

星点设计-效应面法优化龙须藤的大孔树脂纯化工艺

赵永恒,周毅生*,王嵩,林丽微
(广东药学院,广州 510006)

〔摘要〕 目的:优选 D-101 型大孔树脂纯化龙须藤的工艺条件。方法:采用 HPLC 测定 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮(黄酮 1)和 3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮(黄酮 2)含量,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~20 min,30%~40% A; 20~36 min,40%~48% A),检测波长 324 nm。以黄酮 1 和黄酮 2 洗脱率和纯度的“总评归一值”为因变量,上样液质量浓度、乙醇体积分数和用量为自变量,通过星点试验对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合,利用效应面法优选纯化工艺并进行预测分析。结果:二次多项式拟合的相关系数明显优于多元线性回归方程,最佳纯化工艺参数为上样液质量浓度 0.11 g·mL⁻¹,洗脱剂乙醇体积分数 84.41%,乙醇用量 13.94 BV;黄酮 1 和黄酮 2 平均洗脱率分别为 78.45% (RSD 0.32%),78.55% (RSD 0.33%),纯度依次为 1.14% (RSD 0.88%),0.67% (RSD 1.49%)。结论:通过星点设计-效应面法优选的龙须藤大孔树脂纯化工艺稳定可行,预测性好。

〔关键词〕 龙须藤;星点设计-效应面法;D101 型大孔树脂;3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮;3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮;总评归一值

〔中图分类号〕 R283.6;R284.2 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)09-0036-05
〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfx.2014090036
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfx.2014090036.html>
〔网络出版时间〕 2014-02-25 13:52

Optimization of Macroporous Resin Purification Process for *Bauhinia championii* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHAO Yong-heng, ZHOU Yi-sheng*, WANG Song, LIN Li-wei
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To optimize purification technology of *Bauhinia championii* with D-101 macroporous resin. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxy flavone (flavone 1) and 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxy flavone (flavone 2) with mobile phase of acetonitrile (A) -water (B) gradient elution (0-20 min, 30%-40% A; 20-36 min, 40%-48% A) and detection wavelength of 324 nm. Taking overall desirability of desorption rates and purities of flavone 1 and flavone 2 as dependent variable, while the concentration of sample solution, ethanol concentration and volume as independent variables, multiple linear regression and binomial fitting of each level of independent variables was handled by central composite design, response surface methodology was adopted to optimize technological parameters. **Result:** Quadratic equation described relationship between dependent and independent variables was obviously better than multiple linear regression equation. Optimum technological parameters were as following: sample concentration 0.11 g·mL⁻¹, ethanol concentration 84.41%, eluent volume 13.94 BV; Average elution rates of flavone 1 and flavone 2 were 78.45% (RSD 0.32%) and 79.55% (RSD 0.33%), purities were 1.14% (RSD 0.88%) and 0.67% (RSD 1.49%). **Conclusion:** Optimized purification technology was

〔收稿日期〕 20130830(007)
〔第一作者〕 赵永恒,硕士,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:13751764885,E-mail:yonghengzhao@126.com
〔通讯作者〕 *周毅生,教授,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:020-39352168,E-mail:yishzhou@aliyun.com

feasible and stable with good predictability.

[**Key words**] *Bauhinia championii*; central composite design-response surface methodology; D101 macroporous resin; 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxy flavone; 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxy flavone; overall desirability

龙须藤别名过江龙、九龙藤等,具有祛风除湿、行气活血的功效,临床用于治疗风湿痹痛、中风偏瘫、胃脘胀痛等症^[1],主要成分为黄酮类化合物,另外还含有原花青素类、挥发油、糖类及没食子酸等成分。现代药理研究表明,龙须藤提取物显示出较强的抗炎、镇痛、抗血小板凝集^[2-4]等活性。本实验采用星点设计-效应面法优选龙须藤的大孔树脂纯化工艺,以提高药效成分的纯度,为龙须藤制剂的开发提供参考。

1 材料

2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),AY120 型电子天平(日本岛津),LG-04 型中药粉碎机(瑞安市百信药机械厂),GZX-9240 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

