

Box-Behnken 响应面法结合多指标综合加权法优选升麻中酚酸类成分的提取工艺^Δ

范孟雪^{1,2,3*}, 秦昆明^{1,2,3}, 丁 斐³, 黄雨婷^{1,2,3}, 蔡宝昌^{1,2,3#}(1.南京中医药大学江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210046; 2.南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023; 3.南京海昌中药集团有限公司/江苏省企业研究生工作站, 南京 210061)

中图分类号 R983 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1835-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.31

摘要 目的:优化升麻中酚酸类成分的提取工艺。方法:在单因素试验的基础上,以乙醇体积分数、回流提取时间和液料比3个因素为自变量,以咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量和浸出物得率的综合评分为因变量,采用基于Box-Behnken设计的响应面法优化升麻中酚酸类成分的提取工艺。结果:最优提取工艺为以8倍药材量的70%乙醇提取2次,每次200 min。验证试验结果表明,综合评分指标的预测值与实测值相对偏差仅为2.20%。结论:优选的提取工艺方法简单、稳定可行,可为后续升麻药材的制剂生产提供参考。

关键词 升麻;咖啡酸;阿魏酸;异阿魏酸;含量;浸出物得率;Box-Behnken设计;响应面法;提取工艺

Optimization of the Extraction Technology of Phenolic Acids in *Cimicifugae foetidae* by Using Box-Behnken Response Surface Methodology Combined with Multi-index Comprehensive Weighted Method

FAN Mengxue^{1,2,3}, QIN Kunming^{1,2,3}, DING Fei³, HUANG Yuting^{1,2,3}, CAI Baochang^{1,2,3}(1.Jiangsu Key Lab of TCM Processing, Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China; 2.National Reengineering Research Center for Standardization of TCM Processing, Nanjing University of TCM, Ministry of Education, Nanjing 210023, China; 3.Nanjing Haichang TCM Group Company Limited/Enterprises Graduate Workstation in Jiangsu Province, Nanjing 210061, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of phenolic acids from *Cimicifugae foetidae*. METHODS: Based on single factor test, the extraction technology of phenolic acids from *C. foetidae* was optimized by response surface methodology based on Box-Behnken design using ethanol volume fraction, reflux extraction time and liquid to solid ratio as independent variables, comprehensive score of the content of caffeic acid, ferulic acid and isoferulic and extract yield as dependent variable. RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as 8-fold 70% ethanol, extracting for 2 times, 200 min each time. Results of validation test indicated that the difference between predicted value of comprehensive score indicators and measured value was 2.20%. CONCLUSIONS: The optimal extraction technology is simple, stable and feasible, and can provide reference for following production of *C. foetidae* preparation.

KEYWORDS *Cimicifugae foetidae*; Caffeic acid; Ferulic acid; Isoferulic acid; Content; Extract yield; Box-Behnken design; Response surface methodology; Extraction technology

- *****
- [6] 程战立,时岩鹏,种小桃,等.藏紫菀化学成分的研究[J].食品与药品,2009,11(1):33.
- [7] 程战立,时岩鹏,种小桃,等.藏紫菀化学成分的研究:II[J].中草药,2011,42(1):42.
- [8] 黄秋洁,叶勇,欧贤红,等.两种药用植物总黄酮体外抗氧化活性比较[J].医药导报,2013,32(5):576.
- [9] 李茂星,尉丽力,邱建国,等.镰形棘豆黄酮类成分提取工艺与体外抗氧化活性研究[J].医药导报,2012,31(9):1195.
- [10] 曹秦,吴辉,张蓓蓓,等.黄酮类化合物在防治神经退行性疾病中作用的研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2015,29(3):457.
- [11] 吴晓青,陈丹,黄群.玳玳黄酮自微乳化微丸的性能评价及总黄酮含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(24):53.
- [12] 潘冬梅,张巧萍,沈斌,等.超声波辅助提取鸭跖草中总黄酮的工艺优化[J].中国药房,2015,26(7):976.
- [13] 杨浩,郭允,陈永超,等.三种开封观赏菊与怀菊中总黄酮的含量比较[J].沈阳药科大学学报,2014,31(9):726.

