

中心组合设计-响应面法优化新大黄牡丹汤提取工艺

赵磊, 张启立, 汪洁, 夏琦, 夏鹏飞, 张延英*

(甘肃中医药大学, 甘肃省高校中[藏]药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室, 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的 优选新大黄牡丹汤(大黄、丹皮、桃仁等)的提取工艺。方法 在单因素、析因设计、最速上升试验的基础上,以浸膏得率与总蒽醌得率的权重和为响应值,采用中心组合设计-响应面法优选新大黄牡丹汤提取工艺。结果 最佳条件为回流提取 60 min,提取溶剂为 40% 乙醇,料液比为 1:40。结论 该方法准确有效,简便可行,预测性良好。

关键词: 新大黄牡丹汤; 提取工艺; 中心复合设计-响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)06-1265-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.013

Optimizing the extraction of modified Dahuang Mudan Decoction by central composite design-response surface method

ZHAO Lei, ZHANG Qi-li, WANG Jie, XIA Qi, XIA Peng-fei, ZHANG Yan-ying*

(Gansu University of Chinese Medicine, Gansu Provincial Key College Laboratory for Chemistry and Quality of Traditional Chinese Medicines, Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000, China)

KEY WORDS: modified Dahuang Mudan Decoction; extraction; central composite design-response surface method

大黄牡丹汤载于《金匱要略·疮痈肠痈浸淫病脉证并治》篇,由大黄、丹皮、桃仁、冬瓜仁、芒硝等5味药物组成^[1-3],具有泻热破瘀,散结消肿的功效,传统用于湿热蕴结、气血凝滞所致肠痈等症,为泻下、清利、破瘀为一体的有效方剂。通过对复方药味随症加减,可以加强、削弱或改变全方作用,更加适合病情的需要^[4]。现代医家在大黄牡丹汤原方的基础上,加入黄柏、黄芪和丹参3味药组成新大黄牡丹汤,增强了原方清热解毒,活血化瘀的功效,新增补气固表、托毒排脓、养血安神之功,更加有利于患者的术后恢复^[5-6],因其良好的效果在我校附属医院临床得到了广泛使用。为了更好地开发利用大黄牡丹汤,本实验选择浸膏得率与总蒽醌得率的“权重和”为响应值,在单因素考察的基础上,结合析因设计与最速上升试验,采用中心组合设计-响应面法优化新大黄牡丹汤的提取工艺,旨在

为其进一步合理研究及开发利用奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津公司); KH-500DE 数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); BT125D 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); HH-S28s 数显恒温水浴锅(金坛市大地自动化仪器厂)。

1.2 试剂 1,8-二羟基蒽醌(批号 0829-9702,纯度 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院。水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 浸膏得率的测定方法 精密称定新大黄牡丹汤组方药物,精密加入一定体积分数的乙醇,称定质量,回流提取,放至室温,提取溶剂补足缺失的质量,摇匀,精密量取续滤液 100 mL,置于已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105℃干燥 3 h,

收稿日期: 2015-09-01

基金项目: 甘肃省技术研究与开发专项(1305TCYA043); 甘肃省中医药管理局科研项目(GZK-2014-77); 兰州市科技局科研项目(2013-3-45)

作者简介: 赵磊(1967—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药有效成分与质量标准。Tel: (0931) 8762539, E-mail: zzyhx@gszy.edu.cn

* 通信作者: 张延英(1964—),男,硕士,副教授,研究方向为实验动物学。E-mail: zq17751990@126.com

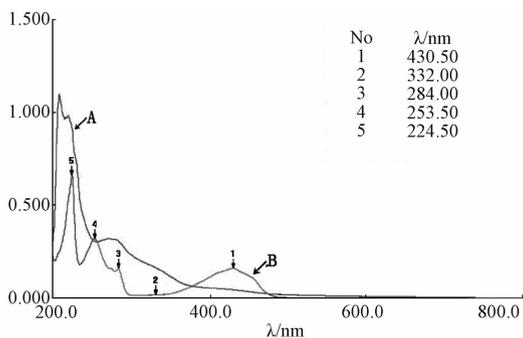
置于干燥器中冷却至室温，精密称定质量，以此计算浸膏得率，并作为测定总蒽醌得率的原料。

2.2 总蒽醌得率的测定方法^[7-9]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的1,8-二羟基蒽醌对照品，加95%乙醇制成每1 mL含1,8-二羟基蒽醌0.0172 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取复方药物，精密加入一定体积分数的乙醇，回流提取60 min，放至室温，补足质量，抽滤，滤液浓缩至干，计算浸膏得率。从中精密称取一定量浸膏粉末，加入95%乙醇溶液3 mL，超声处理20 min，滤过，残渣再加95%乙醇3 mL溶液，超声处理20 min，滤过，合并两次滤液，摇匀。精密量取1.5 mL，置于10 mL量瓶中，95%乙醇定容至刻度，摇匀，即得。

