

· 中药工业 ·

Box-Behnken 响应面法优选地芍苳冬颗粒提取工艺[△]李玉婷¹, 张刚², 姜林^{1,2*}, 郝梦¹, 依孜提·帕力哈提¹, 刘怡¹, 张丽娟¹, 张良², 唐梅¹

1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学第四临床医学院, 新疆 乌鲁木齐 830000

[摘要] **目的:** 采用 Box-Behnken 响应面法优选地芍苳冬颗粒的提取工艺。**方法:** 通过单因素试验考查浸泡时间、提取时间、加水倍数和提取次数对地芍苳冬颗粒中天麻素、芍药苷含量的影响。基于单因素的结果, 应用 Box-Behnken 响应面法考察浸泡时间、提取时间、加水倍数 3 个因素对地芍苳冬颗粒中天麻素、芍药苷含量以及离体血管舒张率的影响, 对结果进行二项式方程拟合, 用响应面法预测最佳水提工艺。**结果:** 二项式拟合方程预测性良好, 理论预测值与实际值偏差较小。在最佳提取工艺条件(浸泡时间为 1.5 h, 加 10 倍量水提取 1 h, 共提取 2 次)下, 天麻素平均质量分数为 0.59 mg·g⁻¹, 芍药苷平均质量分数为 6.35 mg·g⁻¹, 平均离体血管舒张率为 71.03%。**结论:** 此工艺稳定、方便, 准确快速地优化地芍苳冬颗粒的提取工艺。

[关键词] 地芍苳冬颗粒; 天麻素; 芍药苷; 离体血管舒张率; Box-Behnken 响应面法; 综合评分

[中图分类号] [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2019)01-0090-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180625001

Optimization of Dishaojudong Granule Extraction Process by Box-Behnken Response Surface Method

LI Yu-ting¹, ZHANG Gang², JIANG Lin^{1,2*}, HAO Meng¹, PALIHATI Yi-zi-ti¹, LIU Yi¹, ZHANG Li-juan¹, ZHANG Liang², TANG Mei¹

1. Xinjiang medical University, Urumqi 830000, China;

2. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Department of medicine, Urumqi 830000, China

[Abstract] **Objective:** This paper aims to optimize the extraction process of Dishaojudong granule by using the Box-Behnken response surface method. **Methods:** The effects of immersion time, extraction time, extraction multiples and extraction times on the content of gastrodin, paeoniflorin were studied by single factor test. Based on the results of single factor, the effects of the study on the time of immersion, the time of extraction and the extraction multiples were studied. The effect of the three factors on the content of gastrodin, paeoniflorin and blood vessel diastolic rate in vitro was studied, the results were binomial equation fitting, by using the response surface method to predict the best water extraction process. **Results:** The predictive value of the binomial fitting equation was relatively low. In the best extraction technology conditions(soaking time for 1.5 hours, ten times the amount of water, extraction of 1 hour every time, extraction of twice), the mean content of gastrodin was 0.59 mg·g⁻¹, the average content of paeoniflorin was 6.35 mg·g⁻¹, and the average blood vessel diastolic rate in vitro was 71.03%. **Conclusion:** The method is stable and convenient and it can optimize the extraction process of the Dishaojudong granules accurately and rapidly.

[Keywords] Dishaojudong Granula; gastrodin; paeoniflorin; blood vessel diastolic rate in vitro; Box-behnken response surface method; comprehensive score

随着生活条件的提高, 高血压已经成为一种越来越普遍的症状。相关研究^[1]表明, 18 岁以上的高血压患病率约为 10.34%, 其中男性所占的比例是 8.61%, 女性所占比例是 11.75%。高血压病是最常见的心血管疾病之一^[2], 常有心、脑、肾等脏器的

并发症引起的重要器官的病变, 在很大程度上影响着患者的身体健康。地芍苳冬汤是根据新疆医科大学附属中医医院多年中医周铭心专家临床治疗高血压的经验, 以及高血压的发病机理和治疗原则总结而成的经验方。本方不仅对轻中度高血压病有较好

[△] [基金项目] 新疆地产中药民族药新药研发项目(2017-06-02)

* [通信作者] 姜林, 教授, 研究方向: 中药新制剂与新剂型研究; Tel: (0991)5814127, E-mail: 15082388649@qq.com