Δ 基金项目:江苏省科技项目(No.BK20141093)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制机制及质量标准。E-mail: fandana@126.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:中药炮制机制及质量标准。电话:025-68193567。E-mail:bccai@126.com

(收稿日期:2015-09-08 修回日期:2015-11-18)

(编辑:刘 萍)

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim. 或升麻 *Cimicifuga foetida* L. 的干燥根茎, 其味辛、微甘, 性微寒, 归肺、脾、胃、大肠经。该药材具有发表透疹、清热解毒、升举阳气的功效, 主要用于风热头痛、齿痛、口疮、咽喉肿痛、麻疹不透、阳毒发斑、脱肛、子宫脱垂等疾病的治疗^[1]; 临床应用广泛, 资源丰富^[2-3]。其主要化学成分有酚酸类, 包括咖啡酸、阿魏酸及异阿魏酸; 三萜及其苷类, 主要是9, 19-环羊毛脂烷型三萜及其苷类; 色原酮类, 包括升麻素、齿阿米素等成分^[4]。其中, 酚酸类成分经现代药理研究证明具有抗氧化、抗炎、抗血小板凝集、抗肿瘤、降低血糖等作用, 且临床药效显著^[5-6]。

以往有学者已研究过升麻酚酸类成分的提取工艺, 但都采用正交法进行试验^[7-9], 未与浸膏得率相结合, 且未对有效成分贡献率进行加权分析。浸出物是中药的药效物质基础, 浸出物含量的变化会影响有效成分的含量, 并最终影响药物的临床疗效。对于变量是连续性的多因素试验分析, 多指标综合 Box-Behnken 响应面法分析是最佳选择。星点设计-响应面法集数学与统计学方法于一体, 与单因素试验、均匀设计和正交试验相比, 具有设计全面、实验精密度高等优点^[9]。本试验采用基于 Box-Behnken 的星点设计-响应面法, 以咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸和浸膏得率的综合评分为评价指标, 优选升麻中酚酸类成分的提取工艺, 为升麻药材的进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱系统(日本岛津公司); BS2242S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); TDZ5-WS 台式低速自动平衡离心机(湖南湘仪实验开发有限公司); FW135 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

升麻(南京海源中药饮片有限公司, 批号: 150110, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为升麻属植物大三叶升麻的干燥根茎); 对照品咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸(中国食品药品检定研究院, 批号分别为: 110885-200102、110773-201313、111698-201103, 纯度: 均 $\geq 98\%$, 用于含量测定); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸的含量测定

2.1.1 色谱条件、专属性及灵敏度试验 色谱柱: YMC-Pack-ODS-C4(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min, 5%~13% A; 12~23 min, 13%~18% A; 23~30 min, 18%~5% A), 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 320 nm; 进样量: 10 μ l。取“2.1.2”“2.1.3”项下混合对照品和供试品溶液进样分析, 结果表明, 各检测峰峰形良好, 且各峰之间分离度均大于1.5。咖啡酸、阿魏酸和异阿魏酸的定量下限分别为0.019 3、0.020 1、0.023 1 μ g/ml。色谱图见图1。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称定咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸对照品适量, 加甲醇制备成质量浓度分别为47.20、144.80、247.40 μ g/ml的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取升麻粉末(过2号筛)10 g, 置

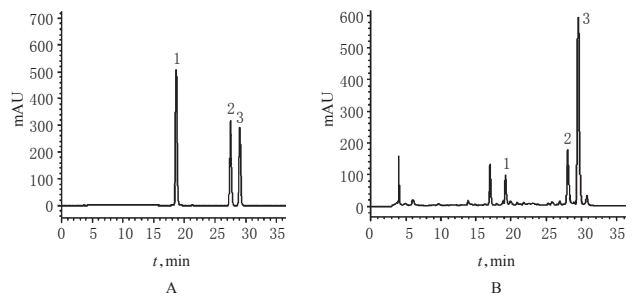


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 咖啡酸; 2. 阿魏酸; 3. 异阿魏酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed substance control; B. test sample; 1. caffeic acid; 2. ferulic acid; 3. isoferulic acid

于250 ml 平底烧瓶中, 精密加入75%乙醇100 ml, 加热回流2 h 提取, 放冷, 用75%的乙醇补足减失的质量, 摇匀, 用0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.4 标准曲线的制备 取不同质量浓度的混合对照品溶液进样测定。以峰面积(y)对质量浓度(x)进行回归分析, 得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸的回归方程分别为: $y=2.733\times 10^5x-1.149\times 10^4$ ($r=0.9999$)、 $y=7.454\times 10^5x+3.814\times 10^4$ ($r=0.9999$)、 $y=1\times 10^6x+2.836\times 10^5$ ($r=0.9995$), 3种成分的检测质量浓度线性范围分别为0.09~0.85、0.29~2.61、0.50~4.45 μ g/ μ l。

