响应面法优化十味盆安颗粒虎杖醋延胡索的提取工艺研究*

刘长龙，李云霄，钱 俊，吴 云，萧 伟**

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

摘 要：目的：优选十味盆安颗粒虎杖、醋延胡索的最佳提取工艺。方法：在单因素考察的基础上，选择乙醇浓度、提取时间、提取次数三个主要因素，以提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率及干膏得率的综合评分为响应值，采用响应面试验优选虎杖、醋延胡索的提取工艺，并对最佳工艺进行工艺验证。结果：最佳提取工艺为10倍量59%乙醇加热回流提取2次，每次95 min，经三批工艺验证，虎杖苷、延胡索乙素平均提取率分别为87.80%、94.11%，干膏的平均得膏率为15.00%，综合评分为94.71，RSD=0.49%。结论：该工艺采用响应面法优化后，稳定可行，有效成分转移率高，适合产业化生产。

关键词：十味盆安颗粒 虎杖苷 延胡索乙素 提取工艺 响应面法

doi：10.11842/wst.2016.09.027 中图分类号：R283 文献标识码：A

十味盆安方为江苏省中医院谈勇教授的临床经验方，由赤芍、虎杖、醋延胡索等十味中药组成[1]，具有清热除湿、化瘀止痛之功效，主治湿热瘀结所致的腹痛、腹坠胀，慢性盆腔炎见上述证候者[2]。该方在临床应用多年，且疗效显著，原方为汤剂，临床应用存在诸多限制。因此，本研究采用现代制剂技术，开发了治疗慢性盆腔炎的中药六类新药——十味盆安颗粒。

虎杖、醋延胡索为方中君药，虎杖苷、延胡索乙素是分别是虎杖、醋延胡索中主要有效成分[3-5]。相关研究表明，两味药均宜采用乙醇提取工艺[6,7]。响应面法已被广泛地用于多因素试验优化上，该法能得到明确的函数表达式，可在指定区域内得到因素的最优组合和响应的最佳值[8]。为提高有效成分的提取率并保证质量的稳定均一，本研究在单因素考察的基础上，以提取液中虎杖苷、延胡索乙素的提取率及干膏率的综合评分为响应值，应用Design-Expert软件的Box-Behnken[9,10]中心组合设计方法设计响应面试验进行虎杖、醋延胡索提取工艺的优化研究。

1 仪器与耗材

Aglient 1260型高效液相色谱仪（美国Aglient公司），BP211D型电子分析天平（德国Sartorius公司）；虎杖苷对照品、延胡索乙素对照品（中国食品药品检定研究院，批号分别为：111575-200502、110726-201213）；虎杖饮片、醋延胡索饮片（亳州市中药饮片厂，批号分别为：140401、140301）；乙腈为色谱纯，水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件

虎杖苷色谱条件Phenomenex luna C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈-水（20∶80）为流动相，检测波长为306 nm，流速1 mL·min^{-1}，进样10 μL，

收稿日期：2014-12-26

修回日期：2014-12-29

* 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项（2013ZX09402203）：现代中药创新集群与数字制药技术平台，负责人：王振中。

** 通讯作者：萧伟，本刊编委，博士，研究员级高级工程师，主要研究方向：中药新药的研究与开发。

柱温 30 ℃。

延胡索乙素色谱条件 Phenomenex Gemini C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈－磷酸钠缓冲盐（精密称取无水磷酸二氢钠 6 g、十二水合磷酸氢二钠约 2 g，加水 1 000 mL 使溶解）（42∶58）为流动相，检测波长为 280 nm，流速 1 mL·min^{-1}，进样 10 μL，柱温 30℃。

2.1.2 溶液的制备

2.1.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取虎杖苷、延胡索乙素对照品适量，分别加甲醇制成浓度分别为 71.9 μg.mL^{-1}、102.7 μg·mL^{-1} 的溶液，即得。

