

2 种根类药材醇沉絮体的分形维数测定方法建立

邵峰¹, 俞梦莹¹, 蒋美林¹, 杨明^{1*}, 尚悦², 刘荣华¹, 张学瑜¹

(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 国家药典委员会, 北京 100061)

[摘要] **目的:**建立黄芪与板蓝根 2 种根类药材醇沉絮体的分形维数测定方法。**方法:**分别以黄芪、板蓝根的水提醇沉絮体为研究对象,采用大津算法对醇沉絮体原始显微图像进行二值化处理,运用周长-面积法分别考察沉淀絮体取样体积、稀释倍数、图像放大倍数及图像采集位数对分形维数的影响。**结果:**黄芪与板蓝根醇沉絮体均具有分形特征;确定这 2 个醇沉絮体取样体积在 600~800 μL ,样品稀释至 5~20 倍,显微图像放大 200 倍或 400 倍,选取 4 个图像采集位点时,能够得到稳定可靠的醇沉絮体分形维数。**结论:**建立的测定方法稳定可行,可为根类药材醇沉絮体的分形理论研究提供参考。

[关键词] 分形维数;醇沉;絮体;黄芪;板蓝根;显微图像;颗粒剂

[中图分类号] R22;O6;R28;C37;Q246 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0103-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191454

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190402.0904.002.html>

[网络出版时间] 2019-04-03 10:39

Establishment of Determination of Fractal Dimension of Ethanol-precipitated Flocs of Two Root Medicinal Herbs

SHAO Feng¹, YU Meng-ying¹, JIANG Mei-lin¹, YANG Ming^{1*}, SHANG Yue², LIU Rong-hua¹, ZHANG Xue-yu¹

(1. *Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),*

Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of fractal dimension of ethanol precipitation flocs in two kinds of root medicinal herbs (Astragali Radix and Isatidis Radix). **Method:** The ethanol-precipitated flocs of Astragali Radix and Isatidis Radix were taken as the research objects. Firstly, the original microscopic images of the ethanol precipitation flocs were binarized by Ostu algorithm. Secondly, the influence of sampling volume, dilution multiple, image magnification ratio and number of image acquisition sites on fractal dimension was investigated using perimeter-area method. **Result:** The ethanol precipitation flocs of Astragali Radix and Isatidis Radix had fractal characteristics. At the same time, the stable and reliable fractal dimension of the flocs could be obtained when the sampling volume was 600-800 μL , the sample was diluted to 5-20 times, the microscopic image was enlarged to 200 times or 400 times, and four different image acquisition sites were selected. **Conclusion:** The established method is stable and feasible, which can provide reference for the fractal theory of ethanol precipitation flocs of root medicinal herbs.

[Key words] fractal dimension; ethanol precipitation; flocs; Astragali Radix; Isatidis Radix; microscopic images; granules

[收稿日期] 20190121(015)

[基金项目] 国家药典委员会研究课题(ZG2018-7-02);江西省教育厅科技研究项目(GJJ170706)

[第一作者] 邵峰,博士,副教授,从事中药制剂与质量评价研究,Tel:0791-87118658,E-mail:shaofeng0729@163.com

[通信作者] *杨明,博士,教授,从事中药制剂研究,Tel:0791-87118118,E-mail:yangming16@126.com

分形理论(fractal theory)由哈佛大学数学系教授 Benoit B. Mandelbrot 于 1975 年首次提出,用于描述自然界中不规则、复杂事物的规律,研究非线性领域中的问题,揭示局部和整体之间本质的内在关联性^[1]。目前,分形理论较好地解决了高浓度悬浊液絮体结构表征^[2]、淤泥压缩脱水^[3-4]及黏性细颗粒泥沙絮凝沉降^[5]等水环境治理问题。近年来,该理论用于絮凝剂处理老鹳草水提液悬浮物研究,取得了良好的效果^[6]。分形维数(D_f)是反映具有分形特征物体形态密实程度的重要评价指标,也是开展分形理论研究的核心内容之一。然而,通常中药絮体在原液有限空间范围内高度密集,使得絮体 D_f 难以准确测定。本实验针对上述问题开展系统研究。