2.1.5 精密密度试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液10 μ l, 重复进样6次, 计算得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸峰面积的RSD分别为0.9%、1.1%、0.8% ($n=6$), 表明仪器精密密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液, 分别于放置0、2、4、6、8、12、24 h 后进样测定, 计算得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量的RSD分别为1.6%、1.9%、2.0% ($n=7$), 表明供试品溶液在24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同批升麻粉末6份, 按照“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液, 进样测定。计算得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量的RSD分别为1.2%、1.4%、1.6% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.1.8 准确度试验 称取已知含量的升麻粉末0.1 g, 共6份, 分别加入一定量的咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸对照品, 按照“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液($n=6$), 进样测定。计算得咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸的平均回收率分别为97.39%、96.37%、97.31%, RSD分别为2.3%、2.5%、3.1% ($n=6$), 结果表明该方法准确度好。

2.2 浸出物的测定

精密吸取提取后溶液10 ml, 置于已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴上蒸干后, 于105 $^{\circ}$ C 干燥3 h, 置于干燥器中冷却30 min, 迅速精密称定质量, 即得 $m_{\text{浸出物}}$ 。

2.3 提取方法的选择

在前期试验中, 称取升麻粉末(过2号筛)10 g, 加75%乙醇30 ml, 提取120 min, 比较水煎煮法、超声法、乙醇回流提取法的差异, 记录提取液中总酚酸(咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸之和)含量(单位: mg/10 g)。结果3种方法所得总酚酸含量分别为29.5、17.2、32.0 mg/10 g, 显示以乙醇回流提取法的效果较好, 故以下试验选用乙醇回流提取法提取升麻。

2.4 单因素考察

2.4.1 提取次数 按“2.1.3”项下方法平行提取3份药材,分别提取1、2、3次。将提取液经0.45 μm微孔滤膜滤过后制备成供试品溶液后进样分析,计算总酚酸含量。结果,以提取2次时含量最高。

2.4.2 乙醇体积分数 在提取次数为2次时,按“2.1.3”项下方法平行提取3份药材,其中乙醇体积分数分别为10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%。将提取液同“2.4.1”项下方法制备成供试品溶液后进样分析,计算总酚酸含量。结果,以乙醇体积分数为70%时含量最高,见图2A。

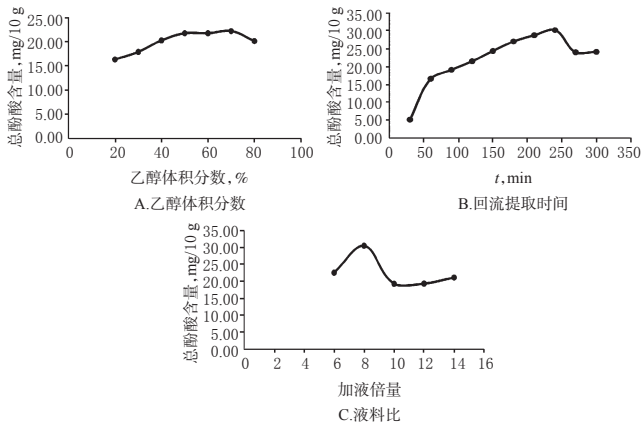


图2 单因素考察结果
Fig 2 Single factor study

2.4.3 回流提取时间 在确定提取次数为2次、乙醇体积分数为70%的基础上,按“2.1.3”项下方法平行提取3份药材,其中回流提取时间分别为30、60、90、120、150、180、210、240、270、300、330 min。将提取液同“2.4.1”项下方法制备成供试品溶液后进样分析,计算总酚酸含量。结果,以回流提取时间为240 min时含量最高,见图2B。

2.4.4 液料比(加液倍数) 在确定提取次数为2次、乙醇体积分数为70%、回流提取时间为240 min基础上,按“2.1.3”项下方法平行提取3份药材,其中液料比分别为6:1、8:1、10:1、12:1、14:1,即加液倍数分别为6、8、10、12、14。将提取液同“2.4.1”项下方法制备成供试品溶液后进样分析,计算总酚酸含量。结果,以液料比为8:1即加液倍数为8时含量最高,见图2C。

2.5 响应面法优化提取条件

2.5.1 响应面法试验设计与结果 由于提取次数为非连续变量,本试验固定提取次数为2次进行后续试验。经上述单因素考察确定考察因素分别为 X_1 (加液倍数)、 X_2 (乙醇体积分数,%)、 X_3 (回流提取时间,min)。采用3因素3水平的Box-Behnken响应面分析法进行试验设计,设定的因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平		
	1	2	3
X_1 (加液倍数)	6	8	10
X_2 (乙醇体积分数),%	55	70	85
X_3 (回流提取时间),min	180	225	270