2.1.2.1 虎杖苷供试品溶液的制备

精密移取各试验项下的提取液 5 mL，置 50 mL 量瓶中，加稀乙醇至刻度，摇匀即得。

2.1.2.1 延胡索乙素供试品溶液的制备

取各试验项下的提取液适量，以 0.45 μm 有机滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.2.2 阴性样品溶液的制备

取虎杖饮片 50 g，加 20 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 90 min，滤过，按照延胡索乙素供试品溶液制备方法制备缺醋延胡索阴性样品溶液；取醋延胡索饮片 50 g，加 20 倍量 60% 乙醇回流提取 2 次，每次 90 min，滤过，按照虎杖苷供试品溶液制备方法制备缺虎杖阴性样品溶液。

2.1.3 系统适应性与专属性试验

在上述色谱条件下，理论塔板数按虎杖苷色谱峰计算应不得低于 3 000，按延胡索乙素色谱峰计算应不得低于 6 000，分离度均＞ 1.5，且均已达到基线分离，拖尾因子在 0.95–1.05 之间。

分别精密吸取虎杖苷对照品溶液、虎杖苷供试品溶液、缺虎杖阴性样品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱，结果见图 1，表明缺虎杖阴性样品溶液无干扰；分别精密吸取延胡索乙素对照品溶液、延胡索乙素供试品溶液、缺醋延胡索阴性样品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱，结果见图 2，表明缺醋延胡索阴性样品溶液无干扰，说明本含量测定方法专属性较强。

2.1.4 线性关系考察

取虎杖苷对照品溶液、延胡索乙素对照品溶液，按“2.1.1”项下的色谱条件分别进样 1、2、5、10、20 μL 和 1、2、5、10、20 μL，测定色谱峰峰面积，以对照品的进样量为横坐标（X），以色谱峰峰面积为纵坐标（Y），绘制标准曲线，得虎杖苷、延胡索乙素的标准曲线分别为 Y=36780X+18.39（r=0.999 9）、Y=6516X+1.967（r=0.999 6），线性范围分别为 0.007 19~0.143 8 μg、0.010 27~0.205 4 μg，线性关系良好。

