

响应面法优化丹参醇沉工艺的研究

何国勇¹, 周牡丹¹, 童胜强¹, 瞿海斌², 颜继忠¹ (1.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 2.浙江大学药学院, 杭州 310014)

摘要: 目的 以原儿茶醛为指标优化丹参醇沉工艺。方法 首先采用 Plackett-Burman 设计对影响丹参醇沉操作的因素进行筛选, 所选取的 8 个相关因素为: 丹参水提浓缩液密度、一次醇沉加醇速度、一次醇沉液乙醇终浓度、一次醇沉浓缩液密度、二次醇沉加醇速度、二次醇沉液乙醇终浓度、氢氧化钠溶液的浓度和二次醇沉液的 pH 值。在此基础上, 采用响应面法在线性范围内对影响醇沉操作的关键因素(丹参水提浓缩液密度、一次醇沉浓缩液密度和 pH 值)作了进一步的研究与探讨。结果 通过对二次项回归方程求解得知, 上述自变量中丹参水提浓缩液密度为 1.15 mg·mL⁻¹、一次醇沉浓缩液密度为 1.26 mg·mL⁻¹ 和 pH 值为 7.68 时, 原儿茶醛含量达到最佳值为 0.512 mg·mL⁻¹。结论 优化工艺的原儿茶醛提取含量高, 可用于丹参醇沉过程中原儿茶醛的含量控制。

关键词: 丹参; 醇沉; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)02-0118-05

Optimizing Process of Radix Salvia Miltiorrhiza Ethanol Precipitation by Response Surface Methodology

HE Guoyong¹, ZHOU Mudan¹, TONG Shengqiang¹, QU Haibin², YAN Jizhong¹ (1.College of Pharmaceutics, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.College of Pharmaceutics, Zhejiang University, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the process of ethanol precipitation of protocatechua-ldehyde. **METHODS** An effective two-phase statistical approach to enhance extracting rate. In the first phase, Plackett-Burman design was undertaken to evaluate the effects of the eight factors: namely density of Radix Salvia Miltiorrhiza extract, first ethanol precipitation rate, ethanol concentration of first alcohol precipitation, density of condensed alcohol precipitation, second ethanol precipitation rate, ethanol concentration of second alcohol precipitation, concentration of sodium hydroxide solution and pH. By regression analysis, density of Radix Salvia Miltiorrhiza extract, density of condensed alcohol precipitation and pH were found to be important for extraction of protocatechualdehyde. In the second phase of the optimization process, a three-level three-factor Box-Behnken design was used to optimize the above critical internal factors. **RESULTS** The results showed that the maximum experimental value of protocatechualdehyde (0.487 mg·mL⁻¹) can be obtained. **CONCLUSION** This extraction technology could be used for the extraction of protocatechualdehyde in the process of Radix Salvia Miltiorrhiza ethanol precipitation.

KEY WORDS: Radix Salviae Miltiorrhizae; ethanol precipitation; response surface methodology

丹参为常用中药, 其味苦、性微寒, 具有活血去瘀、通经止痛、清热安神的功效, 可用于治疗冠心病、中风、微循环障碍等疾病^[1]。但是近年来, 中药注射液屡屡出现质量问题, 质量控制情况不如人意。如何对生产全程进行质量控制成为了中药注射液质量控制的关键问题之一。

响应面法(response surface methodology, RSM)是采用多元二次回归方程来拟合因素和响应值之

间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数, 解决多变量问题的一种统计方法^[2-3]。近年来, 国外常用这种基于二阶模型的优化方法进行试验条件的优化, 具体过程包括实验、建模、数据分析和最优化。根据丹参部颁标准的检测项, 本试验以原儿茶醛的含量作为指标对丹参的醇沉工艺进行研究, 借助试验设计软件 Design Expert(version 7.1.3 Trial), 采用 Box-Behnken 响应

基金项目: 浙江省重大科技专项社会发展项目资助(2008C13004-1)

