

中心复合设计-效应面法优化玄参的炮制工艺

周文杰^{1,2}, 傅亚³, 王云红¹, 张小梅¹, 柯秀梅^{1,2}, 刘楠^{1,2}, 杨荣平^{1,2*}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 成都中医药大学, 成都 611137;
3. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 优选玄参的炮制工艺条件。方法: 采用中心复合设计-效应面法, 以浸泡时间、蒸制时间、干燥温度为考察因素, 哈帕昔、哈帕俄昔、肉桂酸变化率的总评归一值(OD)为指标, 进行中心复合设计试验, 并用多元线性回归及二项式拟合建立指标与因素间的数学模型, 预测玄参的最佳炮制工艺。结果: 最佳工艺为浸泡 19 min, 蒸制 1.2 h, 干燥温度 49 ℃。预测值与实测值偏差均 < 2.65%。结论: 采用中心复合设计-效应面法优化的玄参炮制工艺稳定可行, 结果可靠, 为玄参的质量标准研究提供实验依据。

[关键词] 玄参; 炮制工艺; 中心复合设计; 效应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0010-05

Optimization of Processing Technology for *Scrophularia ningpoensis* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHOU Wen-jie^{1,2}, FU Ya³, WANG Yun-hong¹, ZHANG Xiao-mei¹,
KE Xiu-mei^{1,2}, LIU Nan^{1,2}, YANG Rong-ping^{1,2*}

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China;
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China.)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology conditions of *Scrophularia ningpoensis*. **Method:** Central composite design and response surface method was used with soaking time, steaming time, drying temperature as factors, OD of change ratio of harpagide, cinnamic acid and harpagoside as index, mathematical model of index and factors were established by multi-linear regression and binomial fitting, and to predict optimum processing technology of *S. ningpoensis*. **Result:** Optimal conditions were as followings: soaking time 19 min, steaming time 1.2 h, drying temperature 49 ℃. Deviation of predicted and measured value was less than 2.65%. **Conclusion:** Optimized processing technology was stable, reliable and feasible, it could provide experimental evidence for quality standards research of *S. ningpoensis*.

[Key words] *Scrophularia ningpoensis*; processing technology; central composite design; response surface method

玄参具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效^[1], 主要化学成分包括有机环烯醚萜类、三萜皂苷、苯丙素苷等。其中有机环烯醚萜类的哈帕昔、哈帕俄昔和有机芳酸中肉桂酸均具有抗炎、增强免疫、保肝及治疗糖尿病等作用^[2]。

《中国药典》2010 年版收载玄参的炮制方法为除去残留根茎和杂质, 洗净, 润透, 切薄片, 干燥或微

[收稿日期] 20120912(008)
[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B03)
[第一作者] 周文杰, 在读硕士, 从事中药药剂研究, Tel: 023-89029056, E-mail: 841169954@qq.com
[通讯作者] * 杨荣平, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药剂研究, Tel: 023-89029056, E-mail: rongpingyang18@yahoo.com.cn

泡,蒸透,稍晾,切薄片,干燥^[3]。本文针对收载的“微泡,蒸透,稍晾,切薄片,干燥”炮制方法,拟用中心复合设计-效应面法对浸泡时间、蒸制时间、干燥温度进行考察,以哈帕昔、哈帕俄昔、肉桂酸的含量变化为指标,优选玄参的炮制方法。

1 材料

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),AEG-45SM 型电子天平(日本岛津公司),BS110 S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),DHG-9240A 型电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限公司)。

哈帕昔对照品(南通飞宇生物科技有限公司,批号 FY12871128,纯度 > 98%),哈帕俄昔对照品(南通飞宇生物科技有限公司,批号 FY12861116,纯度 > 98%),肉桂酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110786-200503),乙腈、甲醇为色谱纯,水为自制超纯水,玄参由重庆南川农业开发有限公司种植基地提供,经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的根。

2 方法与结果

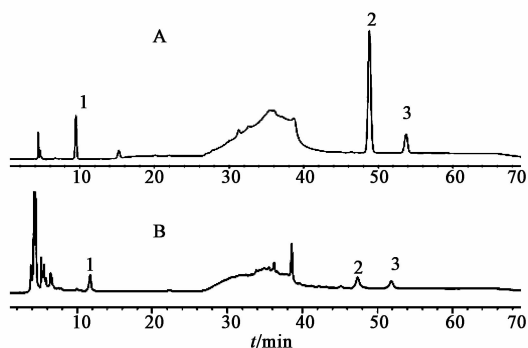
2.1 中心复合设计 采用中心复合设计对玄参的炮制工艺进行优化^[4],确定影响玄参炮制工艺的因素主要有浸泡时间、蒸制时间、干燥温度^[5-6],根据中心复合设计原理,每因素设五水平,见表 1。

