

抗疏健骨颗粒醇提工艺优选研究

史传道 杜 星 郭东艳 王 露 曹 瑞

(陕西中医学院, 陕西咸阳 712046)

摘 要 目的:优化抗疏健骨颗粒醇提工艺条件,为抗疏健骨颗粒的进一步研究奠定基础。方法:在单因素试验的基础上,采用星点设计-效应面法优化醇提工艺条件。以乙醇浓度、溶剂用量、提取时间为自变量,淫羊藿苷、总黄酮含量及醇浸出物得率的加和为因变量,进行多元线性回归及二项式拟合,用效应面法优选最佳工艺条件,并进行预测分析。结果:最佳提取工艺条件为,8 倍量 70%乙醇,回流提取 2 次,每次 120min。结论:通过星点设计-效应面法优选得到的乙醇回流提取工艺条件合理,稳定可行。

关键词 抗疏健骨颗粒 星点设计 效应面法 提取工艺

中图分类号 R284.2 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2015)04-0059-03

抗疏健骨颗粒由淫羊藿、杜仲、牛膝、白术、丹参等药味组成,具有补肾健脾、活血壮骨的功效,主要用于脾肾两虚、气血瘀阻导致的骨质疏松症。淫羊藿、杜仲为方中的主要药味,现代药理研究表明,两味药中的成分具有抗骨质疏松作用^[1-4]。结合文献报道及预实验结果,本实验拟在单因素实验筛选的基础上,以淫羊藿苷、总黄酮含量及醇浸出物得率的加和作为综合评价指标,采用星点设计响应面分析法对乙醇回流提取工艺进行考察,为抗疏健骨颗粒剂的进一步研究提供参考依据。

1 实验材料

1.1 材料 淫羊藿(批号:130401)、杜仲(批号:130501),购于西安盛兴中药饮片有限责任公司;淫羊藿苷对照品(供含量测定用,批号:110737-200415),出自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯(Honeywell);水为过滤后的娃哈哈纯净水。

1.2 仪器 安捷伦 1260 型高效液相色谱仪(G1311C 型四元泵,G1329B 型进样器,G4212B 型二极管阵列检测器,ChemStation for LC 3D systems),UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津),Sartorius MC 电子天平(十万分之一),METTLER TOLEDO(Al204)电子天平(万分之一),RE-52AA 旋转蒸发器,SHB-III 型循环水式多用真空泵,D101 型电热鼓风干燥箱,SAITEXIANGYI 530 离心机。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Thermo ODS C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈-水(30:70);流速:1.0mL/min;检测波长为 270nm;柱温:20℃。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 0.1mg 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密移取各样品液 1mL,置 10mL 量瓶中,加入 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取淫羊藿苷对照品溶液(浓度 0.1mg/mL)1、2、4、6、8、10、12μL,按 2.1.1 项下色谱条件,测定峰面积。以峰面积 A 对淫羊藿苷含量 C(μg)进行线性回归,计算回归方程为: $y=730.19x+3.1022$,相关系数 $R^2=0.9999$,淫羊藿苷在 0.1~1.2μg 之间线性关系良好。

2.1.5 样品测定 精密吸取供试品溶液与对照品溶液各 10μL,注入液相色谱仪,依据 2.1.1 项下色谱条件,记录峰面积,采用外标一点法计算淫羊藿苷的含量。

2.2 醇浸出物得率的测定 精密吸取各浓缩定容至 100mL 的提取液 10mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105℃烘箱内干燥至恒重,置干燥器中冷却 30min,迅速精密称定重量。按公式计算

基金项目:陕西省科技厅资助项目(2012KTCL03-22);陕西省教育厅科研计划项目(11JK0674);陕西省中医药管理局中药药科研课题(13-LC069)

醇浸出率:醇浸出物得率(%)=[浸膏重量×10/药材重量]×100%。

2.3 总黄酮含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取淫羊藿苷对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 0.1mg 的溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密移取样品液 1mL 至 10mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 标准曲线的绘制 精密吸取淫羊藿苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL 置具塞容量瓶中,分别加甲醇定容至 10mL。以甲醇为空白参比,在 270nm 波长处测定吸光度。以吸光度 A 值对淫羊藿苷浓度 C 进行线性回归。结果表明:当淫羊藿苷的浓度在 0.005~0.025mg/mL 范围

内,浓度与吸光度有良好的线性关系,回归方程为: $A = 50.789C - 0.0120$, $R^2 = 0.9992$ 。

2.3.4 总黄酮含量测定 分别取供试品溶液和对照品溶液,以相应试剂甲醇为空白,照紫外-可见分光光度法,在 270nm 波长处测定吸光度值,代入标准曲线计算含量。

2.4 星点设计法优化提取工艺

2.4.1 试验设计及结果 根据星点设计的原理,选择影响醇提工艺的三个因素:乙醇浓度(X_1)、提取时间(X_2)、溶媒比(X_3)进行考察,由于提取次数

为非连续性数据,回归处理较

为困难,故以单因素进行考察,最终确定提取次数为 2 次。上述三个因素每个设三个水平,用代码值-1、0、1 来表示。因素水平见表 1,实验安排和结果见表 2。^[5-6]

2.4.2 模型拟合 采用 Design-Expert 8.0.6 软件,对表 2 中数据以综合评分对自变量进行多元线性回归和二项式拟合,得多元线性回归: $r = 0.6426$, $P < 0.0001$ 。由 r 值可以看出,拟合度不佳,因此线性模型不合适。得二项式拟合: $r = 0.9943$,简化后的二项式方程为: $Y = 94.89 - 1.44X_1 + 4.47X_2 + 1.36X_3 + 0.079X_1X_2 + 0.17X_1X_3 - 0.16X_2X_3 - 4.51X_1^2 - 1.70X_2^2 + 0.32X_3^2$, $r = 0.9839$,相对于线性拟合模型有大幅度提高,表明该方程有较大可信度。拟合回归方程的方差分析结果见表 3。

2.4.3 工艺优化与预测 固定 3 个变量中的一个为中值,再以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图。结果见图 1~3。在图上选取提取较佳的工艺为—— X_1 :68.96%, X_2 :8.12 倍量, X_3 :117.58min。考虑到实验生产中的可操作性,选择乙醇浓度(X_1)70%,溶剂用量(X_2)8 倍量,提取时间(X_3)120min 为最佳工艺条件。

表 1 星点设计因素与水平

水平	X_1	X_3	X_2
	乙醇浓度(%)	提取时间(min)	乙醇用量(倍)
-1	60	60	6
0	70	90	8
1	80	120	10

表 2 星点试验设计与结果

实验号	X_1	X_2	X_3	淫羊藿苷含量 ($\mu\text{g/mL}$)	总黄酮含量 (mg/mL)	醇浸出物得率 (%)	综合评分 (%)
1	-1	-1	0	204.4	9.70344	13.957	86.246
2	1	-1	0	205.3	9.3943	12.22	82.001
3	-1	1	0	232.9	11.0186	14.474	95.214
4	1	1	0	229.6	10.7536	13.157	91.282
5	-1	0	-1	217.8	10.8097	13.603	90.470
6	1	0	-1	216.9	10.5696	13.000	88.464
7	-1	0	1	223.4	10.8555	14.157	92.627
8	1	0	1	221.5	10.5883	13.983	91.282
9	0	-1	-1	233.0	10.1400	11.823	87.493
10	0	1	-1	244.1	11.5548	13.606	96.567
11	0	-1	1	235.0	10.1530	13.243	90.788
12	0	1	1	251.7	11.7583	14.049	99.215
13	0	0	0	245.3	11.1739	13.628	95.832
14	0	0	0	241.5	10.9733	13.651	94.762
15	0	0	0	240.3	11.0269	13.580	94.561
16	0	0	0	240.7	11.2299	13.603	95.190
17	0	0	0	237.4	10.9706	13.66	94.121

注:13~17 号为重复实验

表 3 拟合回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值($F > F_{\alpha}$)	显著性
Model	292.85	9	32.54	47.53	<0.0001	**
X_1	16.61	1	16.61	24.27	0.0017	*
X_2	159.74	1	159.74	233.36	<0.0001	**
X_3	14.9	1	14.9	21.77	0.0023	*
X_1X_2	0.025	1	0.025	0.036	0.8548	
X_1X_3	0.11	1	0.11	0.16	0.7016	
X_2X_3	0.1	1	0.1	0.15	0.7075	
X_1^2	85.49	1	85.49	124.89	<0.0001	**
X_2^2	12.19	1	12.19	17.8	0.0039	*
X_3^2	0.44	1	0.44	0.65	0.4483	
残差	4.79	7	0.68			
失拟性	3.1	3	1.03	2.44	0.2044	
纯误差	1.69	4	0.42			
总差	297.65	16				

注:** $P < 0.001$,极显著性差异;* $P < 0.05$,显著性差异。

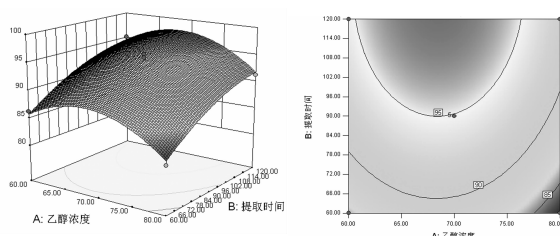


图1 乙醇浓度与提取时间对提取效果的影响

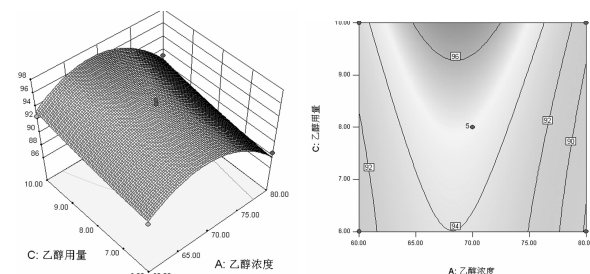


图2 乙醇浓度与溶剂倍量对提取效果的影响

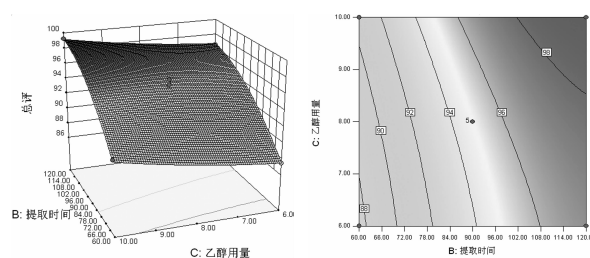


图3 溶剂倍量与提取时间对提取效果的影响

2.4.4 验证试验 按处方比例称取淫羊藿、杜仲药材3份,每份105g,加8倍量70%乙醇,提取2次,每次120min,测定淫羊藿苷含量、总黄酮含量及醇浸出物得率。结果表明:经优化后的工艺提取所得实测值与理论值接近,偏差在3%以内,所选工艺条件合理,稳定可行,见表4。

表4 验证试验结果

次数	淫羊藿苷含量 ($\mu\text{g/mL}$)	总黄酮含量 (mg/mL)	醇浸出物得率 (%)	理论值	实测值	平均偏差率 (%)
1	255.72	11.23	13.66	99.23	97.70	
2	255.10	11.08	13.76	99.23	97.43	-1.14
3	261.91	11.12	14.03	99.23	99.17	

3 结论与讨论

淫羊藿中黄酮类成分是其发挥抗骨质疏松药理作用的主要有效成分,据统计,在治疗骨质疏松症的常用中药中,淫羊藿的使用频率居首位^[7]。杜仲中含有大量的活性物质,成分复杂,但是化合物结构和性质相近,活性成分单体的提取分离较为困难^[8]。杜仲

能增强骨的力学性能,改善骨质量,从而能减少骨质疏松症骨折并发症的发生,同时也增加了骨量,促进骨形成。因此,在本方中结合淫羊藿、杜仲中所含成分的理化性质及现代药理研究结果,选择淫羊藿苷、总黄酮及醇浸出物作为综合评价指标,优选醇提的最佳工艺条件,其较单一指标更加科学合理。

本试验建立了淫羊藿苷含量、总黄酮含量及醇浸出得率的测定方法。通过星点设计-效应面法优选所得的最佳提取工艺为8倍量70%乙醇,提取2次,每次120min,提取预测值与理论值偏差为-1.14%,二项式拟合复相关系数 $r=0.9839$ 。最佳条件下效应的预测值和实测值偏差较小,结果较好。

参考文献

- [1] 王俊勤,胡有谷,郑洪军,等.淫羊藿苷对体外培养成骨细胞增殖和分化的影响.中国临床康复,2002,6(9):1307
- [2] 马慧萍,贾正平,白孟海,等.淫羊藿总黄酮对大鼠实验性骨质疏松生化学指标的影响.中国药理学通报,2003,19(2):187
- [3] 肖静,李三华,莫宁萍,等.杜仲总黄酮对体外培养大鼠成骨细胞增殖的影响.遵义医学院学报,2008,31(3):238
- [4] 梁翔,彭太平,刘胜才,等.杜仲对大鼠骨髓基质细胞增殖及成骨分化影响的实验研究.江西中医学院学报,2007,19(3):58
- [5] 李瑾.太白槲木保肝活性部位的制备及其制剂前研究.咸阳:陕西中医学院,2012
- [6] 郭东艳,覃鸿恩,唐志书,等.基于谱效相关的星点设计-效应面法优化太白槲木提取工艺.西北药学杂志,2012,27(5):399
- [7] 康学,刘仁慧,王秀娟.淫羊藿、女贞子抗骨质疏松症的应用与机制研究进展.中国实验方剂学杂志,2013,28(1):332
- [8] 刘慧,刘仲华,张盛.杜仲中活性成分的研究进展.农产品加工·学刊,2011(8):12

第一作者:史传道(1965-),男,大学学历,教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗退行性骨关节疾病的基础与临床研究。cdjt8899@126.com

收稿日期:2014-12-12

编辑:吴宁

人类健康需要传统医药