

- “整体”释放特征研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 399-401.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [12] 陈立兵, 王中华, 傅丹丹, 等. 应用化合物组释放动力学方法评价银翘解毒片的释放特征(英文)[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 450-455.
- [13] 余煜棉, 彭兰乔, 谢亚斐. 计算分光光度法同时测定多组分的原理和方法[J]. 广东工业大学学报, 1997(2): 60-67.
- [14] 张继稳, 陈立兵, 顾景凯, 等. 多组分中药化合物组释放/溶出动力学理论研究[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 48-52.

正交试验结合 Box-Behnken 响应面法优化靓靓胶囊水提取工艺

李红娟^{1,2}, 柏伟荣^{1,2}, 高如意^{1,2}, 徐振秋^{1,2}, 毕宇安^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

摘要: 目的 采用正交试验法结合 Box-Behnken 响应面法优化靓靓胶囊水提取工艺。方法 以没食子酸、葛根素、芍药苷提取率以及水提物出膏率为指标, 以液料比、提取时间、提取次数为因素, 正交试验初步筛选工艺参数, Box-Behnken 响应面法作进一步优化。结果 最佳条件为液料比 12 : 1, 提取两次, 每次 90 min, 各指标相对误差均小于 2%。结论 正交试验结合 Box-Behnken 响应面法可减少靓靓胶囊水提取次数, 降低生产成本。

关键词: 靓靓胶囊; 水提取工艺; 正交试验; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1933-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.012

Optimization of the aqueous extraction for Liangliang Capsules by orthogonal test combined with Box-Behnken response surface method

LI Hong-juan^{1,2}, BAI Wei-rong^{1,2}, GAO Ru-yi^{1,2}, XU Zhen-qiu^{1,2}, BI Yu-an^{1,2},
WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2*}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China; 2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the aqueous extraction for Liangliang Capsules (for chloasma) by orthogonal test combined with Box-Behnken response surface method. **METHODS** With considerations for paste-forming rate, and the yields of gallic acid, puerarin and paeoniflorin, the processing parameters of liquid-solid ratio, extraction time and frequency were primarily screened by orthogonal test, then the further optimization was performed by Box-Behnken response surface method. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 12 : 1 for liquid-solid ratio, extracting twice, and 90 min for each time. All the relative errors of various indices were less than 2% . **CONCLUSION** Orthogonal test combined with Box-Behnken response surface method can reduce the frequency for aqueous extraction of Liangliang Capsules and lower the production cost.

KEY WORDS: Liangliang Capsules; aqueous extraction; orthogonal test; Box-Behnken response surface method

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: 科技部重大新药创制项目(2013ZX09402203)

作者简介: 李红娟(1983—), 女, 硕士, 研究员, 从事功能性保健食品的研究与开发。E-mail: lihongjuan04@126.com

* 通信作者: 萧伟(1959—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药新药研究与开发。Tel: (0518) 81152337, E-mail: Kanionlunwen@

黄褐斑又称“黧黑斑”、“肝斑”，是一种获得性色素沉着皮肤病，多发于中青年女性，是临床上常见而又难以治愈的皮肤病之一，严重影响了患者的日常生活^[1-2]。靓靓胶囊根据黄褐斑的发病机制，精选当归^[3-4]、葛根^[5-6]、白芍^[7-8]、牡丹皮^[9-10]等原料制成的具有祛黄褐斑作用的保健品。为了控制其产品质量及安全性，本实验采用水煎煮提取其中的有效成分，选取没食子酸、葛根素、芍药苷、出膏率作为综合评分指标，在正交试验基础上，通过 Box-Behnken 响应面法^[11]进一步优化工艺参数，为该药物的产业化研究提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；Sartorius BP 211D 电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；DZTW 型调温电热套（北京市永光明医疗仪器厂）；RE-300 型旋转蒸发仪（上海亚荣）；超纯水机（美国 Millipore 公司）。

1.2 试剂 葛根（产地湖北恩施，葛根素含量 2.6%）、当归（产地甘肃岷县）、白芍（产地安徽亳州，芍药苷含量 1.6%）、牡丹皮（产地安徽亳州，没食子酸含量 0.2%，芍药苷含量 1.0%），经连云港康缘大药房吴舟执业药师鉴定，为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根茎、毛茛科植物芍药 *Paenonia lactiflora* Pall. 的干燥根、毛茛科植物牡丹 *Paenonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。没食子酸（批号 110831-201204，含量 89.9%）、葛根素（批号 110752-201313，含量 95.5%）、芍药苷（批号 110736-201438，含量 96.4%）对照品（中国食品药品检定研究院）。甲醇、乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 指标成分测定

