]。

星点设计-效应面法能反映出连续自变量的改变对考察指标的影响, 精确度更高, 现已广泛用于药学研究领域。曲面的变化趋势反映了自变量对考察指标的影响程度, 曲面越陡峭影响越显著, 反之越平滑影响越小。本试验的自变量均为连续变量, 可选择星点设计-效应面法设计试验, 对于非连续变量可分别考察。

对多糖质量的测定多以 d -无水葡萄糖为对照品, 采用苯酚-硫酸法或蒽酮-硫酸法等。苯酚易氧化, 且毒性较大^[9], 故本试验采用蒽酮-硫酸法测定。测定波长文献报道不一, 黄精多糖的含量测定, 有文献报道采用蒽酮-硫酸法, 测定波长为625 nm^[10]; 2010年版《中国药典》中, 黄精饮片中多糖的测定波长为582 nm^[6]。本方为复方, 成分之间的相互影响导致其最大吸收波长发生变化, 故在测定样品的吸光度之前要进行全波长扫描以确定最大吸收波长。本试验以 d -无水葡萄糖作为对照品, 与水提样品溶液均采用蒽酮-硫酸法处理, 在400~700 nm波长范围内扫描, 最终确定最大吸收波长为582 nm。

参考文献

- [1] 李友元, 邓红波, 向大雄, 等. 黄精多糖的降血脂及抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(4): 429.
- [2] 胡敏, 王琴, 周晓东, 等. 黄精药理作用研究进展及其临床应用[J]. 广东药学, 2005, 15(5): 68.
- [3] 张华锋, 高征, 罗亚飞, 等. 海藻子活性多糖降血脂作用的研究[J]. 中成药, 2009, 31(12): 1 925.
- [4] 谢苗, 钟剑霞, 甘纯玢. 海藻多糖的药用功能与展望[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(8): 513.
- [5] 胡婷婷. 海藻多糖的生物活性研究进展[J]. 科技视界, 2012(36): 17.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 288.
- [7] 王跃生, 欧阳旭, 王丹辉, 等. 数学模式试验设计方法的优缺点比较及其在中药研究应用中的适宜性分析[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(2): 207.
- [8] 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.
- [9] 苏玉顺, 李艳君, 赵方振, 等. 紫外-可见分光光度法在植物多糖含量测定中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3): 1 101.
- [10] 徐艳, 曹松屹, 边际. 超声粉碎与传统方法提取黄精多糖的分析比较[J]. 食品研究, 2008, 29(3): 99.

(收稿日期: 2013-10-27 修回日期: 2014-03-23)

[△] 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(No. GZYZ1226)

* 副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0773-2837023。

E-mail: 516442235@qq.com