

Box-Behnken设计-响应面法优化山楂的醇沉工艺^Δ

万丹娜^{1*}, 饶倩如¹, 俞梦莹¹, 刘荣华¹, 权赫秀², 杨明¹, 邵峰^{1#}(1.江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 2.江西中医药大学基础医学院, 南昌 330004)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2078-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.14

摘要 目的:优化山楂的醇沉工艺,为含山楂制剂生产过程中的质量控制提供参考。方法:通过Plackett-Burman设计考察搅拌速度、加醇速度、醇沉时间、加入乙醇体积分数、醇料比、醇沉前浓缩液密度和静置温度等工艺参数对山楂总黄酮保留率的影响,然后采用Box-Behnken响应面法对关键工艺参数进行优化,并进行验证试验。结果:山楂醇沉关键工艺参数最优值为醇沉前浓缩液密度1.04 g/mL、醇料比2.86:1(mL/g)、搅拌速度185 r/min。经验证,最优工艺参数下山楂总黄酮平均保留率为89.74%($n=3$),与预测值91.40%的相对误差为1.85%。结论:运用Box-Behnken响应面法优化了山楂的醇沉工艺,该法简单、可行。

关键词 山楂;醇沉工艺;总黄酮;Plackett-Burman设计;Box-Behnken响应面法

Optimization of Ethanol Precipitation Technology of *Crataegus pinnatifida* by using Box-Behnken Design-Response Surface Methodology

WAN Danna¹, RAO Qianru¹, YU Mengying¹, LIU Ronghua¹, QUAN Hexiu², YANG Ming¹, SHAO Feng¹(1.Key Lab of Modern TCM Preparation, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2.School of Basic Medical Science, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ethanol precipitation technology of *Crataegus pinnatifida* and provide reference for the production process control of *C. pinnatifida* preparation. METHODS: Plackett-Burman design was used to investigate the effects of technology parameters on retention rate of total flavonoids of *C. pinnatifida*, such as stirring speed, flow speed of ethanol, ethanol precipitation time, ethanol volume fraction, ethanol-solid ratio, density of concentration liquid before ethanol precipitation and static temperature. Box-Behnken response surface methodology was used to optimize critical technology parameters, and validation test was also conducted. RESULTS: The optimal key parameters for ethanol precipitation technology of *C. pinnatifida* included density of concentration liquid before ethanol precipitation 1.04 g/mL, ethanol-solid ratio 2.86:1(mL/g), stirring speed 185 r/min. After validation, under the optimal technology parameters, average retention rate of total flavonoids of *C. pinnatifida* was 89.74% ($n=3$), relative error of which to predicted value 91.40% was 1.85%. CONCLUSIONS: Box-Behnken response surface methodology optimize ethanol precipitation technology of *C. pinnatifida*. It is simple and feasible.

KEYWORDS *Crataegus pinnatifida*; Ethanol precipitation technology; Total flavonoid; Plackett-Burman design; Box-Behnken response surface methodology

山楂为蔷薇科山楂属植物山里红(*Crataegus pinnatifida* Bge var. major N.E.Br.)或山楂(*Crataegus pinnatifida* Bge.)的干燥成熟果实,味酸、甘,性微温,归脾、胃、肝经,具有消食健胃、行气散瘀之功效^[1]。山楂含黄酮类、有机酸类、三萜类及氨基酸类等多种化学成分^[2],其中黄酮类成分在抗心肌缺血再灌注损伤^[3]、降血脂^[4]及

抗肿瘤^[5]等方面均具有显著的生物活性。益心舒片(丸、颗粒、胶囊)以及银丹心脑通软胶囊、荷丹片等含山楂复方制剂广泛用于治疗冠心病、心绞痛、高血脂等疾病,且上述复方提取物在制剂生产过程中均采用醇沉除杂技术,以实现在确保疗效的同时减小服用量。然而,目前在醇沉操作过程中长期依赖主观经验,生产企业按各自对制剂“制法”的理解进行工艺参数设定,缺乏科学系统的研究^[6]。

