

# 星点设计-效应面法优选石斛酒润蒸制工艺

欧德明<sup>1</sup>, 周一帆<sup>2</sup>, 胡昌江<sup>2\*</sup>, 卢晓萍<sup>1</sup>, 胡麟<sup>2</sup>

(1. 重庆桐君阁股份有限公司, 重庆 400012; 2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:采用星点设计-效应面法优选石斛的酒润蒸制工艺。方法:采用 HPLC 测定石斛碱含量,色谱条件为 Diamonsil 钻石二代 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(0.1% 三乙胺)梯度洗脱(0 ~ 30 min, 30% ~ 80% 乙腈; 30 ~ 40 min, 80% 乙腈),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 240 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。利用 UV 测定石斛多糖含量,以白酒体积分数、白酒加入量、蒸制时间为自变量,石斛碱与石斛多糖含量的总评归一值为因变量,通过星点设计-效应面法优选石斛的炮制工艺。结果:石斛碱线性范围 0.336 ~ 3.36 μg (R<sup>2</sup> = 0.999 8),精密密度 RSD 1.24%,重复性 RSD 1.06%,平均加样回收率 97.62% (RSD 1.45%);石斛多糖线性范围 0.020 32 ~ 0.101 6 g·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.997 1),精密密度 RSD 1.71%,重复性 RSD 1.90%。最佳炮制工艺为白酒体积分数 48%,白酒加入量 17%,蒸制时间 6.78 h。石斛碱平均质量分数 0.303%,预测值 0.292%,相对偏差 3.76%;多糖平均质量分数 12.3%,预测值 11.8%,相对偏差 4.24%,建立的模型预测性良好。结论:优选的石斛酒润蒸制工艺简便、稳定。

**[关键词]** 金钗石斛; 石斛碱; 石斛多糖; 炮制工艺; 高效液相色谱法; 星点设计-效应面法

**[中图分类号]** R283.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0034-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013190034

## Optimization of Streamed Processing Technology of Dendrobii Caulis with Wine by Central Composite Design-Response Surface Methodology

OU De-ming<sup>1</sup>, ZHOU Yi-fan<sup>2</sup>, HU Chang-jiang<sup>2\*</sup>, LU Xiao-ping<sup>1</sup>, HU Lin<sup>2</sup>

**[收稿日期]** 20130306(021)

**[基金项目]** 重庆市卫生局中医药科技项目(2011-2-168)

**[第一作者]** 欧德明,副主任中药师,从事中药材饮片的质量管理、控制和验收研究, Tel:13368080586, E-mail:oudeming2012@sina.com

**[通讯作者]** \* 胡昌江,教授,博士生导师,从事中药炮制研究, Tel:13980980796, E-mail:hhccjj@hotmail.com

[19] 常景玲,李慧,朱佩燕. 灵芝多糖发酵工艺优化[J]. 中国食用菌, 2005, 24(6): 47.

[20] 张士国,邵伟国. 灰树花子实体多糖提取方法的比较[J]. 中国林副特产, 2005, 20(2): 40.

[21] 魏红福,孙培龙,杨开,等. 姬松茸子实体多糖分离纯化研究[J]. 中国食用菌, 2005, 24(5): 45.

[22] 孙培龙,杨开,赵培城,等. 姬松茸子实体多糖提取方法的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(6): 71.

[23] 温磊,尚德静,王伟. 灵芝晒多糖的制备及其分离纯化[J]. 中国食用菌, 2005, 24(6): 44.

[24] 江玉姬,孙淑静,官宁,等. 银耳多糖提取工艺的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(Z1): 262.

[25] 徐剑,郑曙光. 正交试验优化骨炎消巴布剂的基质处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 39.

[26] 李智勇,孙冬梅,杜建平. 均匀设计法优选痛痛巴布剂的基质处方研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 1.

[27] 赵春燕,孙军德,李敏,等. 培养条件对羊肚菌菌丝生长的影响[J]. 中国食用菌, 2005, 24(1): 15.