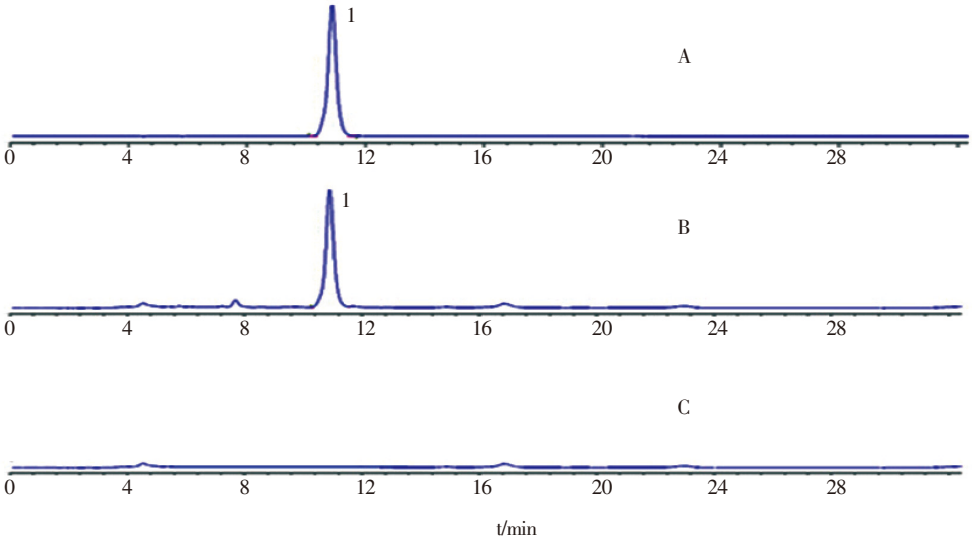

图 1 虎杖苷含量测定 HPLC 图

A. 虎杖苷对照品 B. 虎杖苷供试品 C. 缺虎杖阴性样品，1. 虎杖苷。

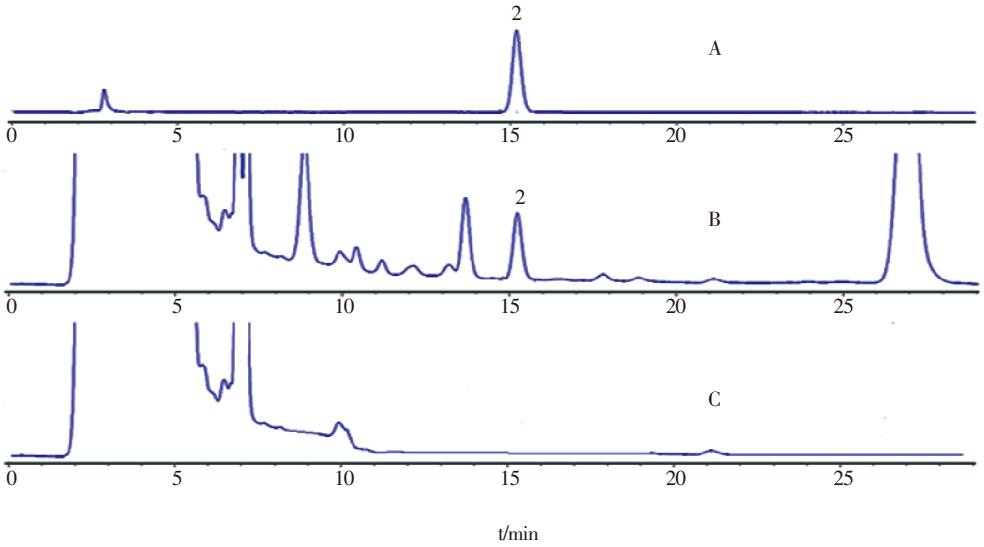

图 2 延胡索乙素含量测定 HPLC 图

注：A. 延胡索乙素对照品，B. 延胡索乙素供试品，C. 缺醋延胡索阴性样品，2. 延胡索乙素。

2.1.5 精密度试验

取虎杖苷对照品溶液、延胡索乙素对照品溶液按“2.1.1”项下的色谱条件测定，分别连续进样 5 次，测得虎杖苷、延胡索乙素色谱峰峰面积 RSD 分别为 0.94%、1.31%，表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验

取“2.3.1”乙醇浓度考察项下 60% 乙醇组提取液适量，按照 2.1.2 项下方法制备虎杖苷、延胡索乙素供试品溶液，分别放置 0、2、4、8、12、24 h，按“2.1.1”项下色谱条件测定，测得虎杖苷和延胡索乙素的色谱峰峰面积 RSD 分别为 1.68%、0.74%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.7 重复性试验

取“2.3.1”乙醇浓度考察项下 60% 乙醇组提取液适量，按照“2.1.2”项下方法制备 6 份虎杖苷、延胡索乙素供试品溶液，按照“2.1.1”项下色谱条件测定色谱峰面积，计算 RSD 分别为 1.07%、0.92%，表明试验重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验

精密称取 6 份已测定含量的提取液适量，分别加入与样品等量的虎杖苷、延胡索乙素对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进行含量测定，计算加样回收率，结果虎杖苷平均回收率为 98.94%，RSD 为 1.58%，延胡索乙素平均回收率为 101.67%，RSD 为 1.02%。

2.2 提取率及干膏率的测定

2.2.1 提取率测定

按照“2.1.1”项下含量测定方法，采用外标一点法分别计算提取液中虎杖苷、延胡索乙素的含量，虎杖中虎杖苷含量、醋延胡索中延胡索乙素含量均按照 2010 年版《中国药典》一部相应药材项下含量测定方法进行测定。

$$\text{虎杖苷提取率}=\frac{\text{提取液中虎杖苷含量}}{\text{虎杖中虎杖苷含量}}\times 100$$

$$\text{延胡索乙素提取率}=\frac{\text{提取液中延胡索乙素含量}}{\text{醋延胡索中延胡索乙素含量}}\times 100$$

2.2.2 干膏率的测定

精密量取试验项下的提取液适量，置干燥至已恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，105 ℃干燥至恒重，称定重量，计算干膏率。