的血压控制疗效,还能明显改善高血压患者头晕、头痛、心悸、烦躁、失眠症状,并对腰膝酸软、口干、耳鸣、健忘、手足心热等症状亦能减轻。

此方传统剂型为汤剂,将其开发成颗粒剂则可以克服汤剂服用剂量大、口感差、储存携带不便等不足,且能使其质量稳定。^[2]本方由生地、白芍、天麻、龙骨等9味药组成。白芍为方中臣药,有止痛平肝、柔肝补血、收汗敛阴、平抑肝阳等功能。彭珍香等^[3]研究证明,芍药苷呈内皮依赖性舒张血管平滑肌,机制可能与其促进NO的合成释放有关。天麻为方中佐药,有息风止痉、平抑肝阳和祛风通络的功能,对于高血压、偏头痛和失眠等有较好的治疗效果。谢世虎^[4]研究证明,天麻素与肾上腺素能产生拮抗作用,且能调节血管的收缩作用,使人体的微小血管扩张,进一步控制血压。临床经验表明,天麻在高血压的治疗中,具有非常好的效果,对于患者的冠状动脉血流量有极明显的调节作用。故选择芍药苷及天麻素为化学指标^[5],优化本方提取工艺。此外,通过离体血管环实验得出的离体血管舒张率,将其作为药效学指标,结合化学成分指标,最终确定本方的提取工艺。本实验以综合评分(天麻素含量、芍药苷含量、离体血管舒张率)为评价指标,采用响应曲面法优化提取工艺,为该制剂的工业化大生产提供方案。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1525型高效液相色谱仪(含2489型PAD检测器、Empower Pro工作站,美国Waters公司);Centra-20型紫外-可见分光光度计(GBC科学仪器有限公司);BL-420E生物机能实验系统、离体组织灌流装置(安徽正华生物仪器设备有限公司);AG-135型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);电热恒温水浴锅(北京永光明医疗仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。

1.2 试药

天麻素对照品、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为807-200104、110736-201337);乙腈色谱纯;其他试剂均为分析纯。

药材饮片均购自新疆玖元堂中药饮片有限责任公司,经新疆维吾尔自治区中医医院李永和主任中药师鉴定均符合2015年版《中华人民共和国药典》相关项下的要求。

2 方法与结果

2.1 天麻素、芍药苷含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 SymmetryShield™ RP₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为乙腈,流动相B为0.05%磷酸溶液,梯度洗脱(0~11 min, 2% A; 11~12 min, 2%~14% A);流量:1.0 mL·min⁻¹;进样量:10 μL;柱温:30℃;天麻素检测波长:220 nm,芍药苷检测波长:230 nm^[6]。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取一定量的天麻素及芍药苷对照品,分别制成质量浓度为0.25、1.82 mg·mL⁻¹的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的配制 称取适量的处方药材,加水10倍量,浸泡1 h,加热回流提取1 h,提取2次。量取其上清液5 mL浓缩蒸干,干膏加少量的色谱甲醇溶解,定容到5 mL容量瓶中,经0.45 μm的微孔滤膜滤过,即得。

