

净化处理,其工作原理是以硅藻土作为填料,硅藻土表面为多孔结构;加入样品后,样品的水溶液将柱中的硅藻土充分润湿,在每一个颗粒表面形成一层薄膜;接下来,向柱中注入与水互不相溶的萃取溶剂,萃取溶剂会在水膜外形成新薄膜,新薄膜迅速将水膜中的目标物萃取出来,并在重力作用下流出萃取柱。这种液液萃取柱简化了传统的液液萃取的步骤,并有效避免发生乳化现象。通过对不同型号、厂家的硅藻土进行比较,最终确定以 545 型硅藻土作为填料,比较硅藻土填料量、最大上样体积、洗脱溶剂和洗脱体积,最终确定了正文所述的净化方法。

3.4 耐用性考察 实验中比较不同柱温、不同流速、不同品牌或规格的色谱柱,结果发现在一定范围内,基线平稳,分离度符合规定,故认为方法耐用性较好。

3.5 单体对照品和对照提取物为对照的测定结果比较 本课题组前期研究结果表明,白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 的含量偏差小于 3.5%,总萜类内酯的含量偏差小于 2.5%,表明银杏叶总内酯对照提取物可以替代相应的单体对照品用以测定银杏叶中萜内酯类成分的定量,所建立的含量测定方法作为定量用银杏叶总内酯对照提取物实际应用一次尝试,为银杏叶系列质量标准的进一步研究提供思路。

中药提取物与原药材的量化关系明确,专属性较强,与化学对照品相比,价格低廉,可大大降低检验检测成本,因此,探索和推行以中药提取物为对照的质量评价体系具有实际意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:296-297.
- [2] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. 一测多评法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925-1928.
- [3] 高慧敏,宋宗华,王智民,等. 适合中药特点的质量评价模式-QAMS 研究概述[J]. 中国中药杂志,2012,37(4):405-416.
- [4] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J]. 中国药理学杂志,2009,44(5):390-394.
- [5] 陆兔林,翟为民,蔡宝昌,等. 对照提取物在中药质量控制中的应用[J]. 中国药理学杂志,2013,48(3):462-465.
- [6] 逢瑜,孙磊,金红宇,等. 替代对照品法在中药多指标含量测定中的应用与技术要求探讨[J]. 药物分析杂志,2013,33(1):169-177.
- [7] 周超,何轶,鲁静,等. 黄芪异黄酮对照提取物的制备及其在黄芪药材含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):523-528.

中心组合设计-响应面法优化 银杏活脑胶囊的提取工艺

漆立军,覃鸿恩,黄华斌

(湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院药学部,恩施 445000)

摘要 **目的** 探索银杏活脑胶囊的提取工艺,优化制剂工艺。**方法** 以加水倍数、煎煮时间为考察因素,以紫丁香苷和大黄素转移率及固形物保留率的权重化值为综合评价指标,采用中心组合设计-响应面法对银杏活脑胶囊水提部位的提取工艺进行筛选。**结果** 银杏活脑胶囊水提部位的优选提取工艺为:加水量 10 倍,提取时间 160 min,提取 2 次。**结论** 中心组合设计-响应面法用于筛选银杏活脑胶囊水提部位的提取工艺可行,预测性较高,所得优选工艺方法简便、可靠。

关键词 银杏活脑胶囊;中心组合设计-响应面法;提取工艺

中图分类号 R286;TQ460.6

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)06-0668-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.017

Extraction Process of Yinxing Huonao Capsule by Central Composite Design-Response Surface Method

QI Lijun, QIN Hongen, HUANG Huabin (Department of Pharmacy, the Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Hubei Province, Enshi 445000, China)

ABSTRACT Objective To explore the extraction process of Yinxing Huonao capsule. **Methods** Central composite

design-response surface method was used to optimize the extraction process with quantity of water and boiling time as main factors and with syringin transfer rate, emodin transfer rate and solids retention rate as evaluation index. **Results** The conditions of the optimized extraction process were as follows: 10-fold water, extracting time of 160 min, extracting 2 times. **Conclusion** It is feasible that central composite design-response surface method is used to optimize the extraction process of *Yinxing Huonao* capsule, and the optimized extraction process is simple and reliable.