[28] 马瑞霞,姚献华,魏志华. 白色金针菇液体菌种生产技术研究[J]. 中国食用菌, 2005, 24(6): 16.

[29] 陈合,赵燕,秦俊哲,等. 金针菇液体菌种发酵罐内深层培养条件的研究[J]. 食用菌, 2005, 27(6): 21.

[30] 马立芝,袁建平,高振江. 杏鲍菇液体菌种培养条件的研究[J]. 食用菌, 2005, 27(3): 10.

[31] 王德芝,余荣珍. 茶薪菇深层发酵产多糖的研究[J]. 中国食用菌, 2005, 24(2): 47.

[32] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社, 1993:191.

[33] 武梅,周应揆,赵永昌,等. 灵芝菌丝体液体发酵培养产灵芝多糖的动态研究[J]. 云南大学学报:自然科学版, 1999, 21(2): 165.

[责任编辑 仝燕]

(1. *Chongqing Tongjunge Co. Ltd, Chongqing 400012, China;*

2. *Chinese Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To optimize streamed processing technology of *Dendrobii Caulis* with wine by central composite design-response surface methodology. **Method:** The content of dendrobine was determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Diamonsil  $C_{18}$  column (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), mobile phase of acetonitrile-water (0.1% triethylamine) gradient elution, flow rate 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, detection wavelength 240 nm, column temperature 30  $^{\circ}$ C, injection volume 10  $\mu$ L. The content of polysaccharides was determined by UV. With the concentration and amount of wine, steaming time as independent variables, overall normalized value of the contents of dendrobine and polysaccharides as dependent variable, processing technology was optimized by central composite design-response Surface methodology. **Result:** Linear range of dendrobine was 0.336-3.36  $\mu$ g ( $R^2 = 0.9998$ ), RSD of precision was 1.24%, RSD of repeatability was 1.06%, average recovery was 97.62% (RSD 1.45%); Linear range of polysaccharides was 0.020 32-0.101 6 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0.9971$ ), RSD of precision was 1.71%, RSD of repeatability was 1.90%. Optimum processing conditions were: the concentration of wine 48%, the amount of wine 17% and steaming time 6.78 h. Deviation between the predicted value (0.292%) and the measured value (0.303%) of the mass fraction of dendrobine was 3.76%, while deviation between the predicted value (11.8%) and the measured value (12.3%) of polysaccharides was 4.24%, established model had a good prediction. **Conclusion:** Optimized processing technology was simple and stable.

**[Key words]** *Dendrobii Caulis*; dendrobine; polysaccharides from *Dendrobii Caulis*; processing technology; HPLC; central composite design-response surface methodology

石斛始载于《神农本草经》,列为上品,具有益胃生津、滋阴清热的功能。《雷公炮炙论》记载的石斛炮制方法<sup>[1]</sup>为“凡使,先去头、土了,用酒浸一宿,漉出,于日中曝干,却用酥蒸,从巳至酉,却徐徐焙干用”。古代炮制专著中所载石斛炮制方法多以酒润蒸制为主<sup>[1]</sup>。石斛中主要含有生物碱及多糖类成分,其中生物碱类成分水溶性不好,通过酒润蒸制法能增强有效成分的溶解。目前,石斛炮制工艺多以操作经验评判为主,无详细的工艺参数规定,本实验采用星点设计-效应面法,以金钗石斛中主要药用成分石斛碱及多糖类成分<sup>[2]</sup>为评价指标,优选金钗石斛的酒润蒸制工艺,为石斛的质量控制提供实验依据。

## 1 材料

1200型高效液相色谱仪(G1312B型二元泵, G1315C型DAD检测器,美国安捷伦公司), UV-6000型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), BD61型1/万电子天平(德国Sartorius公司), TGL-18C型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

石斛碱对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-12030205), 无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110833-200503), 石

