

正交试验-多指标归一化法优化凤丹皮水提工艺^Δ

王 培^{1*},赵宏苏¹,吴德玲^{1#},许凤清¹,张 伟¹,龙全江²,方成武³(1.安徽中医药大学药学院,合肥 230012;2.安徽中医药高等专科学校药理学系,安徽 芜湖 241000;3.安徽省中医药科学院亳州中医药研究所,安徽 亳州 236800)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0361-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.17

摘 要 目的:优化凤丹皮水提工艺。方法:采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以凤丹皮中8个成分没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚的峰面积百分比和浸膏率经归一化法后的综合评分为考察指标,对凤丹皮水提工艺的药材浸泡时间、料液比、提取时间、提取次数进行优化,并进行验证试验。结果:最优水提工艺为加20倍水,浸泡药材1 h,提取2次、每次2 h。验证试验结果中,3次试验的综合评分分别为65.98、68.85、69.25,各指标的RSD均小于5%($n=3$)。结论:建立的综合评分方法能较全面地反映凤丹皮的相对有效成分含量,以此优化得到的提取工艺合理、可行。

关键词 凤丹皮;多指标;归一化法;正交试验;提取工艺;优化

Optimization of Water Extraction Technology of Feng-Moutan Cortex by Orthogonal Test-Multiple-index Normalization Method

WANG Pei¹, ZHAO Hongsu¹, WU Deling¹, XU Fengqing¹, ZHANG Wei¹, LONG Quanjian², FANG Chengwu³
(1.College of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230012, China; 2.Dept. of Pharmacy, Anhui College of TCM, Anhui Wuhu 241000, China; 3.Bozhou Institute of TCM Research, Anhui Academy of TCM, Anhui Bozhou 236800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize water extraction technology of Feng-Moutan Cortex. METHODS: $L_9(3^4)$ orthogonal design was used to optimize soaking time, solid-liquid ratio, extraction time and extraction times in water extraction technology of Feng-Moutan Cortex using comprehensive scores for the peak area percentage and extract yield of 8 ingredients in Feng-Moutan Cortex as gallic acid, paeoniflorin, catechin, paeoniflorin, benzoic acid, benzoyloxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin and paeonol after normalization as indexes. Verification test was conducted. RESULTS: The optimal water extraction technology was that 20-fold water, soaking for 1 h, extracting twice, 2 h each time. Results of verification test showed that comprehensive scores of 3 times of tests were 65.98, 68.85 and 69.25, respectively. RSDs of each index were lower than 5% ($n=3$). CONCLUSIONS: Established comprehensive scoring method can reflect the relative contents of effective components in Feng-Moutan Cortex comprehensively, so that optimized extraction technology is reasonable and feasible.

KEYWORDS Feng-Moutan Cortex; Multiple-index; Normalization method; Orthogonal test; Extraction technology; Optimization

牡丹皮为毛茛科植物牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的干燥根皮,具有清热凉血、活血化瘀之功效,主要用于温毒发斑、吐血、夜热早凉、无汗骨蒸、经闭痛经等症^[1]。牡丹皮在我国主要分布于安徽铜陵、南陵、亳州、青阳,重庆垫江,甘肃榆中以及四川、山东、陕西、湖南等地。传统认为铜陵凤凰山、南陵丫山为丹皮的道地产区,该产区牡丹皮被称为凤丹皮^[2]。本研究以道地药材凤丹皮为研究对象,采用正交试验设计凤丹皮水提工

艺,选定没食子酸、氧化芍药苷、儿茶素、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚等8个成分的面积百分比和浸膏率为评价指标^[3],采用峰面积归一化法对多指标的正交试验结果进行评分,筛选最优水提工艺。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-CLASS超高效液相色谱系统,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);PALL Cascada II.I超纯水一体化系统(颇尔过滤器(北京)有限公司);WL-100打粉机(瑞安市威力制药机械厂);EX125DZHW十万分之一天平(美国奥豪斯仪器有限公司);DZF-6050真空干燥箱(上海光都仪器设备有限公司);HH数显恒温水浴锅(常州国宇仪器

Δ 基金项目:安徽省2015年公益性技术应用研究联动计划(No.15011d04001);安徽高校自然科学研究项目(No.KJ2016A854);安徽道地中药材品质提升协同创新中心项目(No.2014XTCX005)

*硕士研究生。研究方向:中药质量标准。电话:0551-68129133。E-mail:peiwang93712@163.com

#通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药活性成分、中药质量评价、中药新药研究与开发。电话:0551-68120166。E-mail:dl-wu7375@sina.com

