

星点设计-效应面法优化炒茺蔚子炮制工艺

严冬慧, 邓仙梅, 孟江*, 王淑美

(广东药科大学 中药学院, 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室,
广东高校中药质量工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:利用星点设计-效应面法对炒茺蔚子的炮制工艺进行优化,为炒茺蔚子的规范化生产提供依据。方法:采用清炒法,以炮制温度、炮制时间、炒药机转速为自变量,总生物碱、盐酸水苏碱、水溶性浸出物、醇溶性浸出物质量分数为评价指标,对自变量各水平进行多元回归拟合,利用效应面法筛选最佳炮制工艺并进行预测分析。采用UV测定总生物碱的含量,检测波长520 nm;采用高效液相色谱仪-蒸发光散射法测定盐酸水苏碱的含量,流动相乙腈-水(60:40),流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,漂移管温度 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 。结果:三项式拟合复合相关系数较高。最佳炮制工艺为炮制温度 $219 \text{ }^\circ\text{C}$,炮制时间2 min,炒药机转速 $14 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。总生物碱、盐酸水苏碱、水溶性浸出物、醇溶性浸出物质量分数的平均值分别为9.82, 2.50, 86.16, 193.28 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,综合评分与三项式拟合方程预测值偏差0.87%。结论:利用星点设计-效应面法优化炒茺蔚子炮制工艺的方法简便且预测性良好,适用于炒茺蔚子的规范化生产。

[关键词] 炒茺蔚子; 炮制工艺; 总生物碱; 盐酸水苏碱; 浸出物; 综合评分

[中图分类号] R283.3; R943.1; R284.1; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)21-0010-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016210010

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0903.010.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:03

Optimization of Processing Technology of Stir-baked Leonuri Fructus by Central Composite Design-response Surface Methodology

YAN Dong-hui, DENG Xian-mei, MENG Jiang*, WANG Shu-mei

(Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of Universities in Guangdong Province, Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), School of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the processing technology of stir-baked Leonuri Fructus with central composite design-response surface methodology, and provide the basis for its normalized production. **Method:** Stir-baking processing technology was optimized by taking processing temperature, processing time and stir-baking machine speed as independent variables, contents of total alkaloids, stachydrine hydrochloride, water soluble extract and alcohol soluble extract as evaluation indexes, each level of independent variables were fitted by multiple regression fitting. Response surface methodology was used to select optimum processing technology. UV was adopted to determine the content of total alkaloids in stir-baked Leonuri Fructus at 520 nm. HPLC-ELSD was employed to determine the content of stachydrine hydrochloride with a mobile phase of acetonitrile-water (60:40), the flow rate of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the drift tube temperature at $70 \text{ }^\circ\text{C}$. **Result:** Complex correlation coefficient of

[收稿日期] 20151203(017)

[基金项目] 2015年版《中国药典》项目;国家中医药管理局中医药行业科研专项(2012070047)

[第一作者] 严冬慧,在读硕士,从事中药炮制与质量标准研究, Tel:13424037312, E-mail:350635145@qq.com

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

trinomial fitting was high. Optimum processing technology parameters were as follows: processing temperature at 219 °C, processing time of 2 min, stir-baking machine speed of 14 r·min⁻¹. Contents of total alkaloids, stachydrine hydrochloride, water soluble extract and alcohol soluble extract were 9.82, 2.50, 86.16, 193.28 mg·g⁻¹. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology can be used to optimize processing technology of stir-baked Leonuri Fructus, and it is simple with good prediction, which is suitable for standardized production of stir-baked Leonuri Fructus.

[Key words] stir-baked Leonuri Fructus; processing technology; total alkaloids; stachydrine hydrochloride; extract; composite score

