

星点设计-效应面法优选牡丹皮中丹皮酚提取工艺

孙世光^{1,2}, 郝淑娟¹, 陈丽静², 孙蓉³ (1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学第二附属医院/山东省中西医结合医院, 济南 250001; 3. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

摘要: 目的 利用星点设计-效应面法优选牡丹皮中丹皮酚的最佳提取工艺。方法 采用水蒸气蒸馏法提取牡丹皮中丹皮酚, 采用星点设计-效应面法优选提取工艺, 以液固比(X_1)、液馏比(X_2)、钠盐率(X_3)为自变量, 以收率(Y)为因变量, 分别进行多元线性方程回归和二次多项式方程拟合, 优选最佳提取工艺并进行验证。结果 二次多项式方程拟合度较高, 预测性好($r^2=0.9873$, $AIC=46.12$, $P<0.05$); 星点设计-效应面法优选丹皮酚最佳(最节约)提取工艺条件是 $X_1=17.97(12.03)$, $X_2=4.42(6.49)$, $X_3=7.97(2.03)$, 工艺验证试验结果与二次多项式拟合方程预测值偏差较小。结论 星点设计-效应面法可用于优选牡丹皮中丹皮酚提取工艺, 建立的数学模型预测性较好, 优选出的最佳(最节约)提取工艺可供实验室及工业生产参考。

关键词: 丹皮酚; 牡丹皮; 提取工艺; 效应面法; 星点设计

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0920-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.004

Optimization of Extraction Process of Paeonol from Moutan Cortex by Central Composite Design-Response Surface Methodology

SUN Shiguang^{1,2}, HAO Shujuan¹, CHEN Lijing², SUN Rong³ (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine/Shandong Hospital of Integrated Medicine, Jinan 250001, China; 3. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction process of paeonol from Moutan Cortex by central composite design-response surface methodology. **METHODS** Paeonol was optimized by central composite design and response surface methodology, which was prepared from Moutan Cortex by steam distillation method. With the ratio of the volume of solvent to the mass of the herb(X_1), the ratio of the volume of solvent to the volume of distillate(X_2) and the mass fraction of sodium chloride into the distillate(X_3) as the independent variables and the yield(Y) as the dependent variable, the binomial and linear equations were fitted to the data, and the resulting equation was used to produce three-dimensional response surface graphs, through which the optimal formulation was predicted, and the best prescription process was verified. **RESULTS** It showed that the correlation coefficient of second-order quadratic model was higher and the prediction was better($r^2=0.9873$, $AIC=46.12$) than those of linear regression equation. The optimum(the most economical) process for the extraction of paeonol from Moutan Cortex was as follows: $X_1=17.97(12.03)$, $X_2=4.42(6.49)$, $X_3=7.97(2.03)$. The deviation between the result of the best craft verification test and the binomial fitting equation forecast value was acceptable. **CONCLUSION** Central composite design-response surface methodology is successfully used to optimize the extraction process of paeonol from Moutan Cortex, and the optimized process is reliable for laboratory and industrial production.

KEY WORDS: paeonol; Moutan Cortex; extraction process; response surface methodology; central composite design

牡丹皮是毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 具有清热凉血、活血化淤、退虚热的功效, 临床多用于心脑血管、肿瘤、炎症、变态反应及免疫系统等疾病^[1]。丹皮酚是一种小分子苯酚类化合物(2-羟基-4-甲氧基苯乙酮), 是牡丹皮主要有效成分, 呈白色针状结晶, 具有挥发性, 易溶于热水而不溶于冷水, 可采用水蒸气蒸馏法、醇提法、超临界萃取法等多种提取工艺, 其中以

水蒸气蒸馏法最为经济适用^[2]。星点设计-效应面法也是近几年来国内外药学工作者常用的集数学和统计方法于一体的试验设计方法, 通过描绘考察指标对考察因素的效应面, 从效应面上选择较佳的效应区, 从而回推出自变量取值范围, 即得最佳实验条件的优化法, 具有精度高、预测性好、简便等优点^[3-4]。本研究采用星点设计-效应面法对牡丹皮中丹皮酚水蒸气蒸馏法提取工艺进行了优

