

青黛炮制过程中靛蓝定向生成的工艺设计与优化

刘泽玉¹, 苏柘僮¹, 杨 明^{1,2*}, 邹文铨³

1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

2. 江西中医学院 中药现代制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 四川大学, 四川 成都 610065

摘要: **目的** 筛选出青黛炮制过程中显著影响靛蓝生成的因素, 优化最佳水平组合, 确定生成靛蓝的最佳工艺。**方法** 应用 HPLC 法测定粗靛中靛蓝; 并以鲜叶产靛蓝的量(即靛蓝的转移率)为指标, 采用 Plackett-Burman 设计, Box-Behnken 设计效应面分析等统计学方法, 筛选出显著影响因素及最佳水平组合。**结果** 青黛的浸泡、打靛工艺确定为浸泡前不除蜡, 浸泡液 pH 3.5, 溶剂用量与鲜叶质量比例为 13, 避光、浸泡 24 h, 温度 25 ℃, 通气时间 30 min, 加氨水调节打靛前 pH 值至 9。**结论** 系统地优化了青黛浸泡、打靛环节的工艺, 阐明了青黛炮制过程中各个影响因素对有效成分靛蓝的影响, 为炮制原理的研究奠定了基础。

关键词: 青黛; 靛蓝; Plackett-Burman 设计; Box-Behnken 设计; 最佳工艺

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0056-05

Design and optimization of technology for orientation generated indigo in processing of *Indigo Naturalis*

LIU Ze-yu¹, SU Zhe-tong¹, YANG Ming^{1,2}, ZOU Wen-quan³

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstracts: **Objective** Screening the influencing factors that affect the indigo-generated significantly in processing of *Indigo Naturalis*, the levels were optimized and combined to obtain the optimum technology for the indigo-generated. **Methods** Using an HPLC method for determining indigo in crude *Indigo Naturalis* and taking indigo content generated from fresh leaf as an index, the significantly influencing factors and the optimal level combination were screened by the statistical methods of Plackett-Burman design and Box-Behnken design response surface analysis. **Results** The soaking and making indigo process of *Indigo Naturalis* was identified as the wax was not removed before soaking, soaking pH value was 3.5, and solvent volume (mL) : leaf mass (g) was 13. Soaked in dark at 25 ℃ for 24 h, and ventilation time of 30 min, then ammonia water was added to adjust pH value to 9. **Conclusion** The soaking and making indigo process of *Indigo Naturalis* could be optimized systematically, it could be used to clarify the various factors on the impact of the active indigo in the process of *Indigo Naturalis*. At the same time, it could lay the foundation for the study on processing principle of *Indigo Naturalis*.

Key words: *Indigo Naturalis*; indigo; Plackett-Burman design; Box-Behnken design; optimum technology

青黛为爵床科植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.、蓼科植物蓼蓝 *Polygonum tinctorium* Ait.或十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort.的叶或茎叶经加工制得的干燥粉末或团块^[1]。其炮制过程是马蓝茎叶中的前体物质向靛蓝、靛玉红转化的过程, 主要包括浸泡、打靛、水飞精制等环节^[2-5]。

笔者将传统浸泡工艺与文献报道^[6]的在染布的过程中菘蓝叶浸泡前处理对制靛的影响相结合, 明确了马蓝叶在浸泡过程中受除蜡、浸泡液 pH 值、溶剂用量、温度、时间等多种因素影响。打靛时长期依据经验, 没有固定的参数控制, 致使青黛的质量参差不齐。前期研究^[7-9]已明确青黛中有效成分靛

收稿日期: 2010-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772784); 《中国药典》2010 年版一部标准研究

作者简介: 刘泽玉(1986—), 女, 河北省石家庄市人, 硕士研究生, 从事中药生产新技术和新剂型研究。

Tel: (028)61800127 E-mail: 409192399@qq.com

*通讯作者 杨 明 Tel: (028)87825696 E-mail: yangming16@126.com

蓝和靛玉红的生成机制不同,故分别以靛蓝、靛玉红的产量为指标,确定两条炮制工艺路线。本实验通过采用 Plackett-Burman 设计、Box-Behnken 设计效应面分析等统计学方法,筛选出显著影响因素并确定最佳水平组合,优化了产生靛蓝的青黛炮制工艺,阐明了炮制过程中各影响因素对有效成分靛蓝的影响,为炮制原理的研究奠定了基础。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10ATvp 高效液相色谱仪(浙江智达 N2000 色谱工作站);BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius);KQ-400DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);LZB-FB 型转子流量计(苏州化工仪表有限公司);ACO 系列电磁式空气压缩机(浙江森森实业有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

