

响应面法优化酒炙两头尖的炮制工艺

黄平, 毛坤军, 周燕霞, 杨宇秀, 叶颖俊* (江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000)

摘要: 目的 优化酒炙两头尖的炮制工艺。方法 先用单因素试验优化黄酒的稀释倍数, 然后以黄酒用量、浸润时间、炮制温度、炮制时间为自变量, 以竹节香附素 A 的含量作为因变量, 进行响应面分析, 优选酒炙两头尖的炮制工艺。结果 酒炙两头尖的最佳炮制工艺为黄酒用量 32.79%, 浸润时间 61.59 min, 炮制温度 81.55 °C, 炮制时间 43.85 min。结论 用响应面法能优选酒炙两头尖的炮制工艺参数, 提高炮制工艺的稳定性 and 重复性, 更好地控制酒炙两头尖的内在质量以保证临床用药的有效性。

关键词: 酒炙两头尖; 炮制工艺; 响应面法; 竹节香附素 A

中图分类号: R283.3 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)24-3046-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.24.008

引用本文: 黄平, 毛坤军, 周燕霞, 等. 响应面法优化酒炙两头尖的炮制工艺[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(24): 3046-3050.

Optimization of Processing Technology for Prepared *Anemome Raddeana* Regel by Response Surface Methodology

HUANG Ping, MAO Kunjun, ZHOU Yanxia, YANG Yuxiu, YE Yingjun* (Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the processing technology for prepared *Anemome raddeana* Regel(A.R). **METHODS** The single factor experiment was used to optimize the dilution ratio of rice wine. Based on the contents of raddeanin A, response surface methodology(RSM) was used to optimize the rice wine dosage, moistened time, stir-fried temperature and stir-fried time in the processing technology for prepared A.R. **RESULTS** The optimal processing technology for prepared A.R was mixed with 32.79% rice wine, moistened for 61.59 min, and stir-fried for 43.85 min at 81.55 °C. **CONCLUSION** The processing technology for prepared A.R optimized by RSM can be used to optimize the process parameters, promote the stability and repeatability of the processing technology, which can significantly control the inner quality of prepared A.R. to ensure effectiveness in clinical application.

KEYWORDS: prepared *Anemome raddeana* Regel; processing technology; response surface methodology; raddeanin A

两头尖系毛茛科银莲花属植物多被银莲(*Anemone raddeana* Regel)的根茎, 收载于中国药典 2015 年版。其味辛热, 有毒, 具有祛风湿、消痈肿的功效。主要用于四肢拘挛、风寒湿痹、痈肿溃烂、骨节疼痛等疾病的治疗^[1]。研究表明, 两头尖具有抗肿瘤、抗炎、镇痛、解热、抗惊厥等多种药理作用^[2-4], 含有三萜皂苷、挥发油、内酯、多糖等多种成分^[5], 其中三萜皂苷类成分竹节香附素 A 是两头尖发挥抗肿瘤活性的主要活性成分, 是评价两头尖药材质量的主要指标成分^[6-8]。

中药炮制是根据中医药理论, 依照辨证施治用药的需要和药物自身性质以及制剂的不同要求所采取的一种制药技术。中药经辅料炮制后, 在性味、功效、作用趋向归经和不良反应方面都会发生某些变化, 从而最大限度地发挥疗效^[9]。响应

面法具有试验次数少、精密度高、实验结果准确可靠、预测性好等系列优点, 适合于多因素多水平的试验, 与其他试验设计相比, 更简化, 更全面, 已被广泛用于药学领域的试验设计与优化工艺^[10]。药理活性研究表明, 竹节香附素 A 在体外有细胞毒性, 其含量高低与药材毒性有关^[11], 因此, 为降低两头尖药材毒性, 保证两头尖药材临床用药的安全性, 本研究在单因素试验的基础上, 以竹节香附素 A 含量为指标成分, 采用响应面法优化两头尖药材的酒炙工艺, 为两头尖酒炙饮片的制备提供科学依据, 为两头尖药材的用药安全研究奠定了基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1200 液相色谱仪 (DAD 检测器,

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(181170)

作者简介: 黄平, 女, 讲师 Tel: 15779392018 E-mail: huangping2489@163.com *通信作者: 叶颖俊, 男, 副教授 Tel: (0793)7089252 E-mail: yeyingjun2012@163.com