近年来,响应面法因其具有试验次数少、精度高、预测值精准等优点,已广泛应用于丹参^[7]、党参^[8]、六味地黄方^[9]及热毒宁注射液中金银花和青蒿(金青)^[10]等醇沉除杂工艺优化中,并取得了良好的效果。故本研究拟以山楂总黄酮保留率作为考察指标,首先通过Plackett-Burman设计试验确定搅拌速度、醇料比、醇沉前浓缩液密度等工艺参数,再运用Box-Behnken设计响应面法对山

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260638);江西省自然科学基金资助项目(No.20161BAB205220);江西省卫生和计划生育委员会中医药科技计划项目(No.2016A053);江西省教育厅科学技术研究项目(No.GJJ170706);江西省研究生创新专项资金项目(No.YC2016-B079);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(No.JZYC16B02)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: vanwell1230@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:中药质量评价。E-mail: shaofeng0729@163.com

楂醇沉关键工艺参数进一步优化,为含山楂制剂醇沉工艺参数的科学设定提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);BT100S型蠕动泵(保定弗雷流体科技有限公司);JJ-3型恒温电动搅拌器(常州国华电器有限公司);BT 124S型万分之一电子分析天平、BT 25S型十万分之一电子分析天平[德国赛多利斯(北京)科技有限公司]。

1.2 药品与试剂

山楂药材于2016年10月采自山东沂蒙山区,经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定为山里红的干燥成熟果实;芦丁对照品(批号:100396-200301,纯度:98%)购于中国食品药品检定研究院;其余试剂均为分析纯,水为自制双蒸水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 山楂供试品溶液 称取2.3 kg的山楂药材,与水按1:8的比例回流提取2次,每次2 h,滤过,合并滤液并减压浓缩,得到山楂浓缩液。将山楂浓缩液置于烧杯中,在搅拌的同时,根据试验设计中的醇料比匀速加入乙醇溶液,静置,滤过,得醇沉上清液。取一定量的醇沉上清液减压旋干,用30%乙醇溶解并定容于10 mL量瓶中,备用。

2.1.2 芦丁对照品溶液 精密称取芦丁对照品4.91 mg,置于10 mL量瓶中,加入30%乙醇溶解并定容至刻度,得质量浓度为0.491 mg/mL的对照品溶液。

2.2 线性关系考察

2.2.1 总黄酮含量检测波长的选择 精密吸取一定量的芦丁对照品溶液和山楂供试品溶液于不同10 mL量瓶中,加入5% NaNO₂溶液0.3 mL,摇匀,静置5 min;加入10% Al(NO₃)₃溶液0.3 mL,摇匀,静置5 min,然后加入4% NaOH溶液4.0 mL,最后用30%乙醇定容至刻度,静置15 min。以相应试剂做空白,按文献方法^[11-12]显色后,于300~800 nm波长下扫描。结果表明,溶液吸光度在508 nm波长处较大且无干扰,故选择508 nm为测定总黄酮含量的检测波长。紫外-可见光谱图见图1。

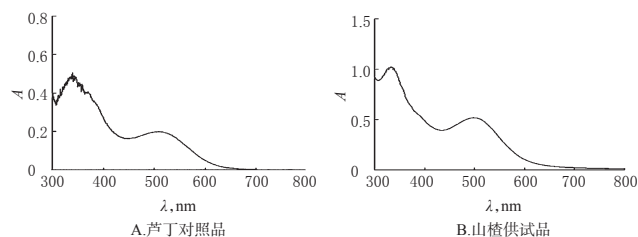


图1 紫外-可见光谱图

Fig 1 UV-visible spectrograms

2.2.2 标准曲线的绘制及线性范围考察 分别精密吸取0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL芦丁对照品溶液于10 mL量瓶中,按“2.2.1”项下方法处理后,采用紫外-可见分光