表 1 玄参炮制工艺中心复合设计因素水平

水平	X_1 浸泡时间/min	X_2 蒸制时间/h	X_3 干燥温度/℃
-1.732	0	0.5	45
-1	19	1.2	49
0	45	2.3	55
1	71	3.3	61
1.732	90	4.0	65

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Boston Symmetrie ODS-AQ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 0.05% H₃PO₄ 水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% B; 20 ~ 30 min, 5% ~ 25% B; 30 ~ 60 min, 25% B; 60 ~ 70 min, 25% ~ 5% B),流速 0.8 mL · min⁻¹,检测波长 210 nm,柱温 35 ℃。采用外标法记录哈帕昔、肉桂酸、哈帕俄昔峰各峰面积并计算含量,理论塔板数均 ≥ 8 000,与相邻杂峰分离度 > 1.9,对称因子 0.99 ~ 1.05,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 哈帕昔; 2. 肉桂酸; 3. 哈帕俄昔

图 1 玄参 HPLC

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取经 P₂O₅ 干燥 10 h 的哈帕俄昔昔、哈帕昔对照品 13.30, 15.36 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中;精密称取肉桂酸对照品 18.88 mg, 置于 25 mL 量瓶中;分别加 30% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液,备用。分别精密吸取哈帕俄昔、哈帕昔及肉桂酸储备液 1, 1, 0.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中混合,用 30% 甲醇稀释至刻度,作为混合对照品溶液(质量浓度分别为 26.6, 30.7, 37.75 mg · L⁻¹)。

2.2.3 供试品溶液制备 取玄参粉末(过二号筛) 0.5 g,精密称定,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇溶液 50 mL,密塞,称定质量,摇匀,浸泡 1 h 后超声处理 30 min,放冷,称定质量,用 30% 甲醇溶液补足质量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系的考察 精密吸取不同体积的对照品溶液,分别置于 10 mL 量瓶中,用 30% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,配制成系列不同质量浓度的对照品溶液,进样量 10 μL,测定峰面积,以对照品进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程分别 $Y_{\text{哈帕昔}} = 331.25X - 0.4181 (r = 0.9999)$, $Y_{\text{肉桂酸}} = 396.25X - 3.0266 (r = 1)$, $Y_{\text{哈帕俄昔}} = 1754X + 9.6059 (r = 0.9999)$,表明哈帕昔、肉桂酸及哈帕俄昔线性范围分别为 0.0614 ~ 1.2280, 0.0755 ~ 1.510, 0.0532 ~ 2.128 μg。

2.2.5 精密度试验 按 2.2.1 项下色谱条件,将混合对照品溶液连续进样 6 次,进样量 10 μL,测定并记录峰面积,结果哈帕昔、肉桂酸、哈帕俄昔的 RSD 分别为 0.55%, 1.31%, 1.08%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批玄参饮片粉末 6 份,每份 0.5 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,测定哈帕昔、肉桂酸、哈帕俄昔的含量,计算 3

种成分含量的 RSD 分别为 1.12% ,0.96% ,1.21%。
2.2.7 稳定性试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μ L, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定峰面积, 计算哈帕昔、哈帕俄昔、肉桂酸峰面积的 RSD 分别为 0.91% ,1.62% ,1.49% , 表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收试验 精密称取同一批已知含量的玄参炮制药材粉末 0.5 g, 共 6 份, 分别加入已知含量的对照品溶液, 按 2.2.3 项下方法制备样品溶液, 按 2.2.1 项下方法测定, 哈帕昔、肉桂酸及哈帕俄昔的平均回收率分别为 99.1% (RSD 1.73%) , 101.3% (RSD 1.86%) , 100.2% (RSD 1.78%)。

2.3 数据分析 取玄参适量, 按表 2 试验号进行炮制加工, 按 2.2.1 项下方法测定, 计算各成分含量。采用 Design Expert8.0 软件对数据进行分析, 以哈帕昔 (Y_1)、肉桂酸 (Y_2)、哈帕俄昔 (Y_3) 变化率为指标 (变化率 = 炮制后成分的改变量/药材中成分质量), 每个指标均标准化为 0 ~ 1 的归一值 d , 采用 Hanssana 法进行数学转换求归一值 d_{max} , 公式如下 $d_{max} = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$, 根据试验结果求得归一值的几何平均值 $OD(Y_4)^{[7]}$ 。