基金项目: 国家自然科学基金项目(81302887); 山东省科技发展计划项目(2014GSF119034); 山东省中医药科技发展计划项目(2011-107, 2013-103)

作者简介: 孙世光, 男, 博士生 Tel: (0531)82436123 E-mail: S.G.SUN@hotmail.com

化和研究。

1 仪器与试剂

牡丹皮由山东中医药大学第二附属医院药学部中药房提供,经中药房主管中药师鹿岩鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Ardr.干燥根皮;水为蒸馏水;氯化钠(天津市广成化学试剂有限公司,批号 20130715);KDM 型调温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司);冷凝管(上海禾汽玻璃仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 丹皮酚的提取工艺

称取适量牡丹皮,加入定量蒸馏水,水蒸气蒸馏,收集定量馏出液,加入定量 NaCl 搅拌溶解,4℃冷藏 24 h,减压抽滤,蒸馏水洗涤 3 次,减压干燥称重,计算丹皮酚类粗提物结晶收率。

2.2 星点设计-效应面法优化提取工艺

2.2.1 单因素分析 根据文献报道,影响牡丹皮中丹皮酚收率的因素有粉碎粒度、浸润时间、溶剂体积、馏出液体积及 NaCl 质量分数^[5-7]。预实验结果提示,溶剂体积、馏出液体积、NaCl 质量分数对丹皮酚收率影响作用明显,而粉碎粒度、浸润时间影响作用次之;且粉碎粒度、浸润时间除了影响丹皮酚收率,更影响提取效率:粉碎粒度越大,浸润时间越长,蒸馏出相同体积馏出液所需时间越长,丹皮酚提取效率相对越低。

2.2.2 星点设计实验 在单因素考察实验的基础上,选择对丹皮酚收率(Y)影响显著的 3 个因素,即液固比(溶剂体积与药材质量比, X_1 : 10~20)、液馏比(溶剂体积与馏出液体积比, X_2 : 3~10)和钠盐率(馏出液 NaCl 质量分数, X_3 : 0%~10%)。根据星点设计原理,每个因素设 5 个水平,分别用代码值 0(中值)、 ± 1 (轴值)、 $\pm \alpha$ (极值)表示;其中,极值 $\alpha=2^{k/4}$,析因设计部分试验次数 $F=2^k$ (k 为因素个数,且 $k \leq 5$)。本实验中 $k=3$, $\alpha=1.682$, $F=8$,星点设计因素水平及试验结果见表 1~2。

表 1 星点设计因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of central composite design

因素	水平				
	-1.68 2	-1	0	+1	+1.68 2
X_1	10	12.027	15	17.973	20
X_2	3	4.419	6.5	8.581	10
X_3	0	2.027	5	7.973	10

表 2 星点设计-效应面法试验设计与结果

Tab. 2 Design and result of central composite design-response surface methodology

编码	X_1	X_2	X_3	Y
1	12.03	4.42	2.03	1.40
2	17.97	4.42	2.03	1.58
3	12.03	8.58	2.03	0.66
4	17.97	8.58	2.03	0.82
5	12.03	4.42	7.97	1.46
6	17.97	4.42	7.97	1.60
7	12.03	8.58	7.97	0.70
8	17.97	8.58	7.97	0.74
9	10.00	6.50	5.00	0.86
10	20.00	6.50	5.00	1.18
11	15.00	3.00	5.00	1.98
12	15.00	10.00	5.00	0.58
13	15.00	6.50	0.00	1.10
14	15.00	6.50	10.00	1.12
15	15.00	6.50	5.00	1.16
16	15.00	6.50	5.00	0.96
17	15.00	6.50	5.00	1.06
18	15.00	6.50	5.00	1.06
19	15.00	6.50	5.00	1.04
20	15.00	6.50	5.00	1.00