光度计测定各样品在508 nm波长处的吸光度。以芦丁对照品溶液的质量浓度为横坐标(x)、吸光度为纵坐标(y)绘制标准曲线,得到回归方程为 $y=9.430 6x-0.0146$ ($r=0.999 6$),芦丁检测质量浓度线性范围为0.014 73~0.044 19 mg/mL。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密性 精密吸取“2.1.2”项下芦丁对照品溶液0.6 mL,按照“2.2.2”项下方法操作测定吸光度,重复测定6次。结果,吸光度的RSD为0.106% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.3.2 重复性 按照“2.1.1”项方法平行制备6份山楂供试品溶液,按照“2.2.2”项下方法操作测定吸光度。结果,吸光度的RSD为1.08% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性 精密吸取山楂供试品溶液适量,按照“2.2.2”项下方法操作,考察室温条件下放置120 min内的稳定性(每20 min测定1次)。结果,吸光度的RSD为2.64% ($n=7$),表明山楂供试品溶液在室温条件下放置120 min稳定性良好。

2.3.4 加样回收率 精密称取已知总黄酮含量的山楂药材10.0 g,共6份,分别按“2.1.1”项下方法制备山楂供试品溶液。精密吸取一定量的山楂供试品溶液于10 mL量瓶中,分别加入一定量的芦丁对照品溶液,按照“2.2.2”项下方法操作后测定吸光度,并计算加样回收率。结果,平均加样回收率为95.8%,RSD为2.80% ($n=6$),表明方法准确度较好。

2.4 总黄酮含量的测定

取“2.1.1”项下山楂供试品溶液适量,按“2.2.2”项下方法处理后,分别测定醇沉前浓缩液和醇沉上清液中总黄酮含量,计算总黄酮保留率:总黄酮保留率(%)=醇沉上清液中总黄酮含量/醇沉前浓缩液中总黄酮含量×100%。

2.5 Plackett-Burman 试验筛选条件

以总黄酮保留率为考察指标,采用Plackett-Burman试验对影响醇沉工艺的因素——搅拌速度(A)、加醇速度(B)、醇沉时间(C)、加入乙醇体积分数(D)、醇料比(E)、醇沉前浓缩液密度(F)及静置温度(G)等进行筛选,确定主要影响因素。根据前期单因素试验结果,每个因素设计高、低两个水平,分别以1、-1表示。因素与水平见表1,试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 Plackett-Burman 试验设计的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiment design

因素	水平	
	1	-1
A(搅拌速度),r/min	100	250
B(加醇速度),mL/min	15	25
C(醇沉时间),h	12	24
D(加入乙醇体积分数),%	85	90
E(醇料比),mL/g	1.7:1	3.0:1
F(醇沉前浓缩液密度),g/mL	1.05	1.15
G(静置温度),℃	5	25

根据表2结果,通过Minitab 17.0软件对各因素与总黄酮保留率的关系进行拟合,得到回归方程为: $[Y(\text{总黄酮保留率}(\%))] = 75.33 + 4.73A - 2.16B - 1.45C - 1.23D + 4.63E - 12.32F - 0.73G$ ($R^2 = 0.9599$),模型的 $P < 0.05$,表明回归方程拟合度好且具有统计学意义。由表3可知,A、E、F 3个因素对总黄酮保留率均有显著影响($P < 0.05$),影响大小依次为 $F > A > E$,其他因素的影响则不显著($P > 0.05$)。故确定搅拌速度、醇料比、醇沉前浓缩液密度3个因素为山楂醇沉的关键工艺参数。