按照中心复合设计要求, 试验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程式可表达为 $Y = A_0 + \sum A_i X_i + \sum A_{ii} X_i^2 + \sum A_{ij} X_{ij}^2$, 其中 Y 为效应值, A_0 ,

A_i, A_{ii}, A_{ij} 为方程系数, $X_i, X_j (i = 1, 2, 3, i \neq j)$ 为自变量真实值。二次多项式模型方程拟合的性质由确定系数 (r) 表达, 其统计学显著性由 F 值检验^[8]。以 Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 分别对各因素进行二次多项式模型方程拟合, 结果分别为

$$Y_1 = 0.10 - 0.04X_1 - 0.69X_2 + 0.02X_3 + 7.98X_1X_2 + 4.67X_1X_3 + 6.59X_2X_3 + 7.92X_1^2 + 0.035X_2^2 - 5.05X_3^2 (R^2 = 0.8531, P < 0.01);$$

$$Y_2 = 0.19 + 5.8X_1 + 0.02X_2 + 0.04X_3 + 0.08X_1X_2 + 0.16X_1X_3 + 0.07X_2X_3 + 9.91X_1^2 - 0.05X_2^2 - 0.1X_3^2 (R^2 = 0.8861, P < 0.01);$$

$$Y_3 = 3.57 - 0.07X_1 - 0.96X_2 - 0.03X_3 + 4.91X_1X_2 + 8.72X_1X_3 + 7.49X_2X_3 + 1.17X_1^2 + 0.05X_2^2 - 2.08X_3^2 (R^2 = 0.8200, P < 0.01);$$

$$Y_4 = 0.18 - 0.03X_1 - 0.07X_2 + 0.04X_3 + 0.02X_1X_2 + 0.11X_1X_3 + 0.17X_2X_3 + 0.07X_1^2 + 0.03X_2^2 - 0.04X_3^2 (R^2 = 0.8959, P < 0.01)$$

说明 4 个模型方程高度显著, 试验设计可靠, 具有较好的可信度。而多元线性回归的 $R^2 = 0.1358$, P 也无显著性差异, 不如二项式回归拟合好。

2.4 效应面优化预测及验证

2.4.1 炮制工艺预测 根据二次多项式模型方程拟合结果, 作出 OD 值对 3 个因素中任意 2 个因素的效应面三维图和二维等高线图, 结果见图 2 ~ 4。

利用效应面和等高线分析各因素的相互作用,

表 2 玄参炮制工艺中心复合试验安排

No.	X_1 /min	X_2 /h	X_3 /°C	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /%	Y_4 / % ¹⁾
1	19	1.2	61	-0.120 5	-0.050 3	0.020 3	0.188 8
2	45	0.5	55	2.279 0	0.028 1	0.336 0	0.513 0
3	45	2.3	45	-0.201 3	-0.215 0	-0.216 2	0.000 0
4	71	1.2	61	-0.029 3	0.037 7	-0.117 7	0.187 7
5	71	3.3	61	-0.046 4	0.567 6	0.158 0	0.563 1
6	19	3.3	61	-0.262 7	-0.101 1	-0.185 9	0.056 6
7	19	3.3	49	-0.199 9	0.134 1	0.027 4	0.239 1
8	19	1.2	49	0.054 8	0.210 7	0.442 2	0.608 4
9	45	2.3	65	-0.260 1	-0.059 5	-0.066 2	0.111 3
10	71	1.2	49	-0.093 1	-0.083 9	-0.252 9	0.000 0
11	90	2.3	55	-0.080 6	0.151 2	0.151 9	0.364 5
12	0	2.3	55	0.041 0	0.230 3	0.082 7	0.426 1
13	71	3.3	49	-0.305 3	-0.109 8	-0.118 2	0.031 7
14	45	4.0	55	-0.422 9	-0.019 3	-0.244 5	0.000 0
15 ~ 20 ²⁾	45	2.3	55	-0.190 4	0.193 2	-0.126 5	0.177 3