制造有限公司)。
1.2 药材、对照品与试剂

风丹皮于2016年10月采自铜陵凤凰山,经安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定为毛茛科植物4年生牡丹的根皮;没食子酸(批号:GZDD-0128)、儿茶素(批号:GZDD-0073)、芍药苷(批号:0736-200015)、苯甲酰氧化芍药苷(批号:GZDD-1655)、苯甲酸(批号:GZDD-0182)、苯甲酰芍药苷(批号:GZDD-0758)对照品均购于贵州迪大生物科技有限责任公司,纯度均大于98%;氧化芍药苷对照品(批号:16021505,纯度:99.93%)由北京恒元启天化工技术研究所提供;丹皮酚对照品(安徽中医药大学天然药物化学实验室制,批号:2016-11,纯度:>99%,经峰面积归一化法计算);乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的前处理

风丹皮药材采集后清洗去除泥沙,除去细根,剥取根皮,晒干,于48℃以下干燥^[4],粉碎,过4号筛备用。

2.2 多成分峰面积百分比测定方法的建立

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定各对照品没食子酸4.02 mg、氧化芍药苷5.05 mg、儿茶素1.47 mg、芍药苷5.53 mg、苯甲酸2.93 mg、苯甲酰氧化芍药苷1.76 mg、苯甲酰芍药苷1.01 mg、丹皮酚2.47 mg,分别加入50%甲醇溶解,定容至10 mL量瓶中,制成对照品贮备液。精密吸取各对照品贮备液适量,置于10 mL量瓶中,制成上述8种成分质量浓度分别为40.2、50.5、28.4、110.6、58.6、35.2、22.0、123.5 μg/mL的混合对照品溶液。

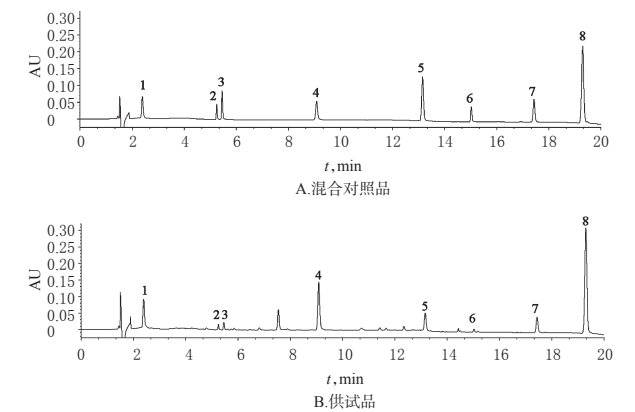
2.2.2 供试品溶液的制备 取风丹皮药材粉末10 g,精密称定9份,根据正交试验进行回流提取,每次提取后过滤,合并滤液,定容至100 mL量瓶中。吸取5 mL,用甲醇定容至25 mL量瓶中,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得各提取液的供试品溶液。另量取提取液50 mL经浓缩后真空干燥至恒质量,称取浸膏量,供测定浸膏率用。

2.2.3 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相:乙腈(A)-0.02%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~1 min,8~15% A;1~8 min,15%~18% A;8~10 min,18%~30% A;10~15 min,30%~35% A;15~20 min,35%~85% A);流速:0.15 mL/min;进样体积:2 μL;柱温:30℃;检测波长:230 nm。按上述色谱条件,取“2.2.1”“2.2.2”项下混合对照品溶液和供试品溶液(正交试验中7号)进样分析,结果各成分色谱峰及与相邻峰间的分离度均大于1.5。色谱图见图1。

2.2.4 精密度试验 取风丹皮10 g,精密称定。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,重复进样6次,记录色谱图。结果,各成分峰面积的RSD均小于2.75%(n=6),表明本试验精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取同批风丹皮药材6份,每份10 g。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,记录

色谱图。结果,各成分峰面积的RSD均小于3.03%(n=6),表明本试验重复性良好。



1.没食子酸;2.氧化芍药苷;3.儿茶素;4.芍药苷;5.苯甲酸;6.苯甲酰氧化芍药苷;7.苯甲酰芍药苷;8.丹皮酚
1. gallic acid; 2. paeoniflorin; 3. catechin; 4. paeoniflorin; 5. benzoic acid; 6. benzoyloxypaeoniflorin; 7. benzoylpaeoniflorin; 8. paeonol