表2 Plackett-Burman设计试验与结果

Tab 2 Plackett-Burman experiment design and results

序号	因素							总黄酮保留率, %
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	62.64
2	-1	1	1	1	-1	1	1	45.89
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	87.27
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	86.65
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	55.66
6	-1	-1	-1	1	1	1	-1	64.32
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	80.77
8	1	1	1	-1	1	1	-1	75.87
9	1	-1	-1	-1	1	1	1	73.73
10	1	1	-1	1	1	-1	1	94.21
11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	86.11
12	-1	-1	1	1	1	-1	1	90.89

表3 Plackett-Burman设计试验的方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance for Plackett-Burman experiment

项目	离均差平方和	自由度	均方	F	P
模型	2 451.49	7	350.21	13.68	0.012
A	268.19	1	268.19	10.47	0.032
B	55.89	1	55.89	2.18	0.214
C	25.10	1	25.10	0.98	0.378
D	18.26	1	18.26	0.71	0.446
E	257.31	1	257.31	10.05	0.034
F	1 820.40	1	1 820.40	71.09	0.001
G	6.36	1	6.36	0.25	0.644
残差	102.43	4	25.61		
总离差	2 553.92	11			

2.6 Box-Behnken设计-响应面法优化关键工艺因素

2.6.1 试验设计与结果 在Plackett-Burman试验研究基础上,以总黄酮保留率为考察指标,运用Box-Behnken设计-响应面法进一步对搅拌速度(X_1)、醇料比(X_2)和醇沉前浓缩液密度(X_3)这3个关键工艺参数进行优化。通过Design-Expert 8.0软件得到15个试验点的响应面分析试验,每个因素共设计高、中、低3个水平,分别用1、0、-1表示。因素与水平见表4,试验设计与结果见表5,方差分析结果见表6。

通过Design-Expert 8.0软件对表5结果进行分析,得到各因素与总黄酮保留率($Y, \%$)之间的回归拟合方程为: $Y = 2.04X_1 + 5.67X_2 - 12.19X_3 - 1.94X_1X_2 - 0.012X_1X_3 + 1.01X_2X_3 - 2.08X_1^2 - 2.08X_2^2 - 0.90X_3^2 + 78.15$ ($R^2 = 0.9599$)。由表6可知,该模型的 $P < 0.01$,表明回归方程拟合度好且具有统计学意义。模型失拟项的 $P >$

表4 Box-Behnken设计的因素与水平

Tab 4 Factors and levels of Box-Behnken experiment design

因素	水平		
	-1	0	1
X_1 (搅拌速度), r/min	150	200	250
X_2 (醇料比), mL/g	1.7:1	2.35:1	3.0:1
X_3 (醇沉前浓缩液密度), g/mL	1.04	1.07	1.10

表5 Box-Behnken设计的安排与结果

Tab 5 The arrangement and results of Box-Behnken design

序号	因素			总黄酮保留率, %
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	63.92
2	-1	0	1	62.74
3	0	0	0	77.85
4	1	1	0	78.74
5	0	1	1	68.43
6	0	0	0	77.19
7	1	0	1	65.83
8	-1	1	0	77.57
9	0	1	-1	93.38
10	0	0	0	79.41
11	1	-1	0	72.84
12	1	0	-1	87.63
13	-1	0	-1	84.49
14	0	-1	1	53.49
15	0	-1	-1	82.49

表6 Box-Behnken设计试验的方差分析结果

Tab 6 Analysis of variance for Box-Behnken design

项目	离均差平方和	自由度	均方	F	P
模型	1 541.46	9	171.27	37.45	0.000 5
X_1	33.27	1	33.27	7.27	0.042 9
X_2	257.56	1	257.56	56.31	0.000 7
X_3	1 188.48	1	1 188.48	259.84	<0.000 1
X_1X_2	15.02	1	15.02	3.28	0.129 7
X_1X_3	5.736×10^{-4}	1	5.736×10^{-4}	1.254×10^{-4}	0.991 5
X_2X_3	4.12	1	4.12	0.90	0.386 3
X_1^2	15.96	1	15.96	3.49	0.120 7
X_2^2	28.99	1	28.99	6.34	0.053 3
X_3^2	2.98	1	2.98	0.65	0.456 0
残差	22.87	5	4.57		
失拟项	20.28	3	6.76	5.22	0.165 1
纯误差	2.59	2	1.30		
总差	1 564.33	14			