水提醇沉法是中药制剂生产过程中常用的精制除杂方法之一,具有操作步骤简单、设备成本相对低廉等优势,尚不能完全被膜分离^[7]、絮凝^[8]、大孔树脂^[9]及高速离心^[10]等纯化技术所取代。但在醇沉过程中,存在有效成分包裹损失严重、浸膏质量不稳定及醇沉过程操作周期长等问题^[11]。运用分形理论,通过建立醇沉絮体 D_f 测定方法,进而开展醇沉絮体形态调控研究,为解决上述问题提供了新思路。本课题组前期调研发现,在 2015 年版《中国药典》(一部)所载制剂的制法项中,涉及到醇沉工艺的中药材有 274 种,其中根类药材约占 37.8%。基于此,本实验选择黄芪、板蓝根为研究对象,拟进行醇沉絮体分形特征研究,重点考察沉淀絮体取样体积、稀释倍数、图像放大倍数及图像采集位点对 D_f 的影响,建立 D_f 测定方法,为黄芪颗粒、板蓝根颗粒醇沉过程控制研究奠定坚实基础,同时也为根类药材醇沉絮体分形理论研究提供参考。

1 材料

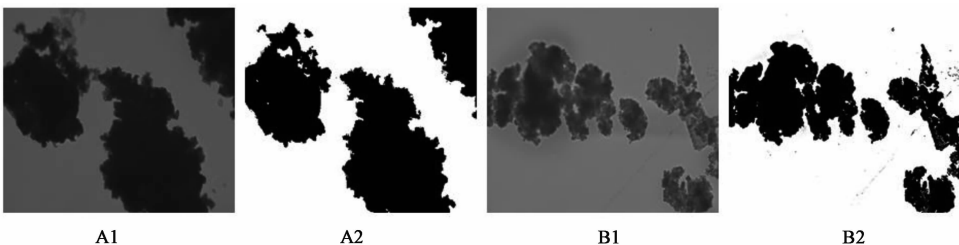
DM2500 型荧光相差显微镜(德国 Leica 微系统有限公司),BT124S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],BT100S 型蠕动泵(保定雷弗流体科技有限公司),JJ-3 型恒温电动搅拌器(常州

国华电器有限公司)。黄芪饮片购自樟树市庆仁中药饮片有限公司、板蓝根饮片购自江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学邓可众教授鉴定,分别为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根和十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* 的干燥根,各饮片凭证(批号分别为 HQ20180301, BLG20180301)标本储存于江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室 B 座 501 室。乙醇为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 样品制备 参考 2015 年版《中国药典》(一部)中黄芪颗粒的制法^[12]。精确称取适量黄芪药材,按料液比 1:8 加水回流提取 2 次,提取时间分别为 3, 2 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩得相对密度为 $1.21 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) 黄芪浓缩液, 备用。参考 2015 年版《中国药典》(一部)中板蓝根颗粒的制法^[12]。精确称取适量板蓝根药材, 按料液比 1:8 加水回流提取 2 次, 提取时间分别为 2, 1 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩得相对密度为 $1.20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($50 \text{ }^\circ\text{C}$) 的板蓝根浓缩液, 备用。上述各药材浓缩液分别在搅拌速度 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下按照一定醇料体积比(黄芪浓缩液、板蓝根浓缩液与 90% 乙醇的体积比分别为 3.5:1, 2:1)加入 90% 乙醇, 加醇的体积流量 $15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下连续搅拌 10 min, 待加醇结束后, 继续搅拌 5 min, 于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置 24 h, 得到待测样品醇沉絮体。

2.2 分形维数(D_f)计算 通过调整移液器(规格 1 mL)取样吸头内径至 5 mm, 吸取待测样品醇沉絮体, 将其置于培养皿内, 获取醇沉絮体显微原始图像。利用 Matlab R2016a 软件, 通过大津算法对原始图像进行二值化处理, 获取显微二值图, 计算 D_f , 见图 1。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件, 通过小岛法^[13]建立醇沉絮体投影面积(A)与周长(P)之间的函数关系, 即 $\ln A = D_f \times \ln P + \ln K$, 式中 K 为常数, 计算醇沉絮体的 D_f 。



A. 黄芪; B. 板蓝根(图 2, 5 同); 1. 原始图; 2. 二值图
图 1 根类药材醇沉絮体的显微原始图像二值化处理

Fig. 1 Binarization of microscopic original images of ethanol-precipitated flocs of two root medicinal herbs

2.3 醇沉絮体取样体积对 D_f 的影响 分别从沉淀物中部吸取醇沉絮体 200, 400, 600, 800, 1 000 μL , 置于培养皿内, 经醇沉上清液稀释 10 倍后, 获取醇沉絮体显微原始图像, 经图像二值化处理, 计算 D_f 。

2.4 醇沉絮体稀释倍数对 D_f 的影响 吸取若干等量醇沉絮体, 分别置于不同培养皿内, 经醇沉上清液稀释 5, 10, 20, 30, 40 倍后, 获取醇沉絮体显微原始图像, 经图像二值化处理, 计算 D_f 。