龙须藤药材购自广东清平药材市场,经广东药学院生药教研室李书渊教授鉴定为豆科植物龙须藤 *Bauhinia championii* (Benth.) Benth. 的干燥藤茎; 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮(黄酮 1),3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮(黄酮 2)(自制,纯度均为 98.0%), D101, AB-8, HPD100, HPD450, HPD750, HPD722 型大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),乙腈为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 上样液的制备 取龙须藤药材粉碎,加 14 倍量 45% 乙醇回流提取 2 次,每次 116 min,抽滤,取滤液减压浓缩至无醇味,加水制成 0.5 g·mL⁻¹ 的母液,上柱时根据试验设计加水稀释得上样液。

2.2 干浸膏质量的测定 取适量预处理好的 D101 型大孔树脂,取适当质量浓度的药液按 1.5 g·mL⁻¹ (药材-树脂) 上样,吸附流速 2 BV·h⁻¹,加水 5 BV 除杂,加一定体积分数乙醇以 2 BV·h⁻¹ 的速率进行洗脱,收集洗脱液并加相应体积分数乙醇定容至 250 mL,精密量取 50 mL 置蒸发皿中,水浴挥干乙醇,于干燥箱内烘至恒重。

2.3 3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮,3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮的含量测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-水 (B)

梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 30% ~ 40% A; 20 ~ 36 min, 40% ~ 48% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 324 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 15 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄酮 1 (11.16 mg) 和黄酮 2 (9.84 mg), 分别加甲醇定容至 10 mL, 依次精密量取 3, 1.5 mL 至同一 100 mL 量瓶中, 加甲醇制成质量浓度分别为 33.48, 14.76 mg·L⁻¹ 的混合溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密量取乙醇洗脱液 5 mL, 水浴挥干溶剂, 加甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得黄酮 1 和黄酮 2 回归方程分别为 $Y = 3\,184.5X - 99\,744$ ($R^2 = 0.999\,9$), $Y = 3\,521.2X - 23\,071$ ($R^2 = 0.999\,9$), 线性范围依次为 66.96 ~ 837, 29.52 ~ 369 ng。

2.3.5 精密度试验 取混合对照品溶液按 2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 结果黄酮 1 和黄酮 2 峰面积的 RSD 分别为 0.95%, 2.28%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24 h 进样, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果黄酮 1 和黄酮 2 峰面积的 RSD 分别为 2.40%, 1.15%, 说明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.3.7 重复性试验 取同一母液, 按 2.3.3 项下方法平行制备供试品 6 份, 依 2.3.1 项下色谱条件进行测定, 结果两种多甲氧基黄酮峰面积的 RSD 分别为 1.77%, 0.95%, 表明该方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 量取同一上样液 5 mL, 共 9 份, 精确加入上样液中成分含量 80%, 100%, 120% 的对照品, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果黄酮 1 和黄酮 2 的回收率分别为 98.95% (RSD 1.99%), 102.10% (RSD 1.49%)。

2.4 纯化工艺的优选

2.4.1 单因素试验 通过对 6 种型号 (D101, AB-8, HPD100, HPD450, HPD750, HPD722) 大孔树脂进行

筛选,结果表明 D101 型大孔树脂对黄酮 **1** 和黄酮 **2** 具有较佳的吸附和洗脱效果。经动态吸附试验考察表明,黄酮 **1** 在 4 BV 时已有 9.92% 的泄漏,黄酮 **2** 在 6 BV 时已有 9.18% 的泄漏,综合考虑,确定上样量 4 BV,换算成药材的量为 1.5 g·mL⁻¹ (药材-树脂)。

2.4.2 星点试验 取处理好的 D101 大孔树脂 15 mL,考察上样液质量浓度、洗脱液乙醇体积分数及洗脱液用量对黄酮 **1** 和黄酮 **2** 洗脱率和纯度的影响,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。数据处理采用“归一化法”,运用 Hassan^[5]方法分别对各指标进行数学转换求“归一值”(d_{max}),计算公式为 d_{max} = (Y_i - Y_{min})/(Y_{max} - Y_{min}),计算“总评归一值