KEY WORDS *Yinxing Huonao* capsule; Central composite design-response surface methodology; Extraction process

银杏活脑胶囊是根据我院神经内科名老中医的经验方自主研制的中药复方制剂,由刺五加、何首乌等多味中药组成,具有活血化瘀、益气健脑、补肾安神、改善脑供血、增强免疫等功能。主要用于神经衰弱、动脉硬化、脑震荡、高脂血症等,其作用显著,疗效确切^[14]。该胶囊剂由水提取物部分和原药粉组成,水提部位的药材包括刺五加和何首乌。本研究组对银杏活脑胶囊提取工艺进行筛选,笔者经对研究组已经发表的文献^[5]进行再次论证时发现,用正交实验设计优选的工艺存在误差,笔者进一步优化该制剂的质量控制体系,为银杏活脑胶囊的生产工艺合理性提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Shimadzu LC20A 高效液相色谱仪 (LC-20AD 四元泵, SPD-M20A 检测器, SIL-20A 进样器 日本岛津公司), KQ-500VDE 型双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), CPA225D 电子天平 (德国赛多利斯, 感量: 0.01 mg), HHS-2S 型电子恒温不锈钢水浴锅 (上海宝蓝实验仪器制造有限公司), YLD-2000 电热恒温鼓风干燥箱 (黄石市恒丰医疗器械有限公司)。

1.2 试剂 刺五加 (湖北聚瑞中药饮片有限公司, 批号: 151001), 何首乌 (安徽方氏药业, 批号: 160301), 以上两味药材经我院张思波主任药师鉴定为道地药材; 紫丁香苷对照品 (批号: 111574-201003), 大黄素对照品 (批号: 0922-201506), 均由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法与结果

2.1 刺五加和何首乌的含量测定

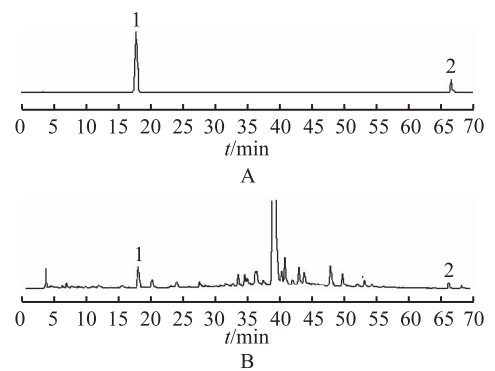
2.1.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.4% 磷

酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 15 min, 15% → 25% A, > 15 ~ 25 min, 25% → 35% A, > 25 ~ 45 min, 35% → 55% A, > 45 ~ 60 min, 55% → 80% A, > 60 ~ 70 min, 80% → 100% A。流速: 1 mL · min⁻¹, 柱温: 35 °C, 检测波长: 254 nm。

2.1.2 供试品溶液的制备 按照处方比例称取刺五加和何首乌, 加 10 倍量水, 煎煮 2 h, 煎煮 2 次, 放冷, 滤过, 合并煎煮液, 蒸干, 得水提部位干浸膏。取适量水提部位干浸膏, 粉碎为细粉, 精密称取 1 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 精密称量, 超声提取 (功率 500 W, 频率 45.80 kHz) 45 min, 取出, 擦干瓶身表面的水, 待冷却至室温后精密称定, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过孔径 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 精密称定对照品紫丁香苷和大黄素, 加甲醇制成每毫升分别含紫丁香苷 0.028 1 g、大黄素 0.001 3 g 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.4 系统适应性实验 按照“2.1.1”项色谱条件, 移取混合对照品和供试品溶液进样, 记录色谱图, 结果见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 紫丁香苷; 2. 大黄素