2.2.3 模型拟合 根据实验结果,应用 Design Expert 7.0 软件对结果进行多元线性方程回归和二次多项方程拟合。多元线性方程为: $Y=26.062X_1-192.62X_2+1\ 813.6X_3+1\ 955.02$ ($r^2=0.944\ 5$, $AIC=80.59$, $P<0.05$); 二次多项式方程为: $Y=-0.159\ 492X_1^2+1.797\ 0X_2^2+0.200\ 508X_3^2-0.242\ 437X_1X_2-0.226\ 274X_1X_3-0.242\ 437X_2X_3+10.098X_1-37.774X_2+3.146\ 2X_3+186.502$ ($r^2=0.987\ 3$, $AIC=46.12$, $P<0.05$); 故选择二次多项式拟合方程作为最优预测模型。

2.2.4 效应面优化与预测 依据二维等高线和三维效应面,当设定 Y 最大时,即为丹皮酚最佳提取工艺: $X_1=17.97$, $X_2=4.42$, $X_3=7.97$, 此时 $Y=1.622\%$ (归一值为 0.745); 当设定 X_1 最小、 X_2 最大、 X_3 最小及 Y 最大时,即为丹皮酚最节约提取工艺: $X_1=12.03$, $X_2=6.49$, $X_3=2.03$, 而此时 $Y=0.950\%$ (归一值为 0.602)。结果见图 1。

2.2.5 最佳提取工艺验证 考虑到试验的稳定性,将上述不同条件下选出的 2 种最佳提取工艺分别进行 3 批平行验证试验,实测值与预测值偏差较小,处于可以接受范围。结果见表 3。

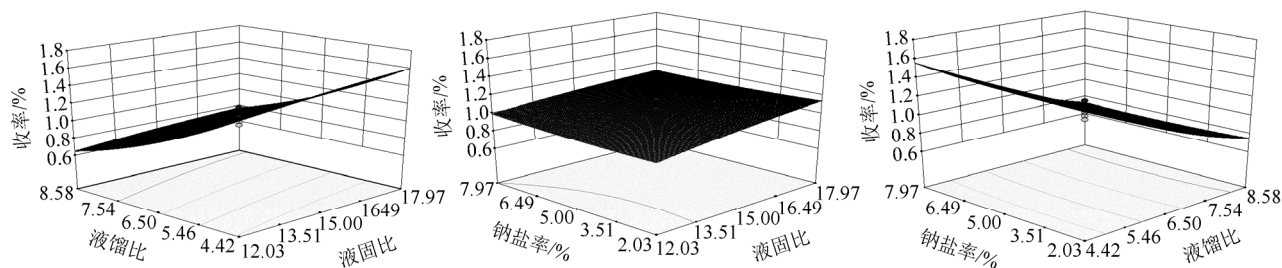


图1 液固比、液馏比、钠盐率对收率影响的二维等高线和三维效应面

Fig. 1 3D-response surface and 2D-contour map of various factor(the ratio of the volume of solvent to the mass of the herb, the ratio of the volume of solvent to the volume of distillate and the mass fraction of sodium chloride into the distillate) effects on inclusion rate

表3 最优二项式方程验证试验($n=3$)

Tab. 3 Predicted and observed responses of the optimization formulation($n=3$)

提取工艺	预测值	实际值	偏差
最佳	1.62	1.56±0.06	4.09%
最节约	0.95	0.93±0.01	1.48%

3 讨论

星点设计-效应面法可通过非线性模型拟合来预测最佳试验条件,可以解决均匀试验设计和正交试验设计优化法的不足,操作简单,既较好地保证了试验精度又可以分析各因素之间的相互作用,同时也相对减少了试验次数^[8-9]。虽然星点设计-效应面法具有精确的预测性,但在应用过程中亦不能缺失专业知识和经验的评判,例如因素和水平选择应结合预试验结果与经验知识,选择范围尽量趋近较优区域以提高模型的优化效果;在最佳工艺的确定上,也应该结合生产过程中的实际情况综合考虑。