(OD)”,计算公式为 $OD = (d_1 \cdot d_2 \cdots d_n)^{1/n}$ (n 为指标数)。

表 1 龙须藤提取工艺星点设计因素水平

	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃
水平	上样液质量 浓度/g·mL ⁻¹	乙醇体积 分数/%	乙醇用量 /BV
-1.682	0.1	50	4
-1	0.18	58.11	6.03
0	0.3	70	9
1	0.42	81.89	11.97
1.682	0.5	90	14

表 2 龙须藤提取工艺星点试验安排

No.	<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	黄酮 1 洗脱率/%	黄酮 1 纯度/%	黄酮 2 洗脱率/%	黄酮 2 纯度/%	OD
1	-1	-1	-1	56.448	0.747	24.347	0.180	0.000
2	1	-1	-1	45.143	0.654	38.640	0.313	0.175
3	-1	1	-1	62.882	0.780	58.622	0.406	0.563
4	1	1	-1	40.485	0.683	66.412	0.626	0.000
5	-1	-1	1	56.955	0.749	54.297	0.399	0.473
6	1	-1	1	49.431	0.701	61.413	0.487	0.411
7	-1	1	1	73.579	0.969	72.552	0.534	0.923
8	1	1	1	64.444	0.903	72.373	0.567	0.825
9	-1.682	0	0	71.853	0.954	77.200	0.573	0.946
10	1.682	0	0	54.005	0.790	68.396	0.559	0.610
11	0	-1.682	0	49.065	0.626	24.852	0.177	0.000
12	0	1.682	0	52.188	0.809	63.154	0.547	0.581
13	0	0	-1.682	49.969	0.654	46.413	0.339	0.244
14	0	0	1.682	55.164	0.775	66.339	0.520	0.585
15~20	0	0	0	56.197	0.697	63.493	0.440	0.454

注:15~20 号为重复试验,其值为平均值。

2.4.3 模型拟合及方差分析 以 OD 为因变量,使用 Design-Expert 7.0.0 软件对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,得多元线性回归方程 $Y = -0.849 - 0.684X_1 + 1.373 \times 10^{-2}X_2 + 6.075 \times 10^{-2}X_3$ ($r=0.799, P=0.000\ 8$),虽然 P 值通过检验,但相关系数过小,模型拟合度不高,预测性较差。二项式拟合模型为 $Y = -3.212 - 8.861 \times 10^{-2}X_1 + 9.220 \times 10^{-2}X_2 - 1.991 \times 10^{-2}X_3 - 7.604 \times 10^{-3}X_1X_2 + 8.962 \times 10^{-3}X_1X_3 + 1.683 \times 10^{-3}X_2X_3 + 8.596 \times 10^{-2}X_1^2 - 5.220 \times 10^{-4}X_2^2 - 3.406 \times 10^{-3}X_3^2$ ($r=0.947, P=0.000\ 7$),方程显著并具有较高的可信度,说明可用此模型对龙须藤的纯化工艺进行分

析和预测。

2.4.4 工艺参数优化和预测 根据回归方程,作相应曲面图(图 1~3),根据拟合的响应曲面形状,发现随着 X_1, X_2, X_3 的增加,OD 先上升后下降,其中 X_2, X_3 对 OD 影响非常显著,基于已建立的数学模型,确定最佳纯化条件为上样液质量浓度 0.11 g·mL⁻¹,乙醇体积分数 84.41%,乙醇用量 13.94 BV。

2.4.5 验证试验 按最佳工艺条件进行 3 次验证试验,计算黄酮 **1** 和黄酮 **2** 平均洗脱率分别为 78.45% (RSD 0.32%), 78.55% (RSD 0.33%),纯度依次为 1.14% (RSD 0.88%), 0.67% (RSD 1.49%),将实际值与预测值进行比较,与洗脱率预