马蓝茎叶由四川江油恒源药业集团有限公司提供;靛蓝(批号 110716-200509)、靛玉红(批号 110717-200204)对照品由中国药品生物制品检定所提供;甲醇(色谱纯, Fisher 公司);水(重蒸水,自制);微孔滤头(0.2 μm , Millipore 公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青黛的制备工艺

以靛蓝的转移率为评价指标,制备青黛。将鲜叶置于 pH 值约为 3.5 的 25 $^{\circ}\text{C}$ 自来水中,要求水与鲜叶质量的比例为 13,避光,浸泡 24 h 后,滤过除去叶渣,加氨水调节滤液 pH 9,再通空气 30 min 后,加入 10% 新制的石灰乳(取鲜叶质量 10% 的 CaO,加入 10 倍量的沸水中,不断搅拌,形成混悬液,即可),搅拌均匀后静置 24 h,滤过取沉淀,干燥即得粗靛。

2.2 粗靛中靛蓝的 HPLC 法测定^[9]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 Zorbax Extend C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(70:30);检测波长为 289 nm;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为室温。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取靛蓝对照品 4.28 mg,分别加入 N,N-二甲基甲酰胺 100 mL,超声处理 30 min,冷却至室温,作为贮备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取适量的粗靛置研钵中研匀,称取粗靛 0.05 g,加入 N,N-二甲基甲酰胺 100 mL,超声 30 min,冷却至室温,过 0.2 μm 微孔滤

膜,取续滤液,即得。

2.3 Plackett-Burman 试验方法

选用 Plackett-Burman 设计对影响浸泡、打靛环节的 8 个因素的重要性进行考察。共 8 个因素做 12 个试验,每个因素取高、低两种水平。Design Expert 7.1 软件设计试验并进行数据处理。比较各因素 P 值, $P < 0.05$ 的因素作为显著影响因素,为下一步 Box-Behnken 设计效应面分析提供指导。

2.3.1 试验因素范围及水平的规定 以叶子前处理是否除蜡(A)、浸泡液 pH 值(B)、浸泡是否避光(C)、溶剂体积与鲜叶质量比例(D)、浸泡时间(E)、温度(F)、加碱种类(G)、通空气时间(H) 8 个因素作为考察对象。每个因素选择了高(+1)、低(-1)两个水平,试验次数为 12。试验因素水平见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计因子的水平

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman design

水 平	因 素							
	A	B	C	D(mL:g)	E/h	F/ $^{\circ}\text{C}$	G	H/min
-1	除蜡	3.5	避光	8	12	30	石灰乳	30
1	不除蜡	7	不避光	15	36	60	氨水	240

2.3.2 Plackett-Burman 试验结果及分析 8 个因素 12 个试验,按 Plackett-Burman 设计表进行试验,每个试验号重复做 3 次,粗靛测定结果取 3 次的均值,再转化为鲜叶中的产靛量。Plackett-Burman 试验设计及响应值(靛蓝的转化率)见表 2。

可以看出,各个因素对产靛有比较显著的影响。运用 Design Expert 7.1 软件对表 2 进行回归分析,各因素的显著性见表 3。

对各因素的显著性分析看出,各因素对响应值(靛蓝转移率)影响的显著性顺序为:溶剂体积、浸泡温度、通气时间、是否除蜡、浸泡 pH 值、浸泡时间、是否避光、加碱种类。其中溶剂体积、浸泡温度、通气时间、是否除蜡 4 个因素对生产靛蓝有显著性影响。此结果为下一步 Box-Behnken 设计效应面分析试验提供了依据。

2.4 Box-Behnken 效应面试验

2.4.1 Box-Behnken 试验方法 此法既能考察各个因素对效应值(靛蓝转化率)的影响及各影响因素间交互作用,也能进行各个因素的最优化,建立数学模型并作出相应的三维应变变量曲面图,对因素与指标的关系进行直观的量化分析。

表 2 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 2 Design and response value of Plackett-Burman test