2.3 单因素试验考察

考虑到延胡索乙素为生物碱类成分，而虎杖中大黄素等蒽醌类为偏酸性，两者配伍合提可能会影响有效成分的煎出率[11-14]。本研究曾对虎杖、延胡索的分提与合提工艺进行考察，结果显示虎杖与延胡索合提时提取液延胡索乙素、虎杖苷提取率及干膏率与分提时无明显差异。考虑到生产可行性，确

定采用合提工艺。

影响中药乙醇提取有效成分提取率、干膏率的因素一般有:乙醇浓度、加醇倍量、提取时间和提取次数。根据前期单因素考察结果发现,溶剂倍量对两个成分的提取率影响不显著,在以10、12倍量60%乙醇提取时提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率、干膏率相差不大,为节省成本、提高效率,将溶剂倍量固定在10倍量,不再进行考察。

2.3.1 乙醇浓度考察

取4份虎杖、醋延胡索饮片,每份虎杖、醋延胡索饮片均为50 g,每份分别加10倍量40、60、80、95%乙醇回流提取2次,每次90 min,测定各组提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率和干膏率。结果,随乙醇浓度的升高提取液中两个成分的提取率、干膏率均呈先增加后降低的规律,以60%乙醇提取时虎杖苷、延胡索乙素提取率最高,因此最优条件为60%乙醇提取。

2.3.2 提取次数考察

取3份虎杖、醋延胡索饮片,每份虎杖、醋延胡索饮片均为50 g,每份分别加10倍量60%乙醇回流提取1、2、3次,每次90 min,测定各组提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率和干膏率,结果提取1、2、3次时虎杖苷提取率分别为62.58%、87.01%、87.56%,延胡索乙素提取率分别为56.21%、93.43%、95.07%,干膏率分别为8.52%、14.08%、16.27%。结果说明,两味药在以10倍量60%乙醇回流提取2次和提取3次时提取率差异不大,考虑到生产成本及效率,以提取2次为最优条件。

2.3.3 提取时间考察

取5份虎杖、醋延胡索饮片,每份虎杖、醋延胡索饮片均为50 g,每份均加10倍量60%乙醇回流提取2次,提取时间分别为每次30、60、90、120、150 min,测定各组提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率和干膏率。结果,随着提取时间的延长,虎杖苷、延胡索乙素提取率以及干膏率不断增加,当提取时间为90 min时最高,到120 min时提取率有所下降,所以选择最佳提取时间为90 min。

2.4 响应面法试验研究

2.4.1 响应面试验设计

取15份虎杖、醋延胡索饮片,每份虎杖、醋延胡索饮片均为50 g,在单因素考察的基础上,根据Box-Behnken的中心组合设计原理,选取乙醇浓度、提取时间、提取次数对提取率、干膏率影响显著的3个因素为自变量,采用三因素三水平响应面分析法,以提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率及干膏率的综合加权评分为响应值,综合加权评分=(虎杖苷提取率/虎杖苷最高提取率×0.4+延胡索乙素/延胡索乙素最高提取率×0.4+干膏率/最高干膏率×0.2)×100[15]。按表1中因素水平进行响应面试验,其中试验1-12为析因实验,试验13-15为中心实验,用来估计实验误差。

2.4.2 回归模型建立及分析

Box-Behnken试验设计及结果见表2。

表1 虎杖醋延胡索提取工艺响应面因素水平编码

编码水平	乙醇浓度(A)	提取时间(B)	提取次数(C)
-1	50	8	1
0	60	10	2
1	70	12	3

表2 响应面试验设计及结果

组别	乙醇浓度A	提取时间B	提取次数C	虎杖苷提取率/%	延胡索乙素提取率/%	干膏率/%	综合评分
1	-1	1	0	70.51	80.20	16.01	82.02
2	0	-1	1	88.40	88.31	13.89	91.40
3	-1	0	1	72.00	71.04	19.78	82.63
4	0	1	1	83.56	91.34	16.75	93.38
5	-1	0	-1	51.23	55.74	7.63	54.47
6	1	0	1	83.57	66.20	13.50	79.47
7	0	1	-1	64.33	59.70	8.76	63.22
8	0	-1	-1	57.08	43.37	8.01	52.27
9	-1	-1	0	73.54	82.10	15.69	83.87
10	1	0	-1	51.78	37.06	5.80	44.97
11	1	1	0	78.32	69.61	14.06	79.10
12	1	-1	0	80.93	56.01	13.54	74.00
13	0	0	0	87.64	93.81	14.51	94.01
14	0	0	0	87.31	94.56	14.83	94.50
15	0	0	0	86.63	93.50	14.37	93.28

由表可知 A、C、A^2、C^2 的 P 值均＜ 0.01，表明其对提取工艺的影响极显著，B 对提取工艺的影响显著，因素对指标的影响为：提取次数 C ＞乙醇浓度 A ＞提取时间 B；AB、AC、BC 的交互项并不显著，交互项可以省略，方差分析结果表明，各因素与指标之间的关系不是简单的线性关系。模型 P ＜ 0.000 1，说明模型具有高度显著性；模型相关系数 R^2=0.996 4，说明模型拟合度很好，失拟误差 P 值为 0.062 3 ＞ 0.05，说明实验误差不显著，响应面模型对实验拟合的情况较好。综上所述，该模型的建立是合理的，可用回归方程代替试验真实点对实验结果进行分析。利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 实验数据进行多元回归拟合，拟合出的综合评分（Y）对自变量 A、B、C 的二次多项回归方程为：

$$Y=93.93-3.18A+2.02B+16.49C+1.74AB+1.59AC-2.24BC-11.93A^2-2.25B^2-16.61C^2。$$

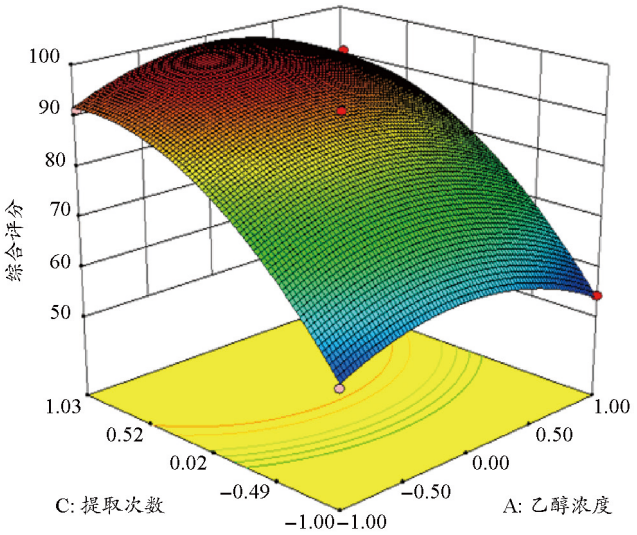

图 3 提取次数、乙醇浓度对综合评分影响的响应面图

2.4.3 相应曲面分析及优化

因素 A 和因素 C 交互响应曲线面见图 5，根据拟合的响应曲面形状，通过 Design-Expert 8.0.6 软件计算并分析得到各因素的最优条件为：提取时间 95.26 min，乙醇浓度 59.12%，提取次数 2.48 次，最优的综合评分 98.21，考虑到生产可行性，将提取时间修正为 95 min，乙醇浓度修正为 59%，此条件下提取次数为 2 次、3 次时预测综合评分分别为 93.57、92.92，两者差异不大，与单因素考察提取次数时结果一致。因此，将提取次数定为 2 次。