图 1 混合对照品和供试品的 HPLC 图

A. mixed reference substance; B. sample; 1. syringin; 2. emodin

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances and sample

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.3”项混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12 μL, 注入高相液相色谱仪, 测定紫丁香苷和大黄素的峰面积。以最小二乘法

收稿日期 2016-08-12 修回日期 2017-02-20

作者简介 漆立军 (1978-), 男, 四川自贡人, 副主任药师, 研究方向: 中药制剂、中药质量控制。电话: 0718-8258252, E-mail: 58659685@qq.com。

通信作者 黄华斌 (1967-), 男, 湖北利川人, 主任药师, 研究方向: 中药资源、中药制剂。电话: 0718-8298028, E-mail: 591942455@qq.com。

进行线性回归得到各成分的回归方程以及线性范围,结果见表1。由表1可知,待测成分在相应的范围呈良好的线性关系。

表1 2个待测组分的线性回归结果

Tab.1 Linear regression of two tested components

待测组分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
紫丁香苷	$Y = 2.21 \times 10^5 X + 2487.1$	0.999 8	0.056 ~ 0.336
大黄素	$Y = 2.68 \times 10^5 X + 19.6$	0.999 9	0.002 6 ~ 0.015 6

2.1.6 精密度实验 依据“2.1.1”项色谱条件,精密吸取混合对照品溶液 10 μL ,重复进样 6 次,记录各待测成分的峰面积,计算 RSD。结果紫丁香苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 1.9%, 结果表明该仪器的精密度较好。

2.1.7 稳定性实验 取“2.1.2”项供试品溶液,并按照“2.1.1”项色谱条件,分别于制样后 0, 2, 4, 8, 12 h, 吸取该供试品溶液 10 μL , 进样、测定, 记录各待测成分峰面积, 计算 RSD。结果紫丁香苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.6%, 结果表明该溶液在 12 h 稳定性较好。

2.1.8 重复性实验 取“2.1.2”项供试品溶液 6 份, 依据“2.1.1”项色谱条件进样, 测定各待测成分峰面积, 计算 RSD。结果紫丁香苷和大黄素峰面积的 RSD 分别为 2.3%, 0.4%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.1.9 回收率实验 采用加样回收法, 各取已知含量的样品 5 mL 6 份, 分别按照 1:0.8, 1:1, 1:1.2 加入混合对照品, 依法制备供试品溶液。按“2.1.1”项色谱条件, 精密吸取各供试品溶液 10 μL , 注入色谱仪, 测定各待测成分峰面积, 计算各待测成分的回收率和 RSD。结果紫丁香苷、大黄素的平均加样回收率分别为 98.6%, 99.58%, RSD 分别为 1.5%, 2.8%, 结果显示该方法的准确度较高。

2.2 固形物保留率的测定 精密吸取水提取液 50 mL, 置于已干燥至恒质量的蒸发皿中, 水浴蒸干; 105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥 5 h, 于干燥器中冷却 30 min, 快速称取质量, 直至样品质量达到恒重, 计算固形物保留率。

2.3 中心组合设计-响应面分析筛选工艺条件

2.3.1 因素与水平的确定及实验方案 查阅相关资料^[6-9], 并通过预实验可知, 影响水提工艺的因素主要有提取次数、提取时间、加水倍量。提取次数为非连续变量, 根据预实验结果确定提取次数为 2 次, 并最终确定各因素的水平取值, 采用软件 Design-Expert8.0.5 中的中心组合实验设计原理及响应面分析法对银杏活脑

胶囊水提部位提取工艺进行优选。以加水倍量(A)、提取时间(B)作为考察因素, 每个自变量的水平分别以 -1.414, -1, 0, 1, 1.414 进行编码, 以紫丁香苷转移率(T_1)、大黄素转移率(T_2)和固形物保留率(S)作为评价指标。因素与水平见表2。按处方比例称取药材, 按照表3的响应面分析方案进行实验。并按照紫丁香苷和大黄素含量测定方法进行测定, 计算各实验组二者转移率及固形物保留率。