2.5 显微镜放大倍数对 D_f 的影响 根据显微镜可能设置的放大倍数, 分别选取放大 50, 100, 200, 400 倍, 以同一个观察位点为中心逐步放大, 分别获取醇沉絮体显微原始图像, 经图像二值化处理, 计算 D_f 。

2.6 显微图像采集位点数对 D_f 的影响 在培养皿显微视野范围内, 选取不同观察位点时, 按照由上至下, 由左至右依次采集若干不同观察位点的醇沉絮体显微原始图像, 经图像二值化处理, 计算 D_f 。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用方差分析和组间 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 图像 D_f 的计算 分别测量黄芪与板蓝根醇沉絮体对应 A 与 P , 对所得数据的自然对数进行拟合, 得这 2 个醇沉絮体的线性回归方程分别为 $\ln A = 1.704 6 \ln P - 0.882 7$ ($R^2 = 0.990 0$), $\ln A = 1.568 2 \ln P - 0.654 5$ ($R^2 = 0.971 3$), 说明 $\ln A$ 与 $\ln P$ 之间线性关系良好, 故确定上述药材的醇沉絮体具有分形特征, 见图 2。

3.2 醇沉絮体取样体积对 D_f 的影响 板蓝根醇沉絮体取样体积为 200 ~ 800 μL 时, D_f 变化幅度较小; 但在 800 ~ 1 000 μL 时, D_f 随着取样体积的增大而减小。黄芪醇沉絮体取样体积分别为 200 ~ 600 μL 和 800 ~ 1 000 μL 时, D_f 均随着取样体积的增大而减小; 但在 600 ~ 800 μL 时 D_f 变化幅度较小。因此, 为得到稳定的 D_f , 将这 2 种药材醇沉絮体取样体积确定在 600 ~ 800 μL , 见图 3。

3.3 醇沉絮体稀释倍数对 D_f 的影响 在显微观察过程中, 醇沉絮体局部堆积与挤压往往会造成絮体原形态发生改变, 使得其 D_f 难以准确测定。因此, 为确保得到稳定可靠的 D_f , 对醇沉絮体加以适当稀释与分散就成为了一项必要工作内容。当黄芪醇沉絮体稀释倍数为 5 ~ 40 倍时, 其 D_f 变化幅度较小。板蓝根醇沉絮体稀释倍数为 5 ~ 20 倍时, 其 D_f 变化幅度较小; 但在 20 ~ 40 倍时, D_f 均随着稀释倍数的

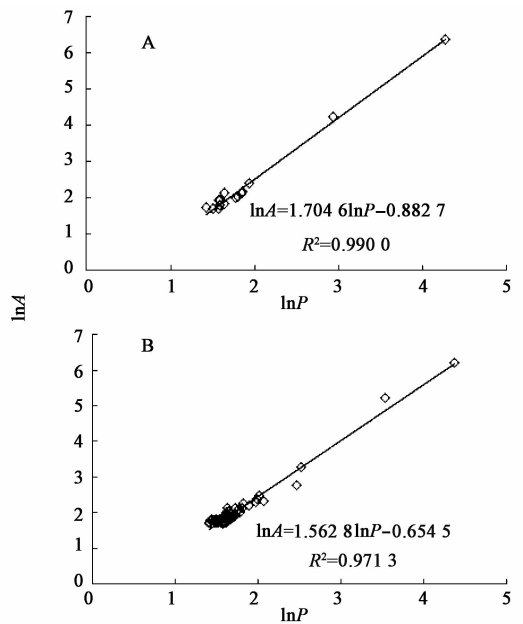


图 2 不同醇沉絮体的面积与周长拟合曲线
Fig. 2 Fitting curves between area and perimeter of ethanol-precipitated flocs

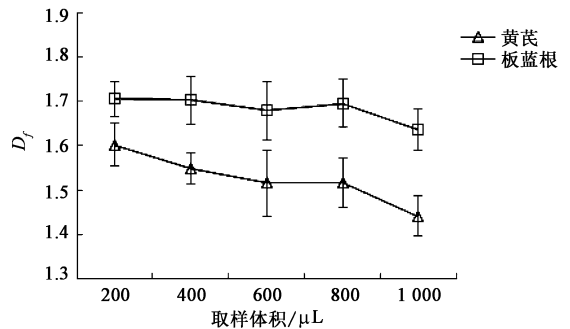


图 3 取样体积对不同醇沉絮体 D_f 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 3 Effect of sampling volume on D_f of ethanol-precipitated flocs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