0.05,说明未知因素对试验结果的干扰很小。因素 X_1 对总黄酮保留率具有显著影响($P < 0.05$),因素 X_2 、 X_3 对总黄酮保留率具有极显著影响($P < 0.001$),其余各项的影响均不显著($P > 0.05$),且 X_1 、 X_2 、 X_3 对总黄酮保留率的影响均不具有显著的交互性($P > 0.05$)。

2.6.2 响应面优化与结果验证 采用Design-Expert 8.0软件进行分析,得到各因素对总黄酮提取率影响的响应面图,结果见图2。

由图2A可知,当 X_2 一定时,总黄酮保留率随着 X_1 的增加呈现出先增大后减小的趋势;同样,当 X_1 一定时,总黄酮保留率随着 X_2 的增加呈现出先增大后减小的趋

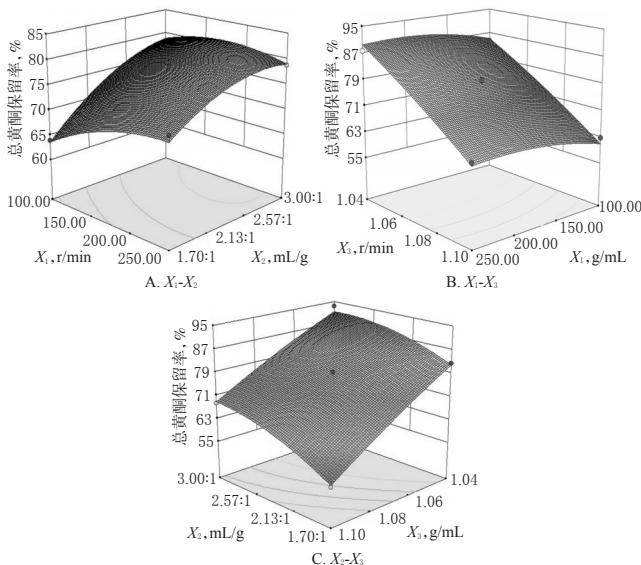


图2 各因素交互作用的响应面图

Fig 2 Response surface plots of interactive effects of each factors

势。由图2B可知可知,当 X_3 一定时,总黄酮保留率随着 X_1 的增加呈现出先增加后趋于平缓的趋势;当 X_1 一定时,总黄酮保留率随着 X_3 的增加呈现出减小趋势。由图2C可知,当 X_2 一定时,总黄酮保留率随 X_3 的增加呈现出减小的趋势;当 X_3 一定时,总黄酮保留率随 X_2 的增加呈现出先增加后趋于平缓的趋势。通过分析3者的交互作用,发现因素 X_1 与 X_2 的相互作用对总黄酮保留率影响最大。

通过Design-Expert 8.0软件预测得到最佳醇沉工艺参数为醇沉前浓缩液密度1.04 g/mL,醇料比2.86:1 (mL/g),搅拌速度184.49 r/min,总黄酮保留率预测值为91.40%。结合实际生产条件对该工艺参数进行修正,即醇沉前浓缩液密度1.04 g/mL,醇料比2.86:1 (mL/g),搅拌速度185 r/min。按修正后工艺条件进行3次验证试验,得到总黄酮保留率的平均值为89.74%,与预测值的相对误差为1.85%,表明该模型优化结果准确、可靠。