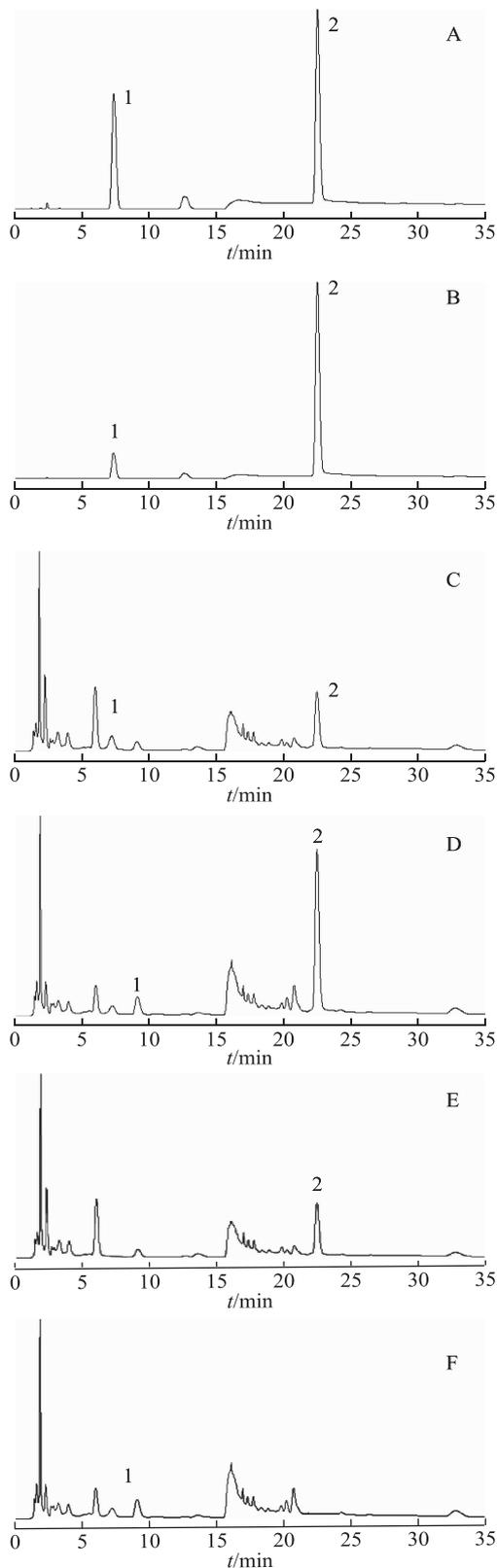
2.1.4 阴性供试品溶液的配制 按处方量分别称取缺少天麻和白芍的药材,按2.1.3方法制备阴性供试品溶液。结果见图1。

2.1.5 标准曲线的建立 配制质量浓度为0.25 mg·mL⁻¹的天麻素对照品溶液,分别取1、2、3、4、5 mL用甲醇定容到5 mL容量瓶中,稀释成质量浓度分别为0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg·mL⁻¹的天麻素对照品系列溶液,如2.1.1项下色谱条件下完成测定,以天麻素浓度作为横坐标,峰面积作为纵坐标,得天麻素线性回归方程: $Y = 21\ 059\ 052X - 13\ 275.4$ ($r = 0.999\ 2$),线性范围0.05~0.25 mg·mL⁻¹。

配制质量浓度为1.82 mg·mL⁻¹的芍药苷对照品溶液,分别取1、2、3、4、5 mL用色谱甲醇定容到5 mL容量瓶中,稀释成为5个浓度梯度的芍药苷对照品系列溶液,如2.1.1项下色谱条件完成测定,以芍药苷浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得芍药苷线性回归方程: $Y = 5\ 906\ 097.353X$ ($r = 0.999\ 2$),线性范围0.364~1.82 mg·mL⁻¹。

2.1.6 精密度试验 精密量取10 μL的混合对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样6次,计算天麻素、芍药苷峰面积的RSD分别为1.16%、1.56%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 重复性试验 按处方精密称取6份药材,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,如2.1.1项下色谱条件完成测定,计算天麻素、芍药苷峰面积的RSD分别为2.24%、0.92%,表明该方法重复性良好。



注: A. 对照品(220 nm); B. 对照品(230 nm); C. 样品(220 nm); D. 样品(230 nm); E. 阴性样品(220 nm); F. 阴性样品(230 nm); 1. 天麻素; 2. 芍药苷。

图1 220 nm、230 nm 波长下混合对照品及供试品溶液的 HPLC 图

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别在0、6、8、12、24、48 h 进样 10 μ L, 计算天麻素、芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.40%、2.09%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.1.9 加样回收试验 取 2.1.7 项下已知含量的供试品溶液 6 份, 分别加入天麻素、芍药苷对照品 0.78、6.37 mg, 按 2.1.1 项下色谱条件完成测定, 其平均回收率为 99.11%、98.48%, RSD 分别为 2.20%、1.90%。实验结果表明, 本品有良好的回收率。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取次数的考察 将加水倍数固定为 10 倍, 浸泡时间固定为 1 h, 提取时间固定为 2 h, 分别考察提取 1、2、3 次的含量, 结果各组分含量在 1~3 次呈增加趋势, 但各组分含量 2 次与 3 次相差不大, 结合实际生产情况选取 2 次作为响应面试验设计的提取次数。

2.2.2 提取时间的考察 将提取次数固定为 2 次, 加水量固定为 10 倍, 分别按 0.5、1、1.5、2 h 进行提取, 结果各组分含量在 0.5~1 h 呈增加趋势, 在 1~2 h 呈递减趋势, 故 1 h 为最佳提取时间。