作者简介: 何国勇, 男, 硕士生 Tel: 13588196284 E-mail: hgy2009@yahoo.com.cn

*通信作者: 颜继忠, 男, 硕士, 教授

E-mail: yjz@zjut.edu.cn

面法对影响提取工艺的各因素进行初步的研究,以寻找最佳的提取工艺,为丹参注射液的生产提供实验基础和参考数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器 高效液相色谱仪(K-501 高压泵、HT-230A 柱温箱、Autosampler3800 自动进样器、K-2501 紫外检测器)(德国 Knauer); BS224S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.1.2 试药 原儿茶醛标准品,自制,纯度:98%;甲醇、乙腈均为分析纯;磷酸为化学纯;水为蒸馏水;丹参水提浓缩液,由正大青春宝药业有限公司供应。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺路线^[4] 取丹参水提浓缩液 3 mL,先加 95%乙醇至一定醇含量,搅拌,静置。高速离心,取上清液,冷藏。冷藏后过滤,进行减压蒸馏回收乙醇。放冷至室温,再加 95%乙醇至一定含醇量,用氢氧化钠溶液调节 pH 值,充分搅拌,静置。冷藏,将二次醇沉液过滤,滤液旋蒸至无醇味,用蒸馏水定容,备用。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为伊力特 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 A 为 0.2%磷酸-水, B 为 0.2%磷酸-乙腈。梯度洗脱程序:0~8 min,由 10%B 升至 22%B;8~15 min,由 22%B 升至 26%B;15~35 min 由 26%B 升至 39%B;进样量为 20 μL;流速为 1 mL·min⁻¹;检测波长为 280 nm;柱温:35 ℃。

1.2.3 原儿茶醛含量的测定 精确称取 3.7 mg 原儿茶醛,用蒸馏水定容至 10 mL。然后分别移取 1.5, 1.0, 0.7, 0.5, 0.2 mL 到 10 mL 量瓶中,用蒸馏水定容。这些溶液可以分别表示为 55.5, 37.0, 25.9, 18.5, 7.4 μg·mL⁻¹。在 280 nm 处测定吸光度(A)对药物浓度(C)作线性回归,得标准曲线方程为: $A=0.1215C-47.629$, $r=0.9995$, 线性范围为 7.4~55.5 μg·mL⁻¹;精密度试验 RSD 为 1.5% ($n=5$);重复性试验 RSD 为 2.1% ($n=5$);加样回收试验得平均回收率为 98.5%, RSD 为 1.2% ($n=5$)。

1.2.4 实验设计

1.2.4.1 Plackett-Burman 实验设计^[5-7] 根据丹参醇沉单元操作的生产工艺以及丹参部颁标准的检测项,本阶段试验研究的影响因素见表 1,评价指标为原儿茶醛的含量,评价结果见表 2。本阶段实验设计、

数据分析及模型建立皆由 SAS V8.0 辅助完成。

表 1 Plackett-Burman 实验设计因素水平及编码

Table 1 Level and code of variables chosen for Plackett-Burman design

因 素	编 码	未 编 码	-1	1
水提浓缩液密度/g·mL ⁻¹	x ₁	X ₁	1.10	1.30
一次醇沉液乙醇终浓度/%	x ₂	X ₂	70	80
一次醇沉加醇速度/mL·min ⁻¹	x ₃	X ₃	15	25
二次醇沉液乙醇终浓度/%	x ₄	X ₄	1.10	1.30
二次醇沉加醇速度/mL·min ⁻¹	x ₅	X ₅	80	90
氢氧化钠溶液的浓度/%	x ₆	X ₆	15	25
pH 值	x ₇	X ₇	10	30
	x ₈	X ₈	7.00	9.00

注:编码值与真实值的关系为: $x_1=(X_1-1.20)/0.10$; $x_2=(X_2-75)/5$; $x_3=(X_3-20)/5$; $x_4=(X_4-1.20)/0.10$; $x_5=(X_5-85)/5$; $x_6=(X_6-20)/5$; $x_7=(X_7-20)/10$; $x_8=(X_8-8.00)/1.00$

Note: The relationship between code value and real value: $x_1=(X_1-1.20)/0.10$; $x_2=(X_2-75)/5$; $x_3=(X_3-20)/5$; $x_4=(X_4-1.20)/0.10$; $x_5=(X_5-85)/5$; $x_6=(X_6-20)/5$; $x_7=(X_7-20)/10$; $x_8=(X_8-8.00)/1.00$