斛(购于成都荷花池药材市场,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为兰科植物金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 的干燥茎), 乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

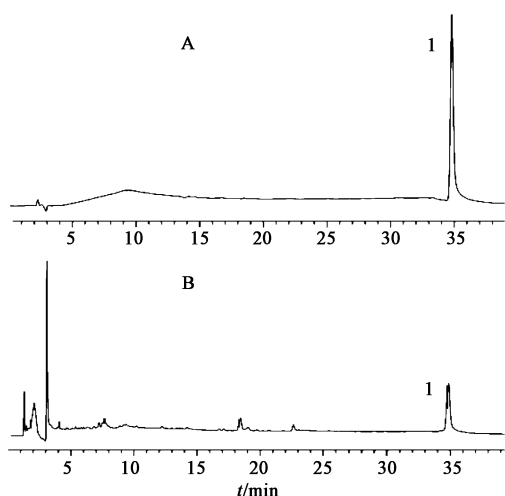
## 2 方法与结果

### 2.1 石斛碱的含量测定

**2.1.1 色谱条件**<sup>[3]</sup> Diamonsil 钻石二代  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈(A)-水(0.1%三乙胺, B)梯度洗脱(0~30 min, 30%~80% A; 30~40 min, 80% A), 流速 1 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 检测波长 240 nm, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 10  $\mu$ L, 见图 1。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取本品粉末(过三号筛)0.5 g, 精密称定, 加氨水 2 mL 浸润 30 min, 加三氯甲烷 50 mL, 称定质量, 回流提取 2 h, 以三氯甲烷补足失重, 过滤, 精密量取续滤液 10 mL, 减压回收溶剂至干, 加甲醇溶解, 精密转入 2 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过, 密塞, 备用<sup>[4]</sup>。

**2.1.3 标准曲线的制备** 精密称取石斛碱对照品适量, 加甲醇制成 0.168 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。分别吸取 2, 4, 6, 8, 10, 20  $\mu$ L, 按 2.1.1 项下色谱条件进行分析, 以峰面积对进样量进行线性回归, 得回归方



A. 对照品; B. 供试品; 1. 石斛碱

图 1 石斛 HPLC

程  $Y = 0.0008X - 0.213$  ( $R^2 = 0.9998$ ), 线性范围  $0.336 \sim 3.36 \mu\text{g}$ 。

**2.1.4 精密度试验** 取石斛样品适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 结果石斛碱峰面积的 RSD 1.24%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取石斛样品适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定, 结果石斛碱峰面积的 RSD 1.63%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

**2.1.6 重复性试验** 精密称取石斛样品 6 份, 每份 0.5 g, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 测定, 结果石斛碱含量的 RSD 1.06%。

**2.1.7 加样回收率试验** 精密称取已知含量的石斛样品粉末 0.5 g, 平行 6 份, 加入石斛碱对照品溶液适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 测定, 计算石斛碱平均回收率 97.62%, RSD 1.45%。

## 2.2 石斛多糖含量测定

**2.2.1 供试品溶液的制备** 取石斛粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 加水 200 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 转移至 250 mL 量瓶中, 用少量水分次洗涤容器, 洗液并入同一量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL 置离心管中, 精密加入无水乙醇 50 mL, 摇匀, 冷藏 1 h, 取出, 离心 ( $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min, 下同), 弃去上清液, 沉淀加 80% 乙醇洗涤 2 次, 每次 40 mL, 离心, 弃去上清液, 沉淀加热溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 放冷, 加水至刻度, 摇匀, 即得<sup>[5-6]</sup>。