茺蔚子味辛、苦,性微寒,归心包、肝经,具有活血调经、清肝明目的功效,用于治疗月经不调、经闭痛经、目赤翳障、头晕胀痛等证^[1]。茺蔚子清炒后寒性减弱,质地酥脆,易于煎出有效成分,长于活血调经,临床应用广泛^[2]。目前关于茺蔚子炮制工艺的报道,仅有酒炙茺蔚子的工艺研究,尚无关于炒茺蔚子的文献报道,且酒炙炒茺蔚子的工艺优选仅以盐酸水苏碱为指标,未能全面客观地反映酒炙茺蔚子的质量和工艺的优劣^[3]。1988 年版《全国中药炮制规范》^[4]中记载炒茺蔚子工艺为取净茺蔚子,置锅内用文火炒至鼓起,色泽加深,并有香气逸出时取出放凉。该表述较为笼统,炮制条件不够客观具体,导致炒茺蔚子质量差异较大。茺蔚子主要有效成分为茺蔚子总碱、水苏碱等成分,研究表明茺蔚子总碱与水苏碱对离体子宫有兴奋作用^[5];水溶性浸出物具有降血压的作用^[6];醇溶性浸出物具有活血化瘀作用^[7]。在前期对茺蔚子质量分析、薄层鉴别和盐酸水苏碱提取工艺研究的基础上^[8-10],本实验以总生物碱、水苏碱、水溶性浸出物和醇溶性浸出物为指标,采用星点设计-效应面法优化炒茺蔚子的炮制工艺,为该药材的规范化生产和质量控制提供科学依据。

1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),BP124S 型电子天平(德国赛多利斯公司),CY-20 型炒药机(江阴市祝塘明科机械厂),LSF-80 型高速粉碎机(常德市中药机械厂),2695 型高效液相色谱仪和 2420 型蒸发光散射检测器(美国 Waters 公司)。茺蔚子药材购买于康美药业股份有限公司,产地安徽,经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* 的干燥成熟果实;盐酸水苏碱(中国食品药品检定研究院,批号 110712-201312,纯度 ≥99.4%),水为屈臣氏蒸馏水,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 总生物碱的含量测定^[11]

2.1.1 标准曲线的绘制 精密称取盐酸水苏碱对照品 12.50 mg,加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL 配制 2.50 g·L⁻¹ 的对照品母液。精密吸取该母液 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 μL 至 25 mL 量瓶中,各加入新制的 2% 硫氰酸铬铵溶液 3 mL,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容至刻度,摇匀,冰浴 1 h,用干燥滤纸滤过,取续滤液。在 520 nm 处测定吸光度 *A*,以质量浓度为横坐标, *A* 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.5943X + 0.0061$ ($r = 0.9992$),线性范围 0.005 ~ 0.060 g·L⁻¹。

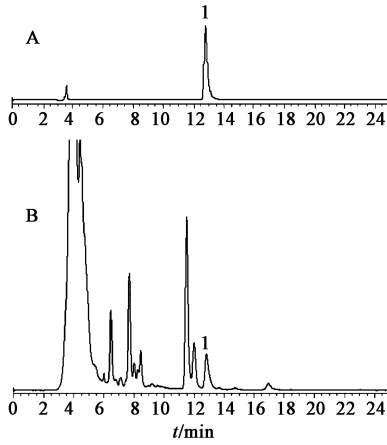
2.1.2 供试品溶液的制备 取不同炮制条件的炒茺蔚子样品粉末(过三号筛)0.2 g,精密称定,加入 70% 乙醇 30 mL,精密称定,超声提取 40 min,静置放冷,称定质量,加 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 20 mL 于蒸发皿中,蒸干,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解并转移至 25 mL 量瓶中,加新制的 2% 硫氰酸铬铵溶液 3 mL,加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液定容至刻度,摇匀,冰浴 1 h,用干燥滤纸滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 精密性、重复性、稳定性、加样回收率试验 取同一对照品溶液按 2.1.1 项下方法操作,连续测定 6 次,结果精密性 RSD 3.0%。另取同批炒茺蔚子粉末(过三号筛)6 份,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,考察重复性 RSD 2.1%;将供试品溶液分别在 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 测定,考察稳定性 RSD 2.3%。精密称取已知指标成分含量的炒茺蔚子粉末(过三号筛)6 份,每份约 0.1 g,按 1:1 比例分别加入盐酸水苏碱对照品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,计算平均加样回收率 99.92%, RSD 1.3%。

2.2 盐酸水苏碱的含量测定^[12]

2.2.1 色谱条件 SCX 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(60:40),流速 0.5 mL·

min^{-1} , 雾化室温度 $42\text{ }^\circ\text{C}$, 漂移管温度 $70\text{ }^\circ\text{C}$, 增益值 10, 氮气气流压力 206.85 kPa, 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 盐酸水苏碱