增大而减小。因此, 在确保各药材醇沉絮体得到适当分散的同时, 尽可能降低稀释倍数对 D_f 的影响, 最终将这 2 种药材醇沉絮体稀释倍数确定为 5 ~ 20 倍, 见图 4。

3.4 显微镜放大倍数对 D_f 的影响 现代研究表明, 显微观察放大倍数对于采集絮体微观形态及 D_f 测定有重要影响^[14]。显微镜放大倍数设置不当, 会使醇沉絮体在显微镜视野中呈现出絮团形态整体过于细小或大絮团的局部。同一药材醇沉絮体分别经显微镜放大 200 倍与 400 倍后, 所测得的 D_f 之间无显著性差异, 且其形态大小较为相似。因此, 将板蓝根与黄芪的醇沉絮体显微观察放大倍数确定为 200 倍或 400 倍, 见图 5, 6。

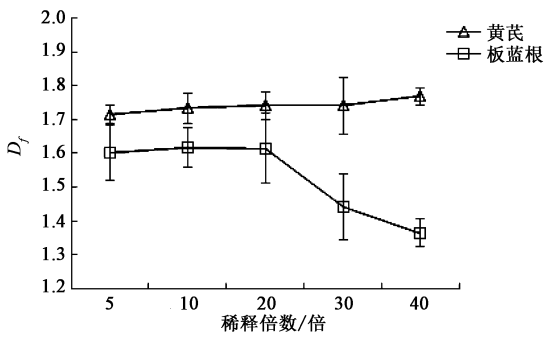
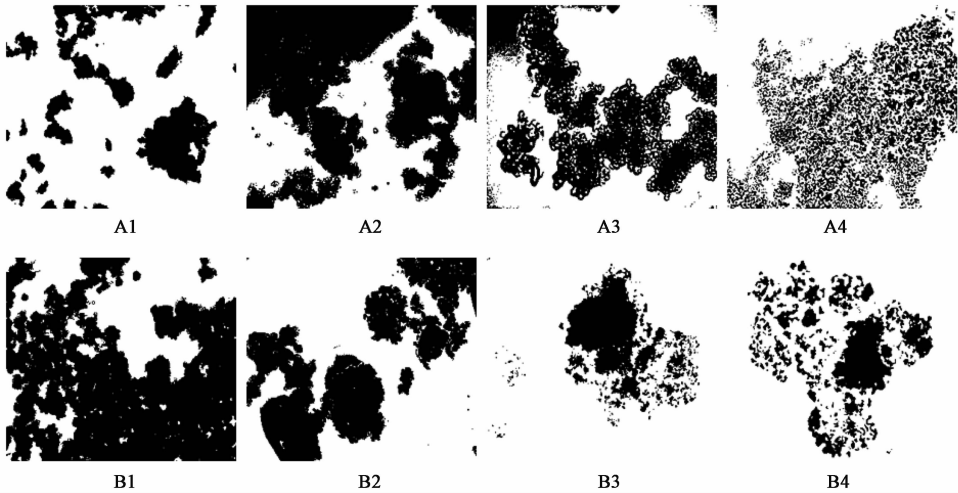


图 4 稀释倍数对不同醇沉絮体 D_f 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 4 Effect of dilution multiple on D_f of ethanol-precipitated flocs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.5 显微图像采集位点数对 D_f 的影响 在醇沉絮体显微图像中,选取多个位点进行图像分析,可提高醇沉絮体 D_f 测定的准确性。当黄芪醇沉絮体与板蓝根醇沉絮体的显微图像采集位点数为 2 ~ 12 时, D_f 变化幅度较小。因此,为提高工作效率,建议将这 2 种药材醇沉絮体显微图像采集位点数确定为 4 个,见图 7。

4 讨论

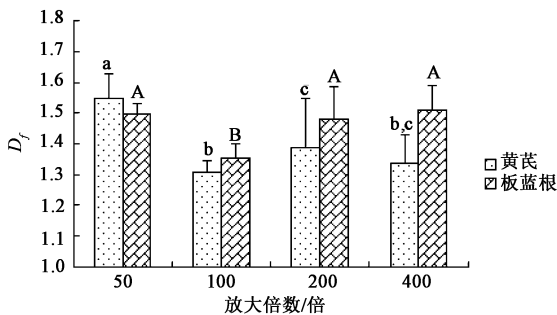
醇沉杂质受自身化学成分性质与外界作用力(布朗运动、差速沉降及水流剪切等作用力)多重因素的影响,整体呈现出复杂、非线性及不规则的絮体



1. $\times 50$; 2. $\times 100$; 3. $\times 200$; 4. $\times 400$

图 5 不同药材醇沉絮体显微放大后图像的二值化处理

Fig. 5 Binarization processing for microscopic magnification images of ethanol-precipitated flocs of root medicinal herbs