2.1.1 色谱条件 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；以乙腈（A）-0.02% 三氟乙酸（B）为流动相，梯度洗脱（程序见表 1）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 250 nm。在此条件下，没食子酸，葛根素，芍药苷均可与其他成分的吸收峰达到基线分离，见图 1。

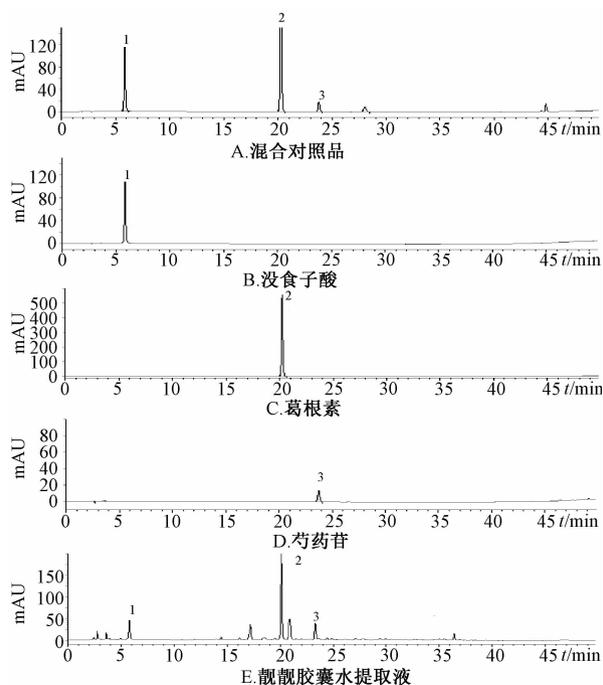
2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 混合对照品溶液 精密称取没食子酸、葛根素、芍药苷对照品适量，置于 50 mL 量瓶中，甲醇稀释定容，摇匀，制得每 1 mL 含没食子酸

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	乙腈/%	0.02% 三氟乙酸/%
0~5	5	95
5~20	5→17	95→83
20~25	17→18	83→82
25~30	18→25	82→75
30~50	25→88	75→12



1. 没食子酸 2. 葛根素 3. 芍药苷
1. gallic acid 2. puerarin 3. paeoniflorin

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

10 μg、葛根素 40 μg、芍药苷 25 μg 的混合对照品溶液。

2.1.2.2 供试品溶液 称取葛根、当归、白芍、牡丹皮适量，加 10 倍量水煎煮两次，每次 1 h。取煎煮液 2 mL，甲醇定容至 5 mL，滤过，取续滤液，即得。

2.1.3 方法学考察

2.1.3.1 线性范围 在“2.1.1”项色谱条件下，以峰面积为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，得回归方程分别为没食子酸 $Y = 16.629X - 1.1003$ ($r = 1$)，在 5.77 ~ 57.69 μg/mL 范围内线性关系良好；葛根素 $Y = 41.571X - 1.9431$ ($r = 0.9998$)，在 13.337 ~ 106.692 μg/mL 范围内线性关系良好；芍药苷 $Y = 15.248X + 1.2343$ ($r = 0.9997$)，在 6.22 ~

93.34 μg/mL范围内线性关系良好。

2.1.3.2 精密性试验 取同一质量浓度的没食子酸、葛根素、芍药苷对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下连续测定6次，测得各成分峰面积RSD分别为0.8%、1.0%、0.5%，表明仪器精密性良好。

2.1.3.3 重复性试验 制备6份供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下测定，测得没食子酸、葛根素、芍药苷峰面积RSD分别为1.5%、1.8%、0.9%，表明该方法重复性良好。

2.1.3.4 稳定性试验 取供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下于0、2、4、8、16、24 h测定，测得没食子酸、葛根素、芍药苷峰面积RSD分别为1.9%、1.7%、1.5%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.3.5 加样回收率试验 精密称取含有量已知的提取液10 mL，置于25 mL量瓶中，加入100%含有量的没食子酸、葛根素、芍药苷对照品，50%甲醇定容至刻度，平行6份，精密吸取10 μL，进样分析。结果，平均回收率分别为没食子酸99.32%，RSD 1.69%；葛根素98.12%，RSD 2.07%；芍药苷99.35%，RSD 1.01%。