2.4.4 工艺验证

响应面分析得到的优化结果是一个预测结果，需要进行工艺验证。按照优选出的最佳工艺平行进行三次验证试验，取 3 份虎杖、醋延胡索饮片，每份虎杖、醋延胡索饮片均为 50 g，每份各加 10 倍量 59% 乙醇回流提取 2 次，每次 95 min，测定各提取液中虎杖苷、延胡索乙素提取率及干膏率，结果见表 4。采用优选工艺所得结果综合评分为 94.71，RSD=0.49%，与预测综合评分 93.57 相差不大，表明本响应面实验是成功的且该工艺稳定可行。

表 3 回归系数显著性及方差分析结果

系数项	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3 773.077	9	419.230 8	116.690 8	＜ 0.000 1
A	80.962 81	1	80.962 81	22.535 59	0.005 1
B	32.724 05	1	32.724 05	9.108 573	0.029 5
C	2 176.35	1	2 176.35	605.776	＜ 0.000 1
AB	12.075 63	1	12.075 63	3.361 189	0.126 2
AC	10.048 9	1	10.048 9	2.797 06	0.155 3
BC	20.115 23	1	20.115 23	5.598 97	0.064 3
A^2	525.727 6	1	525.727 6	146.333 6	＜ 0.000 1
B^2	18.692 31	1	18.692 31	5.202 909	0.071 4
C^2	1 018.985	1	1 018.985	283.629 3	＜ 0.000 1
残差	17.963 33	5	3.592 665		
失拟误差	17.209 53	3	5.736 508	15.220 24	0.062 3
纯误差	0.753 8	2	0.376 9		
总和	3 791.041	14			

表 4　工艺验证结果

组别	虎杖苷提取率 /%	延胡索乙素提取率 /%	干膏率 /%	综合评分	RSD/%
试验 1	87.89	94.03	15.31	95.03	0.49
试验 2	87.32	94.83	15.13	94.92	
试验 3	88.20	93.47	14.57	94.18	
均值	87.80	94.11	15.00	94.71	–

3　讨论

试验中发现，60% 乙醇提取时延胡索乙素、虎杖苷提取率较高，95% 乙醇提取时延胡索乙素提取率急剧下降，说明在考察醋延胡索提取工艺时若以延胡索乙素为指标不适宜用高浓度乙醇提取，延胡索乙素为叔胺碱，并且在延胡索醋制过程中延胡索乙素与醋酸结合成生物碱盐，高浓度乙醇具有盐析作用抑制了延胡索乙素的溶出；另外高浓度乙醇的沸点较低使得提取时温度偏低[16]，对延胡索乙素的溶出也有一定影响。

响应面法能在指定区域内得到因素的最优组合，在采用此法进行工艺优化时一般只确定一个最优参数，导致实际生产中操作空间较小。本响应面试验考察结果发现，乙醇浓度、提取时间均对醋延胡索、虎杖提取结果有较显著性影响，经优化的乙醇浓度为 59%，提取时间为 95 min，而在生产中一般用酒精计来测定所配制乙醇浓度，用肉眼观察溶剂的沸腾与否，较容易受到温度、观测误差等影响，试验参数精确度较低。因此，可设定提取结果在一个允许波动的范围，对乙醇浓度、提取时间的选择范围进行考察，以设定一个便于产业化的工艺参数区间。

中药复方大多存在主要药效物质不明确的情况，在考察中药复方提取工艺时，应尽量采用多指标成分和出膏量综合加权评分的方法来全面评价提取工艺，并且应充分考虑复方化学成分之间的相互影响以及炮制对中药化学成分形态的转化，这样才能优选出疗效显著、适宜产业化生产的工艺。

参考文献

1　萧伟，王振中，毕宇安，等．一种治疗慢性盆腔炎的药物组合物及其制备方法．CN201310585170.6, 2013–11–14.