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(正交试验7号),分别在放置0、2、4、8、10、12、24 h进样测定。结果,各成分峰面积的RSD均小于2.33%(n=7),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3 正交试验风丹皮优化水提工艺

2.3.1 因素与水平 采用L₉(3⁴)正交试验对风丹皮水提工艺进行优化^[5-7]。经前期预试验后,选择水提工艺的4个影响因素:药材浸泡时间(A,h)、料液比(B,g/mL)、提取时间(C,h)及提取次数(D)进行考察,建立4因素3水平表,详见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(药材浸泡时间),h	B(料液比),g/mL	C(提取时间),h	D(提取次数)
1	0.5	1:10	0.5	1
2	1	1:20	1	2
3	2	1:40	2	3

2.3.2 指标计算 将8个成分峰面积百分比(各成分峰面积占有有效成分总峰面积的百分比)的权重系数分别设定为10,浸膏率权重系数设定为20,各项指标通过百分制评价^[7-8],归一化处理后,得到综合评分(P_j)。归一化方程^[9]为:R_{ij}=(F_{ij}-F_{imin})/(F_{imax}-F_{imin})。式中,R_{ij}为第i个指标、第j次试验的峰面积百分比归一化值;F_{ij}为第i个指标、第j次试验峰面积百分比;F_{imax}、F_{imin}为第i个指标峰面积百分比的最大值和最小值;i为评价指标,i=1、2、3……8,j为试验次数,j=1、2、3……9。E_j=(N_j-N_{jmin})/(N_{jmax}-N_{jmin}),式中E_j为浸膏率的归一化值,N_j表示第j次试验中的浸膏率。P_j=10× $\sum_{i=1}^8 R_{ij}$ +20×E_j。

2.3.3 试验方案与结果 选择L₉(3⁴)正交试验,采用多指标归一化-加权法对数据进行处理,各试验中8个成分

峰面积百分比及浸膏率测定结果见表2,正交试验方案及综合评分结果见表3,方差分析结果见表4。

表2 正交试验中8个成分的峰面积百分比及浸膏率(%)

Tab 2 Peak area percentage and extract yield of 8 chemical ingredients in orthogonal test(%)

试验号	峰面积百分比								浸膏率
	没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药苷	苯甲酸	苯甲酰氧化芍药苷	苯甲酰芍药苷	丹皮酚	
1	3.99	3.11	3.49	12.32	1.04	0.61	4.50	9.47	13.04
2	4.02	1.91	3.25	8.64	0.82	0.66	5.11	8.19	46.03
3	3.11	2.66	2.17	10.92	0.96	0.62	4.86	2.93	57.85
4	3.64	2.53	3.10	11.41	1.32	0.63	4.76	6.56	48.53
5	5.53	2.71	2.43	14.23	1.47	0.74	5.62	3.01	38.91
6	2.74	2.24	2.51	11.80	1.29	0.63	4.96	2.76	45.13
7	5.70	1.89	2.81	8.85	1.56	0.61	4.42	11.88	46.27
8	4.05	1.98	2.91	9.79	0.74	0.71	4.84	4.89	51.16
9	3.08	1.75	2.19	9.02	0.94	0.53	4.61	10.43	33.17

表3 正交试验方案及综合评分结果

Tab 3 Orthogonal test design and results of comprehensive scoring

试验号	A(药材浸泡时间),h	B(料液比),g/mL	C(提取时间),h	D(提取次数)	综合评分(P _i)
1	0.5	1:10	0.5	1	46.30
2	0.5	1:20	1	2	47.28
3	0.5	1:40	2	3	42.84
4	1	1:10	1	3	55.46
5	1	1:20	2	1	69.18
6	1	1:40	0.5	2	42.12
7	2	1:10	2	2	54.90
8	2	1:20	0.5	3	51.03
9	2	1:40	1	1	23.39
K ₁	136.42	156.66	139.45	138.87	
K ₂	166.76	167.48	126.13	144.30	
K ₃	129.32	108.36	166.92	149.33	
R	37.43	59.12	40.79	10.46	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	263.63	2	131.816	14.450	
B	660.965	2	330.483	36.229	<0.05
C	288.427	2	144.214	15.809	
D(误差)	18.244	2	9.122		