G1316A 恒温柱箱, G1312A 二元泵, G1322A 在线脱气机, G1329A 自动进样器); AG285 电子分析天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司); SB-2000 旋转蒸发器(中国上海市安科仪器设备有限公司); 1011B-2 真空烤箱(中国上海市神光仪器有限公司); KQ-2200B 超声机(中国昆山市超声波仪器厂)。

1.2 试剂

两头尖购于江西东港中药饮片有限公司, 经上饶市食品药品检定所彭任辉副主任药师鉴定为毛茛科银莲花属植物多被银莲花 *Anemone raddeana* Regel 的干燥根茎; 竹节香附素 A 对照品(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: 20141109; 纯度: 99.2%); 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备^[12]

取适量两头尖药材于干燥烧杯中, 淋入新鲜洁净的黄酒, 与药物拌匀, 稍闷润至吸干水分为宜, 放入锅中, 适宜温度下炒制一定时间, 取出, 放凉, 即得。取不同条件下炮制的酒炙两头尖药材粉碎, 过 60 目筛, 精密称取 1.0 g 置 50 mL 锥形瓶中, 加入 70%乙醇溶液 25 mL, 超声提取 30 min, 过滤, 滤液蒸干, 残渣加甲醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取竹节香附素 A 对照品 10.24 mg, 置 10 mL 的量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 得质量浓度为 $1.024 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的竹节香附素 A 对照品储备液。置于 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 色谱条件

采用 Hanbon-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸水溶液(53:47)为流动相等度洗脱, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 30 °C, 检测波长 206 nm, 进样量 10 μL, 色谱图见图 1。

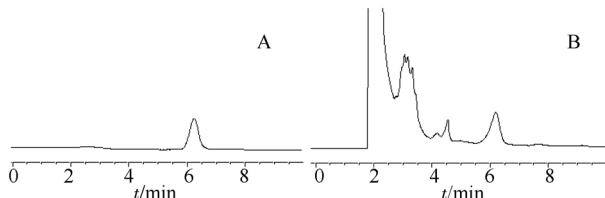


图 1 高效液相色谱图

A-竹节香附素 A 对照品; B-供试品。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-addeanin A substances; B-test sample.

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的绘制 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 mL 置 10 mL 的量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 得不同浓度的对照品溶液。按“2.3”项下色谱条件进样分析, 以峰面积值为纵坐标(Y), 以竹节香附素 A 质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=336.16X-10.999$, $r=0.9999$ 。

2.4.2 仪器精密度试验 取“2.2”项下对照品溶液, 按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 记录峰面积并计算 RSD。结果竹节香附素 A 峰面积 RSD 为 0.81%, 表明仪器精密度较好。

2.4.3 重复性试验 精密称取两头尖药材 1.0 g, 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定, 记录峰面积并计算 RSD。结果竹节香附素 A 峰面积 RSD 为 1.27%, 表明方法重复性较好。

2.4.4 稳定性试验 取两头尖供试品溶液分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进行测定, 结果竹节香附素 A 峰面积值 RSD 为 1.63%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已知含量的两头尖药材粉末约 1.0 g, 共 6 份, 每份按约 1:1 的比例加入对照品, 按“2.1”项下方法进行样品的制备并测定, 计算回收率。结果竹节香附素 A 平均回收率值为 98.98%, RSD 为 2.75%。表明本实验建立的方法回收率较好, 方法可行。

2.5 Box-Behnken 响应面法试验设计

在单因素预试验的基础上, 以黄酒用量(A)、浸润时间(B)、炮制温度(C)及炮制时间(D)为考察因素, 竹节香附素 A 含量为响应指标, 采用 Design Expert 8.06 软件设计 4 因素 3 水平实验方案。响应面法因素水平编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of Box-Behnken

水平	自变量			
	黄酒用量 A/%	浸润时间 B/min	炮制温度 C/°C	炮制时间 D/min
-1	20	30	70	30
0	30	60	80	45
1	40	90	90	60