经预试验,设定综合评分满分为100分,根据升麻中有效成分含量及药效影响,咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量及浸出物得率($m_{\text{浸出物}}/10 \times 100\%$)的权重系数分别为20、30、40、10,在此基础上进行总加权评分。利用综合评分值(P)对试验结果

进行分析:以 Y 表示试验中指标成分的测定值(咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量及浸出物得率的测定值分别为 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4),以各指标的最大值(Y_{max})作为参照对同一指标各数据进行标准化处理, C 表示试验中该指标成分的测定值的标准化数据($C=Y/Y_{\text{max}}$),综合评分 $C=C_{\text{咖啡酸}} \times 20 + C_{\text{阿魏酸}} \times 30 + C_{\text{异阿魏酸}} \times 40 + C_{\text{浸出物}} \times 10$ 。Box-Behnken设计与结果见表2。

表2 Box-Behnken设计与结果

Tab 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	综合评分
1	10	85	225	1.6	3.8	23.7	20.64	89.279
2	8	55	180	1.4	4.0	24.4	20.18	89.517
3	6	55	225	1.5	4.3	24.3	19.61	92.569
4	8	85	270	1.7	3.7	24.4	20.54	90.757
5	6	70	270	1.6	3.8	24.5	20.38	90.496
6	8	70	225	1.8	3.9	26.0	18.88	95.697
7	6	70	180	1.7	3.8	25.3	18.81	92.823
8	6	85	225	1.2	3.6	24.9	18.99	85.264
9	8	70	225	1.8	4.0	26.3	19.04	96.851
10	10	55	225	1.6	3.3	22.9	20.80	84.574
11	8	85	180	1.5	4.1	23.4	20.49	89.805
12	8	55	270	1.5	4.0	23.9	17.34	89.867
13	8	70	225	1.8	3.9	25.1	18.32	94.328
14	10	70	180	1.5	3.6	25.0	21.02	88.750
15	10	70	270	1.6	3.5	24.8	19.74	88.859
16	8	70	225	1.8	3.9	26.1	18.85	95.849
17	8	70	225	1.7	4.1	25.9	18.99	95.829

采用Design-Expert 8.0软件对试验结果进行回归分析,得到回归方程如下: $P = -16.82 + 5.95X_1 + 1.64X_2 + 0.31X_3 + 0.10X_1X_2 + 0.0067X_1X_3 - 0.00022X_2X_3 - 0.94X_1^2 - 0.018X_2^2 - 0.00084X_3^2$ ($R^2=0.9671$)。回归方程一次项中各项系数绝对值的大小反映了各因素对响应值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向。由方程可知,影响升麻指标性成分的因素的主次顺序为 $X_1 > X_2 > X_3$ 。进一步对方程进行回归方差分析,结果见表3。

表3 回归统计方差分析结果

Tab 3 Regression statistical analysis results

方差来源	自由度	平方和	F	P
模型	1	22.67	22.83	0.0002
X_1	1	11.74	11.82	0.0109
X_2	1	0.25	0.25	0.6294
X_3	1	0.1	0.11	0.7547
X_1X_2	1	36.06	36.31	0.0005
X_1X_3	1	1.48	1.49	0.2612
X_2X_3	1	0.091	0.091	0.7714
X_1^2	1	59.9	60.31	0.0001
X_2^2	1	67.96	68.42	<0.0001
X_3^2	1	12.27	12.35	0.0098
模型	7	0.99		
失拟项	3	1.24	1.52	0.338
残差	4	0.81		
纯误差	16			

回归方程中各变量对响应值影响的显著性用 F 检验来判定,概率 P 值越小,则相应变量的显著程度越高,即 $P < 0.01$ 时影响为高度显著, $P < 0.05$ 时影响显著。由表3的分析结果可以看出,模型 $P < 0.01$,说明二次多项模型具有高度的显著性,模型决定系数 $R^2=0.9671$,表明模型拟合度良好,二次项模型拟合成功。将因变量与另外2个因素拟合为三维曲面图,因只

