

星点设计-效应面法优化解毒通络颗粒的提取工艺

王倩倩^{1,2}, 王锦玉¹, 马振山¹, 王琳¹, 陈贝贝^{1,2}, 全燕^{1*}
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优选解毒通络颗粒的提取工艺。方法: 选择浸泡时间、煎煮时间和溶剂用量为自变量, 黄芩苷、槲皮素、异鼠李素提取量的综合评分为因变量, 在单因素试验基础上, 采用星点设计-效应面法优选提取工艺, 通过 SPSS 软件对试验数据进行多元线性模型和二次多项式模型拟合, 确定最佳数学模型, 利用 Design Expert 8.0.0 统计分析软件绘制效应面图和等高线图。结果: 最佳提取工艺为浸泡时间 90 min, 煎煮时间 85.63 min, 溶剂用量 9.21 倍; 综合评分 $(93.2 \pm 0.051)\%$, 与预测值 (94.30%) 的偏差仅 -2.32%。结论: 通过星点设计-效应面法建立的模型预测性良好, 适用于解毒通络颗粒提取工艺的优选。

[关键词] 黄芩苷; 槲皮素; 异鼠李素; 星点设计-效应面法; 解毒通络颗粒; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 09-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000045.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 11:24

Optimization of Extraction Process of Jiedu Tongluo Particles by Central Composite Design-Response Surface Methodology

WANG Qian-qian^{1,2}, WANG Jin-yu¹, MA Zhen-shan¹, WANG Lin¹, CHEN Bei-bei^{1,2}, TONG Yan^{1*}
(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of Jiedu Tongluo particles. **Method:** Based on single factor tests, central composite design-response surface methodology was applied to optimize extraction process with soaking time, decoction time and solvent amounts as independent variables, while composite score of extraction amounts of baicalin, quercetin and isorhamnetin as dependent variable. SPSS software was used to fit multivariate linear equation and second-order polynomial equation for experimental data, response surface and

[收稿日期] 20131127(015)
[基金项目] 国家“重大新药创制”专项(2012ZX09103201-015)
[第一作者] 王倩倩, 在读硕士, 从事中药制剂分析研究, Tel: 18810101746, E-mail: 1648269556@qq.com
[通讯作者] * 全燕, 研究员, 从事中药制剂研究, Tel: 010-84027721, E-mail: tongyan1012@sohu.com

[3] 李倩楠, 葛晓群. 黄芩苷及黄芩复方制剂解热机制研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(5): 342.

[4] 王瑞婷, 关丽华, 周健, 等. 黄芩茎叶总黄酮对 AB_{25-35} 致大鼠学习记忆损伤及海马抗氧化酶活性的影响[J]. 神经药理学报, 2011, 1(2): 14.

[5] 毛捷, 徐善水, 盛莉莉, 等. 黄芩素的抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(10): 1178.

[6] 王健, 刘汉清, 李振国, 等. 黄芩苷固体分散体的制备及体外溶出研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 23.

[7] 蒋艳荣, 张振海, 陆艳, 等. 丹参酮 II_A 二元载体固体分散体的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1383.

[8] 邬瑞光, 罗俊杰, 高晓燕, 等. 黄芩苷固体分散体的制备及差示扫描量热研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 25.

[责任编辑 刘德文]

contour plot were delineated according to best-fit mathematic models by Design Expert 8.0.0 statistic analysis software. **Result:** Optimum extraction process was as follows: soaking time 90 min, decoction time 85.63 min, the amount of solvent 9.21 times; Composite score was $(93.2 \pm 0.051)\%$, which had deviation of -2.32% with the predicted value of 94.30% . **Conclusion:** Model established by central composite design-response surface methodology had good predictability, which was suitable for optimizing extraction process of Jiedu Tongluo particles.

[**Key words**] baicalin; quercetin; isorhamnetin; central composite design-response surface methodology; Jiedu Tongluo particles; single factor test

解毒通络颗粒为临床经验方,由银杏叶、黄芩、栀子、川芎等药味组成,具有益气活血、解毒开郁、熄风通络的功效,临床用于治疗中风恢复期气虚血瘀风痰瘀毒阻络证,症见半身不遂、口舌歪斜、情志抑郁等。现代医学认为银杏叶治疗冠心病、脑血栓等心脑血管疾病效果较好,银杏总黄酮具有扩张冠状血管、改善血清胆固醇与磷脂的比例、抑制和逆转肝纤维化形成等作用^[1];黄芩苷可抑制多种病毒^[2]。本实验以槲皮素、异鼠李素和黄芩苷提取量的综合评分为指标,采用星点设计-效应面法优选解毒通络颗粒提取工艺,为该制剂的临床应用提供参考。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), BSA224S-CW 型 1/万和 BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司), PTHW 型电热套(巩义市予华仪器有限责任公司)。银杏叶、黄芩、栀子等药材均购自北京市卫仁中药饮片厂,经本所何希荣老师鉴定均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求;槲皮素、异鼠李素、黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100081-200406,110860-201109,110715-201016),甲醇为优级纯,水为娃哈哈饮用纯净水,其他试剂均为分析纯。