3 结果

3.1 响应值结果及其拟合模型

采用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 结合单因素试验结果, 分析黄酒用量(A)、浸润时

间(B)、炮制温度(C)及炮制时间(D)对竹节香附素 A 含量的影响。试验设计及结果见表 2。

表 2 响应面设计与结果

Tab. 2 Design and results of the response surface experiment

序号	A 黄酒 用量/%	B 浸润时 间/min	C 炮制温 度/℃	D 炮制时 间/min	含量/mg·g ⁻¹
1	30(0)	30(-1)	70(-1)	45(0)	3.54
2	30(0)	60(0)	80(0)	45(0)	4.29
3	20(-1)	60(0)	80(0)	60(1)	4.09
4	30(0)	90(1)	90(1)	45(0)	3.88
5	40(1)	90(1)	80(0)	45(0)	4.04
6	30(0)	60(0)	70(-1)	60(1)	3.79
7	40(1)	60(0)	80(0)	30(-1)	4.06
8	20(-1)	60(0)	70(-1)	45(0)	3.49
9	20(-1)	60(0)	80(0)	30(-1)	3.54
10	30(0)	60(0)	80(0)	45(0)	4.23
11	40(1)	60(0)	90(1)	45(0)	3.72
12	20(-1)	60(0)	90(1)	45(0)	3.73
13	30(0)	60(0)	70(-1)	30(-1)	3.24
14	20(-1)	30(-1)	80(0)	45(0)	3.64
15	20(-1)	90(1)	80(0)	45(0)	3.65
16	40(1)	60(0)	70(-1)	45(0)	3.66
17	30(0)	30(-1)	80(0)	30(-1)	3.66
18	30(0)	60(0)	80(0)	45(0)	4.24
19	30(0)	60(0)	90(1)	60(1)	3.93
20	40(1)	30(-1)	80(0)	45(0)	3.77
21	30(0)	90(1)	80(0)	30(-1)	4.02
22	40(1)	60(0)	80(0)	60(1)	3.85
23	30(0)	30(-1)	80(0)	60(1)	3.63
24	30(0)	60(0)	80(0)	45(0)	4.12
25	30(0)	60(0)	90(1)	30(-1)	3.76
26	30(0)	30(-1)	90(1)	45(0)	3.55
27	30(0)	90(1)	80(0)	60(1)	3.69
28	30(0)	60(0)	80(0)	45(0)	4.21
29	30(0)	90(1)	70(-1)	45(0)	3.65

3.2 模型拟合及显著性分析

利用 Design-Expert 8.06 软件对表 2 中数据进行多元回归拟合, 结果见表 3, 由方差分析可知, 一次项中的 A, B, C, D 和交叉项 AD 及各因素二次项对响应值的影响显著, AB, AC, BC, BD, CD 项对响应值的影响不显著, 说明响应值与自变量之间不是简单的线性关系。在本试验范围内, 该模型的决定系数 $R=0.880\ 3$, 校正后的决定系数 $R^2_{Adj}=0.760\ 6$, 模型极显著, 失拟项不显著, 说明回归方程拟合度良好, 能较好地描述试验结果。

各因素经回归拟合后, 得拟合方程:

$$Y=4.22+0.080A+0.095B+0.100C+0.059D+0.065AB-0.045AC-0.190AD+0.055BC-0.075BD-0.095CD-0.190A^2-0.250B^2-0.350C^2-0.180D^2。$$

由方差分析结果可知, 该回归方程呈极显著性 $P=0.000\ 3<0.01$, 极具统计意义。回归模型失拟项 $P=0.055\ 8>0.05$, 表明模型拟合度良好。回归方程能很好地描述各因素与响应值之间的关系, 该实验方法可靠, 变异系数(CV)为 1.07%, 说明模型的重现性很好^[13-14]。可用来反映黄酒用量、浸润时间、炮制温度及炮制时间对酒炙两头尖中竹节香附素 A 含量的差异影响, 该模型可用于分析预测酒炙两头尖炮制工艺参数的参考和依据。

表 3 回归模型方差分析结果

Tab. 3 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.71	14	0.12	7.36	0.000 3	极显著
A	0.077	1	0.077	4.64	0.049 2	显著
B	0.11	1	0.11	6.54	0.022 8	显著
C	0.12	1	0.12	7.25	0.017 5	显著
D	0.041	1	0.041	2.47	0.013 9	显著
AB	0.017	1	0.017	1.02	0.329 5	
AC	0.008 1	1	0.008 1	0.49	0.495 8	
AD	0.14	1	0.14	8.72	0.010 5	显著
BC	0.012	1	0.012	0.73	0.407 1	
BD	0.022	1	0.022	1.36	0.263 2	
CD	0.036	1	0.036	2.18	0.162 0	
A ²	0.23	1	0.23	13.62	0.002 4	显著
B ²	0.41	1	0.41	24.77	0.000 2	极显著
C ²	0.79	1	0.79	47.71	<0.000 1	极显著
D ²	0.22	1	0.22	13.26	0.002 7	极显著
残差	0.23	14	0.017			
失拟项	0.22	10	0.022	5.59	0.055 8	不显著
净误差	0.015	4	0.003 87			
总和	1.94	28				