2.1.4 出膏率测定 精密量取待测样品 V_1 (mL)，置于已恒重的蒸发皿中 (M_1)，水浴上挥干，105 ℃烘箱中干燥至恒重，取出，置于干燥器中冷却30 min，迅速精密称定质量 (M_2)，计算出膏率，公式为出膏率 = $(M_2 - M_1) V_2 / m V_1 \times 100\%$ 。其中， m 为待测样品药材总质量， V_2 为待测样品总体积。

2.2 正交试验

2.2.1 试验设计 称取葛根50 g、当归62.5 g、白芍37.5 g、牡丹皮50 g，共9份，以液料比(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为因素煎煮提取，以没食子酸、葛根素、芍药苷提取率以及出膏率为指标进行评价。在此基础上，对多指标成分进行综合加权评分^[12]，设定总分为100分，结合各药味指标成分的药效作用，设定没食子酸、葛根素、芍药苷提取率以及出膏率得分分别为30、30、30、10分。以 D 代表指标成分的测定值，以各指标成分的最大值 D_{\max} 为参照，计算总评“归一值”(OD)，公式为 $OD = 30 \times D_{\text{没食子酸测定值}} / D_{\max - \text{没食子酸}} + 30 \times D_{\text{葛根素测定值}} / D_{\max - \text{葛根素}} + 30 \times D_{\text{芍药苷测定值}} / D_{\max - \text{芍药苷}} + 10 \times D_{\text{出膏率测定值}} / D_{\max - \text{出膏率}}$ 。试验设计及结果见表2。

表2 正交试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of orthogonal tests

编号	A 液料比	B 提取时间/min	C 提取次数/次	提取率/%			出膏率/%	总评“归一值”/%
				没食子酸	葛根素	芍药苷		
1	8:1 (1)	0.5 (1)	1 (1)	17.23	33.95	15.79	6.38	32.91
2	8:1 (1)	1 (2)	2 (2)	20.15	40.19	23.74	8.52	41.52
3	8:1 (1)	1.5 (3)	3 (3)	45.03	52.14	49.62	9.09	67.44
4	10:1 (2)	1 (2)	1 (1)	56.34	59.64	75.11	10.97	86.54
5	10:1 (2)	1.5 (3)	2 (2)	57.16	61.94	75.54	11.62	88.54
6	10:1 (2)	0.5 (1)	3 (3)	50.92	50.77	69.88	9.43	77.24
7	12:1 (3)	1.5 (3)	1 (1)	69.96	70.31	80.12	12.28	99.86
8	12:1 (3)	0.5 (1)	2 (2)	51.65	60.41	55.46	9.13	76.02
9	12:1 (3)	1 (2)	3 (3)	63.19	69.34	78.97	12.45	96.25
K_1	0.47	0.73	0.62					
K_2	0.84	0.69	0.75					
K_3	0.91	0.80	0.85					
R	0.43	0.12	1.09					

2.2.2 方差分析 结果见表3。由表可知，各因素的影响大小依次为 $A > C > B$ ，即液料比 > 提取次数 > 提取时间。其中，A、C两个因素有显著性差异 ($P < 0.05$)，而B因素无显著性差异 ($P > 0.05$)。最终确定，最佳提取工艺为 $A_3B_3C_3$ ，即加12倍量水提取3次，每次1.5 h。

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	0.33	2	0.16	95.19	<0.05
B	0.02	2	0.01	5.98	>0.05
C	0.08	2	0.04	23.51	<0.05
误差项	0.003	2	—	—	—

2.3 Box-Behnken 响应面法

2.3.1 因素水平 在正交试验基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法作进一步优化, 考察液料比、提取时间和提取次数 3 个因素, 每个因素设 3 个水平, 具体见表 4。

表 4 因素水平

Tab. 4 Factors and levels

水平	因素		
	A 液料比	B 提取时间/min	C 提取次数/次
-1	10:1	60	1
0	12:1	90	2
1	14:1	120	3

2.3.2 试验结果 利用 Design-Expert 8.0.7.1 软件进行分析, 试验设计和结果见表 5, 方差分析见表 6。

表 5 试验设计与结果

Tab. 5 Design and results of tests

编号	A	B	C	提取率/%			出膏率/%	总评“归一值”/%
				没食子酸	葛根素	芍药苷		
1	-1	-1	0	53.67	63.75	79.99	11.25	87.72
2	1	-1	0	53.45	59.27	72.08	12.01	83.39
3	-1	1	0	54.67	62.71	73.08	11.27	85.19
4	1	1	0	51.32	59.41	73.86	10.98	82.42
5	-1	0	-1	59.45	60.23	72.05	11.25	85.78
6	1	0	-1	54.86	49.91	72.17	10.92	79.21
7	-1	0	1	61.45	60.11	75.84	9.52	86.67
8	1	0	1	66.77	55.71	77.69	9.89	88.01
9	0	-1	-1	54.13	52.03	79.28	10.23	81.88
10	0	1	-1	54.32	51.83	79.85	10.42	82.23
11	0	-1	1	55.16	51.56	80.35	9.97	82.32
12	0	1	1	55.09	52.63	79.23	10.02	82.37
13	0	0	0	69.05	69.28	80.56	13.35	98.41
14	0	0	0	69.46	70.31	82.17	12.86	99.25
15	0	0	0	68.38	68.67	80.46	12.10	96.89
16	0	0	0	70.11	69.88	79.87	12.87	98.51
17	0	0	0	70.37	70.24	81.01	12.89	99.20

表 6 方差分析

Tab. 6 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F	$P_r > F$
模型	811.84	9	90.20	38.61	<0.000 1
A	19.00	1	19.00	8.13	0.024 6
B	1.20	1	1.20	0.51	0.496 6
C	13.18	1	13.18	5.64	0.049 2
AB	0.61	1	0.61	0.26	0.625 5
AC	15.64	1	15.64	6.70	0.036 1
BC	0.02	1	0.02	0.01	0.924 6
A ²	128.63	1	128.63	55.06	0.000 1
B ²	286.21	1	286.21	122.51	<0.000 1
C ²	269.96	1	269.96	115.55	<0.000 1
残差	16.35	7	2.34	—	—
失拟项	12.71	3	4.24	4.65	0.085 7
净误差	3.64	4	0.91	—	—
总误差	828.19	16	0.980 3	—	—

表 5 中, 编号 1 ~ 12 为析因试验, 13 ~ 17 为中心试验。各因素经回归拟合后, 得二次多项回归方程为 $OD = 168.62 + 29.83A + 1.56B + 21.67C + 0.006 5AB + 0.99AC - 0.002 5BC - 1.38A^2 - 0.009B^2 - 8.01C^2$ 。由表 6 可知, 模型具有高度的显著性 ($P < 0.000 1$), R^2 为 0.980 3, 失拟项不显著, 表明该模型拟合度较好。另外, A、C 两项 $P < 0.05$, 回归性显著, 与正交试验结果一致。

综上所述, 各因素的影响大小依次为 $A > C > B$ 。同时, AC 交互作用显著 ($P < 0.05$), 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。