试验号	A	B	C	D	E	F	G	H	靛蓝转化率/(mg·g ⁻¹)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.18
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0.27
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1.21
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.51
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0.32
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0.12
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0.81
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0.25
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0.75
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1.52
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1.35
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.00

表 3 各因素显著性分析

Table 3 Significance analysis of factors

影响因素	P 值	显著性
是否除蜡	0.045 9	$P < 0.05$
浸泡液 pH 值	0.055 0	
是否避光	0.066 8	
溶剂体积与鲜叶质量比例	0.003 8	$P < 0.05$
浸泡时间	0.062 3	
浸泡温度	0.018 2	
加碱种类	0.933 0	
通气时间	0.037 3	

表 4 Box-Behnken 设计因素水平及编码

Table 4 Factors, levels, and codes of Box-Behnken design

编码水平	因 素		
	X_1	X_2	X_3
-1	8	30	25
0	11.5	135	42.5
1	15	240	60

验号做 3 次重复, 粗靛测定结果取 3 次的均值, 再转化为鲜叶中的产靛量。Box-Behnken 试验设计及响应值 (靛蓝转移率) 见表 5 (第 13~17 次实验为 5 次重复的中心点实验, 用于考察模型的误差)。

经 F 值检验显示总模型方程显著 ($P=0.006\ 2$), $R^2=0.910\ 4$, 失拟性检验不显著 ($P=0.903\ 1$), 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 能准确的预测实际情况。其校正决定系数 $R^2_{\text{adj}}=0.795\ 1$, 表明 79.51% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释, 实验过程中存在一定的误差, 大约有 20% 不能由此模型进行解释, 回归方程为 $Y=2.04\ X_1-0.01\ X_2-0.09\ X_3+4.69\times 10^{-4}\ X_1X_2-0.01\ X_1X_3+2.51\times 10^{-4}\ X_2X_3-0.07\ X_1^2-1.34\times 10^{-5}\ X_2^2+1.98\times 10^{-3}\ X_3^2-7.99$ 。

根据回归分析结果, 作出相应曲面图, 见图 1。溶剂体积和浸泡温度较通气时间对靛蓝转移率影响更大, 溶剂体积和浸泡温度间的交互作用非常显著, 两者均明显地影响靛蓝转移率; 通气时间和浸泡温度间有一定交互作用, 而溶剂体积和通气时间交互作用微弱。可以看出, 靛蓝转移率与不断增加的溶剂间量呈现出先升后降的趋势, 当溶剂量为 12~14 倍时, 靛蓝转移率相对最高, 随着溶剂量的继续增

2.4.2 Box-Behnken 设计因子的水平范围的规定 溶剂体积、浸泡温度、通气时间、除蜡否对靛蓝转移率均有显著性影响。故选用对浸泡和打靛环节影响显著的 3 个因素即溶剂体积与鲜叶质量比例 (X_1)、通气时间 (X_2)、浸泡温度 (X_3) 为因素 (设计因素水平见表 4), 以粗靛中靛蓝转移率为效应进行 Box-Behnken 设计-效应面优化实验, 并采用 Design Expert 7.1 软件对实验数据 (表 4) 进行拟合分析。每一自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 各自变量的编码见表 4。

按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求, 实验模型通过最小二乘法拟合二次多项式方程可以表数, X_i 、 X_j ($i=1, 2, 3; i \neq j$) 为自变量真实值。多项式模型方程拟合的性质由确定系数 R^2 表达, 其统计学上的显著性由 F 值检验; 采用 Design Expert 7.1 软件分析。

2.4.3 Box-Behnken 试验设计及结果 3 个因素 17 个试验, 按 Box-Behnken 设计表进行试验, 每个试

表 5 Box-Behnken 试验设计及响应值
Table 5 Design and response value of Box-Behnken test

试验号	X_1	X_2/min	$X_3/^\circ\text{C}$	靛蓝转移率/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	-1	-1	0	0.220 6
2	1	-1	0	0.067 3
3	-1	1	0	0.057 8
4	1	1	0	0.593 6
5	-1	0	-1	0.191 0
6	1	0	-1	1.809 9
7	-1	0	1	1.474 1
8	1	0	1	0.485 7
9	0	-1	-1	2.347 7
10	0	1	-1	1.455 5
11	0	-1	1	1.030 3
12	0	1	1	1.985 1
13	0	0	0	0.904 8
14	0	0	0	1.050 0
15	0	0	0	1.924 2
16	0	0	0	1.280 9
17	0	0	0	1.066 4