中药饮片质量是保证中医药临床疗效及基础研究稳定性的源头因素。尽管国家已经实施中药材生产质量管理规范,并建立以中国药典及各省、市、自治区地方炮制规范为基础的中药饮片质量标准,但鉴于中药饮片生产加工以及后期使用储藏过程等诸多环节,中药饮片质量稳定性问题仍堪忧^[10-11]。已有研究表明,抽检不同厂家、不同批次牡丹皮,其丹皮酚、水分、浸出物及灰分含量不尽一致;不同储藏时间及条件(温、湿度)下牡丹皮中丹皮酚含量亦不尽一致^[12-14]。因此,在进行中药饮片提取工艺研究时,应综合设计和考虑,包括基原、产地、厂家、批次以及饮片大小、粒度和含水量等诸多因素。

本研究依据文献报道,并结合预实验结果,综合权衡最终选取固液比、液馏比、钠盐率 3 个

因素,采用星点设计-效应面法优选牡丹皮中丹皮酚水蒸气蒸馏法的提取工艺;通过二次多项式拟合描绘二维等高线及三维效应面,从而确定最佳提取工艺: $X_1=17.97$, $X_2=4.42$, $X_3=7.97$, 最节约提取工艺: $X_1=12.03$, $X_2=6.49$, $X_3=2.03$; 最优处方工艺验证试验证明所得提取工艺收率较高,重现性较好,达到了优选提取工艺目的,可供实验室及工业生产参考。

REFERENCES

- [1] HU H Y, YANG Y, YU N J, et al. Study on chemical constituents of bark of *Paeonia suffruticosa* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(21): 1793-1795.
- [2] WANG L, HOU S X, HU P, et al. Study on optimized extraction technology of *Paeonia suffruticosa* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(8): 569-571.
- [3] WANG Y F, WANG C G. The application of response surface methodology [J]. J Cent Univ Natl(Nat Sci)(中央民族大学学报-自然科学版), 2005, 14(3): 236-240.
- [4] 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): 292-298.
- [5] DI L Q, XIE H, FAN B T, et al. Study on the extraction method and the optimum factor for *Paeonia suffruticosa* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 1998, 21(1): 34-36.
- [6] 段晓颖, 高卫芳, 周淑娟, 等. 牡丹皮中丹皮酚的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 41-42.
- [7] DONG X X, FU J, YIN X B, et al. Study of paeonol extraction process and inclusion process from Cortex Moutan [J]. World J Integr Trad West Med(世界中西医结合杂志), 2015, 10(1): 37-39.
- [8] LIU Y J, XIANG R W. Application of central composite design/response surface methodology in pharmacy experiment design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(6): 455-457.
- [9] GUO J H, ZHANG K, ZHANG T J, et al. Optimum technology of homogenated extraction for fresh rehmannia by central composite design-response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(2): 148-152.
- [10] CAI H, QIN K M, LIU X, et al. Current research status and relevant thoughts on quality standardization of Chinese herbak pieces [J]. World Sci Tech Mod Tradit Chin Med(世界科学技术-中医药现代化), 2011, 13(3): 450-456.

- [11] CHEN J Y, CHEN L, AN Z B, et al. Couase and measure of short of quality control on Chinese medicine herbs [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2003, 26(1): 43-46.
- [12] ZHUANG M R, LIN X, CUI L H, et al. Quality analysis of Cortex Moutan in China [J]. Food Drug(食品与药品), 2006, 8(9): 56-57.
- [13] 孙毅坤, 艾路, 于珊珊, 等. 高温高湿对黄芩、牡丹皮饮片

有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(8): 22-23.