2.4 响应面图 见图 2 ~ 4。

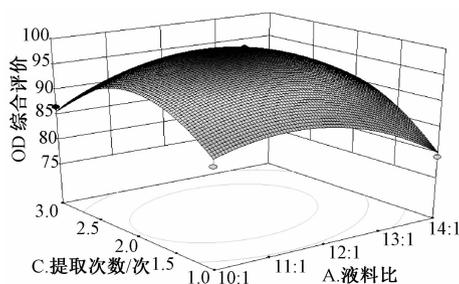


图 2 液料比与提取次数

Fig. 2 Liquid-solid ratio and extraction times

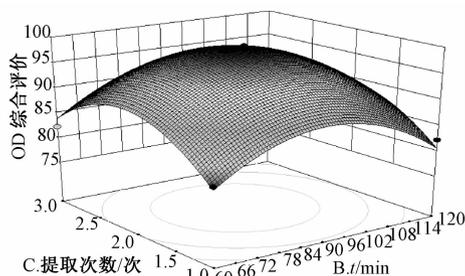


图 3 提取次数与提取时间

Fig. 3 Extraction times and extraction time

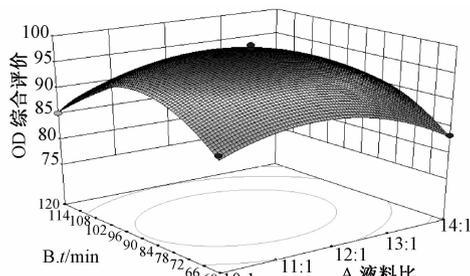


图 4 液料比与提取时间

Fig. 4 Liquid-solid ratio and extraction time

由图2可知,液料比和提取次数的交互作用较显著。由图3可知,提取次数和提取时的交互作用较小。由图4可知,提取时间和液料比存在一定的交互作用,但不显著。

2.5 验证试验 通过对二次回归方程求解,得到最佳工艺条件为液料比 11.74 : 1,提取时间 89.18 min,提取次数 2.07 次;在正交试验分析中,最佳工艺条件为液料比 12 : 1,提取时间 90 min,提取次数 3 次,其中提取次数 K_3 为 0.85, K_2 为 0.75,相差较小。考虑经济成本等因素,最终确定优选工艺条件为液料比 12 : 1,提取时间 90 min,提取次数两次。设计 3 组验证试验,结果见表 7,发现没食子酸、葛根素、芍药苷提取率以及出膏率的相对误差均小于 2%,说明该工艺稳定,重复性好。

表 7 验证试验结果

Tab. 7 Results of verification tests

编号	提取率/%			出膏率/ %	总评“归一 值”/%	相对误 差/%
	没食子酸	葛根素	芍药苷			
1	70.45	71.25	81.02	13.35	98.51	0.10
2	72.76	70.37	80.98	12.56	98.50	0.12
3	69.76	70.37	82.45	12.89	98.04	0.57

3 讨论

中药药效的发挥往往是多种活性成分共同作用的结果^[13]。对于多味药材的提取,由于成分的复杂性,故选择合适的指标成分尤为重要。本试验采用多指标含有量测定,结合出膏率来综合评价提取工艺,并对各成分提取率和出膏率进行系数加权,可较全面地反映各味药在整体制剂中的作用,并更直观地反映整体提取工艺。

本研究首先选取液料比、提取时间和提取次数 3 个因素,通过正交试验初步筛选工艺参数。再通过 Box-Behnken 响应面法作进一步的优化,建立数学模型,得到靛靛胶囊最佳水提取工艺为液料比 12 : 1,提取时间 90 min,提取次数两次,与单纯

正交试验结果相比,提取次数有所降低,并节约了成本。而且,验证试验结果与实测值的相对误差均小于 2%,表明该方法科学、合理、可行,而且工艺稳定可靠,可为工业化生产提供参考。

参考文献:

[1] 汤楠,吴艳华,李其林,等. 黄褐斑病因及发病机制研究现状[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2013, 20(4): 302-304.

[2] 杨婷婷,杨国红,王曙光. 黄褐斑发病机制及治疗药物的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(3): 604-606.

[3] 万晓青,张伟. 当归对血液系统的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(12): 附录6-附录8.

[4] 应军,倪庆纯,杨威,等. 杭白菊、当归、丹参提取液抑制黄褐斑形成及机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(5): 958-962.

[5] 仲惟燕,蒋海强,王建平,等. 葛根抗氧化有效部位的提取分离[J]. 食品与药品, 2008, 10(9): 31-33.

[6] 郑伟. 葛根及葛根素对衰老小鼠皮肤总抗氧化能力和羟自由基抑制率影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2012.

[7] 何晓燕,李真贞. 白芍对血虚小鼠补血作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 999-1000.

[8] 张建军,黄银峰,王丽丽,等. 白芍、赤芍及芍药苷、芍药内酯苷对综合放血法致血虚小鼠补血作用的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3358-3362.

[9] 解士海,陈志强,卜今,等. 丹皮酚在体外对人黑素细胞酪氨酸酶活性及黑素生成的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(11): 639-641.

[10] 侯建刚,苗方. 丹皮酚急性毒性和抗肿瘤活性的实验研究[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2008, 20(4): 27-29.

[11] Xu Q, Shen Y Y, Wang H F, et al. Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from *Fructus Sophorae* [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2122-2129.

[12] 王雪焦,焦连庆,于敏,等. 多指标综合加权评分法优选五味子与丹参醇提工艺研究[J]. 中草药, 2015, 46(7): 998-1001.

[13] 胡彬,果德安. 中药有效成分的探秘者[N]. 中国中医药报, 2014-02-26(3).