加,靛蓝转移率反而轻微降低;随着通气时间的延长靛蓝转移率逐渐降低。随着温度的提高,靛蓝转移率呈现先降后升的趋势,当浸泡温度为 25~30 $^\circ\text{C}$ 时,靛蓝转移率相对最高。靛蓝转移率随着通气时间的延长而降低,当通气时间在 30~90 min 时,靛蓝转移率相对最高。综上所述,当温度在 25~30 $^\circ\text{C}$,通气时间在 30~90 min,溶剂量为 12~14 倍变动时,靛蓝转移率相对较高。

2.4.4 验证试验 为了确定建立模型与试验结果是否相符,通过进一步试验对模型的可靠性进行验证,在验证试验中,各因素取值在温度为 25~30 $^\circ\text{C}$,通气时间 30~90 min,溶剂量 12~14 倍(取整数进行组合,其中时间间隔为 10 min),根据模型的计算结果筛选出靛蓝转移率>2 mg/g 的组合共进行 9 组试验,靛蓝转移率见表 6,实测值与模型计算值间的相对标准偏差均小于 3%,说明该模型比较可靠。其中第 5 组的 RSD 最小,说明此组合生成的靛

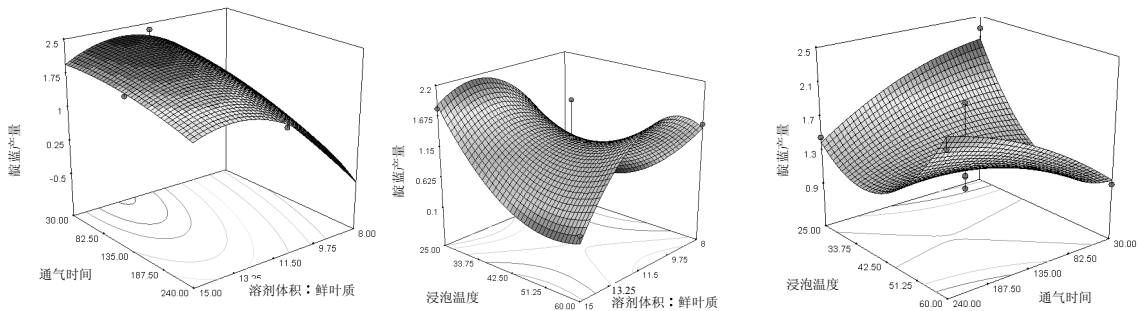


图 1 各因素对靛蓝转移率影响的效应面图

Fig. 1 Response surface of factors effect on indigo transfer rate

表 6 验证试验较优组合及试验结果
Table 6 Optimized group and results of verification test

试验号	靛蓝转移率/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)		RSD/%
	预测值	实测值	
1	2.13	2.09	1.91
2	2.07	2.11	1.89
3	2.01	1.96	2.55
4	2.03	1.98	2.53
5	2.15	2.13	0.94
6	2.09	2.03	2.96
7	2.02	2.07	2.42
8	2.03	2.00	1.50
9	2.03	1.98	2.53

蓝量与预测值最接近,故在较优组合中青黛炮制工艺产生靛蓝的相对最优工艺条件为溶剂量 13 倍,浸泡温度 25 $^\circ\text{C}$,通气时间 30 min。

综上所述,以靛蓝为评价指标的青黛的浸泡、打靛工艺确定为浸泡前不除蜡、浸泡液 pH 3.5、溶剂量与鲜叶质量比例为 13、避光、浸泡时间 24 h、浸泡温度 25 $^\circ\text{C}$ 、通气时间 30 min、加氨水调节打靛前 pH 值至 9。

3 讨论

国内文献尚无关于青黛炮制工艺的研究资料,一般工艺研究常采用均匀设计和正交设计的方法选择较佳工艺,由于其试验次数少,数据处理和操作都较方便,其应用已达到了普及的程度,然而在这两种方法的应用过程存在误区,它们是基于线性模型设计的方法,然而事实上影响因素与效应间有时可能不是线性关系,若忽略这种情况简单进行线性模型设计,则会很大程度上与真实值偏离,而效应

面法运用效应面曲面模型进行分析, 基于非线性模式进行设计和研究比较合理。

本实验采用了 Box-Behnken 设计, 其充分考虑到各因素的交互作用, 设计方法简单, 试验次数少, 在中心点进行重复试验以提高试验精度, 同时采用非线性模型拟合, 可信度较好, 预测值更接近真实值。与正交及均匀设计相比, 此方法所得结果更加直观, 便于分析。

传统青黛炮制过程均依赖老药工的经验控制浸泡时间、浸泡温度、打靛加入石灰量等影响靛蓝生成的重要因素, 没有固定的参数控制, 炮制工艺不规范, 最终导致产品质量参差不齐, 药效相差甚远。本实验以靛蓝为评价指标研究了青黛炮制工艺, 量化了各个工艺参数, 确定了工艺路线, 为青黛炮制的产业化、自动化奠定基础。

前期文献调研中, 参阅国外染料业制靛原理, 阐明了靛蓝和靛玉红不同生成机制, 总结出了可能影响青黛浸泡、打靛环节的 8 个因素, 系统地对各因素进行了研究, 建立了炮制原理指导炮制工艺的研究模式。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李雅臣. 青黛制备中的干燥方法研究 [J]. 中草药, 2003, 33(5): 429-429.
- [3] 滕 炯. 黛及蓝的本草研究 [J]. 中草药, 1996, 27(2): 110-111.
- [4] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1998.
- [5] 左中丕. 中药鉴别炮制应用手册 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2001.
- [6] Garcia-Macias P, John P. Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 7891.
- [7] Maugard T, Enaud E, Choisy P, et al. Identification of an indigo precursor from leaves of *Satis tinctoria* (Woad) [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58: 897.
- [8] Gilbert K G, Maule H G, Rudolph B, et al. Quantitative analysis of indigo and indigo precursors in leaves of *Isatis spp.* and *Polygonum tinctorium* [J]. *Biotechnol Prog*, 2004, 20: 1289.
- [9] 王虎山, 张艳艳, 蒋巧梅, 等. 连续式泡沫浮选分离青黛的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 682-685.
- [10] 刘泽玉, 苏柘僮, 高亚男, 等. HPLC 法同时测定青黛有效成分靛蓝和靛玉红的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13(3): 324-326.

中草药 杂志社 售过刊信息

天津中草药杂志社经国家新闻出版总署批准于 2009 年 8 月在天津滨海新区注册成立。编辑出版《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM)、《现代药物与临床》(2009 年由《国外医药·植物药分册》改刊)、《药物评价研究》(2009 年由《中文科技资料目录·中草药》改刊)。欢迎投稿, 欢迎订阅。

《中草药》杂志合订本: 1974-1975 年、1976 年、1979 年、1988-1993 年 (80 元/年), 1996、1997 年 (110 元/年), 1998 年 (120 元/年), 1999 年 (135 元/年), 2000 年 (180 元/年), 2001-2003 年 (200 元/年), 2004 年 (220 元/年), 2005 年 (260 元/年), 2006—2008 年 (280 元/年), 2009 年 (400 元/年)。

《中草药》增刊: 1996 年 (50 元), 1997 年 (45 元), 1998 年 (55 元), 1999 年 (70 元), 2000、2001 年 (70 元), 2002-2007 年 (65 元/年), 2008、2009 年 (55 元/年)。凡订阅《中草药》杂志且提供订阅凭证者, 购买增刊 7 折优惠, 款到寄刊。

《现代药物与临床》合订本: 2009 年 (100 元/年)。

《国外医药·植物药分册》合订本: 1996—2008 年 (80 元/年), 2006—2008 年 (90 元/年)。

《药物评价研究》2009 年单行本, 每册 15.00 元。

《中文科技资料目录·中草药》: 1993—2006 年合订本 (全套 2040 元), 2007—2008 年单行本, 每册定价 30.00 元, 全年订价 210.00 元 (6 期+年索引)。

地 址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

电子信箱: zcy@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

邮 编: 300193

网 址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

账 号: 44114010010081504

电 话: (022)27474913, 23006821

传 真: (022)23006821

户 名: 天津中草药杂志社