3.3 响应曲面分析

根据回归方程绘制出响应曲面, 结果显示, 随着 A、B、C、D 取值增大, 响应值竹节香附素 A 含量增大, 达到最大值后, 随着各因变量的继续增大, 响应值有所下降, 结果见图 2。运用 Design Expert 8.06 统计软件求解回归方程, 以竹节香附素 A 含量为参考指标, 得到酒炙两头尖的最佳工参数为: 黄酒用量 32.79%(每 100 g 两头尖药材拌入黄酒 32.79 g), 浸润时间 61.59 min, 炮制温度 81.55 ℃, 炮制时间 43.85 min。在此最优工艺条件下, 预测竹节香附素 A 含量可达 4.19 mg·g⁻¹。

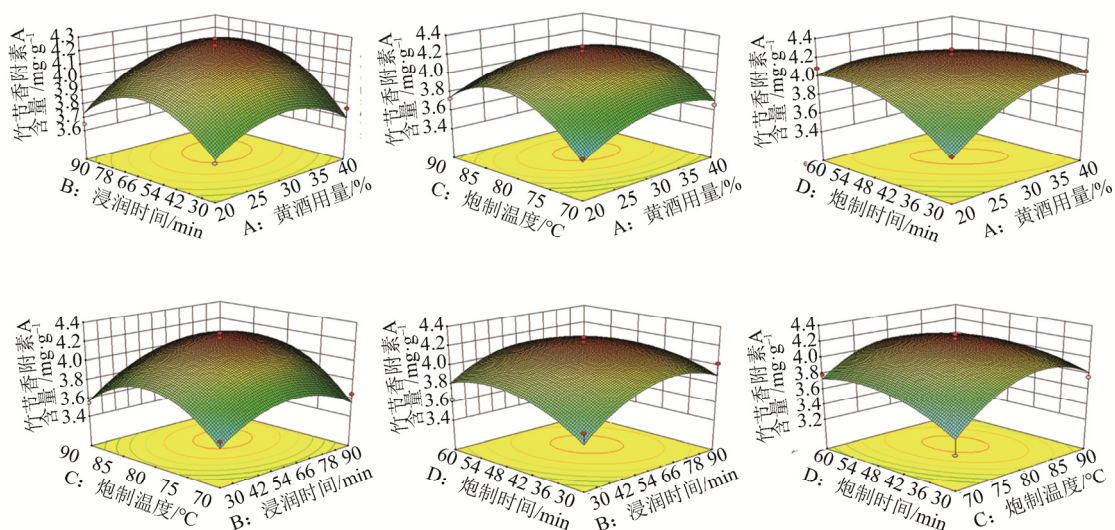


图2 各因素对竹节香附素 A 含量影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plot of factors on yield of raddeanin A

3.4 最佳炮制工艺确定及试验验证比较

综合炮制工艺及实际情况,修正炮制工艺:黄酒用量 30%(每 100 g 两头尖药材拌入黄酒 30 g),浸润时间 60 min,炮制温度 80 °C,炮制时间 45 min。根据所修正的最佳炮制工艺进行试验验证($n=3$),实际测得竹节香附素 A 含量为 0.42%(RSD=0.43%),与理论预测值 0.41%相比,无显著性差异,说明此方程与实际情况拟合良好,所建模型可靠。

4 讨论

4.1 指标性成分的选择

竹节香附素 A 是两头尖药材的主要活性成分,具有显著的抗肿瘤作用,是两头尖药材质量评价的主要指标成分,为中国药典 2015 年版中两头尖药材含量测定项下的指标性成分,其含量的高低直接反映了两头尖药材及其炮制品的药效和质量。因此,本实验选择竹节香附素 A 作为指标成分,以评价两头尖药材炮制的工艺。