2.2.3 浸泡时间的考察 将提取次数固定为 2 次, 加水量固定为 10 倍, 提取时间固定为 1 h, 分别提取浸泡时间为 0.5、1、1.5、2 h 的供试品测定含量, 结果各组分含量在 0.5~1.5 h 呈增加趋势, 在 1.5~2 h 呈递减趋势, 故 1.5 h 为最佳浸泡时间。

2.2.4 加水倍数的考察 将提取次数固定为 2 次, 提取时间固定为 1 h, 分别提取加水倍数为 6、8、10、12 倍的供试品, 结果各组分含量在 8~10 倍呈增加趋势, 在 10~12 倍呈递减趋势, 故加 10 倍量为最佳加水倍数。

2.3 体外血管环实验

2.3.1 大鼠主动脉环的获取 本次实验用颈椎脱臼法处死大鼠, 用鼠板固定后从腹部起直至胸腔剪开, 配置 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 调节其 pH 为 7.2, 用棉花蘸取此缓冲液轻轻地擦拭组织表面以使视野清晰。找到胸主动脉的两端用止血钳钳夹后剪断, 快速取出胸主动脉放入盛有已充入混合气体 (95% O₂ + 5% CO₂) 的 4 $^{\circ}$ C kerb's 液培养皿中 [用蒸馏水配成 10 倍的母液 (mmol·L⁻¹): NaCl 118、KCl 4.7、MgSO₄·7H₂O 1.2、NaHCO₃ 20、KH₂PO₄ 1.1、葡萄糖 4.5、CaCl₂ 1.25], 葡萄糖需要在临用前加入, 且需调节其溶液 pH 在 8.1~8.4, 将血管在 4 $^{\circ}$ C 的 kerb's 液中不断漂

洗以去除血管内残余血液，并剪去残余的脂肪组织和结缔组织。将胸主动脉剪成大约3 mm长的动脉环放置于已经通入混合气体的4℃ kerb's液中，备用^[7]。

2.3.2 血管环实验 实验时，血管环下端固定，上端通过张力换能器连于自动平衡记录仪，持续通入95% O₂ + 5% CO₂混合气体，调节血管环预负荷为1 g。平衡90 min后开始给药。在氯化钾(kcl, 40 mmol·L⁻¹)预致血管收缩的条件下，观察不同提取方法的药物对体外血管张力的影响^[8]，结果用离体血管舒张率表示。

$$\text{离体血管舒张率}(\%) = \frac{\text{加入kcl后的张力} - \text{加入药物后的张力}}{\text{加入kcl后的张力} - \text{初始张力}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 提取工艺优选

2.4.1 响应面试验设计 在单因素试验基础上，固定提取次数为2次，选择提取时间、浸泡时间、加水倍数作为影响因素，以天麻素含量、芍药苷含量、离体血管舒张率为评价指标(根据本方中各化学指标对本方药效贡献程度的大小综合考虑，决定其权重系数分别为25%、35%、40%)，采用Design-Expert 8.0.4 Trial软件试验设计的方案进行研究，结果见表1。