注: F_{0.05}(2,2)=19.00; F_{0.01}(2,2)=99.00

Note: F_{0.05}(2,2)=19.00; F_{0.01}(2,2)=99.00

由表3、表4可见,各因素影响大小依次为B>C>A>D,即料液比>提取时间>药材浸泡时间>提取次数。方差分析结果显示,料液比在风丹皮提取过程中有显著影响。由结果来看,虽以A₂B₂C₃D₃为最优组合,但D因素的第2、3水平之间的差距较小,即增加提取次数也不会大幅度地提高指标得分,反而只会增加能耗、浪费时间,故从经济环保、节约成本的方面考虑,最终确定风丹皮的最优水提工艺为A₂B₂C₃D₂,即药材浸泡1 h,加入20倍体积的水,提取2次、每次2 h。

2.4 验证试验

称取风丹皮药材3份,每份精密称定100 g,置于圆底烧瓶中,加入2 L纯水,浸泡1 h,加热回流提取2次,每

次2 h。结果,3次试验8个成分峰面积百分比及浸膏率的RSD均小于5%(n=3),表明优化的水提工艺可行、稳定,结果见表5。

表5 验证试验结果(n=3)

Tab 5 Results of verification tests(n=3)

序号	峰面积百分比, %								浸膏率, 综合评分(P _i)	
	没食子酸	氧化芍药苷	儿茶素	芍药苷	苯甲酸	苯甲酰氧化芍药苷	苯甲酰芍药苷	丹皮酚	%	分(P _i)
1	3.77	2.88	3.18	11.53	1.26	0.67	4.87	8.72	53.54	65.98
2	3.92	2.87	3.22	11.27	1.23	0.72	4.93	9.33	52.24	68.85
3	3.84	2.97	3.16	11.44	1.34	0.71	4.96	9.48	49.56	69.25
RSD, %	1.95	1.89	0.96	1.16	4.45	3.78	0.93	4.39	3.92	2.62

3 讨论

风丹皮中含有多种化学成分,其主要化学成分为酚及酚苷类、单萜及其苷类、有机酸类、黄酮类等^[10-11]。其中丹皮酚属于酚及酚苷类,芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷属于单萜及其苷类,没食子酸、苯甲酸属于有机酸类,儿茶素属于黄酮类。药理研究发现:酚及酚苷类中的丹皮酚具有降血糖、抗炎、抗过敏及免疫调节等作用,单萜及其苷类中的芍药苷具有抗血小板聚集、降血压、调节血脂、镇静、镇痛、抗炎等作用。有机酸类成分具有抗炎、抑制血小板聚集、抗氧化等作用^[112-13],黄酮类成分具有抑制酪氨酸酶、高级糖化物终末产物(AGES)的产生等作用^[14]。目前在牡丹皮提取工艺研究中,有的选取丹皮总酚作为指标性成分,有的选取总苷单体作为指标性成分,有的选取总黄酮作为指标性成分等^[15-17]。以上试验中提取工艺的优化在指标选择上都存在一定局限性,故笔者将具有明确药理活性的酚及酚苷类成分、单萜及其苷类成分、有机酸类成分、黄酮类成分同时作为优选风丹皮提取工艺的评价指标,并结合浸膏率,可在一定程度上保证风丹皮提取工艺的合理性,并且能够较全面地反映药材的质量,使其在临床使用时具有更好的药物作用效果。

本试验以风丹皮中8个活性成分和浸膏率为考察指标,优化水提工艺,有利于兼顾各指标的综合效应,符合中药化学成分复杂的特点。同时为减少8个成分含量测定工作的烦琐,运用多指标归一化法对数据进行处理并建立了正交试验评价指标公式。本试验建立的提取工艺方法简单、快速,可为中药有效成分的提取评价提供一定的参考。

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, 2015:172.

[2] 侯宇荣, 刘炜, 郑艳. 安徽南陵丫山产牡丹皮的道地性研究[J]. 中药材, 2014, 37(8):1488-1491.

[3] 范旭航, 马天成, 沈旭, 等. UPLC法测定不同产地不同部位牡丹皮中6种活性成分[J]. 中成药, 2012, 34(2):317-320.

[4] 胡云飞, 徐倩, 徐国兵, 等. 牡丹皮炒制前后 UPLC 特征指纹图谱比较[J]. 中国药房, 2015, 26(6):800-802.