图 1 炒茺蔚子 HPLC

Fig. 1 HPLC of stir-baked Leonuri Fructus

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称定盐酸水苏碱对照品 7.16 mg , 加 70% 甲醇 1 mL 配制成 $7.16\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品母液。吸取该母液 $96.7\text{ }\mu\text{L}$ 置 1 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇稀释并定容至刻度, 得 $0.692\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品溶液。分别精密吸取该对照品溶液 $1, 2, 4, 6, 10, 14\text{ }\mu\text{L}$ 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以进样量的对数为横坐标, 峰面积的对数为纵坐标, 得回归方程 $Y = 0.6217X - 3.0982$ ($r = 0.9995$), 线性范围 $0.692 \sim 9.688\text{ }\mu\text{g}$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取不同炮制条件的炒茺蔚子样品粉末(过三号筛) 2 g , 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 20 mL , 精密称定, 加热回流提取 60 min , 室温放冷, 称定质量, 加 70% 甲醇补足质量, 摇匀, 经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验 取同一对照品溶液, 连续测 6 次, 考察精密度。另取同批药材粉末(过三号筛) 6 份, 精密称定, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 考察重复性; 将供试品溶液分别在 $0, 2, 4, 8, 12, 24\text{ h}$ 测定, 考察稳定性。精密称取已知含量的炒茺蔚子粉末(过三号筛) 6 份, 每份 0.1 g , 按 1:1 比例加入盐酸水苏碱对照品, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 考察加样回收率。结果精密度、重复性、稳定性 RSD 分别为 1.2%, 2.0%, 2.1%, 平均加样回收率 100.48%, RSD 2.1%。

2.3 水溶性浸出物与醇溶性浸出物的含量测定

取不同炮制条件的炒茺蔚子样品粉末(过三号筛) 1.0 g , 精密称定, 按《中国药典》2015 年版四部通则 2201 浸出物测定法项下的热浸法测定其水溶性浸出物与醇溶性浸出物, 计算浸出物得率。

2.4 炒茺蔚子炮制工艺优化 设定炮制温度、炮制时间、炒药机转速为自变量, 各因素根据星点设计原理分别设 5 个水平, 分别用代码 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 表示 ($\alpha = 1.732$)。以总生物碱、盐酸水苏碱、水溶性浸出物、醇溶性浸出物的质量分数为指标, 采用加权评分法综合评估炒茺蔚子的炮制工艺, 权重系数分别为 $0.2, 0.5, 0.15, 0.15$ 。每次投药量 50 g , 得不同炮制程度的炒茺蔚子炮制品。试验安排及结果见表 1。

利用 Design-Expert 8.0.6.1 软件, 以综合评分为因变量对各因素分别进行多元回归拟合, 得多元线性回归拟合方程 $Y = 82.91 + 1.58A - 0.38B - 1.34C$ ($P = 0.7248, r = 0.0769$), 二项式拟合方程 $Y = 76.47 + 1.58A - 0.38B - 1.34C - 3.60AB + 0.24AC + 3.64BC + 2.54A^2 + 3.43B^2 + 3.22C^2$ ($P = 0.0208, r = 0.7824$), 三项式拟合方程 $Y = 76.47 + 2.66A + 2.79B - 1.68C - 3.60AB + 0.24AC + 3.64BC + 2.54A^2 + 3.43B^2 + 3.22C^2 + 1.67ABC - 5.55A^2B + 0.59A^2C - 1.89AB^2$ ($P = 0.0047, r = 0.9566$)。说明三项式拟合方程的相关系数较高, 表明该模型拟合度高, 预测性好, 故选择三项式拟合模型。采用 ANOVA 分析效应面的回归参数, 方差分析见表 2。

方差分析结果显示, 该三项式拟合模型 $F = 10.16, P < 0.01$, 表明该模型极具显著性; 确定系数 $R^2_{\text{adj}} = 0.8624$, 说明该方程的因变量与各自变量之间的线性关系显著, 响应值的变化有 86.24% 是来源于试验所选的自变量。模型的变异系数 2.92%, 说明该模型的精密度良好。方程的失拟项 $F = 3.97, P > 0.05$, 表示失拟项不显著, 回归方程在整个回归区域内的拟合情况良好。根据所拟合的三项式方程, 应用 Design-Expert 8.0.6.1 软件分别绘制各因素对综合评分影响的三维效应面图, 见图 2。