表2 响应面因素水平表

Tab.2 Factors and levels of response surface analysis

水平	加水倍量(A)/倍	提取时间(B)/min
-1.414	7.17	35.15
-1	8	60
0	10	120
1	12	180
1.414	12.83	204.85

2.3.2 实验数据处理方法 目标成分转移率计算公式为: 水提液中目标成分含量/投料饮片中标目标成分含量, 固形物保留率计算公式为: 水提液干膏固形物量/药材量^[10]。采用 SPSS statistics 数学软件将数据进行归一化处理, 按照归一化方法计算公式处理数据, 紫丁香苷转移率和大黄素转移率归一化为 $D_{\max} = (V_n - V_{\min}) / (V_{\max} - V_{\min})$, 固形物保留率计算公式为 $D_{\min} = (V_{\max} - V_n) / (V_{\max} - V_{\min})$, 总评归一值 $OD = (D_1 D_2 \cdots D_n)^{1/n}$, n = 指标数, D_1 、 D_2 、 D_3 分别为紫丁香苷转移率、大黄素转移率和固形物保留率的归一值, 总评归一值将作为响应面参考值的直接指标代入 Design-Expert8.0.5 软件进行分析, 结果见表3。

2.3.3 模型的建立及显著性检验 用 ANOVA 分析响应面的回归参数, 以总评 OD 的方差分析见表4, 可知, 二次项 B^2 达到极显著水平, $A^2 < 0.05$, 二次项各因素对响应值 OD 的线性关系显著; 一次项 AB 对响应值 T 的曲面效应显著。利用 Design-Expert8.0.5 软件对表4数据进行多元回归拟合, 得到响应值 OD 对加水倍量(A)、提取时间(B)的二次多项回归模型: 拟合总评 $OD = 0.9106A + 0.0382B - 0.0377A^2 - 1.015 \times 10^{-4}B^2 - 1.293 \times 10^{-3}AB$ 。该方程的相关系数 $r = 0.9994$ 。相对于线性拟合模型有显著提高, 表明该方程有较大可信度。

由表4可知, 该模型达到极显著水平 ($P < 0.001$), 表明该二次方程的模型比较显著。

表 3 响应面实验方案与结果

Tab.3 Design and results of response surface experiment

实验组	加水倍量 (A)	提取时间 (B)	紫丁香苷转移率	大黄素转移率	形物保留率	D ₁	D ₂	D ₃	OD
			%						
1	-1	-1	92.46	87.00	20.89	0.271 8	0	1	0
2	0	0	97.33	91.25	24.45	0.957 7	0.965 9	0.562 1	0.804 2
3	0	0	97.60	91.18	24.98	0.995 8	0.950 0	0.496 9	0.777 5
4	1	-1	91.47	88.32	21.23	0.132 4	0.300 0	0.958 2	0.336 4
5	1	1	95.99	90.23	29.02	0.769 0	0.734 1	0	0
6	-1	1	94.56	90.11	28.54	0.567 6	0.706 8	0.059 0	0.287 2
7	0	0	97.36	90.89	24.79	0.962 0	0.884 1	0.520 3	0.762 0
8	0	0	97.45	91.16	24.77	0.974 6	0.945 5	0.522 8	0.783 9
9	0	0	97.22	91.40	25.06	0.942 3	1	0.487 1	0.771 4
10	0	-1.414	90.53	89.20	20.97	0	0.500 0	0.990 2	0
11	-1.414	0	95.08	90.21	25.14	0.640 8	0.729 5	0.477 2	0.606 5
12	0	1.414	94.34	90.46	28.34	0.536 6	0.786 4	0.083 6	0.328 0
13	1.414	0	95.47	90.58	26.23	0.695 8	0.813 6	0.343 2	0.579 2
14	0	0	97.63	91.10	24.55	1.000 0	0.931 8	0.549 8	0.800 2

