

表 3 PLA 不同相对分子质量制备的 4ac-PLA-NP 中 4ac 的体外释药回归方程

Table 3 Regression equation of 4ac in 4ac-PLA-NP prepared by different relative molecular weights of PLA *in vitro* release

PLA	数学模型	0~12 h	24~144 h
PLA 5 000	零级	$Q=0.0147t+0.0789 (R^2=0.9304)$	$Q=0.0015t+0.2982 (R^2=0.8951)$
	一级	$\ln(1-Q)=-0.0178t-0.0792 (R^2=0.9443)$	$\ln(1-Q)=-0.0025t-0.3449 (R^2=0.9209)$
	Higuchi	$Q=0.0737t^{1/2}-0.0056 (R^2=0.9699)$	$Q=0.0258t^{1/2}+0.1929 (R^2=0.9574)$
	Niebergull	$(1-Q)^{1/2}=-0.0081t+0.9602 (R^2=0.9376)$	$(1-Q)^{1/2}=-0.0009t+0.8395 (R^2=0.9084)$
	Hixcon-crowell	$(1-Q)^{1/3}=-0.0056t+0.9735 (R^2=0.9393)$	$(1-Q)^{1/3}=-0.0007t+0.8904 (R^2=0.9127)$
	Weibull	$\ln\ln(1/1-Q)=0.6065\ln t-2.738 (R^2=0.9629)$	$\ln\ln(1/1-Q)=0.3483\ln t-2.1035 (R^2=0.985)$
PLA 10 000	零级	$Q=0.0106t+0.0685 (R^2=0.95)$	$Q=0.0014t+0.2808 (R^2=0.8613)$
	一级	$\ln(1-Q)=-0.0123t-0.0689 (R^2=0.957)$	$\ln(1-Q)=-0.0022t-0.3233 (R^2=0.8809)$
	Higuchi	$Q=0.0534t^{1/2}+0.0066 (R^2=0.9885)$	$Q=0.0243t^{1/2}+0.1808 (R^2=0.9336)$
	Niebergull	$(1-Q)^{1/2}=-0.0057t+0.9656 (R^2=0.9536)$	$(1-Q)^{1/2}=-0.0009t+0.8493 (R^2=0.8713)$
	Hixcon-crowell	$(1-Q)^{1/3}=-0.0039t+0.977 (R^2=0.9549)$	$(1-Q)^{1/3}=-0.0006t+0.8971 (R^2=0.8747)$
	Weibull	$\ln\ln(1/1-Q)=0.5259\ln t-2.8512 (R^2=0.9934)$	$\ln\ln(1/1-Q)=0.3446\ln t-2.1694 (R^2=0.9715)$
PLA 20 000	零级	$Q=0.0228t+0.0577 (R^2=0.9501)$	$Q=0.0008t+0.3468 (R^2=0.8121)$
	一级	$\ln(1-Q)=-0.0287t-0.0488 (R^2=0.9641)$	$\ln(1-Q)=-0.0013t-0.4242 (R^2=0.8306)$
	Higuchi	$Q=0.1141t^{1/2}-0.0741 (R^2=0.9847)$	$Q=0.0136t^{1/2}+0.2905 (R^2=0.8926)$
	Niebergull	$(1-Q)^{1/2}=-0.0128t+0.9731 (R^2=0.9574)$	$(1-Q)^{1/2}=-0.0005t+0.88085 (R^2=0.8214)$
	Hixcon-crowell	$(1-Q)^{1/3}=-0.0089t+0.9826 (R^2=0.9597)$	$(1-Q)^{1/3}=-0.0004t+0.8679 (R^2=0.8239)$
	Weibull	$\ln\ln(1/1-Q)=0.8328\ln t-2.9865 (R^2=0.9852)$	$\ln\ln(1-Q)=0.1851\ln t-1.432 (R^2=0.9458)$
PLA 30 000	零级	$Q=0.0108t+0.0625 (R^2=0.9475)$	$Q=0.0014t+0.2571 (R^2=0.8593)$
	一级	$\ln(1-Q)=-0.0125t-0.0624 (R^2=0.9554)$	$\ln(1-Q)=-0.0025t-0.2906 (R^2=0.8854)$
	Higuchi	$Q=0.0541t^{1/2}+0.0001 (R^2=0.709)$	$Q=0.0257t^{1/2}+0.1513 (R^2=0.9326)$
	Niebergull	$(1-Q)^{1/2}=-0.0058t+0.9688 (R^2=0.9515)$	$(1-Q)^{1/2}=-0.0009t+0.8633 (R^2=0.8726)$
	Hixcon-crowell	$(1-Q)^{1/3}=-0.004t+0.9791 (R^2=0.9527)$	$(1-Q)^{1/3}=-0.0006t+0.907 (R^2=0.8768)$
	Weibull	$\ln\ln(1/1-Q)=0.5576\ln t-2.9496 (R^2=0.9758)$	$\ln\ln(1/1-Q)=0.3817\ln t-2.3889 (R^2=0.9667)$
PLA 40 000	零级	$Q=0.0148t+0.061 (R^2=0.9485)$	$Q=0.009t+0.2841 (R^2=0.9204)$
	一级	$\ln(1-Q)=-0.0176t-0.0589 (R^2=0.9563)$	$\ln(1-Q)=-0.0014t-0.3306 (R^2=0.8809)$
	Higuchi	$Q=0.0744t^{1/2}+0.025 (R^2=0.9841)$	$Q=0.0156t^{1/2}+0.2218 (R^2=0.9558)$
	Niebergull	$(1-Q)^{1/2}=-0.0081t+0.97 (R^2=0.9525)$	$(1-Q)^{1/2}=-0.0006t+0.8468 (R^2=0.9265)$
	Hixcon-crowell	$(1-Q)^{1/3}=-0.0055t+0.9801 (R^2=0.9533)$	$(1-Q)^{1/3}=-0.0004t+0.8954 (R^2=0.9259)$
	Weibull	$\ln\ln(1/1-Q)=0.6625\ln t-2.9604 (R^2=0.9901)$	$\ln\ln(1-Q)=0.2249\ln t-21.7758 (R^2=0.9671)$

References:

[1] Peng Y X, Liao G T. The *in vitro* release kinetics of Daunorubicin in polybutyl cyanoacrylate nanoparticles [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 1999, 30 (2): 168.

[2] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, et al. PLGA-nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties [J]. *J Control Release*, 2002, 79 (1-3): 123.

[3] Chorny M, Fishbein I. Study of the drug release mechanism from tyrophostin AG-1295-loaded nanospheres by *in situ* and external sink methods [J]. *J Control Release*, 2002, 83: 401.

[4] Lamprecht A, Bouligand Y. New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amodarone [J]. *J Control Release*, 2002, 84: 59-68.

## 均匀设计-响应曲面法优化莪术的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺

刘红梅, 李可意

(北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 目的 以莪术醇为响应指标, 优化莪术有效成分的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺。方法 通过均匀试验设计, 采用气相色谱法测定莪术醇的量, 采用响应曲面分析方法优化提取工艺。结果 莪术的超临界 CO<sub>2</sub> 最佳萃取工艺为萃取温度 40 ℃、萃取压力 20 MPa、动态萃取时间 120 min、改性剂用量 24 mL、改性剂体积分数 70%、静态萃取时间 20 min; 模型预测值的绝对误差小于 2%。结论 利用均匀设计和响应曲面法可以对莪术超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺进行优化。

收稿日期: 2006-10-24

作者简介: 刘红梅(1970—), 女, 安徽霍邱人, 硕士, 副教授, 1995年毕业于中国科学院大连化学物理研究所, 从事传质和天然产物分离纯化技术的研究。 Tel: (010) 67373054 E-mail: hgthongmei@buu.com.cn

关键词: 莪术; 超临界萃取; 莪术醇; 均匀设计; 响应曲面法

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)04-0535-04

## Optimizing supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Curcuma phaeocaulis* with uniform design and response surface methodology

LIU Hong-mei, LI Ke-yi

(College of Biochemical Engineering of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**Key words:** *Curcuma phaeocaulis* Valetton; supercritical extraction; curcumol; uniform design; response surface methodology (RSM)

响应曲面法(response surface methodology, RSM)是由 Box 等于 20 世纪 50 年代提出的一种数据分析方法,它以回归方程作为函数估算的工具,在多因子试验中,因子与响应值的相互关系用多项式拟合,把因子和响应值的关系函数化,因此,可对函数的面进行分析,研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系,并进行优化。它是一种优化反应条件和加工工艺参数的有效方法,采用 RSM 法可以建立连续变量曲面模型,对影响过程的因子水平及交互作用进行优化和评价<sup>[1,2]</sup>,目前已广泛应用于化学化工、生物、食品等方面<sup>[3]</sup>。

莪术是姜科姜黄属植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Valetton、桂莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 和温莪术 *C. wenyuin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。莪术味辛,性温,归肝、脾经,具有行气破血、消积止痛、抗肿瘤、抗病毒等功效<sup>[4]</sup>,对多种肿瘤细胞生长有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>,是一种具有发展前途的抗肿瘤药物,其主要活性成分莪术醇、莪术酮和 β-榄香烯对癌细胞具有直接破坏作用<sup>[6]</sup>。传统上采用浸提的方法提取其中的有效成分,但存在收率低、有效成分的量低等缺点,而超临界萃取技术具有提取温度低、提取物中药有效成分的量高、无溶剂残留等特点。

本实验以莪术醇的量为响应值,采用均匀设计法对莪术的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺进行研究,并运用响应曲面分析方法对试验数据进行分析,优化提取工艺。

### 1 药品和仪器

莪术醇对照品(批号 0185-9703)购自中国药品生物制品检定所;莪术购自北京同仁堂集团,由北京联合大学生物化学工程学院制药工程研究所林强博士鉴定为蓬莪术的干燥根茎;醋酸乙酯为分析纯;二氧化碳质量分数 > 99.95%。

江苏南通华安公司的 HA120-50-01 型超临界萃取装置;日本岛津 GC-14C 型气相色谱仪。

### 2 实验方法

2.1 均匀试验设计:采用均匀设计法,以莪术醇的量为响应指标,以萃取压力、萃取温度、改性剂体积分数和用量、动态萃取时间及静态平衡时间为试验因素,每个试验因素安排 4~6 个水平,选用 U<sub>6</sub>(6<sup>6</sup>) 均匀设计用表安排试验。但由于试验数据点太少,实验操作误差会对试验结果产生较大影响,从而会影响响应方程的预测精度。因此采用 DPS 5.02 专业版软件筛选出的 U<sub>12</sub>(6<sup>6</sup>) 混合水平均匀设计表安排实验,试验的因素与水平见表 1。

表 1 均匀设计因素水平

Table 1 Factors and levels of uniform design

水平	因素					
	萃取压力(X <sub>1</sub> )/MPa	萃取温度(X <sub>2</sub> )/℃	动态时间(X <sub>3</sub> )/min	改性剂用量(X <sub>4</sub> )/mL	改性剂体积分数(X <sub>5</sub> )/%	静态时间(X <sub>6</sub> )/min
1	18	35	30	6	70	15
2	20	40	60	12	75	20
3	22	45	90	18	80	25
4	24	50	120	24	85	30
5	26	55	150	30	90	
6	28	60	170	36	95	

2.2 超临界萃取流程:莪术生药粉碎,过 40 目筛,60℃ 烘干 6 h,精确称 200 g 过筛的莪术粉,加入夹带剂,充分混合过夜,然后置于超临界萃取釜中,按选定的均匀设计安排试验,收集萃取液,滤过,95% 乙醇定容,供分析用。

2.3 莪术醇的毛细管气相色谱法测定<sup>[7]</sup>

2.3.1 色谱条件:色谱柱:OV-1701 弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);检测器:FID;柱前压:50 kPa;柱温:135℃;气化室温度:200℃;检测器温度:250℃;柱温采用程序升温;载气:氮气,50 mL/min。

2.3.2 标准曲线的绘制:精密称取莪术醇对照品 76.7 mg,置于 25 mL 量瓶中,用醋酸乙酯溶解并稀释至刻度,摇匀。分别取上述对照品溶液 2.25、3.0、3.75、4.45、5.25 mL 用醋酸乙酯定容至 10 mL,测

定。以峰面积为横坐标,质量浓度为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程: $Y = -0.0245 + 1.907 \times 10^{-5} X$ ,  $r = 0.9997$ 。结果表明:莪术醇在 0.6903~1.6107 mg/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.3.3 供试品溶液的制备及测定:精密称取一定量的莪术 SFE 萃取物置于 50 mL 量瓶中,用醋酸乙酯定容,摇匀得供试品溶液,进样测定,用标准曲线方程计算出各供试品溶液中莪术醇的量,进而计算出基于每克生药材的莪术醇的量。

2.4 数据分析:采用响应曲面分析方法,研究试验因素与响应指标间的响应关系,建立相应的响应模型。

### 3 实验结果

3.1 均匀设计试验结果:分析莪术超临界萃取产物中莪术醇的量,结果见表 2。

表 2 均匀设计用表和试验结果

Table 2 Results and arrangement of uniform design

试验编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	Y 莪术醇/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	24	60	150	36	90%	20	0.0160
2	18	50	180	24	70%	20	0.0541
3	26	45	180	12	85%	30	0.0152
4	20	45	60	30	85%	15	0.5996
5	22	60	60	18	75%	30	0.5323
6	18	55	90	6	90%	25	0.0570
7	22	35	150	18	95%	15	0.2326
8	20	40	120	36	80%	30	0.4111
9	24	40	30	6	80%	20	0.0061
10	28	50	30	24	95%	25	0.4107
11	28	55	120	12	75%	15	0.1178
12	26	35	90	30	70%	25	0.1270

3.2 响应曲面方法优化工艺条件:测定结果利用数据处理系统 DPS5.02 专业版软件进行二次多项式逐步回归分析,得到响应方程: $Y = 0.989 - 8.285 \times 10^{-3} X_3 - 1.421 \times 10^{-3} X_4^2 - 4.342 \times 10^{-4} X_6^2 + 3.634 \times 10^{-4} X_1 X_3 - 1.783 \times 10^{-3} X_1 X_4 - 0.06547 X_1 X_5 + 1.805 \times 10^{-3} X_2 X_5 - 1.444 \times 10^{-4} X_3 X_4 + 0.09588 X_4 X_5 + 1.368 \times 10^{-3} X_4 X_6$ 。

其中模型中各项的偏相关系数、方差、显著性检验结果见表 3。

响应模型的复相关系数  $r = 0.99999$ ,  $F = 5459.81$ , 而  $F_{0.01}(6, 5) = 10.67$ , 因此方程在  $\alpha = 0.01$  的水平上显著;其剩余标准差  $s = 0.003$ , 响应模型具有很高的预测精度,预测结果的绝对误差不大于 0.6%;由表 3 也可以看出,响应模型中的二次项和交互项都极为显著,响应模型的因变量与全体自变量之间密切相关。因此,用该模型预测萃取工艺参数对莪术的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取的影响是可行的。

另外,表 3 还表明萃取压力和改性剂用量、动态

表 3 模型中各项的偏相关系数、方差、显著性检验结果

Table 3 Dependent coefficients, variances, and notability for each items in response model

方差来源	偏相关系数 $r$	均方差	F 值	P 值
$X_3$	-0.9998	1500.00	2986.12	0.0003
$X_4^2$	-0.9999	9408.00	7631.26	0.0001
$X_6^2$	-0.9997	6875.00	1489.20	0.0007
$X_1 X_3$	0.9999	7300.00	5249.78	0.0002
$X_1 X_4$	-0.9999	2976.00	3705.26	0.0003
$X_1 X_5$	-1.0000	150.45	11603.09	0.0001
$X_2 X_5$	0.9964	806.48	137.11	0.0070
$X_3 X_4$	-0.9998	2000.00	2123.21	0.0005
$X_4 X_5$	1.0000	903.32	18101.34	0.0001
$X_4 X_6$	0.9999	6100.00	3789.56	0.0003

萃取时间、改性剂体积分数之间以及改性剂用量和改性剂体积分数、静态萃取时间之间具有极为显著的交互作用,动态萃取时间和改性剂用量间有显著的交互作用。

利用响应曲面分析绘制响应曲面分析图。由图 1 可见,动态萃取时间对莪术醇的影响非常显著,理论上动态萃取时间越长,越有利于莪术醇的萃取,但萃取时间的延长会增加生产成本,因此选择 60~120 min 为宜;改性剂的用量和体积分数对提取效果具有极为显著的影响,在考察的范围内,随着改性剂乙醇用量和体积分数的不断增加,莪术醇的提取率增大。但乙醇体积分数过高时,可使植物体内细胞蛋白质很快凝固,妨碍乙醇向细胞内渗透,影响有效成分的浸出,因此不宜过高,以 70%~80% 乙醇为

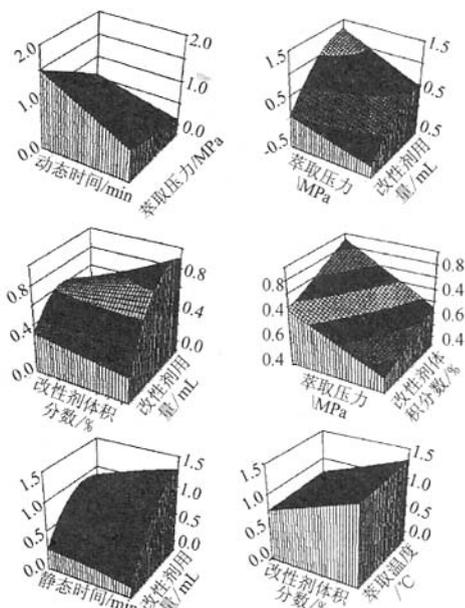


图 1 响应曲面分析图

Fig. 1 RSM Analysis diagrams

妥;增大改性剂用量能提高莪术醇,但改性剂用量的增加会导致改性剂回收任务的加重。

静态萃取时间对萃取率有一定的影响,理论上增加静态萃取时间,有利于 CO<sub>2</sub> 溶剂扩散到固体颗粒内部,可以适当提高莪术醇的萃取率,但这种萃取率的提高是有限的,因此选择为 20 min;萃取温度对萃取结果是不显著的,随着温度的提高,莪术醇萃取率有微小提高,考虑到能耗等原因,取 35~40 ℃ 为宜。

根据响应曲面模型求出最优组合,并综合响应曲面分析图分析,得到综合的最优组合为  $X_1=20$ ,  $X_2=40$ ,  $X_3=90$ ,  $X_4=24$ ,  $X_5=0.70$ ,  $X_6=20$ 。

3.3 验证试验:取 200 g 粉碎过筛的莪术粉,按优化后的条件进行萃取试验,制备 3 批样品,测定莪术醇的量,其平均值为 0.602 9 mg/g,响应模型预测的相对误差为 0.8%。

#### 4 讨论

优化后的萃取工艺为:萃取温度 40 ℃、萃取压力 20 MPa、动态萃取 120 min、改性剂用量 24 mL、改性剂体积分数 70%、静态萃取时间 20 min。

通过响应曲面分析,得到高精度和高显著性的响应模型,而且模型中因素之间的交互作用极为显著。利用响应模型对实验结果进行预测,其绝对误差不大于 0.6%。

#### References:

- [1] Rastogi N K, Rashmi K R. Optimization of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology [J]. *Eur Food Res Technol*, 1999, 209: 57-62.
- [2] Gouveia E R, Alvaro B N. Optimization of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23: 157-161.
- [3] Giovinni M. Response surface methodology and product optimization [J]. *Food Technol*, 1982, 37 (1): 41-45.
- [4] Li G D, Xu F, Shen A J. Progress in the research of zedoary turmeric oil [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37 (1): 806-809.
- [5] Deng R, Chen J M, Wu W Y. The anti-tumor activity of zedoary turmeric oil gelatin microspheres for heparical arterial Em-bolization [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17 (3): 197-199.
- [6] Xu H Q, Li Y D. Introduction to the research of *Curcuma* [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 1995, 12 (1): 46-48.
- [7] Zheng S Z, Wu W H. Determining the content of curcuminol by gas chromatography [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 1997, 13 (2): 120-121.

## HPLC 法测定半枝莲及其制剂热炎宁胶囊中野黄芩苷

高晓霞,原红霞,赵云丽,刘涛,于治国\*

(沈阳药科大学药学院,辽宁沈阳 110016)

热炎宁胶囊由蒲公英、虎杖、败酱和半枝莲 4 味药材经提取加工制备而成,具有抗菌消炎、清热解毒的功效,临床上用于咽喉肿痛、急性咽炎、风热感冒、发热等症<sup>[1]</sup>。目前对于热炎宁胶囊的质量控制方法仅限于薄层扫描法对大黄的测定<sup>[1]</sup>。由于野黄芩苷(scutellarin)为半枝莲抗菌消炎的主要活性成分之一<sup>[2~4]</sup>,本研究实现了制剂中野黄芩苷的测定。另外,由于作为原料的中药材受地域、气候、采收季节等方面的因素影响较大,为使质量标准更加完善,因此同时作为内控指标对半枝莲药材也进行了测定,建立了一种简便、快捷、专属、可靠的方法,优化了《中国药典》2005 年版一部中半枝莲中野黄芩苷的测定方法。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(岛津 LC-10AT *vp* Shimadzu 液相色谱仪,7725 型手动进样器,岛津 SPD-10A *vp* 紫外检测器和 ANASTAR 色谱工作站);DL-180 型超声波发生器(浙江省象山县石浦海天电子仪器厂);BS110S 型万分之一天平。

野黄芩苷对照品(批号 0756-200110)购自中国药品生物制品检定所;半枝莲药材(江西 01、02、03 批)、热炎宁胶囊(规格:0.5 g/粒,批号为 040907、050302、050401)均购自沈阳成大方圆药品连锁店,其中药材经沈阳药科大学生药教研室孙启时教授鉴定;乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇与冰醋酸为分析纯,水为实验室自制重蒸水。

收稿日期:2006-11-22

作者简介:高晓霞(1981—),女,山西省平遥县人,在读博士研究生,2002 年 7 月毕业于山西医科大学,2006 年 7 月获得沈阳药科大学理学硕士学位,主要从事中药质量标准及药理学研究。Tel:(024)23986295 E-mail:gaoxiaxia6218@163.com

\* 通讯作者 于治国