经综合评价, 得炒茺蔚子的最佳炮制工艺为炮制温度 $219\text{ }^\circ\text{C}$, 炮制时间 2 min , 炒药机转速 $14\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。按优选的炮制工艺条件重复 3 次试验, 每次投药量 500 g , 结果总生物碱、盐酸水苏碱、水溶性浸出物、醇溶性浸出物质量分数的平均值分别为 $9.82, 2.50, 86.16, 193.28\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 $2.0\%, 1.0\%, 2.4\%, 1.3\%$, 各评价指标平均值的综

表 1 炒茺蔚子炮制工艺星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis for processing technology of stir-baked Leonuri Fructus

No.	A 炮制温度 / $^{\circ}\text{C}$	B 炮制时间 /min	C 转速 / $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$	总生物碱 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	盐酸水苏碱 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	水溶性浸出物 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	醇溶性浸出物 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	综合评分
1	190.57	2.06	14.27	6.71	2.24	87.60	182.84	88.26
2	219.43	2.06	14.27	10.42	2.42	86.86	194.40	99.87
3	190.57	4.94	14.27	6.10	2.18	85.49	189.49	86.01
4	219.43	4.94	14.27	6.30	1.81	74.67	184.91	76.54
5	190.57	2.06	17.73	7.59	1.91	78.75	183.50	81.67
6	219.43	2.06	17.73	6.36	2.24	84.72	188.36	87.53
7	190.57	4.94	17.73	6.43	2.23	83.74	188.43	87.29
8	219.43	4.94	17.73	6.02	2.17	83.53	191.44	85.46
9	180.00	3.50	16.00	5.48	1.93	80.92	181.67	78.27
10	230.00	3.50	16.00	8.86	2.02	81.93	190.96	87.50
11	205.00	1.00	16.00	5.42	2.07	75.58	189.00	80.70
12	205.00	6.00	16.00	8.51	2.18	84.97	187.21	90.37
13	205.00	3.50	13.00	7.46	2.17	86.58	179.50	87.83
14	205.00	3.50	19.00	5.73	2.09	80.86	181.06	82.00
15	205.00	3.50	16.00	5.70	1.99	76.67	185.67	79.51
16	205.00	3.50	16.00	5.66	1.95	75.67	172.69	77.44
17	205.00	3.50	16.00	5.38	1.89	78.66	181.67	76.86
18	205.00	3.50	16.00	5.47	1.90	65.72	163.71	73.64
19	205.00	3.50	16.00	5.31	1.93	69.70	174.69	75.48
20	205.00	3.50	16.00	5.09	1.94	70.70	180.67	75.90

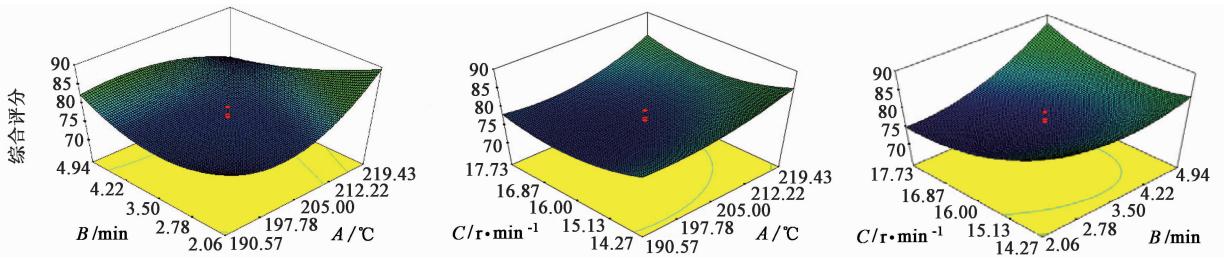


图 2 炮制温度、炮制时间、炒药机转速对炒茺蔚子炮制工艺影响的效应曲面

Fig. 2 Response surfaces of effects of factors on processing technology of stir-baked Leonuri Fructus

合评分 98.10, 综合评分预测值 98.96, 按(预测值 - 实际值)/预测值 $\times 100\%$ 计算偏差为 0.87%。炒茺蔚子外观性状为外黑褐色, 内棕黄色, 符合传统经验标准, 说明优选的拟合方程可较好地预测炒茺蔚子的炮制工艺。