能表达含2个因素变量的函数,故固定3个因素之一为中值,将中心点值代入二次回归模型方程得到新方程,根据新模型方程得到响应面三维图,结果见图3。

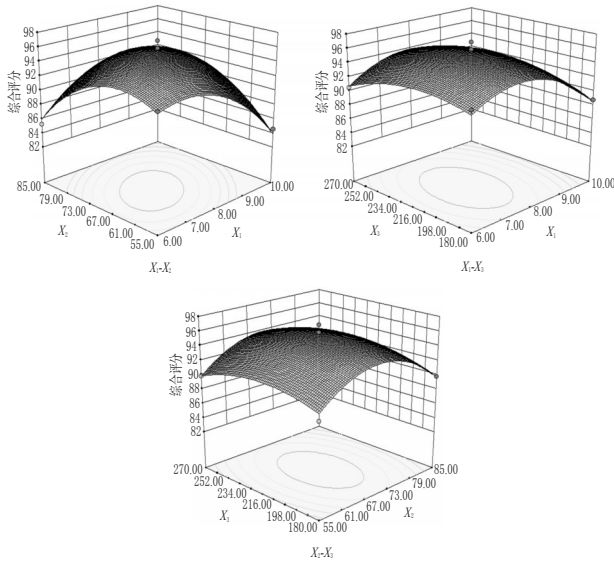


图3 3种因素对综合评分的响应面图

Fig 3 Response surface plot of 3 factors on comprehensive score

经过中心组合设计优化提取条件,得到最优工艺条件为加液倍量8.02、乙醇体积分数69.42%、回流提取时间203.20 min、提取2次。

2.5.2 验证试验 采用上述最优提取工艺预测咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸和浸出物的得率分别为1.75%、3.98%、25.80%、19.07%,综合得分95.36。考虑试验条件的可操作性,调整加液倍量为8、乙醇体积分数为70%、回流提取时间为200 min、提取2次。精密平行称定3份升麻粉末各10.0 g,按此调整后工艺提取进行验证试验,结果平均综合评分为93.26,与预测值相比较,相对偏差为2.20% (<5%)。

为了适应工业生产,本课题组考虑到提取工艺的可靠性问题,又精密平行称定3份升麻粉末各200.0 g,按照上述优化提取工艺进行对比研究,结果平均综合评分93.67,与预测值相比较,相对偏差1.70%。因此,响应面法优化得到的升麻回流提取法的工艺参数准确、可靠,具有一定的实际指导意义。

3 讨论

在选择药材样本量时,根据本试验设计方案的要求,考虑到前期单因素考察或正式试验时若样本量大则耗时较长。为了减少试验误差,使结果在短期时间内具有可比性,经文献查阅后确定采用10 g药材粉末进行相关试验。

本试验先设计了单因素试验,通过单因素试验的初步筛选结果使各因素水平在星点设计范围之内,以提高星点设计的精确性。

升麻作为我国的传统中药,资源十分丰富,但是对比其他传统中药,临床应用尚少。目前,炎症一直是困扰医学界的难题,中药抗炎成为了新药开发的热点,也是中医药现代研究极为活跃的领域。近年来经国内外研究,升麻具有较强的抗炎活性,其作用除了与酚酸成分有关外,也可能还与某种皂苷类成分有关^[10-11]。本试验通过采用Box-Behnken的星点设计-响应面法,以酚酸类成分等的综合评分为参考指标,对所选取指标进行了合理的权重系数分配,使得结合有浸出物得率为指标的综合评分评价提取工艺更加合理,优化了升麻中酚酸类成分的提取工艺条件,为其作为一种抗炎药物的制剂生产提供了一定的参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:73-74.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第3册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:175-181.
- [3] 杨洋,吴程彦,严明明,等.大三叶升麻化学成分及开发利用研究进展[J].中国药房,2015,26(34):4 865.
- [4] 赵晓宏,陈迪华,斯建勇,等.中药酚酸类化学成分的研究[J].药学学报,2002,37(7):535.
- [5] 杨九凌,祝晓玲,李成文,等.咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J].中国药学杂志,2013,48(8):577.
- [6] 欧仕益,包惠燕.阿魏酸及其衍生物的药理作用研究进展[J].中药材,2001,24(3):220.
- [7] 靳波,刘友平,彭月,等.多指标正交试验优选升麻提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(6):27.
- [8] 黄贵平,李存玉,李红阳,等.升麻中酚酸类成分提取工艺优选[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(4):50.
- [9] 邱宏聪,刘布鸣.星点设计-效应面法优选岗松总黄酮提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):46.
- [10] Moon L, Ha YM, Jang HJ, et al. Isoimperatorin, cimiside E and 23-O-acetylshengmanol-3-xyloside from Cimicifugae rhizome inhibit TNF- α -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells: involvement of PPAR- γ upregulation and PI3K, ERK1/2, and PKC signal pathways[J]. *J Ethnopharma*,2011,133(2):336.
- [11] Mun L, Jun MS, Kim YM, et al. 7, 8-didehydrocimigenol from Cimicifugae rhizoma inhibits TNF- α -induced VCAM-1 but not ICAM-1 expression through upregulation of PPAR- γ in human endothelial cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*,2011,49(1):166.

(收稿日期:2015-11-17 修回日期:2016-01-19)

(编辑:刘 萍)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