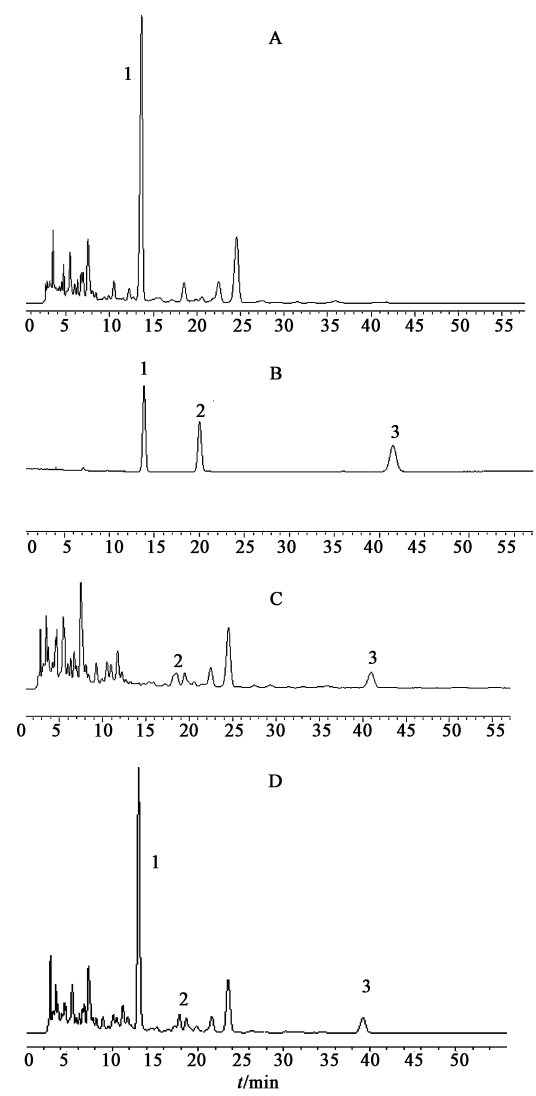
2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定^[3]

2.1.1 色谱条件 月旭拓普 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-0.4% 磷酸溶液(47:53), 检测波长 360 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL。理论板数按槲皮素峰计算应不低于 2 500, 见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷、槲皮素、异鼠李素对照品适量,加甲醇制成质量浓度依次为 140,30,20 mg·L⁻¹的混合溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密量取样品煎出液 10 mL,水浴浓缩至半干,加少量水转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。



A. 缺银杏阴性样品; B. 对照品; C. 缺黄芩阴性样品; D. 供试品;
1. 黄芩苷; 2. 槲皮素; 3. 异鼠李素

图 1 解毒通络颗粒 HPLC

2.1.4 标准曲线的绘制 精密称取干燥至恒重的黄芩苷、槲皮素、异鼠李素对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 117.6,14.4,10.8 mg·L⁻¹的混合溶液,分别进样 2,4,6,8,10,12,14,16,18,20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰

面积为纵坐标,得回归方程分别为 $Y = 427\,832.535X - 19\,138.267$ ($r = 0.999\,8$), $Y = 3\,937\,841.961X - 15\,029.067$ ($r = 0.999\,9$), $Y = 2\,614\,278.404X - 49\,933.511$ ($r = 0.999\,9$),线性范围分别为 $0.24 \sim 2.3$, $0.03 \sim 0.29$, $0.043\,2 \sim 0.216\,\mu\text{g}$ 。

2.2 单因素试验考察 通过查阅文献及预试验确定影响提取工艺的因素包括浸泡时间、煎煮时间、煎煮次数及溶剂用量等,以黄芩苷、槲皮素、异鼠李素提取量的综合评分为指标,权重系数分别为 0.4 , 0.3 , 0.3 。

2.2.1 浸泡时间 称取2倍处方量的药材4份,加10倍量水分别浸泡0,30,60,90 min,煎煮2次,每次60 min,合并煎煮液,静置,滤过,取样,按**2.1.1**项下色谱条件测定,结果综合评分依次为43.24%,64.45%,86.03%,62.87%,故选择浸泡时间60 min为中心点。

2.2.2 煎煮时间 称取2倍处方量的药材4份,加10倍量水浸泡60 min,煎煮2次,煎煮时间分别为30,60,90,120 min,合并煎煮液,静置,滤过,取样,按**2.1.1**项下色谱条件测定,结果综合评分依次为56.83%,70.45%,69.82%,70.87%,故选择煎煮时间90 min为中心点。