2.2.3 检测波长的确定 取供试品与对照品溶液各约4 mL，以95%乙醇为空白对照，在紫外分光光度计上于200~800 nm波长范围内扫描。结果表明，1,8-二羟基蒽醌的最大吸收波长为224.5 nm，而供试品为219.5 nm，均在(222±3) nm范围内，而且周围无干扰峰，故实验选择224 nm作为检测波长，结果见图1。



A. 供试品 B. 对照品

A. test sample B. reference substance

图1 紫外光谱图

Fig. 1 Ultraviolet spectrum

2.2.4 标准曲线的建立 精密量取上述对照品溶液0.9、1.2、1.4、1.5、1.8、2.1 mL，分别置于10 mL量瓶中，95%乙醇定容至刻度，摇匀。以95%乙醇为空白对照，于224 nm波长处测定其吸光度，以质量浓度为横坐标(X)，吸光度为纵坐标(Y)绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 15.883X + 0.0853$ ， $r = 0.997$ ，表明对照品在15.48~36.12 μg/mL范围内线性关系良好。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取对照品溶液1 mL，置于10 mL量瓶中，加95%乙醇至刻度，摇匀，在224 nm波长下连续测定6次，测得吸光度RSD为0.65%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 吸取供试品溶液4 mL，分别于0、2、4、6、8、10、12 h，在224 nm波长下测定吸光度，测得吸光度RSD为0.89%，表明样品在12 h内稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批复方药物6份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，计算浸膏、总蒽醌得率以及权重和，测得RSD为1.83%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 加样回收试验 精密称取总蒽醌含有量已知的浸膏粉末9份，每份0.0064 g，精密加入1,8-二羟基蒽醌对照品(相当于浸膏粉末中总蒽醌含有量的80%、100%、120%)，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在224 nm波长下测定吸光度，计算加样回收率。结果，平均回收率为100.06%，RSD为0.9867% (n=9)，符合相关要求。

2.4 大黄牡丹汤新组方提取工艺的优化

2.4.1 单因素试验 筛选乙醇体积分数、提取时间及料液比等因素的水平范围，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别考察乙醇体积分数(30%、40%、50%、60%、70%)、提取时间(30、45、60、75 min)及料液比(1:10、1:20、1:30、1:40)对浸膏及总蒽醌得率权重和(权重和=浸膏得率×60%+总蒽醌得率×40%，下同)的影响，结果见图2。

由图可知，当乙醇体积分数为30%时，浸膏得率较低，权重和较小，故选择在40%~60%之间。在30~50 min提取时间内，两者得率随时间延长而增加，而50 min与60 min时对结果影响较小，为全面考察提取时间对其的影响，故选择在30~60 min。料液比1:10与1:40对两者得率影响较大，故选择1:20~1:30作为考察区间。综合考虑，得出各因素水平范围为乙醇体积分数40%~60%，提取时间30~60 min，料液比1:20~1:30。

2.4.2 二级全析因设计^[10] 析因设计可以有效控制或消除其他混杂因素对反应变量的干扰，分析更准确，能同时研究几个因素之间的交互作用，使分析结果更可靠和稳定，为选择最优处理组合提供科学依据。以浸膏得率为考察指标，筛选对复方药物提取率有显著影响的因素，试验安排及结果见表1及表2。由表2可知，乙醇体积分数与料液比，对

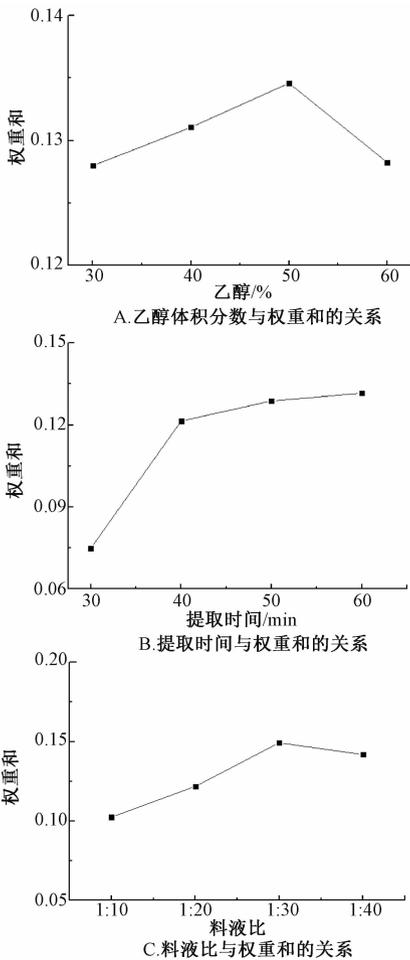


图2 单因素试验结果

Fig. 2 Results of single factor tests

浸膏得率有显著性影响 ($P < 0.05$), 而提取时间为非显著性影响因素 ($P > 0.05$), 故将提取时间确定为 60 min, 对乙醇体积分数与料液比两个因素进行优化。