注: ¹⁾ 计算 OD 值时, Y_1, Y_2, Y_3 同时增加, 避免负值影响 OD 值; ²⁾ 15 ~ 20 号为重复试验, 取平均值。

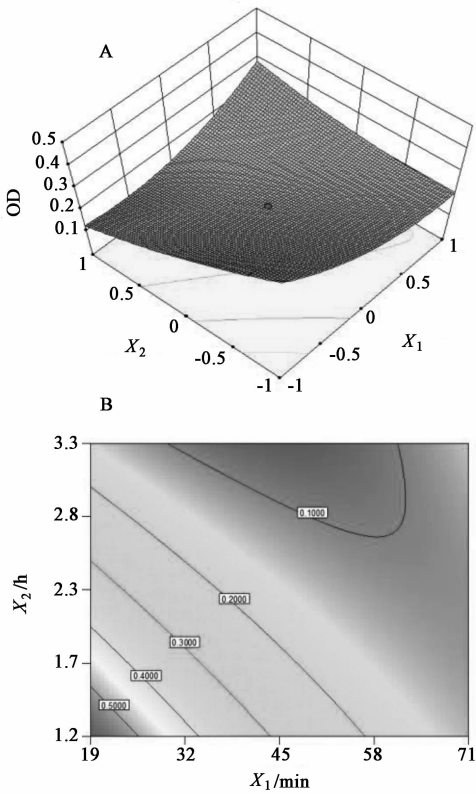


图2 浸泡时间和蒸制时间对 OD 值的响应面三维图(A)和等高线(B)

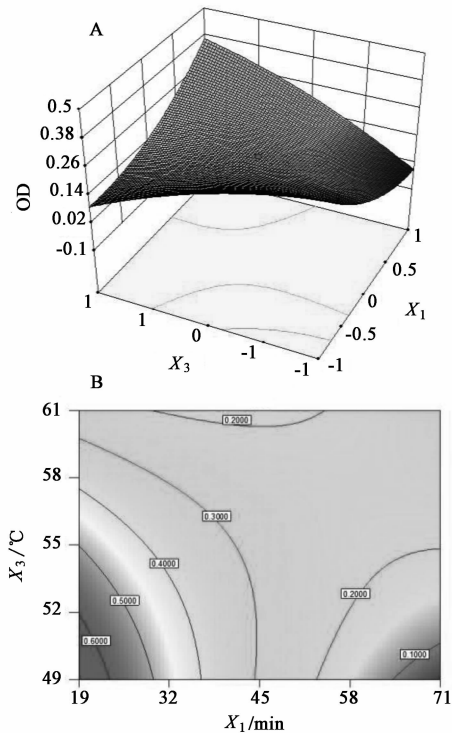


图3 浸泡时间和干燥温度对 OD 值的响应面三维图(A)和等高线(B)

等高线密度大说明影响因素对响应值影响大,且等高线的形状可直观地看出交互效应的大小,椭圆形

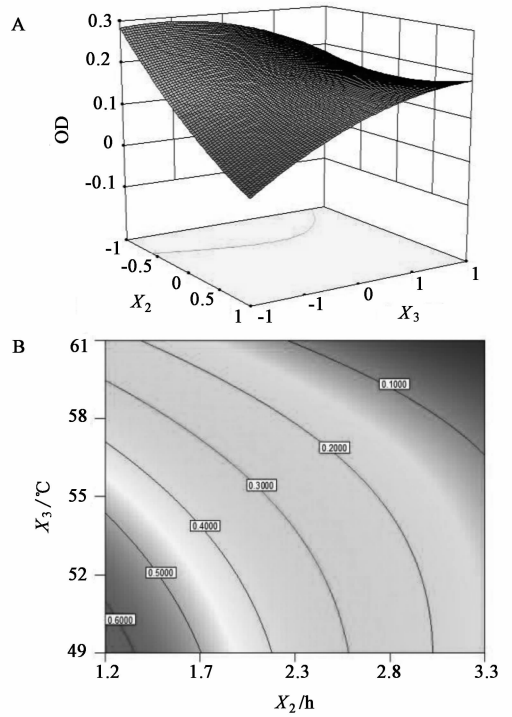


图4 蒸制时间和干燥温度对 OD 值的响应面三维图(A)和等高线(B)

反映了两因素的交互作用较强,呈圆形则相反,而响应曲线陡则说明交互作用较强^[9]。由图2~4可知,浸泡时间、蒸制时间和干燥温度各因素间交互作用显著,减少浸泡时间、蒸制时间和降低干燥温度均能较好地提高 OD 值。根据效应面预测,3个因素较佳范围为 $X_1: 19 \sim 28 \text{ min}$, $X_2: 1.2 \sim 1.5 \text{ h}$, $X_3: 49 \sim 55 \text{ }^\circ\text{C}$ 。以 OD 值对最佳工艺进行预测,得玄参的最佳炮制工艺为浸泡 19 min,蒸制 1.2 h,干燥温度 49 $^\circ\text{C}$ 。