- [14] YI J L. Effect of storage time on content of paeonol in prepared dru and material drug of Cortex Moutan [J]. J Tradit Chin Med Univ Hunan(湖南中医药大学学报), 2008, 28(3): 42-43.

收稿日期: 2014-12-09

仙茅、淫羊藿配伍对肾阳虚小鼠血浆 ACTH 和 cAMP 含量的影响

胡伟¹, 杨明华^{2*}, 陈婉姬³, 朱芳芳¹, 李晓东¹(1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省中药研究所, 杭州 310023; 3.浙江省立同德医院, 杭州 310012)

摘要: 目的 比较仙茅、淫羊藿若干配伍方对肾阳虚小鼠补肾壮阳作用的疗效, 并初探其作用机制。方法 在总量恒定的情况下, 以仙茅与淫羊藿的经典比例 1 : 1 为基准, 向两侧扩展, 得到若干水提及醇提的配伍方, 小鼠灌胃给予腺嘌呤复制肾阳虚模型, 同时以 5 g·kg⁻¹ 剂量灌胃给二仙汤各配伍方, 给药 3 周后, 以小鼠体质量、自主活动次数、脏器指数、血浆垂体促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)含量为指标, 比较各配伍方的疗效。结果 与模型组相比, 给药 3 周后, 水提 1 : 2 组、醇提仙茅组、醇提 1 : 1 组、醇提 1 : 2 组体质量增加非常显著($P < 0.01$); 水提 1 : 2 组、水提淫羊藿组、醇提 1 : 2 小鼠自主活动次数均显著增加($P < 0.01$); 水提淫羊藿组、水提 1 : 2 组、醇提 1 : 2 组脏器指数增大较为明显; 水提 2 : 1 组、水提 1 : 2 组、醇提 1 : 2 组小鼠血浆中 cAMP 活力显著升高($P < 0.01$), ACTH 含量明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 二仙汤各配伍方中, 水提 1 : 2 组、醇提 1 : 2 组补肾壮阳的作用最为显著。

关键词: 二仙药对; 配伍; 补肾壮阳

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)08-0923-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.005

Effect of Compatibility of Curculigo and Epimedium to ACTH and cAMP on the Kidney Yang Deficiency Mice

HU Wei¹, YANG Minghua^{2*}, CHEN Wanji³, ZHU Fangfang¹, LI Xiaodong¹(1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Institute of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310023, China; 3.Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of curculigo and epimedium some compatibility of kidney yang deficiency mice role and Preliminary its mechanism of action. **METHODS** Under the total dosage being constant, several compatible prescriptions were obtained by uniform design with Curculigo and Epimedium classical proportion 1 : 1 as a reference. Their extracts were obtained being by water and alcohol. Mice fed with adenine copy kidney Yang model, while 5 g·kg⁻¹ dose intragastric administration to each compatibility prescripti-ions, after three weeks administration to mice, body weight, locomotor activity, organ index, plasma pitu-itary adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content were taken as indexes, comparing the efficacy of different compatible prescriptions. **RESULTS** Compared with the model group, after three weeks experiment, in water extract 1 : 2 group, water extraction Curculigo group, alcohol extract of 1 : 2 and 1 : 1 groups, body weight of mice increased significantly($P < 0.01$); independent activity of water extract 1 : 2 groups, water extraction Epimedium groups, alcohol extract 1 : 2 was increased significantly in the number of mice($P < 0.01$); water extraction Epimedium group, alcohol extract 1 : 2 and water extract 1 : 2 group, viscera index increased more obviously; alcohol extract 1 : 2 groups, water extract 2 : 1 and 1 : 2 group, plasma cAMP vitality of mice were increased significantly($P < 0.01$), and ACTH were increased significantly($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** The different compatibility prescriptions of Erxian soup,

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY13H270001)

作者简介: 胡伟, 男, 硕士生 Tel: 13735883045
13857181369 E-mail: ymh702@126.com

E-mail: m13735883045@163.com

*通信作者: 杨明华, 男, 博士, 教授 Tel: