

Box-Behnken 设计-效应面法优选防风炮制工艺

刘婵¹,张水寒^{1,2*},黄惠勇^{1*},秦裕辉¹,肖娟^{1,2},蔡萍^{1,2},万丹^{1,2}

(1. 湖南省中医药研究院,长沙 410003;
2. 杨永华全国名老中医药专家传承工作室,长沙 410003)

[摘要] 目的:优选防风的炮制工艺。方法:以升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量、浸膏得率、水分的综合评分为指标,采用 Box-Behnken 设计-效应面法考察切片厚度、干燥时间、干燥温度对防风饮片质量的影响,优选防风饮片的炮制工艺参数。结果:最佳炮制工艺为切片厚度 3~4 mm,干燥温度 60℃,干燥时间 2 h。升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的质量分数分别为 0.917%,0.054%,水分 5.110%,浸膏得率 20.45%。结论:采用 Box-Behnken 设计-效应面法优选的炮制工艺合理可行,为防风饮片的质量控制提供参考。

[关键词] 防风;炮制工艺;Box-Behnken 设计;响应曲面法;升麻素苷;5-*O*-甲基维斯阿米醇苷
[中图分类号] R283.3 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)05-0018-04
[doi] 10.11653/syfy2014050018
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1408.006.html>
[网络出版时间] 2013-12-18 14:08

Optimization of Processing Technology for Saposhnikovia Radix by Box-Behnken Design-Response Surface Methodology

LIU Chan¹, ZHANG Shui-han^{1,2*}, HUANG Hui-yong^{1*}, QIN Yu-hui¹,
XIAO Juan^{1,2}, CAI Ping^{1,2}, WAN Dan^{1,2}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410003, China;
2. Yang Yong-hua Name of Old Chinese Medicine Experts Heritage Studio, Changsha 410003, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize processing technology of Saposhnikovia Radix. **Method:** Taking composite score of contents of prim-*O*-glucosylcimifugin and 5-*O*-methylvisammioside, extract yield, water contents as index, effects of slice thickness, drying time and drying temperature on pieces quality were investigated by Box-Behnken design-response surface methodology, so as to optimize processing technology parameters of Saposhnikovia Radix. **Result:** Optimal processing parameters were as follows: slice thickness 3-4 mm, drying temperature at 60℃, drying time 2 hours. Under these conditions, contents of prim-*O*-glucosylcimifugin and 5-*O*-methylvisammioside, extract yield, water contents were 0.917%, 0.054%, 20.45% and 5.110%, respectively. **Conclusion:** Optimized processing technology for Saposhnikovia Radix was feasible and reasonable, it could provide a reference for quality control of Saposhnikovia Radix pieces.

[Key words] Saposhnikovia Radix; processing technology; Box-Behnken design; response surface methodology; prim-*O*-glucosylcimifugin and 5-*O*-methylvisammioside

[收稿日期] 20131018 (004)
[基金项目] 湖南省科技厅重点项目(2012TF1005)
[第一作者] 刘婵,在读硕士,从事中药新制剂与新技术研究,Tel:18711088838,E-mail:89318914@qq.com;
[通讯作者] *张水寒,研究员,从事中药制剂及分析研究,E-mail:zhangshuihan0220@126.com;
*黄惠勇,教授,从事中医药基础研究,E-mail:hntemakj@163.com

防风具有祛风解表、胜湿止痛、止痉的功效,临床用于治疗感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等症。目前已从生防风中分离的化学成分达 100 多种^[1],其中升麻素苷与 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为防风解热镇痛和抗炎的主要有效成分^[2]。防风须经过加工炮制才能供临床应用,但目前关于其炮制工艺的文献较少,2010 年版《中国药典》亦缺乏具体的炮制工艺参数,致使市场上防风饮片的质量良莠不齐。本实验以升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量、浸膏得率及水分的综合评分为评价指标,采用 Box-Behnken 设计-效应面法考察切片厚度、干燥时间与温度对防风质量的影响,为防风炮制工艺的规范化提供参考。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),BP211DE 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),101-2 型恒温干燥箱(上海天缘实验仪器厂),DZKW-4 型恒温水浴锅(上海科析实验仪器厂)。5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111523-200405,0781-200311),甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯,防风购自安徽亳州药材市场,由湖南省中医药研究院生药室实习研究员刘浩鉴定为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根。

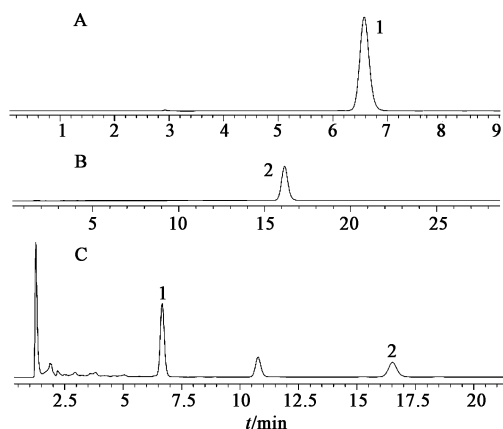
2 方法与结果

2.1 升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 依利特柱 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(40:60),检测波长 254 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 5 μL。理论塔板数按升麻素苷峰计算应不低于 2 000,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取升麻素苷对照品 8.75 mg 置 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密量取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。精密称取 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品 16.01 mg 至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取防风细粉约 0.25 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,称定质量,水浴回流 2 h,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。



A, B. 对照品; C. 供试品;

1. 升麻素苷; 2. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷

图1 防风提取液 HPLC

2.1.4 线性关系的考察 分别精密量取升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程依次为 $Y = 656.56X - 12.32$ ($R^2 = 0.9996$), $Y = 762.03X - 9.652$ ($R^2 = 0.9997$), 线性范围分别为 0.14 ~ 0.70, 0.128 ~ 0.64 μg。

2.2 水分测定 参照《中国药典》2010 年版一部附录 IX H 第一法测定。

2.3 浸膏得率的测定 参照《中国药典》2010 年版一部附录 X A 项下热浸法测定, 以乙醇作溶剂。

2.4 炮制工艺优选 选择切片厚度、干燥时间、干燥温度为自变量, 升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量、水分、浸膏得率的综合评分为效应值, 权重系数依次为 0.3, 0.3, 0.2, 0.2, 综合评分^[3] = $M_1/M_{1max} \times 0.3 + M_2/M_{2max} \times 0.3 - M_3/M_{3max} \times 0.2 + M_4/M_{4max} \times 0.2$, 式中 M_1 为升麻素苷含量, M_2 为 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量, M_3 为水分, M_4 为浸膏得率。称取防风药材 15 份, 每份 250 g, 除去杂质, 洗净, 润透, 去芦头后, 运用 Minitab 16 软件进行 Box-Behnken 试验设计, 试验安排及结果见表 1, 按时取出, 放凉, 贮存于干燥箱内, 备用。

采用 Minitab 16 软件对表 1 中数据建立多元二次效应面回归模型, 得拟合方程 $Y = 0.5171 - 0.0798A + 0.0566B + 0.0673C + 0.0368AB + 0.0788AC - 0.0386BC - 0.0129A^2 + 0.0538B^2 + 0.0269C^2$, 回归方程及各影响因素的方差分析见表 2。

由方差分析可知, 模型的 $F = 5.42$, $P = 0.039 < 0.05$, $R^2 = 0.9071$, 说明采用的二次模型具有统计

表 1 防风炮制工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	A 切片厚度 /mm	B 干燥温度 /℃	C 干燥时间 /h	升麻素苷 /%	5-O-甲基维斯 阿米醇苷/%	水分 /%	浸膏得率 /%	综合评分
1	3 ~ 4	80	2. 0	0. 974	0. 055	2. 877	23. 15	0. 684
2	4 ~ 5	70	2. 0	0. 929	0. 053	5. 079	22. 46	0. 627
3	3 ~ 4	60	2. 0	1. 124	0. 058	6. 797	22. 23	0. 665
4	3 ~ 4	70	1. 5	0. 835	0. 046	4. 398	17. 06	0. 529
5	3 ~ 4	80	1. 0	0. 877	0. 056	3. 890	14. 62	0. 608
6	4 ~ 5	60	1. 5	0. 782	0. 031	7. 841	14. 24	0. 337
7	2 ~ 3	60	1. 5	0. 992	0. 063	4. 413	18. 21	0. 649
8	2 ~ 3	70	2. 0	0. 740	0. 041	2. 654	23. 06	0. 551
9	3 ~ 4	60	1. 0	0. 843	0. 048	6. 986	12. 93	0. 434
10	3 ~ 4	70	1. 5	0. 698	0. 040	4. 411	18. 46	0. 473
11	3 ~ 4	70	1. 5	0. 751	0. 053	4. 387	18. 31	0. 549
12	4 ~ 5	70	1. 0	0. 718	0. 037	7. 406	11. 94	0. 354
13	2 ~ 3	70	1. 0	0. 771	0. 064	3. 708	15. 11	0. 592
14	4 ~ 5	80	1. 5	0. 788	0. 038	2. 312	18. 09	0. 541
15	2 ~ 3	80	1. 5	0. 974	0. 055	2. 062	23. 21	0. 705

表 2 防风炮制工艺方差分析

方差来源	<i>f</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	9	16. 299 × 10 ⁻²	5. 42	0. 039
<i>A</i>	1	5. 097 × 10 ⁻²	15. 26	0. 012
<i>B</i>	1	2. 564 × 10 ⁻²	7. 68	0. 011
<i>C</i>	1	3. 626 × 10 ⁻²	10. 86	0. 039
<i>A</i> ²	1	0. 130 × 10 ⁻²	0. 18	0. 686
<i>B</i> ²	1	0. 993 × 10 ⁻²	3. 20	0. 134
<i>C</i> ²	1	0. 266 × 10 ⁻²	0. 80	0. 413
<i>AB</i>	1	0. 543 × 10 ⁻²	1. 63	0. 258
<i>AC</i>	1	2. 485 × 10 ⁻²	7. 44	0. 041
<i>BC</i>	1	0. 595 × 10 ⁻²	1. 78	0. 240
残差	5	0. 676		
失拟项	3	0. 655	2. 87	0. 269
纯误差	2	0. 022		
合计	14	0. 179		

学意义。失拟项 $P = 0. 269 > 0. 05$, 表明无明显失拟因素存在, 拟合优度良好, 故可采用该回归方程代替试验真实点对结果进行分析。因素 A, B, C, AC 项的 P 均 $< 0. 05$, 说明这几项对综合评分均有显著影响, 因素 A 与 C 存在交互作用, 其他项则均无显著影响。综合 Box-Behnken 试验设计方案, 应用 Minitab 16 软件研究各因素交互作用对综合评分的影响, 绘制各自变量对响应值的三维曲面图(图 2), 结果显

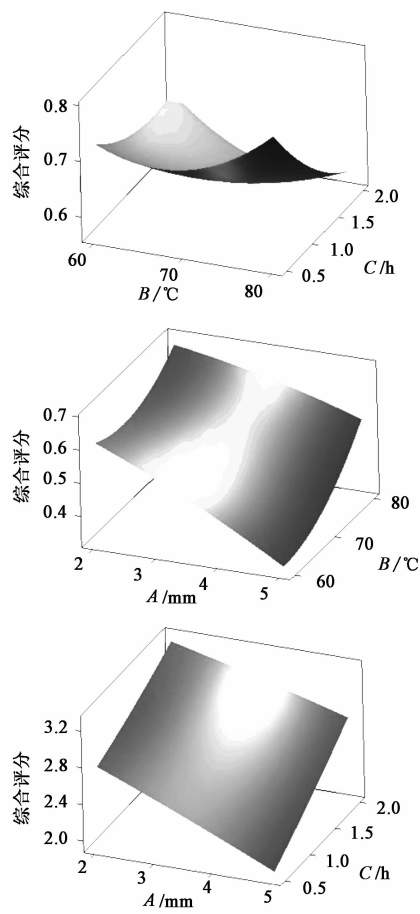


图 2 防风炮制工艺各影响因素交互作用对综合评分的三维响应面

示切片厚度与干燥时间的交互作用对综合评分具有显著性影响,表现为曲面较陡,干燥温度和干燥时间对综合评分影响较小,表现为曲面光滑。综上所述,确定优选的炮制工艺为切片厚度 3.909 1 mm,干燥温度 60 ℃,干燥时间 1.999 9 h,预测的响应值 0.600,合意性 1.000,结合实际操作考虑,将防风炮制工艺定为取防风药材,除去杂质,洗净,润透,去芦头,切成 3~4 mm 厚片,置恒温干燥箱中于 60 ℃干燥 2 h。

2.5 验证试验 取 3 份防风药材,每份 1 kg,按最佳炮制工艺条件制成防风饮片,测定升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含量、水分、浸膏得率,计算综合评分平均值 0.586 1, RSD 0.57%,接近预测值,说明优选的炮制工艺稳定可行。

3 讨论

Box-Behnken 中心组合设计与正交设计相比,能同时进行线性、两因素相互作用、二次多项式或更高次项的模型拟合,可充分考虑到各因素的交互作用^[4],使试验结果更直观和准确。

防风的祛风解表功效与解热、降温密切相关。升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为防风中主要有效成分,对酵母致热大鼠不仅具有抗炎^[5]作用还有一定的解热和降温^[6]作用,故选择二者作为指标成分。

预试验对不同温度(40,60,80,90,100 ℃)干燥的防风饮片进行浸膏得率和外观的比较,结果表明干燥温度为 60~80 ℃时浸膏得率最高且外观最好,90 ℃饮片颜色开始变深,100 ℃略显焦灼。同时考

察了不同干燥时间(1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h)对防风饮片质量的影响,结果表明干燥 1.0~2.0 h 时药材即可达到干燥要求。

饮片切制的厚薄会直接影响临床疗效,合适的厚度有利于药物有效成分煎出,提高药效煎出率^[7];适宜的干燥温度、时间可使饮片含水量减低,既方便配方又能减少霉变、虫蛀等因素,有利于饮片的贮存与质量的提高。本文优选的炮制工艺不仅能提高防风中升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量、降低饮片中水分,且外观性状良好,符合传统防风饮片切厚片的要求。

[参考文献]

- [1] 刘双利,郜玉钢,张春红,等. 防风类药材的质量评价研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(14):1462.
- [2] 薛宝云,李文,李丽,等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(5):287.
- [3] 陈洁,戴衍朋,孙立立,等. Box-Behnken 设计-效应面法优选甘草切制工艺[J]. 中草药,2013,44(12):1579.
- [4] 姜雯,何承辉,薛桂蓬,等. Box-Behnken 中心组合设计优化复方一枝蒿滴丸成型工艺[J]. 中草药,2013,44(9):1134.
- [5] 唐荣江,闵照华,徐诚愈. 防风的药理实验研究[J]. 中药通报,1998,13(6):45.
- [6] 肖永庆,杨滨,姚三桃,等. 防风质量标准的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(3):185.
- [7] 王延年,刘晓秋. 现代中药炮制[M]. 北京:人民军医出版社,2008:176.

[责任编辑 仝燕]