2　钱俊，林夏，刘莉莉，等．干法制粒技术在 FK Ⅳ颗粒剂制备中的应用．世界科学技术 – 中医药现代化，2013, 15(9): 1990–1997.

3　贾玉梅，王君明，崔瑛．基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展．中国实验方剂学杂志，2011, 17(9): 263–269.

4　孔晓华，周玲芝．中药虎杖的研究进展．中医药导报，2009, 15(5): 107–110.

5　鲁春梅，张春森，姜立勇．延胡索化学成分及药理作用研究进展．中国现代药物应用，2011, 5(15): 126–127.

6　周素娟．正交设计法研究补肾通痹颗粒提取工艺．中华中医药学刊，2007, 25(3): 606–607.

7　谢扬，朱秋华，刘瑞源，等．正交实验筛选虎杖甙提取工艺．中药材，2004, 27(9): 678–679.

8　陈敬，温庆果，刘韶，等．正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究．中草药，2012, 43(11): 2183–2188.

9　朱海琳，孟兆青，丁岗，等．响应面法优化续断中川续断皂苷 VI 的超声提取工艺．世界科学技术 – 中医药现代化，2014, 16(8): 1777–1783.

10　于兆慧，刘其媛，崔莉，等．超声辅助酶解人参总皂苷制备人参稀有皂苷 compound K 的研究．中国中药杂志，2014, 39(16): 3079–3084.

11　贺凯，高建莉，赵光树．延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展．中草药，2007, 38(12): 1909–1911.

12　刘艺娜，王宏，何薇．不同药物分组对化学成分提取率的影响．中国实验方剂学杂志，2012, 18(7): 30–31.

13　曾灵娜，王伽伯，肖小河，等．中药调剂规范化研究（Ⅲ）：含不同类型成分的中药对大黄蒽醌煎出量的影响．中国中药杂志，2012, 37(2): 202–206.

14　邹佳丽，黄萍，袁月梅，等．大黄黄连泻心汤不同配伍浸渍剂中主要化学成分变化研究．世界科学技术 – 中医药现代化，2009, 11(2): 263–268.

15　王洁，宋忠兴，郭东艳，等．多指标综合加权评分法优选桑蒂复肝胶囊的提取工艺．现代中医药，2010, 30(1): 56.

16　卢耀文，杨中林．延胡索乙素提取工艺优选研究．中成药，2008, 30(8): 1247–1248.

Optimum Extraction Process of Polygoni Cuspidati Rhizoma Et Radix and Corydalis Rhizoma from *Shiwei Pen'an* Granule Using Response Surface Method

Liu Changlong, Li Yunxiao, Qian Jun, Wu Yun, Xiao Wei

(Jiangsu Kanion Parmaceutical Co.,Ltd., State Key Laboratory of New-Tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This study aimed to optimize extraction process of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix and Corydalis Rhizoma from *Shiwei Pen´an* granule (SWPAG). In the study, ethanol concentration, extraction duration, extraction frequency were set up for main indexes according to the results of single factor experiments; the overall weighted scores of dry cream rate, polydatin and tetrahydropalmatine extraction rates for the response values, while response surface method (RSM) for optimum extraction process. It was found that optimal parameters included hotreflux for twice with ten folds of 59.00% ethanol solution, lasting 95 min for each time. Under the optimum conditions, the average dry extract rate was 15.00%, average extraction rates of polydatin and tetrahydropalmatine were 87.80% and 94.11%, respectively; the average dry cream rate was 15.00%, while the weighted composite score was 94.71 with the RSD value of 0.49%. As a conclusion, it was beneficial to industrial production for increasing effective components through the stable and optimum process of RSM.

Keywords: *Shiwei Pen´an* granule, polydatin, tetrahydropalmatine, response surface method, extraction process

(责任编辑 :马雅静, 责任译审 :朱黎婷)