星点设计-效应面法(CCD-RSM)优选颈痛巴布剂提取工艺研究*

杨全伟[1]，程　璐[1]，马浩然[1]，张　耕[1]，谭静玲[2△]

(1. 武汉市第一医院，湖北 武汉 430022；2. 湖北省食品药品监督检验研究院中药所，湖北 武汉 430064)

摘要：目的　优选颈痛巴布剂中葛根素和干膏得率的水回流提取工艺条件。**方法**　以君药葛根中有效成分葛根素的提取量和干膏得率，作为考察指标，以星点设计-效应面法进行工艺优。**结果**　优选工艺为加 8.7 倍水，提取 3 次，每次 1.85h。**结论**　优选工艺所得葛根素含量提取率高，干膏得率较高，工艺稳定可行，可以进行中试生产。

关键词：星点设计-效应面；提取工艺；葛根素；巴布剂

中图分类号：R284.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1000-2723(2015)06-0028-04

颈痛巴布剂为武汉市中西医结合医院国家级重点专科针灸科张红星主任医师的临床处方，由《伤寒论》中葛根汤的基础上加减化裁而成，该方对神经根型颈椎病具有很好的疗效，用于治疗颈椎病，尤其是神经根型颈椎病，主要症见颈肩背强痛，颈部活动受限，常伴上肢放射性痛、麻木，甚则肌肉萎缩。本方为纯中药制剂，以前多与凡士林调和后涂敷与病患部位进行使用，经多年临床使用，副作用少、疗效确切。本研究在原组方不变的基础上，进行剂型改革，将传统膏药制剂制成具有良好的舒适性、渗透性好、使用方便，不污染衣物的巴布剂[1]。为了优选其最佳提取工艺条件，以方中君药葛根中有效成分葛根素的提取量和干膏提取率作为提取指标，采用 HPLC 法测定处方中葛根素的含量，结合提取的干膏得率，以加水量、提取时间、提取次数分别设定其提取因素水平，以星点设计-效应面进行工艺，试验方法与结果报道如下。

1　仪器与试药

Waters e2695 高效液相色谱仪；赛多利斯 ME215S 电子天平(Max210g d=0.01mg)；葛根素对照品(批号：110752-201110)；药材(葛根、芍药、防风、黄芪、桂枝、川芎、当归、炙甘草等 10 味中药)(购于湖北天济医药有限公司)；甲醇为色谱纯，水为双重蒸馏水，其他试剂均为分析纯。

2　试验与结果

按处方比例称取药材 137g，加水回流提取，收集所得药液，浓缩，加苯甲酸钠 0.6g，调整全量至 200mL，摇匀，装入棕色瓶中，密闭阴凉处保存备用。

2.1　实验仪器与材料[2]

色谱条件：色谱柱：依利特 ODS HYPERSIC-C_{18} 柱(200mm×4.6mm，5μm)，流动相：甲醇-水(20:80)，流速：1.0mL/min，波长：250nm，柱温：25℃

2.2　溶液的制备

葛根素对照品溶液的制备：精密称取葛根素 13.99mg，置于 100mL 容量瓶中，加 30%乙醇，制成每 1mL 含 0.139 9mg 的溶液，作为对照品溶液。

供试品溶液的制备[3-4]：按处方比例称取药材 137g，用 8 倍量的水，回流提取 2 次，每次提取 1h，收集所得药液，浓缩至一定程度，加苯甲酸钠 0.6g，调整全量至 200mL，摇匀，作为实验样品；精密量取样品 1mL，置 50mL 容量瓶中，加 30%乙醇稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液即得。

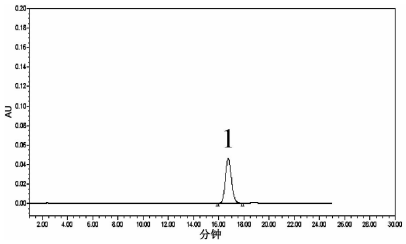
葛根阴性溶液的制备：称取不含葛根的其余药材，用 8 倍量的水，浸泡 0.5h，回流提取 2 次，每次提取 1h，收集所得药液，浓缩至一定程度，加苯甲酸钠 0.6g，调整全量至 200mL，摇匀，按葛根供试品溶液制法即得。

* **基金项目：**武汉市临床医学科研项目(WZ14Z07)
收稿日期：2015-07-18
作者简介：杨全伟(1986-)，男，山西太谷人，中药师，主要从事中药医院制剂及新药研究。
△通信作者：谭静玲，E-mail：290415991@qq.com

2.3　方法

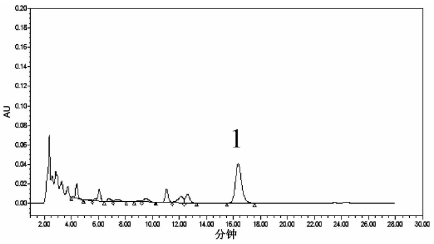
2.3.1　方法专属性

吸取对照品溶液、供试品、葛根阴性对照溶液各 20μL,进样,检测,葛根素对照品、供试品、在 18min 左右出现葛根素色谱峰，葛根阴性对照无干扰,见图 1-3。



1:葛根素

图 1　对照品



1:葛根素

图 2　供试品

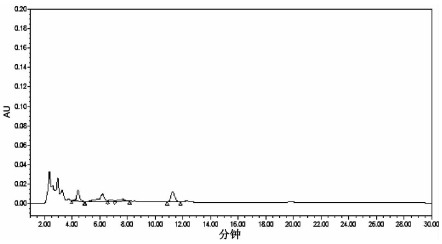


图 3　阴性对照

2.3.2　线性关系试验

取上述葛根素对照品溶液,分别在上述色谱条件下，分别进样 2,4,8,12,16,20μL 注入高效液相色谱色谱中,测定峰面积,以峰面积、对照品浓度计算线性回归方程:Y=11143X-23229,r=0.9999;表明葛根素在 0.2798~2.798μg 范围内线性关系良好。

2.3.3　精密度试验

取上述对照品溶液，精密取 10mL 至 20mL 量瓶中,加 30%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得,进样 20μL，连续进样 6 次，记录葛根素峰面积 RSD=1.02%,表明仪器的精密度良好。

2.3.4　稳定性试验

取 2.2 项下的溶液的制备项下供试品溶液中制备的实验样品,摇匀,精密量取 1mL,置 50mL 容量瓶中,加 30%乙醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液即得。分别于 0,1,4,8,12,24h 进样 20μL,测定峰面积,计算葛根素峰面积 RSD=0.49%,表明供试品溶液在 24h 内稳定。

2.3.5　重现性试验

取同一批 2.2 项下的溶液的制备项下供试品溶液中制备的实验样品,按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份,测定葛根素的含量,计算结果平均含量为 4.722mg·mL^{-1},RSD 值为 0.83%,表明本法重复性良好。

2.3.6　加样回收率试验

取已知含量样品 1 份,摇匀,分别 6 次精密量取 1mL,置于 6 个 100mL 容量瓶中,各精密加入适量的葛根素对照品，加 30%的乙醇稀释至刻度,摇匀,过滤,取续滤液即得,分别进样 20μL,测定并计算回收率,平均回收率为 100.89%(RSD=0.96%),结果见下表 1。

表 1　根痛合剂加样回收率试验结果

样品中含量/mg	加入对照品量/mg	实测值/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
4.722	4.470	9.215	100.51	100.89	0.96
4.722	4.470	9.289	102.17		
4.722	4.470	9.179	99.71		
4.722	4.470	9.243	101.14		
4.722	4.470	9.194	100.04		
4.722	4.470	9.271	101.77		

3　星点设计-效应面实验结果

在查阅文献基础上[5-8],针对加水量,提取时间、提取次数 3 个影响因素,分别设置 3 个水平,以葛根素含量和干膏得率作为考察指标，采用星点设计-效应面进行工艺优选,结果见表 2,表 3。

3.1　模型拟合

根据实验结果，采用按照 Design-Expert. V8.0.6.1 分别以葛根素含量为 $Y1$,干膏得率 $Y2$,对所选的 2 个因素分别进行多元线性回归方程及二次多项式拟合，分别得回归方程为 $Y1$=661.12+2.95$X1$-4.14$X2$+142.02$X3$ (r=0.568 1,P=0.022 2);$Y2$=30.60-1.21$X1$+0.55$X2$+3.39$X3$(r=0.786 5,P=0.000 5)。二项多项式方程为:$Y1$=807.49+2.95$X1$-4.14$X2$+142.02$X3$-84.75$X1X2$-25.01$X1X3$+21.51$X2X3$-106.59$X1^2$-80.04$X2^2$-87.80$X3^2$ (r=0.972 1,P=0.002 3);$Y2$=31.39-1.21$X1$+0.55$X2$+3.39$X3$-1.28$X1X2$+

表 2　星点设计因素水平

因素/水平	加水量 $X1$	提取时间 $X2$	提取次数 $X3$
-1	6 倍	1.0h	1 次
0	8 倍	1.5h	2 次
+1	10 倍	2.0h	3 次

表 3　星点设计及各指标试验结果

实验号	*X1*	*X*2	*X*3	葛根素含量（*Y*1）/mg	干膏得率（*Y*2）/%
1	6 倍	1h	2 次	573.248	29.173
2	10 倍	1h	2 次	137.866	30.748
3	6 倍	2h	2 次	673.335	33.697
4	10 倍	2h	2 次	498.964	30.148
5	6 倍	1.5h	1 次	432.275	31.049
6	10 倍	1.5h	1 次	498.964	25.168
7	6 倍	1.5h	3 次	777.258	33.957
8	10 倍	1.5h	3 次	743.895	32.102
9	8 倍	1h	1 次	498.171	25.136
10	8 倍	2h	1 次	508.005	25.622
11	8 倍	1h	3 次	728.267	34.051
12	8 倍	2h	3 次	824.149	34.017
13	8 倍	1.5h	2 次	808.159	31.376
14	8 倍	1.5h	2 次	807.148	31.410
15	8 倍	1.5h	2 次	807.156	31.389

$1.01X1X3-0.13X2X3+0.21X1^2-0.66X2^2-1.03X3^2$（$r$=0.906 6，$P$=0.039 1）。

根据多元线性方程及二次多项式方程数据可以看出，各自的回归方程数据显示二项式方程的 r 值更接近 1，P 值小于 0.05. 故选择二项式模型为最终效应模型。

3.2　效应面优化与评估

根据模型拟合得到的二项式方程，采用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件分别绘制各指标与因素的三维效应图和二维等高图，由图 1 可知，葛根素含量（*Y*1）和干膏得率（*Y*2）随加水量、提取时间的增加而增加，然后到达顶点后再减少；随提取次数的增加而增加。葛根素的含量（*Y*1）由软件计算得最佳提取条件为加水量 8.78 倍，提取 3 次，每次提取 1.87h；干膏得率（*Y*2）的最佳提取条件为加水量 8.66 倍，提取 3 次，每次提取 1.82h；综合考虑，最终优选颈痛巴布剂处方最佳提取条件为加水 8.7 倍，提取 3 次，每次提取 1.85h。见图 4.

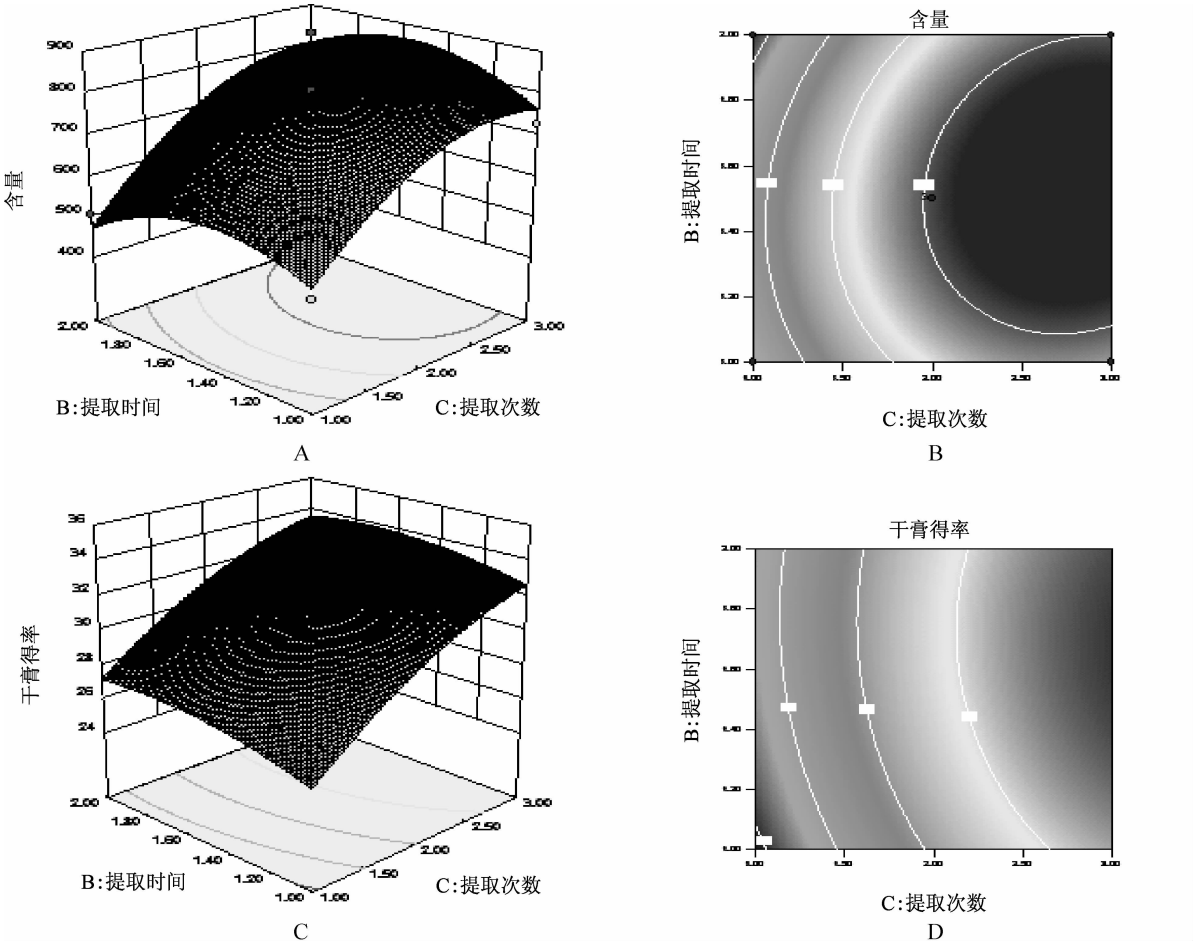


图 4　葛根素含量（*Y*1）、干膏得率（*Y*2）对 *X*2、*X*3 的三维效应图（A、C）和二维等高图（B、D）

4　优化验证

按照优选出的颈痛巴布剂处方的最佳提取条件，平行操作 3 次，取其平均值与预测值进行比较，结果可知，实验值与预测值可以较好的描述其最佳提取关系，3 批验证结果葛根素含量及干膏得率较高，测定葛根药材的含量为 47.296mg/g，计算 3 批验证结果的平均转移率为 56.64%，转移率较高，可以继续下一步的中试生产研究。验证结果见表 4.

表 4　验证结果

项目	干膏得率/%	葛根素含量/mg	转移率/%
预测值	33.440	803.475	56.63
实测值	33.578	803.694	56.64
RSD/%	0.291	1.93	1.25

5　讨论

星点设计-效应面法可以弥补均匀设计和正交设计在实验中水平选择上的精确度，避免各因素之间的交互作用，可以优选出实验中的最佳提取工艺条件范围，以便在实验中来更加明确，细化，留有实际操作空间，以弥补均匀设计和正交设计的大线条和条件筛选狭窄的缺点[9-12]。同时通过星点设计-效应面可以预测出最佳工艺的指标值，以便按其实验条件可以得出实际结果进行比对，通过相对标准偏差来检验实验的准确性。优选的各项指标范围的变化较小，方法稳定可靠，可以更好的适用于工业化大生产。

虽然星点设计-效应面优势明显，但是如果所选择的实验因素较多，水平较多，会使得实验数成倍的增加，实验劳动过程强度会很大[13-14]。故本实验中，通过查阅文献，选择了对处方提取最关键的提取因素，设计了最可能影响实验的因素水平，以便能用较少的实验来优选出最佳提取工艺条件。

有报道[15]，有采用 CCD-RSM 法对葛根药材进行了提取工艺研究，选择因素仅考虑了加水量和提取时间，忽略了实验次数因素，本实验中，实验次数对葛根素含量和干膏得率影响较大，故加入了试验次数这个因素进行了工艺优选，使得本实验更加全面。为实验参数的选择提供了较完整的科学依据。

参考文献：

[1] 杜倩，潘金火. 巴布剂的研究进展 [J]. 时珍国医国药，2004，15（11）：785-786.

[2] 国家药典委员会. 中国药典（一部）[M]. 北京：化学工业出版社，2010：312-313.

[3] 方弘，许士兵，张波，等. HPLC 测定葛根芩连合剂中葛根素的含量[J]. 中华中医药学刊，2014，32（5）：1083-1085.

[4] 刘同祥，王勇. HPLC 测定消渴胶囊中葛根素的含量[J]. 云南中医学院学报，2009，32（3）：33-35.

[5] 冯程，田和，张伯峰，等. 健脾祛湿颗粒提取工艺的星点设计-效应面法优化[J]. 时珍国医国药，2015，26（6）：1383-1384.

[6] 杨丽，李雪莲，陈鸿平，等. 星点设计-效应面法优化枸杞子总黄酮提取工艺[J]. 中药与临床，2015，6（1）：25-27.

[7] 于丽娜，王桂玲. 星点设计响应面法优选拳参中总黄酮的提取工艺[J]. 泰山医学院学报，2015，36（2）：133-136.

[8] 杨林，罗晓星，王四旺，等. 正交设计提取当归川芎中阿魏酸的研究[J]. 云南中医学院学报，2007，30（2）：14-16.

[9] 郭俊浩，杜光. 星点设计-效应面法优化足宁颗粒处方[J]. 医药导报，2012，31（2）：216-218.

[10] 侯世祥. 现代中药制剂设计理论与实践[M]. 北京：人民卫生出版社，2010：461.

[11] 吴伟，崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药中的应用[J]. 国外医学：药学分册，2000，27（5）：296.

[12] 刘艳杰，项荣武. 星点设计-效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志，2007，24（6）：455.

[13] 王永菲，王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报（自然科学版），2005，14（3）：236.

[14] 涂颖秋，朱孟夏，刘会，等. 优化药物制剂工艺的多种数据处理方法的研究进展 [J]. 中国药学杂志，2013，48（16）：1333.

[15] 孙向阳，张永玲，张振巍，等. 星点设计-效应面法优化葛根素提取工艺[J]. 中药材，2012，35（6）：980-983.

（编辑：杨阳）

（英文摘要见第 50 页）

肠止泻的血肉有情之品的配伍和使用价值。当然，在我们认识到鸡子黄的临床价值的同时，也应该注意到，在诸多本草著作中，常有“鸡子多食令人滞闷”之戒[18]，大致因为鸡子偏于滋补，多食易壅滞气机，故体内痰湿、湿热、瘀血、食积等实邪偏盛者，不宜使用。

参考文献：

[1] 陈明. 黄煌教授应用黄连阿胶汤的经验[J]. 南京中医药大学学报，1999，15(5)：320.
[2] 陈永朴. 黄连阿胶汤辨证新用[J]. 四川中医，2004，22(8)：30-31.
[3] 蔡金波. 禽蛋疗法浅识[J]. 山东中医杂志，1984(2)：4-6.
[4] 李时珍. 本草纲目 [M]. 4 版. 北京：华夏出版社，2011：1724-1725.
[5] 张锡纯. 医学衷中参西录 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2011.
[6] 管仕伟. 黄连阿胶汤古代方证探析[J]. 辽宁中医药大学学报，2015(6)：143-144.
[7] 范永升. 金匮要略 [M]. 北京：中国中医药出版社，2007：278.
[8] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：401.
[9] 黄元御. 黄元御药解 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2011：38-39.
[10] 刘奇才. 复方鸡子黄油治疗浅深Ⅱ度烧伤 300 例 [J]. 中医外治杂志，1995(3)：7.
[11] 谢欣梅. 醇提蛋黄油治疗烫伤的药效学探讨 [J]. 河南大学学报，2012，31(2)：98-101.
[12] 邹孟城. 三十年临证探研录[M]. 上海：上海科学技术出版社，2000：159-160.
[13] 王紫娟. 蛋黄油治疗妇科杂症应用举隅 [J]. 中国中医药现代远程教育，2012，10(22)：135-136.
[14] 北京中医医院. 赵炳南临床经验集[M]. 北京：人民卫生出版社，1975：328.
[15] 严建业. 蛋黄油的现代研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2012，19(3)：106-109.
[16] 宋·王怀隐. 太平圣惠方 [M]. 北京：人民卫生出版社，1958：1224.
[17] 申海明. 蛋黄油在内科疾病治疗中的应用 [J]. 实用中医内科杂志，1998，12(2)：5-6.
[18] 汪昂. 本草备要[M]. 北京：中国中医药出版社，2008：241.

（徐建平）

Study of the Effect and Clinical Application of Egg Yolk

ZHU Jihong, LI Weihong, SHI Niangang, QIAO Weilong, TIAN Lu, LI Han
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT: Egg yolk, used as food and medicine, is often restricted to nourishing yin only in modern clinic application of Chinese medicine. This article systematically analyses the effect and clinical application of egg yolk and egg yolk oil in previous literature. We point out egg yolk has an integrated effect of nourishing yin and supplying blood, Strengthening spleen and promoting tissue regeneration and relieving diarrhea with astringents, aiming to expand the clinic application of egg yolk and contributing to the clinical curative effect.

KEY WORDS: egg yolk; nourishing yin and supplying blood; strengthening spleen and promoting tissue regeneration; relieving diarrhea with astringents

（原文见第 28 页）

Study on Extraction Technology of Babu Agent for Neck Pain with CCD-RSM

YANG Quanwei[1], CHENG Lu[1], MA Haoran[1], ZHANG Geng[1], TAN Jingling[2]
(1. Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT: **Objective** To optimize the extraction process of puerarin in Babu agent for neck pain of extract. **Methods** The extraction amount of puerarin and the yield of extract were selected as the CCD-RSM was conducted to predict the optimal extraction process. **Results** The optimal conditions of extraction process were determined as follows: adding 8.7 times of water, refluxing 3 times, 1.85h for each time. **Conclusion** Under the optimal conditions, the extraction rate of puerarin was higher, the yield of extract is higher, the optimized extraction technology was stable, feasible and suitable for pilot scale test.

KEY WORDS: CCD-RSM; extraction process; Puerarin; Babu agent