表 4 方差分析结果

Tab.4 Results of variance analysis

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.22	5	0.058	22.41	0.000 4
A	7.667E-006	1	7.667E-006	7.062E-004	0.979 5
B	0.022	1	0.022	2.01	1.199 6
AB	0.096	1	0.096	8.88	0.020 5
A ²	0.17	1	0.17	15.50	0.005 6
B ²	0.99	1	0.99	90.82	<0.000 1
残差	0.076	7	0.011		
失拟差	0.075	3	0.025	74.94	0.000 6
纯误差	1.328E-003	4	3.321E-004		
总误差	1.35	13			

A:加水倍量;B.提取时间

A:water amount;B:extracting time

2.3.4 效应面分析与优化 采用 Design-Expert 软件,以“2.3.3”项拟合的数据模型为基础,绘制出相应的等高线图和自变量对因变量的三维曲线图,见图 2。通过软件预算处最优提取工艺参数为:A=9.94 倍,B=159.1 min。综合考虑各方面因素,最终确定优选工艺为加水 10 倍,提取时间 160 min。

2.3.5 优选提取工艺验证实验 按效应面分析得到优选提取工艺,即:加水倍量为 10 倍,提取时间为160 min,平行 3 次实验。按照供试品溶液制备方法制备供试品溶液,再按照色谱条件测定紫丁香苷和大黄素含量,计算转移率,并计算固形物保留率。结果见表 5。

由表 5 可知,效应面实验得出的优选提取工艺为加水倍量为 10 倍,提取时间 160 min,此条件下紫丁香

苷转移率可接近 99%,大黄素转移率可达到 93% 以上,固形物保留率可降低至22.0%,其重复性较好。

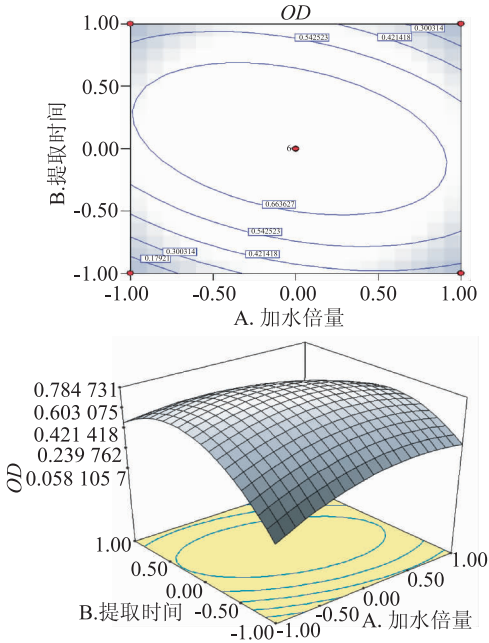


图 2 加水量和提取时间二维图及 3D 效应面

Fig.2 Contour chart and 3D response surface of water amount and extracting time

表 5 验证实验结果

Tab.5 Result of verification test

项目	1	2	3	平均值	RSD
紫丁香苷转移率	98.90	98.86	99.11	98.96	0.14
大黄素转移率	93.64	94.03	93.90	93.86	0.21
固形物保留率	22.28	22.73	22.56	22.52	1.01

3 讨论

3.1 评价指标的选择 按照处方组成,水提部位由刺五加和何首乌两味中药组成。刺五加主要有效成分为紫丁香苷,何首乌的主要有效成分为大黄素,二者均具有抗氧化的作用^[11-12],属于处方中重点保留的成分,故选择紫丁香苷和大黄素作为评价指标。固形物保留率是中药制剂质量的重要指标之一,银杏活脑胶囊水提部分提取物中含有皂苷成分和多糖成分较多,多糖成分及一些杂质增多不仅影响单位剂量药物的疗效,而且会导致制剂吸潮,从而使制剂稳定性降低,故降低水提物的固形物保留率也常常作为提取工艺中的重要指标。