2.4.2 验证试验 为验证模型与试验结果是否相符,通过进一步试验对模型的可靠性进行验证,根据模型计算出各成分的变化率 $Y_1 = 15.58\%$, $Y_2 = 29.73\%$, $Y_3 = 42.57\%$,以最佳炮制工艺进行 3 次验证试验,结果实测平均值为 $Y_1 = 14.23\%$, $Y_2 = 30.65\%$, $Y_3 = 43.28\%$, RSD 依次为 1.18%, 1.73%, 2.65%,与模型预测值非常接近,说明该模型比较可靠。

3 讨论

本文以哈帕昔,哈帕俄昔和肉桂酸为指标,较为全面地考察了玄参在不同炮制条件下,有效成分的含量变化。3种成分的总含量最高的玄参功效是否最优,仍然需要结合药效学试验进一步验证。玄参炮制过程中成分含量的变化是动态的,不是单一成分的减少和增加。文献报道,哈帕俄昔易水解成

大孔树脂分离纯化枳壳中总黄酮的工艺优选

傅华强, 邹建国*, 刘飞, 刘燕燕, 李不悔
(南昌大学环境与化学工程学院, 南昌 330031)

[摘要] 目的: 优选大孔树脂分离、纯化枳壳总黄酮的工艺条件。方法: 通过静态吸附试验比较 7 种不同大孔树脂对枳壳总黄酮的吸附性能, 筛选最佳大孔树脂型号; 采用单因素试验考察大孔树脂的吸附和洗脱条件。结果: AB-8 型大孔树脂最适合用于纯化枳壳中总黄酮; 其最佳分离、纯化工艺参数为上样液质量浓度 $0.408 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4, 上样速率 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 6 BV 75% 乙醇以 $1 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 进行洗脱; 总黄酮纯度由原来的 14.03% 提高到 42.54%。结论: 优选的分离、纯化工艺稳定可行, 可推广于大生产应用。

[关键词] 枳壳; 总黄酮; 大孔树脂; 静态吸附; 动态吸附

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0014-04

Optimization of Separation and Purification Technology for Total Flavonoids from *Citrus aurantium* by AB-8 Macroporous Adsorption Resin

FU Hua-qiang, ZOU Jian-guo*, LIU Fei, LIU Yan-yan, LI Bu-hui

(School of Environment and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize separation and purification technology of total flavonoids from *Citrus aurantium* by AB-8 macroporous resin. **Method:** Adsorption property of seven different kinds of macroporous

[收稿日期] 20120628(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31060210)

[第一作者] 傅华强, 硕士, 从事化学工程研究, E-mail: fufelix@foxmail.com

[通讯作者] * 邹建国, 博士, 教授, 从事精细化工研究, Tel: 18970021079, E-mail: Jianguozou@163.com

哈帕昔和肉桂酸^[10], 但通过本实验可知, 不能忽略在炮制过程中会有其他物质转化成哈帕俄昔, 哈帕昔和肉桂酸的情况也是一样。本研究为玄参的炮制质量和临床应用选择提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 张洪利, 刘瑶, 成金乐, 等. 玄参破壁粉粒体内抗菌实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 178.
- [2] 华静, 戚进, 余伯阳. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 233.
- [3] 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: 109.
- [4] 施俊辉, 杨军宣, 赵成城, 等. 星点设计-效应面法优化栀子的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2011, 22

(3): 667.

- [5] 张发科, 吕青涛, 张兆旺, 等. HPLC 法研究不同炮制工艺对玄参中哈帕俄昔和肉桂酸含量的影响[J]. 化学分析计量, 2006, 15(6): 51.
- [6] 聂诗明, 孙晓静, 陈璇, 等. 不同干燥方法对玄参品质的影响[J]. 中药材, 2010, 33(1): 33.
- [7] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学药学分册, 2000, 27(5): 292.
- [8] 苏栢僮, 刘英, 徐佳丽, 等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(3): 501.
- [9] 李东东, 放茂良, 刘琼, 等. 星点设计-响应面法优化超声提取青竹标多酚[J]. 中药材, 2011, 34(1): 129.
- [10] 龚友兰, 向大雄, 邓长风, 等. HPLC-UV 双波长法同时测定玄参中 5 种主要成分含量[J]. 中南药学, 2008, 6(6): 660.

[责任编辑 仝燕]