3 讨论

盐酸水苏碱属于季铵碱, 结构中无共轭体系, 在 192 nm 处有微弱的紫外吸收, 为末端吸收, 基线噪音大, 不利于准确定量分析。蒸发光散射检测器是

一种浓度型检测器, 其响应不依赖于样品的光学特性, 适合无紫外或紫外末端吸收化合物的定量分析^[13]。本试验采用蒸发光散射检测器, 通过优化雾化器温度、漂移管温度、气体压力等各检测器参数, 得到最大的信噪比, 并且获得较好的峰形。同时课题组前期优化了茺蔚子中盐酸水苏碱的提取工艺^[10], 结果显示回流提取 60 min, 乙醇体积分数 70%, 料液比 1:10 的工艺条件提取时效率高, 该方法适合茺蔚子(炒)中盐酸水苏碱的 HPLC-ELSD 含

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Analysis of variance for regression model

来源	SS	f	MS	F	P
模型	776.29	13	59.71	10.16	0.004 7
A	42.60	1	42.60	7.25	0.035 9
B	46.75	1	46.75	7.96	0.030 3
C	16.99	1	16.99	2.89	0.139 9
AB	103.46	1	103.46	17.61	0.005 7
AC	0.45	1	0.45	0.08	0.792 1
BC	106.07	1	106.07	18.05	0.005 4
A ²	101.95	1	101.95	17.35	0.005 9
B ²	185.03	1	185.03	31.49	0.001 4
C ²	163.39	1	163.39	27.80	0.001 9
ABC	22.41	1	22.41	3.81	0.098 7
A ² B	105.43	1	105.43	17.94	0.005 5
A ² C	1.20	1	1.20	0.20	0.667 2
AB ²	12.29	1	12.29	2.09	0.198 3
残差	35.26	6	5.88		
失拟项	15.61	1	15.61	3.97	0.102 8
纯误差	19.65	5	3.93		
总和	811.55	19			

量测定。

本试验采用小型定制的炒药机,最大投药量 1.0 kg,采取自动测温控制,炒制样品受热均匀,色泽均一,便于小试,节省饮片用量同时又便于进行中试转化,优于实验室手工炮制的工艺优化。同时在工艺优选过程中,选择总生物碱、盐酸水苏碱、水溶性浸出物和醇溶性浸出物为评价指标,多成分、多层次、多方位体现炒茺蔚子的整体质量,为炒茺蔚子饮片的炮制工艺优化和规模化生产提供科学依据。

[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,2015:241.

[2] 龚千峰. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:119.

[3] 李智萌,张彦飞,蔡广知,等. 中药茺蔚子炮制工艺优化的研究[J]. 中国当代医药,2015,22(15):16-19.

[4] 卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京:人民卫生出版社,1988:174.

[5] 潘思源,常英,魏路雪. 茺蔚子总碱和水苏碱收缩离体小鼠子宫的比较[J]. 中草药,1998,29(10):687-688.

[6] 高文义,李银清,蔡广知,等. 茺蔚子降血压活性成分筛选的实验研究[J]. 长春中医药大学学报,2008,24(2):142-143.

[7] 李锐,王树真,李乐,等. 益母草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 广东化工,2014,41(2):54-55.

[8] 周苏娟,麦小梅,赵斌,等. TOPSIS 与灰色关联分析在不同产地炒茺蔚子质量评价中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):40-43.

[9] 邓仙梅,赵斌,贾天柱,等. 对《中国药典》2010 年版茺蔚子薄层鉴别方法的改进[J]. 时珍国医国药,2015,26(4):893-894.

[10] 周苏娟,赵斌,孟江,等. 基于 BP 神经网络和遗传算法优化茺蔚子水苏碱提取工艺的研究[J]. 广州中医药大学学报,2015,32(4):735-738,744.

[11] 许小华,杜绍亮,杨云. 益母草中总生物碱的提取及含量测定[J]. 河南科学,2008,26(12):1481-1482.

[12] 张彦飞,李智萌,蔡广知,等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定中药茺蔚子中盐酸水苏碱的含量[J]. 中国医药导报,2015,12(15):124-127.

[13] 曹邦静,苏娟,叶霁,等. 蒸发光散射检测器在中药分析中的应用[J]. 药学实践杂志,2015,33(1):13-16.

[责任编辑 刘德文]