表1 析因设计及结果

Tab. 1 Factorial design and results

序号	乙醇/%	提取时间/min	料液比	平均浸膏得率/%
1	40	30	1:20	14.52
2	40	60	1:20	15.60
3	60	30	1:20	15.81
4	60	60	1:20	17.62
5	40	30	1:30	16.17
6	40	60	1:30	18.28
7	60	30	1:30	20.39
8	60	60	1:30	21.61

2.4.3 最速上升试验^[11-13] 最速上升试验是沿着最速上升路径及响应有最大增量的方向逐步移动的方法。根据析因设计结果, 选择乙醇体积分数(A)与料液比(B)试验, 以浸膏与总蒽醌得率的权重和为评价指标, 确定两者的基本步长分别为

表2 方差分析

Tab. 2 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
校正模型	0.019	3	0.006	20.718	0.007
截距	1.174	1	1.174	3770.418	0.000
乙醇体积分数	0.007	1	0.007	22.642	0.009
提取时间	0.002	1	0.002	7.483	0.052
料液比	0.010	1	0.010	32.028	0.005
误差	0.001	4	0.000		
总计	1.194	8			
校正总计	0.021	7			

5%与1:5, 试验设计和结果见表3。由表可知, 权重和最高值在第3组(浸膏得率29.21%, 总蒽醌得率1.1781%), 故将其作为响应面试验的中心实验点。

表3 最速上升设计及结果

Tab. 3 Steepest ascent design and results

序号	A 乙醇/%	B 料液比	浸膏得率/%	总蒽醌得率/%	权重和
1	40	1:20	20.17	0.8138	0.5904
2	45	1:25	22.48	1.0544	0.7170
3	50	1:30	29.21	1.1781	0.8548
4	55	1:35	27.79	0.5927	0.6020
5	60	1:40	22.89	0.4941	0.4982

2.4.4 中心组合设计-响应面法设计及结果 根据最速上升试验确定的响应面实验中心点, 以浸膏与总蒽醌得率的权重和为评价指标进行设计, Design Expert 8.0 软件对结果进行分析处理, 因素和水平见表4, 设计和结果见表5。

表4 因素和水平

Tab. 4 Factors and levels

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
A 乙醇/%	35.85	40	50	60	64.14
B 料液比	15.86	20	30	40	44.14

表5 设计和结果

Tab. 5 Design and results

序号	A 乙醇/%	B 料液比	浸膏得率/%	总蒽醌得率/%	权重和
1	40	1:20	0.1560	0.82	0.0970
2	60	1:20	0.1762	1.37	0.1400
3	40	1:40	0.3743	1.31	0.2300
4	60	1:40	0.2289	0.60	0.1400
5	35.86	1:30	0.2809	1.28	0.1740
6	64.14	1:30	0.2675	1.20	0.1650
7	50	1:15.86	0.2237	1.43	0.1400
8	50	1:44.14	0.3437	1.11	0.2107
9	50	1:30	0.2943	1.07	0.1809
10	50	1:30	0.2843	1.06	0.1812
11	50	1:30	0.2833	1.09	0.1809
12	50	1:30	0.2843	1.04	0.1810
13	50	1:30	0.2837	1.07	0.1809

利用 Design Expert 软件, 对表 5 数据进行多元二次回归拟合, 得回归方程 $Y = 0.17 - 7.466 \times 10^{-3}A + 0.029B - 0.033AB$, ($r = 0.9149$, $P < 0.0001$)。