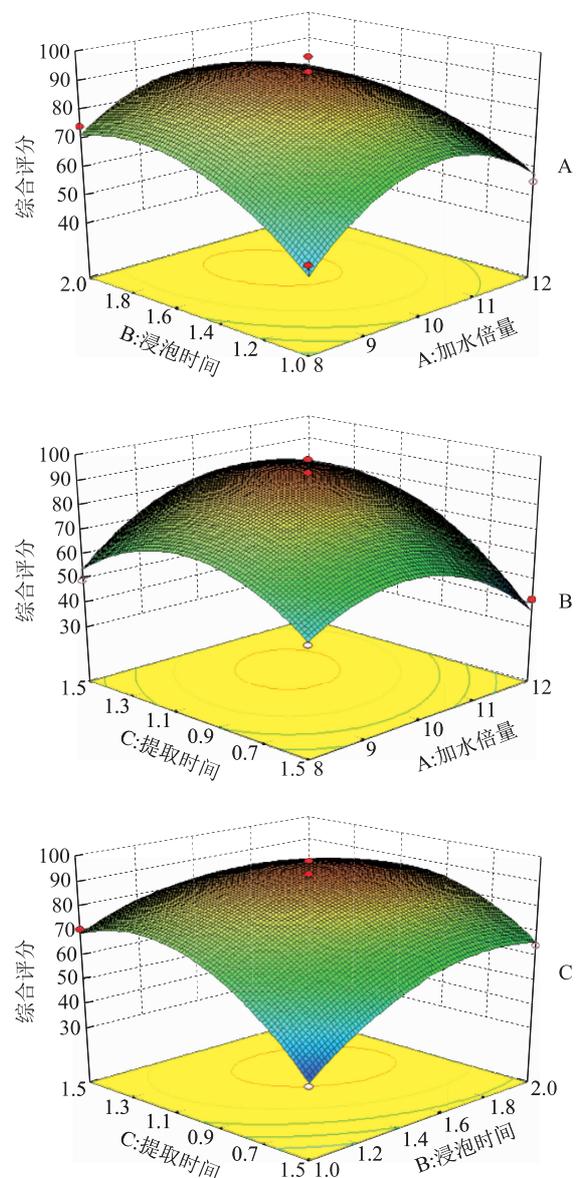
表1 响应面试验设计及结果

序号	加水 倍数 (A)/倍	浸泡 时间 (B)/h	提取 时间 (C)/h	天麻 素/ mg·g ⁻¹	芍药 苷/ mg·g ⁻¹	离体血 管舒张 率/%	综合 评分/ %
1	10	1.5	1.0	0.58	4.70	83.33	98.28
2	8	1.5	1.5	0.25	2.51	40.00	47.70
3	10	1.0	0.5	0.21	1.98	25.00	35.18
4	12	2.0	1.0	0.46	3.51	33.33	60.61
5	12	1.0	1.0	0.36	3.33	33.33	55.10
6	10	1.0	1.5	0.38	3.15	66.67	70.88
7	8	1.0	1.0	0.31	2.49	40.00	50.15
8	10	1.5	1.0	0.59	4.74	66.67	90.78
9	10	1.5	1.0	0.62	4.38	60.00	86.18
10	10	1.5	1.0	0.62	3.99	71.43	88.75
11	10	2.0	0.5	0.31	3.80	50.00	64.56
12	8	2.0	1.0	0.42	4.18	55.56	74.65
13	10	2.0	1.5	0.34	4.09	60.00	72.95
14	12	1.5	0.5	0.30	2.68	20.00	41.77
15	10	1.5	1.0	0.61	4.40	75.00	93.08
16	12	1.5	1.5	0.40	4.60	50.00	74.07
17	8	1.5	0.5	0.26	3.27	33.33	50.50

2.4.2 模型的拟合 采用ANOVA对各因素进行多元二次回归，得回归方程：

$$Y = 91.41 + 0.87A + 7.68B + 9.40C - 4.75AB + 8.37AC - 6.83BC - 19.13A^2 - 12.16B^2 - 18.37C^2$$

从表2的方差分析表可以看出，B、C、A²、B²、C²具有显著性影响，影响程度为C > B > A；失拟项为0.328 0 > 0.05，表明差异无统计学意义；相关系数r为0.968 7，证明该模型拟合很好，可用该模型对试验结果进行测定。根据回归分析结果，得其三维曲面图，结果如图2。



注：A. 浸泡时间和加水倍数对综合评分的影响；B. 提取时间和加水倍数对综合评分的影响；C. 提取时间和浸泡时间对综合评分的影响。

图2 综合评分的三维响应面图

表2 方差分析

方差来源	<i>f</i>	SS	MS	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
模型	9	5 726.36	636.26	24.10	0.000 2
A	1	5.99	5.99	0.23	0.648 5
B	1	472.17	472.17	17.88	0.003 9
C	1	707.26	707.26	26.79	0.001 3
AB	1	90.16	90.16	3.41	0.107 1
AC	1	280.06	280.06	10.61	0.013 9
BC	1	186.46	186.46	7.06	0.032 6
A ²	1	1 540.99	1 540.99	58.37	0.000 1
B ²	1	622.16	622.16	23.56	0.001 8
C ²	1	1 420.21	1 420.21	53.79	0.000 2
残差	7	184.82	26.40	—	—
失拟项	3	100.01	33.34	1.57	0.328 0
纯误差	4	84.81	21.20	—	—
总差	16	5 911.18	—	—	—