**2.2.2 标准曲线的制备** 精密称取无水葡萄糖对照品适量, 加水制成  $0.1016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。

精密量取该溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 10 mL 具塞试管中, 加水补至 1.0 mL, 精密加入 5% 苯酚溶液 1 mL (临用配制), 摇匀, 加入硫酸 5 mL, 摇匀, 置沸水浴中加热 20 min, 取出, 置冰浴中冷却 5 min, 以相应试剂为空白, 于 488 nm 处测定吸光度 (A), 以质量浓度为纵坐标, A 为横坐标, 得回归方程  $Y = 0.0967X + 0.0006$  ( $R^2 = 0.9971$ ), 线性范围  $0.02032 \sim 0.1016 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.3 精密度试验** 取石斛供试品溶液 1.0 mL, 按 2.2.2 项下自“精密加入 5% 苯酚溶液”起连续测定 6 次, 结果 A 的 RSD 1.71%。

**2.2.4 稳定性试验** 取石斛供试品溶液 1.0 mL, 按 2.2.2 项下自“精密加入 5% 苯酚溶液”起每隔 1 h 测定 1 次 A, 连续测定 6 h, 结果 A 的 RSD 1.55%。

**2.2.5 重复性试验** 精密称取石斛样品 0.5 g, 共 6 份, 按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液, 测定 A, 结果多糖含量的 RSD 1.90%。

**2.3 炮制工艺优选** 在预试验基础上, 选取白酒体积分数、白酒质量分数、蒸制时间为考察因素, 以石斛碱、石斛多糖含量为综合评价指标, 每个指标均标准化为 0~1 的“归一值”<sup>[7]</sup>, 各指标“归一值”求算几何平均数, 得总评“归一值” $(OD) = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$  ( $k$  为指标数), 由于石斛碱及石斛多糖含量均为越大越好, 所以采用 Hassan 方法进行数学转换求“归一值”, 公式为  $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$ 。因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

表 1 金钗石斛的酒润蒸制工艺星点设计因素水平

水平	A 白酒体积分数 /%	B 白酒加入量 /%	C 蒸制时间 /h
-1.680	32	5	2
-1	36	6	3.22
0	42	12.5	5
1	48	17	6.78
1.680	52	20	8

使用 Design-Expert 8.0 软件对试验数据进行拟合, 得方程  $Y = 5.46 - 15.9A - 16.5B - 0.615C + 21.1AB + 1.01AC + 0.452BC + 10.9A^2 + 27.3B^2 + 0.0226C^2$  ( $R^2 = 0.8257, P = 0.0076$ )。根据响应曲面分析绘出各因变量的曲面图<sup>[8-10]</sup>, 见图 2~4, 说明随蒸制时间的增加 OD 值显著升高, 白酒体积分数与用量对 OD 值的影响不太显著, 综合考虑确定最佳炮制工艺为白酒体积分数 48%, 白酒质量分数 17%, 蒸制时间 6.78 h。按该工艺进行 3 次验证试

验,结果石斛碱平均质量分数 0.303%,与预测值(0.292%)相对偏差 3.76%,多糖平均质量分数 12.3%,与预测值(11.8%)相对偏差 4.24%,表明建立的模型预测性较好。

表 2 金钗石斛的酒润蒸制工艺星点试验安排

No.	A	B	C	石斛碱/%	多糖/%	OD(Y)
1	0.36	0.08	3.22	0.237	7.85	0.068
2	0.48	0.08	3.22	0.274	7.63	0.000
3	0.36	0.17	3.22	0.237	10.0	0.226
4	0.48	0.17	3.22	0.235	9.84	0.189
5	0.36	0.08	6.78	0.238	10.2	0.241
6	0.48	0.08	6.78	0.246	12.0	0.407
7	0.36	0.17	6.78	0.316	8.33	0.350
8	0.48	0.17	6.78	0.305	13.4	0.933
9	0.32	0.13	5.00	0.234	7.98	0.069
10	0.52	0.13	5.00	0.237	9.35	0.191
11	0.42	0.05	5.00	0.240	9.34	0.208
12	0.42	0.20	5.00	0.264	7.90	0.140
13	0.42	0.13	2.00	0.227	8.74	0.000
14	0.42	0.13	8.00	0.268	10.1	0.447
15~20	0.42	0.13	5.00	0.238	8.02	0.093