根据确立的多项式模型, 绘制乙醇体积分数和料液比对综合评分的二维等高线图和三维效应曲面图, 并优选两个因素的最佳取值范围, 结果见图 3。

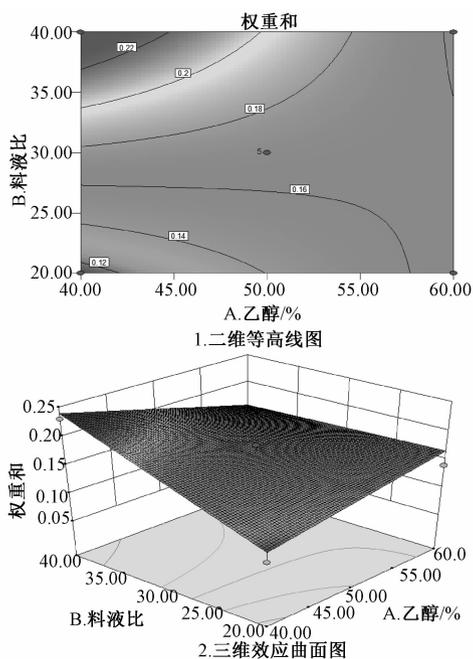


图 3 等高线图和效应曲面图

Fig. 3 Contour map and response surface graph

由图可知, 最佳提取条件为回流提取, 提取时间 60 min, 提取溶剂 40% 乙醇, 料液比 1 : 40。然后进行验证实验, 平行 3 次, 浸膏与总蒽醌平均得率分别为 37.43% 和 1.31%, 权重和为 0.23, 预测值为 0.2392, RSD 为 2.77%, 表明模型预测性良好, 提取条件重复性理想。

3 讨论

新大黄牡丹汤方中, 大黄具有泻热逐瘀, 荡涤肠中热毒瘀滞的功效, 为原方君药^[14]。药理学研究表明, 大黄中的蒽醌类成分具有抗肿瘤、抗衰老、增加消化及免疫功能等作用^[15], 是主要药效物质。浸膏得率能够较为综合地反映提取工艺的优劣, 故本实验选择物理指标 (浸膏得率) 和化学指标 (总蒽醌得率) 的权重和作为评价指标, 首先通过单因素试验筛选乙醇体积分数、提取时间及料液比 3 个因素的水平范围, 再采用析因设计确定显著性因素为乙醇体积分数与料液比, 接着通过最速上升试验确定两者合适的取值, 最后以此为中心

实验点, 中心组合设计-响应面法优化这两个参数, 得到最佳提取条件为回流提取, 提取时间 60 min, 提取溶剂 40% 乙醇, 料液比 1 : 40。

在提取工艺优化过程中, 中心组合设计-响应面法能够克服正交设计、均匀设计预测性较差、精确度不高的缺点, 通过非线性模型拟合来预测最佳实验条件, 使得工艺得到最大程度的优化。本实验采用中心组合设计对新大黄牡丹汤的提取工艺进行优化, 发现预测值与实测值相对偏差较小, 可为其开发利用奠定实验基础。

参考文献:

[1] 张保国, 刘庆芳. 大黄牡丹汤现代药效学研究与应用[J]. 中国药杂志, 2009, 44(21): 1601-1604.

[2] 苗大兴, 肖天保, 梁宛伶. 大黄牡丹汤含药血清对巨噬细胞释放炎症因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 843-845.

[3] 郑冬生, 王丽红, 邓向亮, 等. 大黄牡丹汤提取液对结肠炎小鼠的治疗及作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(3): 226-230.

[4] 李家铎, 谢洪. 中药复方加减变化对全方作用的影响[J]. 中成药, 1991, 13(1): 44-45.

[5] 邓芳芳, 曹森, 张文兴. 大黄牡丹汤恢复急性阑尾炎术后肠功能的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(2): 124-127.

[6] 杨军, 张刚领, 杨朔, 等. 大黄牡丹汤加味联合西医疗法治疗急性阑尾炎 108 例效果观察[J]. 当代医学, 2011, 17(35): 145-146.

[7] 周红燕, 陈建伟. 紫外分光光度法测定炒决明子中总蒽醌含量[J]. 天津中医药, 2007, 24(2): 156-158.

[8] 金乾兴, 戴晓燕, 吴巧凤. 直接紫外分光光度法测定不同产地大黄中总蒽醌含量[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(3): 235-236.

[9] 汪洁, 李宁, 夏鹏飞, 等. 中心复合设计-效应面法优化大黄渗漉提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2301-2307.

[10] Zeraik M L, Yariwake J H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD[J]. *Microchem J*, 2010, 96(1): 86-91.

[11] 杨洪涛, 赵勇山, 来琳琳, 等. 响应面法优化金霉素发酵培养基[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(6): 434-469.

[12] 彭哲, 张嗣良. 中心组合设计优化东方拟无枝酸菌发酵生产万古霉素的微量金属离子[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(4): 65-69.

[13] 王仙, 王祥军, 曹连蕾, 等. 大麦籽粒总黄酮超声辅助提取工艺的优化[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2010, 28(2): 152-157.

[14] 崔国有, 王丽莎, 邓旭明, 等. 中药复方大黄牡丹汤的化学成分研究[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(6): 717-719.

[15] 郑言博, 马卓. 蒽醌类化合物抗菌与抗肿瘤活性的研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(2): 74-76.