表 2 偏回归系数及显著性检验

Table 2 Regression coefficients and their significance for the model

模 型 项	回 归 系 数	标 注 误 差	t 值	P 值
水提浓缩液密度/g·mL ⁻¹	0.740 3	0.052 5	14.097 80	0.000 7
一次醇沉液乙醇终浓度/%	0.385 4	0.052 5	7.339 70	0.055 2
一次醇沉加醇速度/mL·min ⁻¹	0.731 8	0.053 8	13.579 10	0.186 4
二次醇沉液乙醇终浓度/%	0.382 6	0.053 8	7.099 79	0.005 7
二次醇沉加醇速度/mL·min ⁻¹	0.247 5	0.053 8	4.592 85	0.059 3
氢氧化钠溶液的浓度/%	-0.090 5	0.053 8	-1.680 20	0.191 4
pH 值	-0.106 3	0.053 8	-1.973 05	0.143 0
	0.471 6	0.052 5	8.980 80	0.002 9

1.2.4.2 Box-Behnken 实验设计^[8-9] 基于第一阶段实验结果,该阶段实验研究采用 Box-Behnken 响应面设计法,对影响丹参醇沉的关键因子进行研究和优化,以获得提取的最佳条件及操作水平范围。实验辅助软件为 Design Expert。

由 Plackett-Burman 试验结果表明,对丹参醇沉过程影响显著的外界因子为水提浓缩液密度、一次醇沉液乙醇终浓度和 pH 值。因此,本次设计以原儿茶醛的含量(mg·mL⁻¹)为响应值,自变量为水提浓缩液密度、一次醇沉液乙醇终浓度和 pH 值,分别以 X₁、X₂、X₃ 代表,按方程 $X_i=(X_i-X_0)/\Delta X$ 对自变量进行编码。其中, x_i 为自变量的编码值, X_i 为自变量的真实值, X₀ 为实验中心点处自变量

的真实值, ΔX 为自变量的变化步长。因子编码及各自变量水平见表 3。

表 3 Box-Behnken 实验设计因素水平及编码

Tab 3 Level and code of variables chosen for Box-Behnken design

因素	编码	未编码	-1	0	1
水提浓缩液密度/g·mL ⁻¹	x ₁	X ₁	1.10	1.20	1.30
一次醇沉浓缩液密度/g·mL ⁻¹	x ₂	X ₂	1.10	1.20	1.30
pH 值	x ₃	X ₃	7.00	8.00	9.00

注: 编码值与真实值的关系为: $x_1=(X_1-1.20)/0.10$; $x_2=(X_2-1.20)/0.10$; $x_3=(X_3-8.00)/1.00$

Note: The relationship between code value and real value: $x_1=(X_1-1.20)/0.10$; $x_2=(X_2-1.20)/0.10$; $x_3=(X_3-8.00)/1.00$

设该模型通过最小二乘法拟合的二次多项方程为:

$$Y=B_0+B_1X_1+B_2X_2+B_3X_3+B_{12}X_1X_2+B_{13}X_1X_3+B_{23}X_2X_3+B_{11}X_1^2+B_{22}X_2^2+B_{33}X_3^2 \quad (1)$$

式中: Y 为预测响应值; B_0 为常数项; B_1 、 B_2 、 B_3 为线性系数; B_{12} 、 B_{13} 、 B_{23} 为交互项系数; B_{11} 、 B_{22} 、 B_{33} 为二次项系数。

为了求得此方差的各项系数, 需 15 组试验来求解, 实验设计表见表 4。利用统计软件 Design Expert 来进行实验设计与分析。

表 4 Box-Behnken 实验设计及响应值的实测值

Tab 4 Factors of design of Box-Behnken and results of experiments

组别	水提浓缩液密度/g·mL ⁻¹	一次醇沉浓缩液密度/g·mL ⁻¹	pH 值	原儿茶醛实测值/mg·mL ⁻¹
1	1.10	1.20	7.00	0.469
2	1.10	1.20	9.00	0.307
3	1.20	1.10	9.00	0.286
4	1.10	1.30	8.00	0.442
5	1.20	1.20	8.00	0.459
6	1.20	1.30	7.00	0.423
7	1.30	1.30	8.00	0.225
8	1.10	1.10	8.00	0.303
9	1.20	1.10	7.00	0.341
10	1.20	1.20	8.00	0.474
11	1.30	1.20	9.00	0.348
12	1.20	1.20	8.00	0.483
13	1.30	1.10	8.00	0.244
14	1.20	1.30	9.00	0.487
15	1.30	1.20	7.00	0.158

对于影响不显著的其他工艺参数, 如醇沉加醇速度、氢氧化钠溶液的浓度等, 皆选定在合适水平, 即醇沉加醇速度为 20 mL·min⁻¹、氢氧化钠溶液的浓度为 20%。

2 结果与分析

2.1 模型方程的建立与显著性检验

试验设计及结果见表 4, 利用 Design Expert 软件, 通过表 4 中原儿茶醛试验数据对方程(1)进行多元回归拟合, 获得原儿茶醛含量对编码自变量水提浓缩液密度、一次醇沉浓缩液密度、pH 值的二次多项回归方程为:

$$\text{原儿茶醛含量} = -20.263 + 24.888x_1 + 15.434x_2 - 0.842x_3 - 3.950x_1x_2 + 0.880x_1x_3 + 0.298x_2x_3 \text{ g/mL} + 1.613x_1^2 - 5.238x_2^2 - 0.035x_3^2 \quad (2)$$

从模型的方差分析表 5 可见, 本试验所选用的二次多项模型具有高度的显著性 ($P_{\text{Model}}=0.0014 < 0.01$), 失拟项在 $\alpha=0.1$ 水平上不显著 ($P=0.1179 > 0.1$), 其校正决定系数 (r^2_{Adj}) 为 0.8767, 表明此模型拟合度较好, 模型能与实验数据进行较好的拟合。因此, 该模型能够预测各因素对原儿茶醛含量的影响。

表 5 二次多项模型方差分析表

Tab 5 Analysis of variance for the model

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值(Prob>F)
模型	0.160	9	0.017	23.850	0.0014
失拟项	3.371E-003	3	1.123.580	7.640	0.1179
误差项	2.940E-004	2	147.000		
总和	0.160	14			

$r=0.9885$ $r^2=0.9772$ $r^2_{\text{Adj}}=0.8767$

2.2 原儿茶醛含量的响应面分析

通过方程(2)所作的响应面图及其等高线图见图 1, 图 2, 图 3。图 1 显示了 pH 位于中心水平, 即 pH 8.00 时, 水提浓缩液密度和一次醇沉浓缩液密度对原儿茶醛含量的交互影响效应。因为等高线为近圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形则交互作用显著。由图 1 可知, 在水提浓缩液密度在低水平时, 随着一次醇沉浓缩液密度的增加, 原儿茶醛含量也相应增加。当水提浓缩液密度在高水平时, 原儿茶醛含量随着一次醇沉浓缩液密度的增加反而减小。由响应面可以看出, 水提浓缩液密度处于低水平时, 原儿茶醛含量随着水提浓缩液密度的增大而逐渐增大; 处于高水平时, 结果相反。因此, 水提浓缩液密度是影响原儿茶醛含量重要的因素。这是水提浓缩液密度小, 药液比较稀, 形成的沉淀不易聚结, 从而有利于提取; 密度太大时, 醇沉时形成大块, 包裹了有效成分, 造成有效成分的损失。

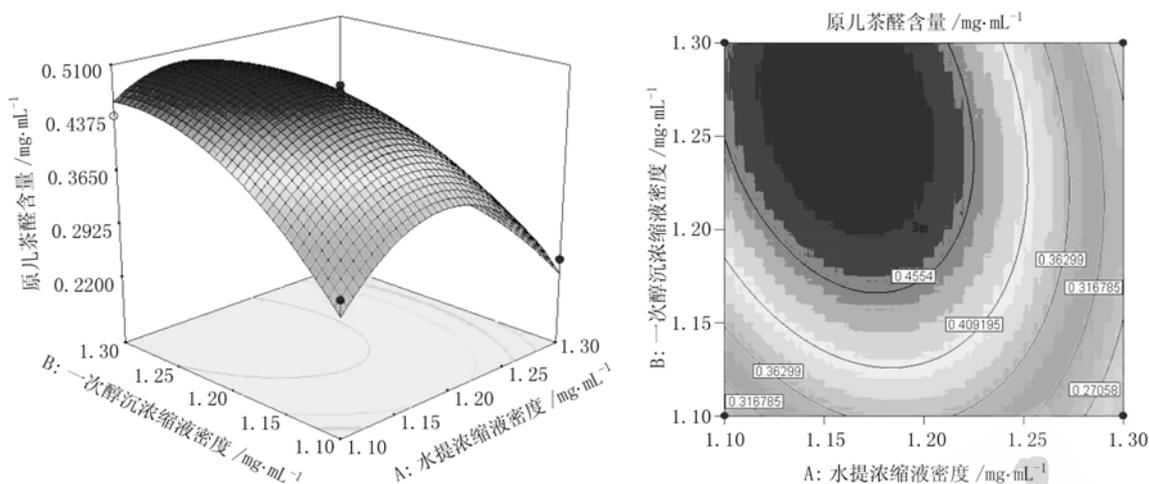


图 1 水提浓缩液密度和一次醇沉浓缩液密度交互影响原儿茶醛含量的曲面图及其等高线图

Fig 1 Response surface plot and contour plot of density of Radix Salvia Miltiorrhiza extract, density of condensed alcohol precipitation on the extraction of protocatechualdehyde

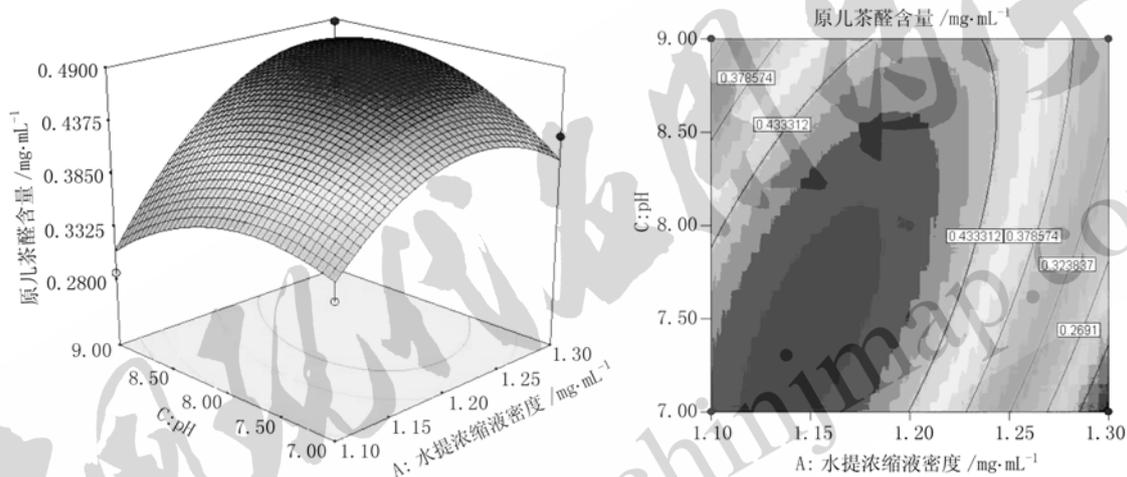


图 2 水提浓缩液密度和 pH 值交互影响原儿茶醛含量的曲面图及其等高线图

Fig 2 Response surface plot and contour plot of density of RSM extract, pH on the extraction of protocatechualdehyde

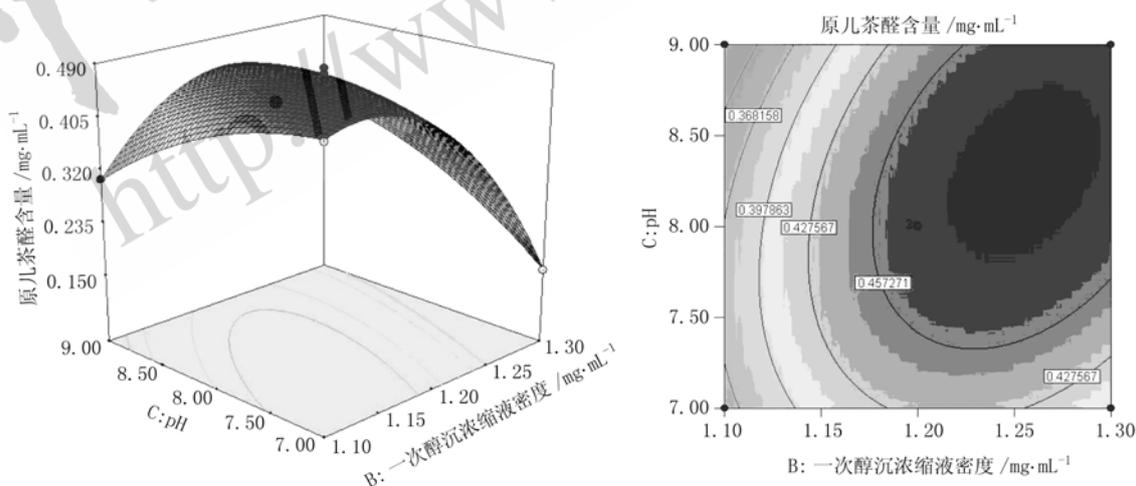


图 3 醇提浓缩液密度和 pH 值交互影响原儿茶醛含量的曲面图及其等高线图

Fig 3 Response surface plot and contour plot of density of condensed alcohol precipitation, pH on the extraction of protocatechualdehyde