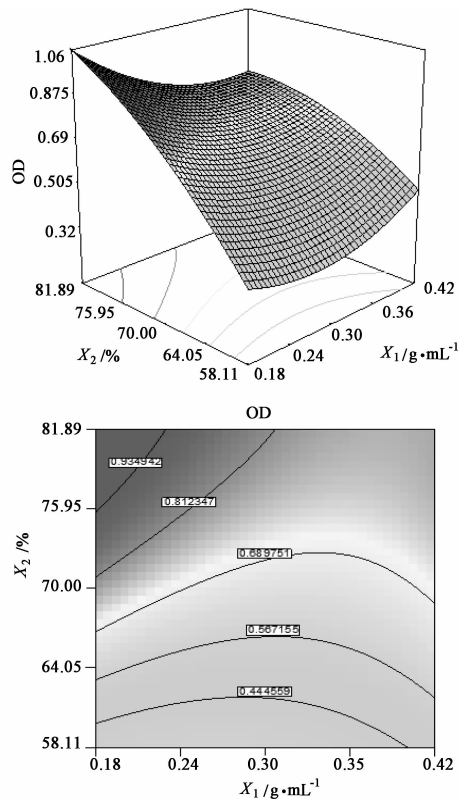


图1 上样液质量浓度和乙醇体积分数相互作用对龙须藤大孔树脂纯化工艺影响的响应面和等高线

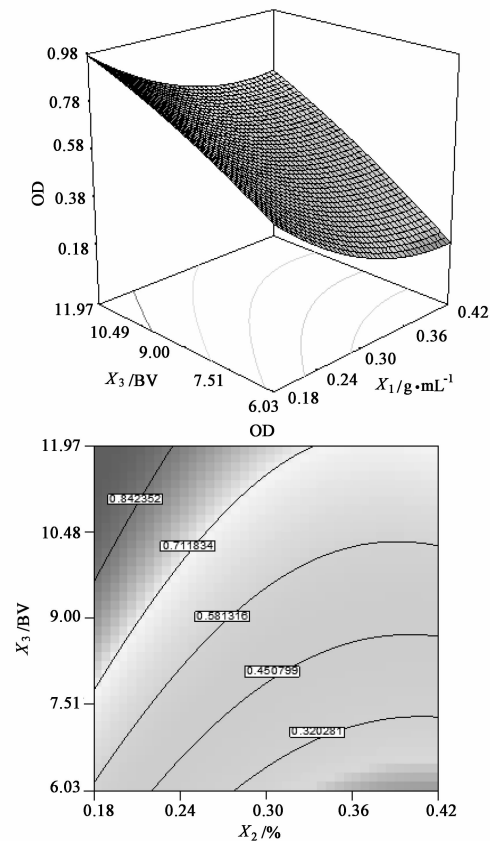


图2 上样液质量浓度和乙醇用量相互作用对龙须藤大孔树脂纯化工艺影响的响应面和等高线

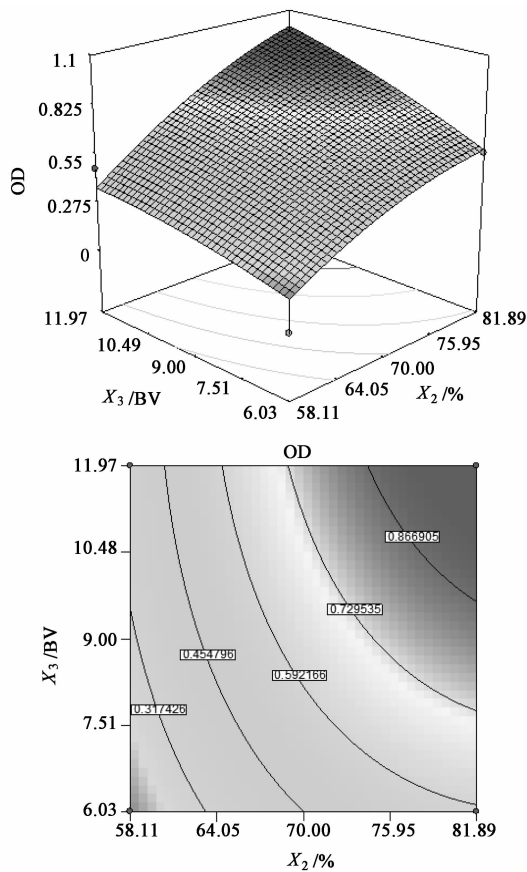


图3 乙醇体积分数和乙醇用量相互作用对龙须藤大孔树脂纯化工艺影响的响应面和等高线

测值(80.47%, 77.98%)的相对偏差^[6]分别为2.51%, -0.73%,与纯度预测值(1.17%, 0.65%)的相对偏差依次为2.56%, -3.08%,计算转移率^[7]分别为78.45%, 78.55%,说明建立的数学模型可靠,具有良好的预测性。

3 讨论

本实验首次采用星点设计-效应面法优化龙须藤的大孔树脂纯化工艺,黄酮1和黄酮2纯度分别由0.22%, 0.13%提高到1.14%, 0.67%,达到了提高有效成分相对含量的目的,可为减少龙须藤制剂的服用量提供依据,具有一定的推广应用价值。文献对多指标处理常采用打分制^[8],存在很强的主观性,依据评分优选的条件往往预测性不好,为将所有指标综合为一个能反映总体效应结果的值,本实验数据处理采用“归一化法”,使所有指标均能量化体现,使模型具有更好的预测性。

[参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第2册[S]. 广州:广东科技出版社, 2011:114.

蛻螂壳聚糖游离膜的制备工艺优选

谭承佳^{1,2}, 辛超³, 易胜兰³, 马家骅^{3*}, 曾敏¹, 杨明⁴

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621006;
3. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010; 4. 江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 优选蛻螂壳聚糖膜的制备工艺。方法: 以力学性能、透湿性、溶胀性、耐酸性为指标, 采用单因素试验考察溶剂(乙酸)、脱膜剂(氢氧化钠)、增塑剂(甘油)、壳聚糖质量分数及干燥条件等因素对壳聚糖成膜的影响。结果: 优选的制备工艺为 2% 乙酸, 2% 壳聚糖, 2% 氢氧化钠, 脱膜时间 2 h, 5% 甘油, 成膜干燥温度 40 ℃; 制成的壳聚糖膜外观透明, 厚薄均匀, 透湿性小, 具备一定的耐酸性, 机械性能及综合性能良好。结论: 该工艺稳定可行, 为壳聚糖的药用包衣及工业化成膜提供参考。

[关键词] 蛻螂; 壳聚糖; 游离膜; 结肠定位给药系统
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0040-03
[doi] 10.11653/syfy2014090040

Preparation of Chitosan Film from *Catharsius molossus*

TAN Cheng-jia^{1,2}, XIN Chao³, YI Sheng-lan³, MA Jia-hua^{3*}, ZENG Min¹, YANG Ming⁴

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;
2. Mianyang Normal University, Mianyang 621006, China;
3. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China;
4. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To prepare chitosan film as a carrier of colon-specific drug delivery system from *Catharsius molossus*. Method: Taking mechanical properties, moisture penetrability, swelling and acid resistance as indexes, single factor tests were adopted to optimize preparation technology with concentrations of acetic acid, glycerol and sodium hydroxide, drying conditions as factors. Result: The best process of film-forming were as follows: 2% acetic acid as solvent, the concentration of chitosan 2%, 2% sodium hydroxide as de-film agent, immersion time of 2 h, 5% glycerol as plasticizer; Chitosan solution on glass plate was heated for 3 h at 40 ℃

[收稿日期] 20140108(008)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30902005); 四川省教育厅项目(13ZB0274)
[第一作者] 谭承佳, 在读博士, 讲师, 从事中药新制剂与天然产物开发研究, Tel: 0816-6089531, E-mail: meditanjia@126.com
[通讯作者] * 马家骅, 博士, 副教授, 从事中药药剂学研究, Tel: 0816-6089531, E-mail: jiahuama@163.com

[2] 张玉琴. 龙须藤抗类风湿关节炎的药效物质基础研究及作用机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.

[3] 易荆丽, 张嘉家, 周毅生, 等. 龙须藤提取物的镇痛抗炎作用[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 647.

[4] 张玉琴, 徐伟, 李煌, 等. 龙须藤研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(8): 207.

[5] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 530.

[6] 赵明琴, 尹蓉莉, 白兰, 等. 星点设计-效应面法优化地

锦草总黄酮结肠定位片处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 42.

[7] 陈国留, 刘东辉, 张琼丹, 等. 关黄柏提取纯化过程中生物碱转移率的考察[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(6): 573.

[8] 鲍爱娜, 沈敏, 吴丹丹, 等. 广藿香油-β-环糊精包合物胶囊的制备及稳定性研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(11): 2318.

[责任编辑 刘德文]