2.2.3 溶剂用量 称取2倍处方量药材4份,分别加6,8,10,12倍量水浸泡60 min,煎煮2次,每次煮60 min,合并煎煮液,静置,滤过,取样,按**2.1.1**项下色谱条件测定,结果综合评分依次为69.99%,80.42%,82.56%,84.14%,故选择溶剂用量10倍为中心点。

2.2.4 煎煮次数 称取2倍处方量药材4份,加10倍量水浸泡60 min,分别煎煮1,2,3,4次,每次60 min,合并煎煮液,静置,滤过,取样,按**2.1.1**项下色谱条件测定,结果综合评分依次为53.59%,86.05%,83.43%,63.55%,故选择煎煮数为2次。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 星点试验设计^[4-5] 因为煎煮次数为非连续变量,在数据处理中比较困难,在单因素试验基础上,结合预试验和实际情况暂定为2次。选择浸泡时间、煎煮时间和溶剂用量为考察因素进行中心组合设计(取中心点为5),以黄芩苷、槲皮素、异鼠李素提取量的综合评分为响应值,采用Design Expert 8.0.0 统计分析软件进行数据拟合,因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

2.3.2 模型拟合 采用SPSS 软件对试验数据进行

表1 解毒通络颗粒提取工艺星点试验因素水平

水平	X_1	X_2	X_3
	浸泡时间/min	煎煮时间/min	溶剂用量/倍
-1	30	60	8
0	60	90	10
1	90	120	12

多元线性模型和二次多项式模型拟合,得多元线性回归方程 $Y = 22.541 + 0.132X_1 + 0.026X_2 + 5.353X_3$ ($P = 0.026$),虽然该模型通过检验,但拟合度不佳($r = 0.706$),预测性较差,即多元线性模型不适合;采用二项式拟合得回归方程 $Y = -204.441 + 0.893X_1 + 1.516X_2 + 42.151X_3 - 0.003\,761\,X_1X_2 + 0.024X_1X_3 + 0.015X_2X_3 - 0.005\,135\,X_1^2 - 0.007\,699\,X_2^2 - 2.476X_3^2$ ($r = 0.948\,3$),说明方程拟合度和可信度均较好,可采用此模型对提取工艺进行分析和预测,方差分析见表3。结果显示因素 X_3 差异极显著,因素 X_1 , X_2 差异不显著,交互项均不具有显著性差异,二次项 X_3^2 差异极显著, X_1^2 , X_2^2 差异不显著;表明溶剂用量对提取工艺具有显著性影响,3个考察因素间不存在交互作用,各因素的主效应关系为 $X_3 > X_2 > X_1$ 。

表2 解毒通络颗粒提取工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	黄芩苷 /mg	槲皮素 /mg	异鼠李素 /mg	综合 评分
1	0	0	0	373.83	3.62	4.62	83.45
2	-1	0	-1	301.42	2.21	2.57	55.47
3	0	0	0	409.19	4.03	4.01	85.63
4	0	1	1	428.38	3.64	3.99	84.34
5	0	0	0	389.99	3.51	5.08	86.73
6	0	1	-1	320.77	2.55	3.4	64.35
7	1	1	1	487.52	4.06	3.58	89.73
8	-1	-1	0	335.02	3.54	3.25	71.60
9	1	-1	0	359.51	3.93	4.64	84.57
10	1	0	-1	352.4	2.54	2.6	62.17
11	-1	1	0	355.46	2.97	3.45	70.45
12	0	-1	-1	330.25	2.05	2.31	55.17
13	0	0	0	401.61	3.92	4.16	85.12
14	0	0	0	384.92	4.26	4.38	87.45
15	-1	0	1	412.41	2.59	4.26	77.23
16	1	1	0	338.04	2.79	3.81	69.88
17	0	-1	1	318.66	3.44	3.58	71.51

2.3.3 工艺参数优化和预测 将因变量与另外两因素拟合为三维曲面图,因只能表达含2个因素变

表 3 解毒通络颗粒提取工艺二项式回归模型系数显著性检验					
方差来源	SS	F	MS	F	P
模型	1 882. 33	9	209. 15	6. 79	0. 009 7
X_1	124. 82	1	124. 82	4. 05	0. 083 9
X_2	4. 76	1	4. 76	0. 15	0. 705 9
X_3	916. 99	1	916. 99	29. 79	0. 000 9
X_1X_2	45. 83	1	45. 83	1. 49	0. 261 9
X_1X_3	8. 41	1	8. 41	0. 27	0. 617 3
X_2X_3	3. 33	1	3. 33	0. 11	0. 751 8
X_1^2	89. 94	1	89. 94	2. 92	0. 131 1
X_2^2	202. 17	1	202. 17	6. 57	0. 037 4
X_3^2	413. 03	1	413. 03	13. 42	0. 008 0
残差	205. 95	7	205. 95		
总差	2 097. 81	16	2 097. 81		