4.2 考察因素的选择

通过单因素法对影响酒炙两头尖的炮制工艺的因子进行试验。结果表明黄酒用量、浸润时间、炮制时间、炮制温度的变化对两头尖酒炙品中竹节香附素 A 含量均有不同程度的影响,且黄酒用量、浸润时间、炮制时间和炮制温度的交互作用对竹节香附素 A 含量影响显著。因此,本试验选择黄酒用量、浸润时间、炮制时间和炮制温度 4 个自变量为考察因素。

4.3 优化工艺的选择

传统中药的提取工艺研究大多采用正交试验设计,但正交试验的优化试验次数较响应面试验少,只能得到离散型的优化数据,具有精度不高、预测性不佳的特点,最佳工艺条件只能从试验中每个因素的水平中选择一个;而响应面法设计本质上是将正交试验与回归分析相结合,使各因素与响应值之间进行二元多项回归,既可以分析各因素的变化对响应值的影响规律,也可以得到相对精确的优化条件,提高实验的预测性和准确性,因而认为利用该法得到的提取工艺具有实用价值。

5 小结

课题组在比较两头尖药材生品和酒炙品中竹节香附素 A 的含量过程中发现,两头尖药材经炮制后,有效成分竹节香附素 A 的含量发生显著变化,其中酒制品中竹节香附素 A 的含量明显升高。本试验在前期实验的基础上,又首次通过响应面分析法对酒炙两头尖的炮制工艺进行了优化,有效地筛选出了酒炙两头尖的最佳炮制工艺参数,进一步提高了两头尖酒炙品的内在质量,为两头尖酒炙品的开发利用和临床用药安全性研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 168.
- [2] GAO Y, GUO P, BAI S F, et al. Chemical composition and pharmacological effects of *Anemone raddeana* Regel [J].

- Drugs Clin(现代药物与临床), 2009, 24(2): 91-95.
- [3] WANG L N, DONG Y H. Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of *Anemone raddeanae* and its influence against delayed type hypersensitivity [J]. Inform Tradit Chin Med(中医药信息), 2012, 29(4): 154-156.
- [4] ZHANG X P, CAI G Z, AN N, et al. Anti-inflammatory effect of alcohol extract of *Anemone raddeanae* on adjuvant arthritis in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Med(中药药理与临床), 2016, 32(2): 131-134.
- [5] ZHANG Y F, LI Z M, ZHAO L L, et al. Study on the HPLC fingerprint of *Anemone raddeana* [J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27(3): 399-401.
- [6] XUE G, ZOU X, ZHOU J Y, et al. The effects of raddeanin A on human gastric cancer BGC-823 cell cycle and STAT3 signaling pathway [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2017, 33(1): 78-81.
- [7] MA T, WANG Y, WANG J B, et al. Study of raddeanin A on inhibiting gastric tumor growth through regulating the expression level of lncRNA HOTAIR [J]. J Sichuan Tradit Chin Med(四川中医), 2017, 35(4): 62-66.
- [8] WANG Y, JIANG X B, HAN D, et al. Effects of raddeanin A on proliferation, apoptosis, migration and invasion of human carcinoma colon cell line HCT-116 [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2018, 29(2): 123-130.
- [9] 徐楚江. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [10] ZHAO X, WANG K, WANG N F. Optimization of extraction Anemones Raddeanae Rhizoma by using response surface method [J]. Chin J Inform TCM(中国中医药信息杂志), 2017, 24(3): 66-68.
- [11] ZHANG J M, CAO L, WU Z M. Studies on anticancer activities of triterpenoid in *Anemone raddeana* Regel [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2003, 12(3): 191-193.
- [12] ZHANG Y F, LIU D, ZHANG L, et al. Determination of raddeanin A from *Anemone raddeana* Rhizoma by HPLC-ELSD [J]. Chin Tradit Patent Med(中成药), 2018, 39(2): 123-130.
- [13] ZHANG L X, LI Z, LIU D Y, et al. Optimization of reflux extraction technology of hyperin in pine needle of cedrus deodra by response surface methodology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(6): 850-854.
- [14] JIANG H Y, LIU Y F, PAN X, et al. Response surface methodology for optimization of extraction process of naringin and neohesperidin from huyou fruitlet [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(11): 1546-1551.
- 收稿日期: 2019-02-05
(本文责编: 李艳芳)