

Box-Behnken 响应面法优化牡丹皮炭炮制工艺

朱琼花, 莫毛燕, 孟江*, 周苏娟, 王淑美, 梁生旺

(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选牡丹皮炭的炮制工艺。方法: 采用砂烫法, 以 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素、丹皮酚含量的综合评分为指标, 在单因素试验基础上, 选择炮制时间、炮制温度、投料比为自变量, 采用 Box-Behnken 响应面法优化牡丹皮炭的炮制工艺。结果: 牡丹皮炭最佳炮制工艺为炮制时间 9.0 min, 炮制温度 180.0 °C, 投料比 25.5 倍。5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素、丹皮酚质量分数分别为 0.022 1%, 0.023 3%, 0.175 7%, 0.042 0%, 综合评分预测值 97.67 分, 实测值 95.01 分。结论: 优选的炮制工艺简便可行, 预测性良好, 充分体现了牡丹皮炭凉血止血、止血而不留瘀的作用特点。

[关键词] 牡丹皮炭; 5-羟甲基糠醛; 没食子酸; 儿茶素; 丹皮酚; 外观性状

[中图分类号] R283.3; R284.1; R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0012-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140012

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150527.1032.008.html>

[网络出版时间] 2015-05-27 10:32

Optimization of Processing Technology for Moutan Cortex Carbon by Box-Behnken Response Surface Methodology ZHU Qiong-hua, MO Mao-yan, MENG Jiang*, ZHOU Su-juan, WANG Shu-mei, LIANG Sheng-wang (Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of Moutan Cortex carbon. **Method:** With the content of gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, catechin, paeonol as comprehensive evaluation index, based on single factor tests, herb-to-sand ratio, processing time and temperature were selected as independent variables, sand-scorch method was adopted, processing technology of Moutan Cortex carbon was optimized by Box-Behnken response surface methodology. **Result:** Optimum processing conditions were as follows: processing time of 9.0 min, processing temperature at 180.0 °C, herb-to-sand ratio of 25.5:1. The content of 5-hydroxymethyl furfural, gallic acid, catechin and paeonol were 0.022 1%, 0.023 3%, 0.175 7% and 0.042 0%, respectively. The measured value of composite score was 95.01, which was close to the predicted value of 97.67. **Conclusion:** This optimized processing technology of Moutan Cortex carbon is simple and feasible with good predictability, which fully embodies function characteristics of this herb.

[Key words] Moutan Cortex carbon; 5-hydroxymethyl furfural; gallic acid; catechin; paeonol; appearance

牡丹皮炭具有凉血止血的作用, 临床用于治疗吐血、崩漏及其他多种血热出血证^[1]。牡丹皮炭自元代始即用于临床治疗各种出血性疾病, 如临床常用的凉血止血药——十灰散^[2]。目前关于牡丹皮炭的炮制工艺报道^[3-4]仅以单一成分没食子酸或鞣质为指标进行优化, 未能完全反映牡丹皮炭的质量。在前期研究牡丹皮炭质量控制和紫外谱线组学^[5-6]的基础上, 本实验以药效成分没食子酸、丹皮酚、儿茶素和受热程度标志物 5-羟甲基糠醛的含量为综

合评价指标, 结合单因素试验和 Box-Behnken 设计优选砂烫牡丹皮炭的炮制工艺, 为该药物的规范化生产和质量控制提供参考。

1 材料

LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), DFY-400 型粉碎机(上海江仪仪器有限公司), AY120 型电子分析天平(日本岛津公司)。牡丹皮饮片购于广州至信药材有限公司, 批号 120302, 经广东药学院刘基柱副教授鉴定为毛茛科植物牡丹

[收稿日期] 20141016(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473352); 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201207004-7)

[第一作者] 朱琼花, 在读硕士, 从事中药炮制与质量标准研究, Tel: 15011968067, E-mail: 1034026217@qq.com

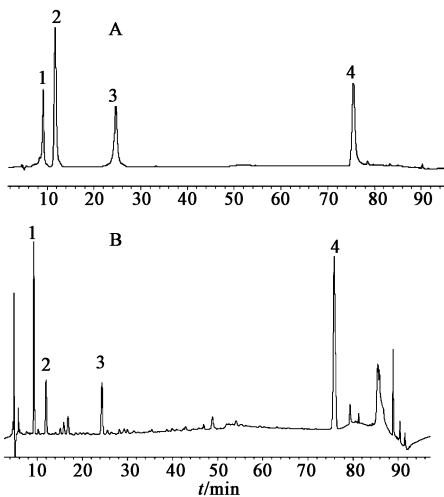
[通讯作者] * 孟江, 博士, 教授, 从事中药炮制与饮片质量标准研究, Tel: 020-39352169, E-mail: jiangmeng666@126.com

Paeonia suffruticosa 的干燥根皮;5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素、丹皮酚对照品(南通飞宇生物科技有限公司,批号分别为FY15250512, MUST-12122813, MUST-12050702, MUST-12081212), 甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 牡丹皮炭中4个指标成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 UltiMate™ XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.2% 甲酸水(B)梯度洗脱(0~20 min, 5%~10% A; 20~30 min, 10%~15% A; 30~70 min, 15%~35% A; 70~85 min, 35%~95% A), 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。理论塔板数以 5-羟甲基糠醛峰计不低于 3 000, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 没食子酸; 2. 5-羟甲基糠醛; 3. 儿茶素; 4. 丹皮酚

图1 牡丹皮炭 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of Moutan Cortex carbon

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚适量, 分别加甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 0.261, 0.205, 2.005, 0.531 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取各对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 μL, 按 2.1.1 项下方法测定, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚的回归方程分别为 $Y = 1.203 \times 10^6 X + 1.446 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9992$), $Y = 1.781 \times 10^6 X - 4.202 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9996$), $Y = 1.183 \times 10^5 X + 5.176 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9992$), $Y = 1.305X + 7.679 \times 10^3$ ($R^2 = 0.9998$), 线性范围依次为 0.522~5.220, 0.410~4.100, 4.010~40.10,

1.062~10.620 μg。

2.1.4 供试品溶液的制备 取样品粉末(80~100目)0.25 g, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用 50% 甲醇补足失重, 滤过, 取滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.5 精密性、重复性、稳定性、加样回收率 取同一对照品溶液连续进样 6 次, 结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.4%, 3.0%, 2.2%。取同批牡丹皮炭粉末样品, 按 2.1.4 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.1 项下方法测定, 结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 1.9%, 2.6%, 2.0%。将同一供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.4%, 2.0%, 2.1%。取已知含量的牡丹皮炭饮片粉末 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 加入 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚对照品适量, 按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液, 结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素和丹皮酚的平均加样回收率分别为 102.1%, 101.9%, 98.9%, 99.4%, RSD 依次为 2.5%, 1.2%, 2.2%, 0.2%。

2.2 数据处理 根据“炒炭存性”的要求, 要同时满足牡丹皮炭的 2 个功效(凉血、止血), 即 5-羟甲基糠醛、没食子酸、丹皮酚、儿茶素 4 个有效成分含量都比较高为较佳工艺。采用加权评分法综合评估牡丹皮炭炮制工艺, 权重系数分别为 0.3, 0.3, 0.2, 0.2, 综合评分 = (5-羟甲基糠醛含量/5-羟甲基糠醛最大含量) × 100 × 0.3 + (没食子酸含量/没食子酸最大含量) × 100 × 0.3 + (丹皮酚含量/丹皮酚最大含量) × 100 × 0.2 + (儿茶素含量/儿茶素最大含量) × 100 × 0.2, 同时结合常规质量要求优化炮制工艺。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 炮制温度 取已分好档的牡丹皮药材 4 份, 每份 20 g, 选取炮制温度分别为 180, 210, 240, 270 ℃, 加砂量 30 倍, 炮制时间 12 min, 按 2.1.4 项下制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 见表 1。结果表明 180 ℃ 和 210 ℃ 的综合评分较高, 同时外观性状符合常规炭药质量标准的要求。

2.3.2 投料比 取已分好档的牡丹皮药材 3 份, 每份 20 g, 分别加入 20, 30, 40 倍量砂, 入锅砂温度 210 ℃, 炮制时间 12 min, 按 2.1.4 项下方法配制供试品溶液, 按 2.1.1 项下条件测定, 见表 2。结果显示当投料比为 30 倍时, 综合评分达到最大值。

表 1 炮制温度对牡丹皮炭质量的影响

Table 1 Effect of processing temperature on quality of Moutan Cortex carbon

因素	数值	外观性状	没食子酸/%	5-羟甲基糠醛/%	儿茶素/%	丹皮酚/%	综合评分/分
炮制温度	180 ℃	外焦褐色,内黄褐色	0.012 6	0.014 3	0.188 9	0.071 1	100.00
	210 ℃	外焦褐色,内褐色	0.011 8	0.011 8	0.179 6	0.043 8	84.19
	240 ℃	外黑色,内黑褐色	0.004 9	0.003 9	0.094 4	0.028 9	37.97
	270 ℃	外黑色,内黑色	0.003 2	-	0.035 4	0.016 8	16.09
炮制时间	9 min	外焦褐色,内深黄色	0.060 7	0.047 2	0.195 2	0.069 0	99.31
	12 min	外焦褐色,内褐色	0.038 0	0.027 8	0.202 2	0.055 5	72.54
	15 min	外黑色,内黑褐色	0.008 2	0.001 6	0.051 0	0.013 4	13.99

注:“-”表示未检出(表 2 同)。

表 2 投料比对牡丹皮炭中 4 个成分含量的影响

Table 2 Effect of herb-to-sand ratio on contents of four ingredients from Moutan Cortex carbon

投料比	没食子酸	5-羟甲基	儿茶素	丹皮酚	综合评分
/g·g ⁻¹	/%	糠醛/%	/%	/%	/分
1:20	0.006 8	0.007 0	0.000 9	0.051 0	73.06
1:30	0.006 6	0.010 2	0.002 4	0.046 3	92.68
1:40	0.006 9	0.002 7	-	0.066 2	57.94

2.3.3 炮制时间 取已分好档的牡丹皮药材 3 份,每份 20 g,入锅砂温度 210 ℃,加砂量 30 倍,炮制时

间分别为 9,12,15 min。按 2.1.4 项下方法配制供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,见表 1。结果显示随炮制时间延长,加权综合评分逐渐降低;炮制时间为 12 min 时,炮制品外观较好。

2.4 Box-Behnken 响应面试验 在单因素试验基础上,按 Design-Expert 7.0 中 Box-Behnken 试验设计^[7],固定每份药材加入量 20 g,选取炮制时间、炮制温度与投料比为自变量因素,3 个自变量分别以 -1,0,1 水平编码,以 5-羟甲基糠醛、没食子酸、丹皮酚、儿茶素含量的综合评分为响应值,试验安排与结果见表 3。

表 3 牡丹皮炭炮制工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 3 Box-Behnken test analysis of processing technology for Moutan Cortex carbon

No.	A 炮制时间/min	B 炮制温度/℃	C 投料比/g·g ⁻¹	没食子酸/%	5-羟甲基糠醛/%	儿茶素/%	丹皮酚/%	综合评分/分
1	15	180	30	0.008 7	0.009 8	0.101 7	0.027 9	46.52
2	15	210	40	0.006 1	0.006 4	0.059 8	0.014 1	28.35
3	12	210	30	0.004 5	0.006 3	0.064 4	0.014 4	26.95
4	9	210	20	0.011 5	0.012 4	0.090 6	0.024 2	50.45
5	9	240	30	0.002 8	0.004 8	0.027 0	0.006 6	15.47
6	9	210	40	0.010 9	0.008 4	0.141 5	0.040 1	56.96
7	12	240	40	0.003 9	0.004 9	0.032 5	0.011 0	19.44
8	12	210	30	0.020 2	0.014 8	0.184 8	0.045 1	83.35
9	12	240	20	0.004 3	0.004 4	0.022 4	0.008 5	17.07
10	12	180	40	0.010 3	0.012 3	0.097 0	0.023 4	49.23
11	9	180	30	0.025 2	0.022 8	0.162 1	0.045 5	97.54
12	12	180	20	0.020 0	0.015 4	0.153 7	0.042 1	79.21
13	12	210	30	0.009 0	0.007 3	0.144 4	0.033 7	50.76
14	15	210	20	0.005 8	0.005 1	0.050 4	0.016 6	26.37
15	12	210	30	0.018 5	0.014 1	0.146 6	0.038 8	73.49
16	15	240	30	0.002 1	0.001 8	0.003 5	0.003 8	6.92
17	12	210	30	0.016 2	0.013 7	0.126 0	0.037 4	67.39

按照 Box-Behnken 设计要求,试验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程,得方程 $Y = 60.40 - 14.02A - 26.69B - 2.37C + 10.59AB + 8.09BC - 9.72A^2 - 9.05B^2 - 10.09C^2$ 。对该模型进行方差分析,结果 $P = 0.03 < 0.05$,说明该模型具有显著性,与实际试验拟合较好,模型方程 $R^2 = 0.805 7$,说明模型预测值与实测值间具有高度的相关性,模型失

拟度 ($F = 0.145, P > 0.05$),无显著性差异,表明方程拟合度和可信度均良好,试验误差小,可用此模型对牡丹皮炭炮制工艺进行分析和预测。

根据拟合的二项式方程,采用 Design Expert 7.0 软件分别绘制三维效应图,考察各自变量对牡丹皮炭炮制工艺的影响,见图 2。得牡丹皮炭砂烫法最佳工艺为炮制时间 9 min,炮制温度 180 ℃,投料比

25.5 倍,综合评分 97.67 分。

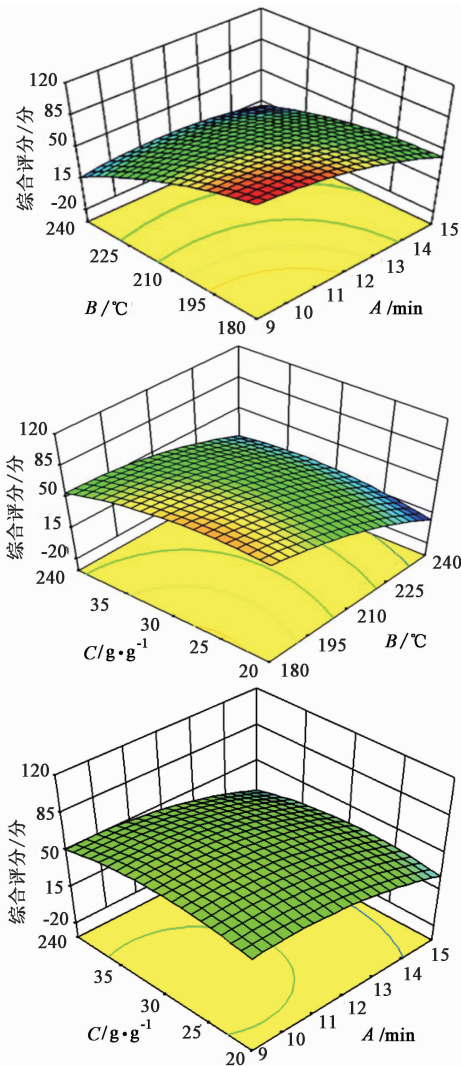


图 2 炮制时间、炮制温度与投料比对牡丹皮炭炮制工艺影响的三维响应曲面

Fig. 2 Three-dimensional response surface showing effects of herb-to-sand ratio, processing time and temperature on processing technology of Moutan Cortex carbon