注:15~20号为平行试验,以平均值表示。

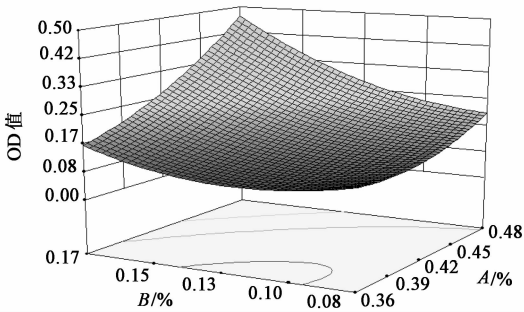


图 2 白酒体积分数和白酒加入量对 OD 值的效应面

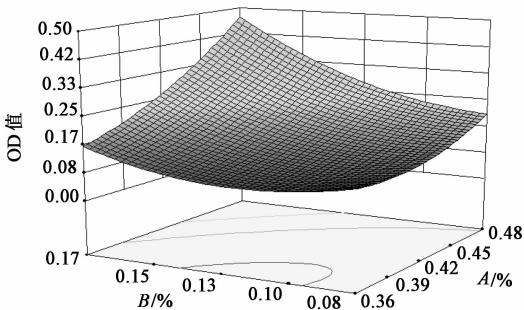


图 3 白酒体积分数和蒸制时间对 OD 值的效应面

### 3 讨论

本草古籍所载石斛的炮制方法多为酒润蒸制。《中国药典》2010年版一部所载的干品石斛炮制方法为“除去残根,洗净,切段,干燥”。《四川省中药饮片炮制规范》和《重庆市中药饮片炮制规范及标

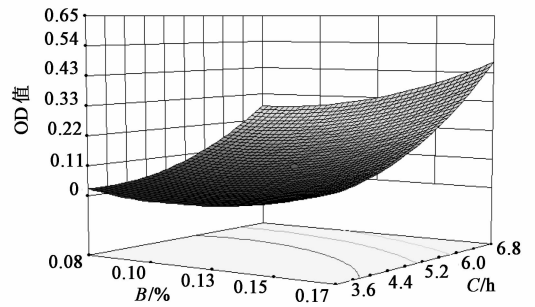


图 4 白酒加入量和蒸制时间对 OD 值的效应面

准》中石斛炮制方法均与《中国药典》2010年版相同。传统炮制多以个人经验操作为主,炮制品的质量取决于操作者的个人主观判断,易造成炮制品质量不稳定的现象。本文通过对石斛的炮制工艺参数进行考察,为石斛炮制品的标准操作流程的建立提供实验依据。采用星点设计能很好地弥补正交设计及均匀设计中试验精度不够、工艺条件不准确、各因素间交互作用无法考察等问题。

### [参考文献]

- [1] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1998:369.
- [2] 陈晓梅,郭顺星. 石斛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2000,13(1):750.
- [3] 申刚,乙引,张习敏,等. HPLC法测定金钗石斛中石斛碱含量[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15248.
- [4] 李墅,王春兰,郭顺星. 高效液相色谱法测定金钗石斛中石斛碱的含量[J]. 中国药学杂志,2009,44(4):252.
- [5] 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,2010:306.
- [6] 高巍,乙引,张习敏,等. 黔产金钗石斛生物碱组成的HPLC指纹图谱建立[J]. 安徽农业科学,2009,37(28):13610.
- [7] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志,2000,35(8):530.
- [8] 徐向宏,何明珠. 试验设计与 Design-Expert, SPSS 应用[M]. 北京:科学出版社,2010:115.
- [9] 王秋红,苏阳,吴伦,等. 星点设计-效应面法优化升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):24.
- [10] 周一帆,胡昌江,余凌英,等. 星点设计-效应面法优选淫羊藿油炙工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):16.

[责任编辑 全燕]