量的函数,故固定 3 个影响因素之一为中值,将中心点值代入二次回归模型方程得到新方程,根据新模型方程得到效应面三维图,结果见图 2~4,经过中心组合设计优化提取条件,确定最佳提取工艺参数为浸泡时间 90 min,煎煮时间 85. 63 min,溶剂用量 9. 21 倍,得理论预测值 94. 30%。

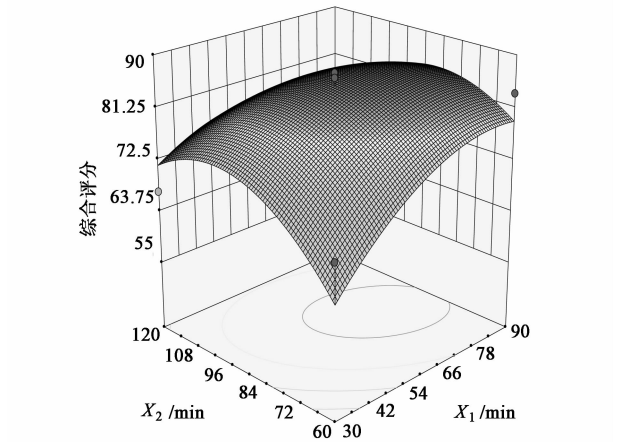


图 2 综合评价对浸泡时间和煎煮时间的三维效应面和二维等高线

2. 3. 4 验证试验 称取 2 倍处方量的药材,按优选的提取工艺进行 3 次验证试验,按 2. 1. 1 项下色谱条件测定黄芩苷、槲皮素、异鼠李素含量($\bar{x} \pm s$),计算综合评分(93. 2±0. 051)%,RSD 0. 83%,预测值与真实值间的偏差仅-2. 32%。

3 讨论

预试验采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行提取工艺优选,得最佳提取工艺为加 10 倍量水提取 3 次,每次

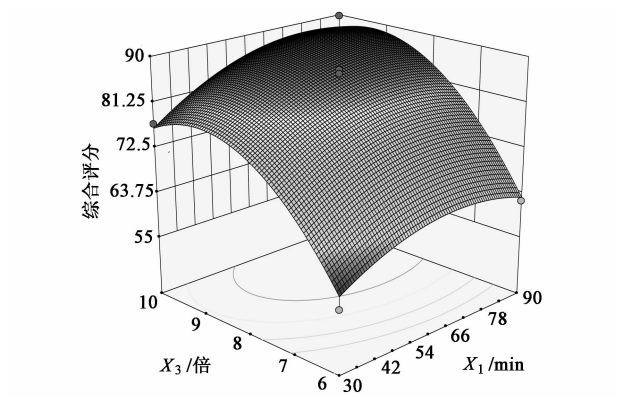


图 3 综合评价对浸泡时间和溶剂量的三维效应面和二维等高线

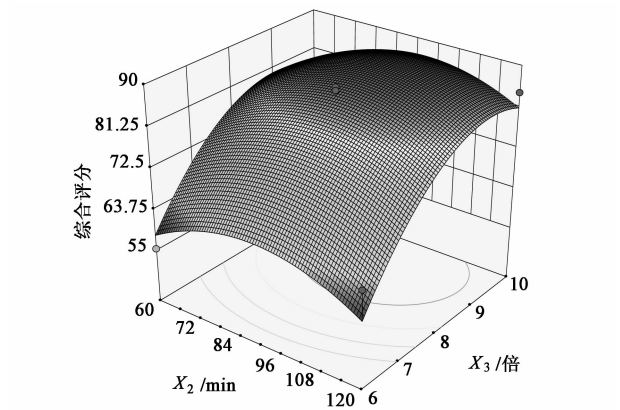


图 4 综合评价对煎煮时间和溶剂量的三维效应面和二维等高线

60 min,计算综合评分 95. 44%,说明试验设计和结果处理的方法不同,得到的结论各不相同。正交设计存在试验次数少、数据处理及操作均较方便等特点;星点设计-效应面法是通过非线性模型拟合得出最佳条件,解决了正交设计的不足。

[参考文献]

[1] 陈西娟,王成章,叶建中. 银杏叶化学成分及其应用研究进展[J]. 生物质化学工程,2008,42(4):57.
[2] 刘雄,高建德. 黄芩研究进展[J]. 甘肃中医学院学报,2007,24(2):46.
[3] 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,2010:297.
[4] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学药学分册,2000,27(5):292.
[5] 张婷,谢军波,张彦青,等. 星点设计-效应面法优化酸枣仁黄酮滴丸的制备工艺[J]. 中国药学杂志,2013,48(2):123.

[责任编辑 刘德文]