3.2 流动相的选择 首先以单一组分进行进样分析,紫丁香苷的流动相为甲醇-水,大黄素的流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液,分别对以上2种流动相进行分析,所检测出来的结果均不理想,综合各种因素,故将其调整为甲醇-0.4%磷酸溶液,该系统条件下,由于非目标峰影响目标峰,并且由于紫丁香苷和大黄素极性相差较大,为了更好地分离二者,故考虑适当调整流动相比例,延迟大黄素出峰时间。

3.3 检测波长的确定 采用等吸收图和3D全波长数据采集方法,在波长190~400 nm对样品溶液进行谱图信息分析,并分别选取203,215,254,265,285,306,350和385 nm 8个不同波段进行比对考察,综合分析,大黄素和紫丁香苷分别在254和265 nm处有特征吸收,二者最大吸收波长较为接近,相对紫丁香苷而言,大黄素峰面积较小,综合考虑,最终确定以254 nm为最佳检测波长。

3.4 优化结果分析与方法比较 本研究主要针对银杏活脑水提部位的提取工艺进行优化,通过对水提部位处方进行分析,主要针对其中紫丁香苷与大黄素的转移率变化进行比较,在前期研究过程中已经确定基本提取方法,本研究只能调整提取参数,故选择研究方法应具备较好的实验精度和具备较好的预测性能,目前研究较为成熟的方法有正交实验设计、效应面实验设计和均匀实验设计,通过查阅相关资料,分析结合实验可行性,最终确定中心组合设计-效应面法为研究方法。

3.5 实验方法的选择 通过对本研究得出的最优工艺与正交实验设计优选的优选工艺进行比较,结果发现,中心组合设计-效应面法实验精度更高,预测值更准确,符合相关文献资料的论述^[13],故中心组合设计-效应面法更适用于筛选银杏活脑胶囊的提取工艺。

参考文献

- [1] 刘群会,李俊,莫家鹏,等. 银杏活脑胶囊治疗 TIA45 例临床分析[J]. 内蒙古中医药,2009,10:1-2.
- [2] 刘群会,李俊,莫家鹏,等. 银杏活脑胶囊治疗椎基底动脉供血不足的临床及 TCD 观察[J]. 中国康复,2008,23(3):172-173.
- [3] 田桦,鲁启洪. 高压氧联合银杏活脑胶囊治疗脑梗死临床观察[J]. 中国中医急症,2012,21(1):13-14.
- [4] 陈开广,鲁启洪,刘红艳,等. 银杏活脑胶囊治疗缺血性脑卒中的临床研究[J]. 国际中医中药杂志,2007,29(6):353-354.
- [5] 黄宏云,覃鸿恩. 基于正交设计优化银杏活脑胶囊水提部分的提取工艺参数[J]. 临床合理用药,2016,9(28):78-79.
- [6] 殷佳,殷健,朱艳,等. 星点设计-效应面法优化补肾活血胶囊提取工艺[J]. 中国药房,2016,27(16):2276-2278.
- [7] 晏建新,王晓丽. 星点设计-效应面法优化黔产金樱子多糖超声提取工艺[J]. 医药导报,2015,34(10):1367-1370.
- [8] 殷明阳,刘素香,张铁军,等. 复方中药提取工艺研究概况[J]. 中草药,2015,46(21):3279-3283.
- [9] 魏词,万蕊,王红,等. 星点设计-效应面法优化白芍提取工艺[J]. 医药导报,2016,35(2):174-176.
- [10] 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]. 中国药理学杂志,2000,35(8):530-533.
- [11] 冯光远,石璐缘,崔宝弟,等. 制何首乌提取物及主要单体成分对细胞酪氨酸酶及抗氧化保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(4):578-584.
- [12] ES-SAFI N E, KOLLMANN A, KHLIFI S, et al. Antioxidative effect of compounds isolated from Globularia alypum. structurel-activity relationship[J]. LWT Food Sci Tech,2007,40(7):1246-1252.
- [13] 刘艳杰,项荣武. 星点设计效应面法在药学实验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学,2007,24(6):455-457.