相同字母代表组间无显著性差异,反之代表具有显著性差异

图 6 显微镜放大倍数对不同醇沉絮体 D_f 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Effect of microscopic magnification on D_f of ethanol-precipitated flocs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

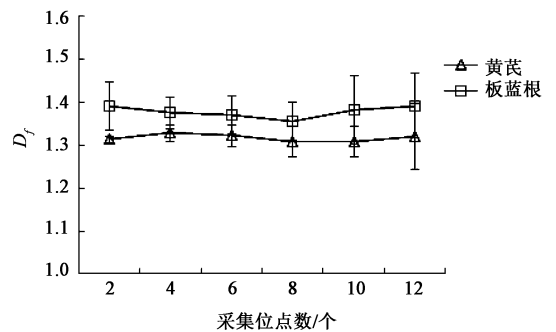


图 7 显微图像采集位点数对不同醇沉絮体 D_f 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Effect of microscopic acquisition sites on D_f of ethanol-precipitated flocs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

形态。醇沉絮体形态的稳定与其所处的环境(含特定体积分数乙醇)密不可分。因此,本实验选用显微成像技术,使醇沉絮体始终处于在原液环境中,观察其原始形态。

本实验是在以往研究结果基础上的深入探

讨^[15],通过考察醇沉絮体取样体积、样品稀释倍数、显微观察放大倍数等因素对黄芪、板蓝根 2 种根类药材醇沉絮体 D_f 的影响,优化得到醇沉絮体取样体积 600 ~ 800 μL ,絮体稀释 5 ~ 20 倍,显微镜放大 200 倍或 400 倍,选取 4 个不同显微图像采集位点

等操作参数,从而实现准确测定其醇沉絮体的 D_f 。同时,还应注意,絮体粒径过小或过大均会增加计算机对絮体外形轮廓线测量的难度,造成测量误差^[6]。本实验首次将分形理论引入醇沉絮体形态学研究,建立了一种对其形态密实程度可量化的评价方法,为后续开展基于分形理论的根类药材醇沉工艺过程研究打下了坚实基础,并为有效解决醇沉工艺所存在的问题提供了新思路和新方法。

[参考文献]

[1] 孙霞,吴自勤,黄昀. 分形理论及其应用[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2003:185-191.

[2] 李冬梅,金伟如,王和平,等. 高浓度悬浊液絮体分形结构的发展变化研究[J]. 环境科学研究,2005,18(3):39-42.

[3] 柴朝晖,杨国录,陈萌. 淤泥絮体孔隙分形特性的提出、验证及应用[J]. 武汉大学学报:工学版,2011,44(5):608-612.

[4] 谢敏,李好,刘小波,等. 微波调质对剩余污泥结构及其脱水性能的影响[J]. 环境工程学报,2016,10(8):4457-4461.

[5] 范杨臻,杨国录,陆晶,等. 电离作用下黏性细颗粒泥沙絮凝沉降数值模拟[J]. 华中科技大学学报:自然科学版,2015,43(2):103-108.

[6] 张建伟,王彦力,冯颖. 壳聚糖盐酸盐对老鹳草水提液絮凝效果及微观特性的影响[J]. 高校化学工程学

报,2015,29(5):1082-1088.

[7] 唐进法,张辉,张娜娜,等. 膜分离法和醇沉法对清消口服液的纯化效果比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):28-30.

[8] 楚笑辉,唐路梅,夏新华. 壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):1-4.

[9] 许浮萍,梁志家,田娟娟. 应用膜分离结合醇沉法纯化大豆异黄酮[J]. 食品科学,2009,30(16):78-82.

[10] 陈玉兴,黄雪君,曾晓会,等. 逍遥散离心工艺制剂与醇沉工艺制剂和标准煎剂疏肝健脾作用对比研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1860-1861.

[11] 石猛,莫尚志,周文政. 醇沉法存在的问题及解决办法[J]. 中药材,1999,22(6):313-314.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1033,1471.

[13] 任鹏飞,南军,郑凯. 机械破碎强度对絮体破碎再絮凝过程的影响[J]. 中国给水排水,2016,32(17):56-60.

[14] 唐朝生,施斌,王宝军. 基于 SEM 土体微观结构研究中的影响因素分析[J]. 岩土工程学报,2008,30(4):560-565.

[15] 金鹏康,张瑶瑶,冯永宁,等. 腐殖酸絮凝体形成过程中初期搅拌条件对其形态结构的影响[J]. 环境科学学报,2013,33(6):1553-1560.

[责任编辑 刘德文]