注：“—”为无意义的值。

2.4.3 验证试验 通过对实验数据的综合分析,最佳提取工艺:浸泡时间1.62 h,加10.08倍量水,提取时间1.11 h;结合实际生产确定最佳工艺为浸泡1.5 h,加10倍量水提取2次,每次1 h。按优选的提取工艺再进行3次验证试验,结果天麻素、芍药苷平均质量浓度分别为0.59、6.35 mg·g⁻¹;平均离体血管舒张率为71.03%。综合评分和预测值的偏差较小,表明该二项式模型拟合效果良好,可信度高。结果如表3。

表3 验证试验结果

实验号	天麻素含量/mg·g ⁻¹	芍药苷含量/mg·g ⁻¹	离体血管舒张率/%	综合评分	\bar{x}
1	0.57	6.65	71.43	95.02	
2	0.65	6.15	75.00	97.37	94.25
3	0.57	6.25	66.67	90.37	

3 讨论

地芍苣冬汤中生地为其君药,其主要成分为梓醇及毛蕊花糖苷,未将其两种成分作为含量测定指标的原因如下:1)处方中毛蕊花糖苷的理论含量小于制剂的万分之一,含量测定指标应体现对制剂质量的可控性,含量低于万分之二已基本没有质控意义,故未将毛蕊花糖苷作为含量测定指标。处方中梓醇的理论含量为制剂的万分之三,含量也相对偏低;2)梓醇为环烯醚萜类化合物,经查阅文献知其对热和酸不稳定,在酸性条件下可发生化学反应。故猜测其与方中其他药材发生了化学反应,故未能测出;

3)查阅文献得知,生地中含有梓醇及能水解梓醇的 β -葡萄糖苷酶, β -葡萄糖苷酶易被高温破坏,在低温下活性较强。故影响梓醇稳定性的3个主要因素归结为 β -葡萄糖苷酶酶解、酸碱度和温度。所以提取梓醇的过程中,考察了 β -葡萄糖苷酶抑制剂加入量、pH值及温度对其含量的影响,但是经反复实验摸索,并未测出梓醇。故采用了臣药白芍中芍药苷及佐药天麻中天麻素作为含量测定指标。

离体血管环实验中,在配置离体血管环实验中所需的kerb's营养液时,最后加入CaCl₂时多次出现浑浊现象,考虑到是加入时未快速搅拌以避免形成络合物,改良操作方法后配置出了澄清的营养液。且血管环需放置在4℃ kerb's营养液中以保证血管的存活时间。

本方为治疗高血压的经验方,以君药和臣药中主要化学成分为指标;通过离体血管环实验确定了本方有扩张血管作用,故将离体血管舒张率作为药效学指标以优化提取工艺。其扩张血管作用也为本方降压机制的研究提供了基础。将化学成分指标与药效学指标相结合,对提取工艺进行评价,进一步优化了本方的提取方法,使优选出的工艺更准确可靠,这是本文的一个创新点,同时也为中药复方提取工艺的优化提供了新思路。

参考文献

- [1] 薛莲,陈贤云,阮丹,等.武汉市部分居民高血压发生率相关因素分析[J].检验医学与临床,2012,9(6):653-654.
- [2] 刘力生.临床高血压病学[M].北京:北京大学医学出版社,2015.
- [3] 彭珍香,黄海定,邓时贵.芍药苷对大鼠离体胸主动脉血管环的作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):190-194.
- [4] 谢世虎.天麻的鉴定和药理作用研究[J].中国卫生产业,2016,13(21):167-169.
- [5] 杨荣艳.HPLC测定通络痹痛丸中天麻素的含量[J].中国现代中药,2011,13(3):36-37.
- [6] 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,2015:105.
- [7] 刘广辉,李新,陈锋,等.ERK1/2参与自发性高血压大鼠离体血管环对apelin-13舒张反应性降低作用[J].生物化学与生物物理进展,2009,36(12):1578-1588.
- [8] 贾国栋,崔文玉,龙超良,等.盐酸埃他卡林对大鼠主动脉血管环和尾动脉血管条的选择性舒张作用[J].中国临床康复,2004,8(3):443-445.

(收稿日期:2018-06-25 编辑:王笑辉)