图 2 显示了在一次醇沉浓缩液密度处于中心水平时,水提浓缩液密度和 pH 值也存在着交互影响效应。由等高线图可以看出,实验因素在最小的椭圆内时,实验结果较佳。说明在中心水平时对提取的影响效应最显著。图 3 显示了在水提浓缩液密度处于中心水平时,一次醇沉浓缩液密度和 pH 值也存在着交互影响效应。由于丹参中所含成分均为酚酸类化学物,因此,溶剂的 pH 值对于丹参提取化学组成有较大影响。随着 pH 值的增加,原儿茶醛含量呈现逐渐增加的趋势。

2.3 模型验证实验

对回归方程求一阶偏导,解得 $X_1=1.15$, $X_2=1.26$, $X_3=7.86$ 和 $Y=0.533$ 。即最佳组合水提浓缩液密度、一次醇沉浓缩液密度为 1.15 , $1.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值为 7.86 时,最佳条件下原儿茶醛预测值为 $0.533 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

此外,为了验证原儿茶醛含量模型方程(2)的合适性和有效性,进行了最适原儿茶醛含量提取条件的验证试验。重复 5 次的原儿茶醛提取的平均值为 $0.512 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 试验值与预测值吻合情况良好。可见该模型可以用于预测原儿茶醛在丹参醇沉过程中的提取规律,证明了此模型是合适有效的,并具有一定的实践指导意义。

3 讨论

本试验在丹参醇沉工艺的基础上,应用 Plackett-Burman 筛选试验考察了工艺因素对醇沉效果的影响,发现水提浓缩液密度、一次醇沉浓缩液密度和 pH 值对丹参醇沉过程影响最为显著。通过响应面法笔者建立了关键因素影响原儿茶醛含量的二次多项数学模型,并利用统计学方法对该模型进行了显著性检验,优化了工艺参数,探讨了各因素间的交互作用。利用 Design Expert 软件,对原儿茶醛含量二次多项式数学模型解逆矩阵得知:在水提浓缩液密度、一次醇沉浓缩液密

度为 1.15 , $1.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值为 7.86 时,原儿茶醛含量的实验值为 $0.512 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,与预测值吻合良好。

经上述方法优化,丹参醇沉过程中原儿茶醛提取的最佳工艺为:水提浓缩液密度为 $1.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;醇沉加醇速度 $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;一次醇沉液乙醇终浓度为 75% ;一次醇沉浓缩液密度为 $1.26 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$;二次醇沉加醇速度为 $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;二次醇沉液乙醇终浓度为 85% ;氢氧化钠溶液的浓度为 20% ;二次醇沉加醇速度为 $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 和 pH 值为 7.86 。

REFERENCES

- [1] WANG Z P, FAN J Y, LIU Y Q, et al. Study on adsorption of Danshen water-soluble compounds with macroporous resin D301 [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 19(6): 554-560.
- [2] HUANG K, AKOH C C. Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using RSM [J]. J Food Sci, 1996, 61(1): 137-141.
- [3] SHIEH C J, AKOH C C, KOEHLER P E. Four factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids using capric acid [J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72(6): 619-623.
- [4] CHIATAI QINGCHUNBAO PHARMACEUTIACL CO.LTD. Preparation methods and Quality control of Salviae Miltiorrhizae Injection: China, 200710143306.2 [P]. 2008-02-27.
- [5] PLACKETT R L, BURMAN J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. Biometrika, 1946, 33(4): 305-325.
- [6] DRAPER N R, LIN D K. Projection properties of Plackett and Burman designs [J]. Technometrics, 1992, 34(4): 423-428.
- [7] MONTGOMERY D C, BORROR C M, STANLEY J D. Some cautions in the use of Plackett-Burman designs [J]. Quality Engineering, 1997, 10(2): 371-381.
- [8] AHMED S Z, OMAIMA A S, MOHAMMED A H, et al. Quality by design: understanding the formulation variables of acyclosporine a self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function [J]. Int J Pharm, 2007, 332(1/2): 55-63.
- [9] FERREIRA S L, BRUNS R E, FERREIRA H S, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 597(2): 179-186.