2.5 验证试验 参照《中国药典》2010 年版附录 II D 项下砂炒法。取牡丹皮药材 500 g,按优选的炮制工艺条件重复 3 次试验,结果 5-羟甲基糠醛、没食子酸、儿茶素、丹皮酚平均质量分数分别为 0.022 1%, 0.023 3%, 0.175 7%, 0.042 0%, RSD 分别为 2.8%, 1.9%, 1.3%, 2.0%, 综合评分平均值 95.01 分 (RSD 0.8%)。按 (预测值 - 实测值)/预测值 × 100% 计算预测值偏差 2.7%。牡丹皮炭外观性状为外黑褐色,内焦褐色,符合常规经验标准,说明优选的拟合方程可较好地预测牡丹皮炭炮制工艺。

3 讨论

炭药的“炒炭存性”和“炭药止血”具有一定科

学内涵,一方面炭药炒炭后可产生或增强止血作用,另一方面还要保留药物原有的药性,因此对于炭药炮制工艺的优化,指标的选取应能充分体现炭药的止血、存性两方面的作用。在已发表的牡丹皮炭工艺优化报道中^[3-4],以单一成分没食子酸或鞣质为指标进行优化,仅体现了该药的止血功效,未能反映其凉血存性的功效。本文以没食子酸、儿茶素、丹皮酚及 5-羟甲基糠醛为综合评价指标,其中没食子酸、儿茶素等鞣质类成分具有收敛止血的作用^[8],为牡丹皮炭的止血药效成分;丹皮酚具有解热、活血化瘀的功效^[9],为牡丹皮炭的凉血存性药效成分。5-羟甲基糠醛是葡萄糖等单糖化合物在高温或弱酸等条件下脱水产生的醛类化合物,随着温度的升高,又容易分解为乙酰丙酸和甲酸,是加热程度的标志物^[10]。传统的牡丹皮炭采用清炒法,在炒制过程中升温较快,而砂烫法中砂子升温较慢,温度易于控制,且药材受热均匀。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:160-161.
- [2] 武月萍,张磊. 张磊应用炭药经验[J]. 中医杂志, 2011,52(2):98-100.
- [3] 毛维伦,许腊英,骆小梅,等. 牡丹皮炭炮制工艺与质量标准研究[J]. 时珍国医国药,1999,10(11):841-843.
- [4] 赵学龙,丁安伟,张丽,等. 丹皮炭炮制工艺的研究[J]. 中成药,2009,31(4):570-572.
- [5] 付腾飞,朱琼花,周立艳,等. 牡丹皮炭质量标准研究[J]. 现代医药卫生,2013,29(12):1761-1762.
- [6] 朱琼花,付腾飞,周立艳,等. 牡丹皮及牡丹皮炭紫外谱线组法鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2013,29(9):2148-2149.
- [7] 叶陈丽,贺帅,张守尧,等. Box-Behnken 设计优化黄芩超高压提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):40-44.
- [8] 刘振丽,宋志前,巢志茂,等. HPLC 测定何首乌中抗氧化有效成分没食子酸和儿茶素在炮制前后含量的变化[J]. 中成药,2009,31(9):1392-1394.
- [9] 李薇,王远亮,蔡绍哲,等. 丹皮酚和阿司匹林对大鼠血液流变性的比较[J]. 中草药,2000,31(1):31-33.
- [10] 张丽,曹琳琳,赵学龙,等. 不同炮制程度牡丹皮炭中 5-羟甲基糠醛的含量变化[J]. 中国药房,2009,20(33):2624-2626.

[责任编辑 刘德文]