3 讨论

醇沉工艺因其具有操作过程简单、溶剂安全性高和除杂效果好等优点被广泛应用于中药制剂的生产中,到目前为止,一些新技术(如膜分离^[13-14]、絮凝^[15]、及高速离心^[16]等)也未能将其完全取代,醇沉工艺在制剂纯化过程中仍有较为广泛的应用。因此,系统地开展醇沉工艺优化研究,对中药资源高效利用与制剂质量提升具有重要的现实意义。

中药醇沉过程的控制涉及到搅拌速度、加醇速度、醇沉时间、加入乙醇体积分数、醇料比、醇沉前浓缩液密度及静置温度等诸多工艺参数。本研究采用Plackett-Burman设计对上述重要醇沉工艺参数进行考察,经方差分析确定搅拌速度、醇料比、醇沉前浓缩液密度是山楂醇沉的关键工艺参数。乙醇体积分数的变化对有

效成分在上清液中的溶解程度具有重要的作用。另外,在本试验过程中发现,搅拌速度和醇沉前浓缩液密度均直接影响沉淀物的形态。而沉淀物的形态变化与有效成分包裹、损失程度又有着直接的联系。为从提取液中尽可能多的得到山楂总黄酮,笔者进一步采用Box-Behnken响应面法对上述3个山楂醇沉关键工艺参数进行了优化,通过验证试验结果发现,实测值与预测值的相对误差为1.85%,表明该方法预测性好、精度高,这为含山楂制剂的醇沉工艺研究提供了一定参考。但是,各复方制剂中所用药材和辅料均有差别,其适用性有待进一步考察。

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,2015:31.
- [2] 刘荣华,邵峰,邓雅琼,等.山楂化学成分研究进展[J]. 中药材,2008,31(7):1100-1103.
- [3] 周玲,邓琳,赵湜.山楂总黄酮抗心肌缺血作用及机制[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(6):475-477.
- [4] 王玲,吴军林,吴清平,等.山楂降血脂作用和机理研究进展[J]. 食品科学,2015,36(15):245-248.
- [5] 张妍,李厚伟,孙建平,等.山楂果总黄酮的提取分离及体外抗肿瘤活性[J]. 中草药,2004,35(7):787-789.
- [6] 周跃华.关于中药复方制剂醇沉含醇量的调研[J]. 中草药,2015,46(15):2309-2314.
- [7] ZHANG L, GONG XC, QU HB. Optimizing the alcohol precipitation of Danshen by response surface methodology [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 48(6):977-983.
- [8] 许之麟,黄文华,龚行楚,等.设计空间法优化党参一次醇沉工艺[J]. 中国中药杂志,2015,40(22):4411-4416.
- [9] 闫明,韦迎春,李雪峰,等.响应面法对六味地黄方醇沉工艺的优化研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(19):3794-3799.
- [10] 王永香,米慧娟,张传力,等. Box-Behnken响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)的醇沉工艺研究[J]. 中草药,2015,46(5):671-678.
- [11] 罗旭东,李成义,李旭,等.当归根、茎中总黄酮的提取工艺优化[J]. 中国药房,2018,29(3):364-368.
- [12] 刘艳清,汪洪武,蔡璇,等.响应面法优化栀子总黄酮提取工艺研究[J]. 中药材,2014,37(2):333-337.
- [13] 许浮萍,梁志家,田娟娟.应用膜分离结合醇沉法纯化大豆异黄酮[J]. 食品科学,2009,30(16):78-82.
- [14] 唐进法,张辉,张娜娜,等.膜分离法和醇沉法对清消口服液的纯化效果比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):28-30.
- [15] 楚笑辉,唐路梅,夏新华.壳聚糖絮凝澄清工艺与醇沉工艺纯化乙肝宁复方水提液的对比[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):1-4.
- [16] 陈玉兴,黄雪君,曾晓会,等.逍遥散离心工艺制剂与醇沉工艺制剂和标准煎剂疏肝健脾作用对比研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1860-1861.

(收稿日期:2018-02-01 修回日期:2018-04-17)

(编辑:林 静)