[5] 王立, 侯世祥, 胡平, 等. 牡丹皮药材的最适提取工艺研究

当归根、茎中总黄酮的提取工艺优化^Δ

罗旭东*,李成义#,李 旭,强正泽,冯晓莉,王明伟,李 硕,王 燕(甘肃中医药大学药学院,兰州 730000)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0364-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.18

摘要 目的:优化当归根、茎中总黄酮的提取工艺。方法:以提取溶剂乙醇的体积分数、料液比、提取时间、提取次数等为考察因素,以提取液中总黄酮含量为评价指标,在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化当归根、茎中总黄酮的回流提取工艺。结果:当归根、茎中总黄酮最优提取工艺分别为乙醇体积分数 70%、50%,料液比 1:40、1:30,提取时间 1.3、1.7 h,均提取 2 次;验证试验中总黄酮含量分别为 7.253 6、25.144 1 mg/g(RSD=1.57%、1.49%, $n=3$),与模型预测值(6.942 8、25.703 5 mg/g)的相对误差分别为 4.28%、2.24%。结论:优化后的当归根、茎中总黄酮的提取工艺方法简单,重现性和可预测性较好。
关键词 当归;根;茎;总黄酮;单因素试验;Box-Behnken 设计;响应面法;回流提取;工艺优化

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from the Roots and Stems of *Angelica sinensis*

LUO Xudong, LI Chengyi, LI Xu, QIANG Zhengze, FENG Xiaoli, WANG Mingwei, LI Shuo, WANG Yan
(School of Pharmacy, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize reflux extraction technology of total flavonoids from the roots and stems of *Angelica sinensis*. METHODS: The reflux extraction technology of total flavonoids from the roots and stems of *A. sinensis* was optimized by Box-Behnken design-response methodology based on single factor test using volume fraction of extraction solvent ethanol, solide-liquid ration, extraction time, extraction times as investigation factors, the content of total flavonoids in extract as evaluation index. RESULTS: The optimal extraction technology of total flavonoids from the roots and stems of *A. sinensis* was that volume fractions of ethanol were 70% and 50%; solid-liquid ratios were 1:40 and 1:30; extraction time were 1.3 h and 1.7 h; The number of extraction times is two times. In verification test, the contents of total flavonoids were 7.253 6, 25.144 1 mg/g (RSD=1.57%, 1.49%, $n=3$); relative errors of those to predicted value (6.942 8, 25.703 5 mg/g) were 4.28%, 2.24%. CONCLUSIONS: Optimized extraction technology for total flavonoids from the roots and stems of *A. sinensis* is simple, reproducible and predictable.
KEYWORDS *Angelica sinensis*; Roots; Stems; Total flavonoids; Single factor test; Box-Behnken design; Response methodology; Reflux extraction; Technology optimization

[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8):569-571.

[6] 孟庆胜, 祖元刚, 王化, 等. 牡丹种皮中芍药苷和丹皮酚的优化提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(17):68-71.

[7] 郑礼娟, 秦昆明, 蔡皓, 等. 多指标正交试验优选白术芍药散提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10):1504-1509.

[8] 张星海, 李媛, 秦昆明, 等. 多指标正交试验优化菊花提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6):821-824.

[9] 梁苗苗, 林强, 王洋. 运用多指标数据归一化加权法综合评价我国护理期刊的学术影响力[J]. 护理学杂志, 2011, 26(21):88-90.

[10] 曹春泉. 牡丹皮的化学成分研究进展[J]. 广州化工, 2013, 41(12):44-45.

[11] 范旭航, 马天成, 沈旭, 等. UPLC 法测定不同产地不同部位牡丹皮中 6 种活性成分[J]. 中成药, 2012, 34(2):317-320.

[12] 王祝举, 唐力英, 赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用[J]. 现代药物与临床, 2006, 21(4):155-159.

[13] 汤喜兰, 刘建勋, 李磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):243-246.

[14] DING HY, LIN HC, CHANG TS. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa*[J]. *Int J Cosmetic Sci*, 2010, 32(2):162-162.

[15] 徐金龙, 张红梅, 徐秀泉. 响应面设计法优化牡丹皮中总酚的提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(34):19295-19297.

[16] 王艳华, 吴德玲, 刘劲松, 等. 牡丹皮中丹皮总苷的提取工艺研究[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(2):69-71.

[17] 徐金龙, 张红梅, 徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(27):2536-2538.

(收稿日期:2017-06-07 修回日期:2017-11-06)
(编辑:刘 萍)

Δ 基金项目:2016 年甘肃省中医药管理局科研立项项目(No. G2k-2016-34)
* 硕士研究生. 研究方向:中药鉴定与品质评价. 电话:0931-8765385. E-mail:2455008357@qq.com
通信作者:教授, 博士生导师. 研究方向:中药品种与质量研究. 电话:0931-8765385. E-mail:gslichengyi@163.com