

正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究

陈敬^{1,2}, 温庆果¹, 刘韶^{1*}, 李新中¹

1. 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008

2. 长沙市中心医院药学部, 湖南 长沙 410004

摘要: 目的 确定壳聚糖用于莲子心提取液除杂的最佳工艺条件。方法 以固形物去除率、甲基莲心碱保留率为考察指标, 分别考察壳聚糖用量、药液质量浓度、药液 pH 值、作用温度、搅拌时间对除杂效果的影响; 在单因素分析的基础上采用正交试验设计及响应面法对比优化除杂工艺条件。结果 莲子心提取液除杂的优化工艺条件: 药液质量浓度为生药 0.2 g/mL (1:5) 或 0.18 g/mL (1:5.5), 壳聚糖溶液 (1%) 用量为 1.2 mL/g (壳聚糖溶液体积与生药量之比), 作用温度为 60 ℃, pH 值为 6.2, 搅拌时间 20 min。结论 正交设计与响应面法均可用于壳聚糖对莲子心提取液除杂的工艺条件优化, 且除杂效果良好; 但正交设计的试验次数相对较少, 且方法简便, 更加适合壳聚糖除杂工艺的优化。

关键词: 莲子心; 壳聚糖; 除杂工艺; 正交设计; 响应面法; 甲基莲心碱

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)11-2183-06

Optimization for purifying technology of *Nelumbinis Plumula* extract with chitosan by comparison of orthogonal design and response surface method

CHEN Jing^{1,2}, WEN Qing-guo¹, LIU Shao¹, LI Xin-zhong¹

1. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

2. Department of Pharmacy, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China

Key words: *Nelumbinis Plumula*; chitosan; purifying technology; orthogonal design; response surface method (RSM); neferine

莲子心中生物碱具有抗心律失常^[1]、降压^[2]、降血糖^[3]、抗血小板聚集^[4]、逆转肿瘤多药耐药^[5-6]等多种药理作用, 但在提取过程中, 莲子心中所含的胶质、蛋白质、叶绿素、果胶、鞣质等成分使其难以用普通滤过方式除去, 有人曾采用膜分离方法分离莲心碱^[7], 但滤膜抗污染能力弱, 使用寿命短。壳聚糖是天然阳离子型絮凝剂, 具有优良的絮凝效果, 在中药提取液除杂澄清工艺中应用较多^[8-10], 但尚未见壳聚糖用于莲子心提取液除杂处理的报道。本实验采用正交试验设计法和响应面法 (response surface method, RSM) ^[11-13] 分别优化了壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺条件, 并对两种试验设计获得的结果进行了比较。

1 仪器与材料

DF—101S 集热式磁力加热搅拌器: 江苏金坛市医疗仪器厂; 赛多利斯分析天平 (德国赛多利斯

仪器系统有限公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1311A 柱温箱、G1315A 二极管阵列检测器 (美国安捷伦公司)。

壳聚糖 (国药集团化学试剂有限公司); 莲子心 (湖南三湘中药饮片有限公司, 经湘雅医院药剂科刘韶副主任药师鉴定为睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 成熟种子的干燥绿色胚芽)。甲基莲心碱对照品 (自制, HPLC 峰面积归一化法计算质量分数 > 97%); 甲醇 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 其他试剂为分析纯。

数据分析软件: 正交设计助手 II (专业版) V3.1; Design-expert 8.0.4。

2 方法与结果

2.1 莲子心提取液的制备

取莲子心 1 kg, 按文献报道^[14]方法提取, 回收

收稿日期: 2012-03-06

基金项目: 湖南省中医药管理局基金资助项目 (2009056)

作者简介: 陈敬 (1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药。Tel: 13974903224 E-mail: xtcj2003@163.com

*通讯作者 刘韶 Tel: 13723873434 E-mail: liushao999@hotmail.com

网络出版时间: 2012-10-19 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121019.1034.005.html>

乙醇至完全, 加纯化水定容, 得质量浓度为生药 0.2 g/mL (1:5) 的莲子心提取液, 测得其 pH 值为 6.2; 依法可得 0.17 g/mL (1:6)、0.13 g/mL (1:8)、0.10 g/mL (1:10) 的莲子心提取液, 备用。

2.2 壳聚糖溶液的制备^[9]

称取 5.0 g 壳聚糖, 先用少量 1% 醋酸溶液将其搅成糊状, 再用 1% 醋酸溶液定容至 500 mL, 溶胀 24 h, 充分搅拌均匀, 即得 1% 壳聚糖溶液, 备用。

2.3 甲基莲心碱的测定^[14]

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-0.1% 三乙胺水溶液(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 60%~75% A; 5~10 min, 75%~80% A; 检测波长 282 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取甲基莲心碱对照品 6.7 mg 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 定容, 得 268 μg/mL 对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密吸取 1 mL 莲子心提取液澄清剂处理前后的样品于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2、4、6、8、10、15、20 μL 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 甲基莲心碱质量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=809.58 X-16.738$, $r=1.000 0$, 表明甲基莲心碱在 0.536~5.36 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.5 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 外标法计算, 即得。

2.4 评价指标

2.4.1 甲基莲心碱保留率 采用 HPLC 法分别对澄清前后提取液中甲基莲心碱进行定量测定, 计算保留率。

甲基莲心碱保留率 = 澄清后甲基莲心碱的量 / 澄清前甲基莲心碱的量

2.4.2 固形物去除率^[15] 精密量取澄清处理前后提取液各 25 mL, 置已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干, 105 ℃ 烘 3 h, 迅速置于干燥器中冷却, 30 min 后精密称定, 计算固形物去除率。

固形物去除率 = (澄清前固形物的量 - 澄清后固形物的量) / 澄清前固形物的量

2.4.3 综合评分 (overall desirability, OD) 在用

澄清剂对莲子心提取液进行除杂处理时, 既需最大限度地减少目标有效成分的损失, 又要保证较好的澄清效果, 所以选取固形物去除率 (Y_1) 及甲基莲心碱保留率 (Y_2) 一同作为评价指标进行综合评分, 将 Y_1 的权重设定为 0.3, Y_2 的权重设定为 0.7, 则: $OD=(Y_1/Y_{1max} \times 0.3 + Y_2/Y_{2max} \times 0.7)^{[16-17]}$ 。

2.5 除杂工艺单因素考察

2.5.1 壳聚糖溶液用量对除杂效果的影响 取质量浓度为 1:6 的莲子心提取液 60 mL, 平行 6 份, 在 50 ℃ 下加入不同量的壳聚糖溶液, 搅拌 10 min, 保温 1 h, 室温静置 12 h, 滤过, 滤液定容至 50 mL, 测定固形物去除率和甲基莲心碱保留率, 结果见表 1。由结果可知, 壳聚糖溶液用量对固形物去除率及甲基莲心碱保留率影响明显, 随着壳聚糖溶液用量增大, 固形物去除率增大, 但甲基莲心碱保留率随之下降。

表 1 壳聚糖用量对除杂效果的影响

Table 1 Effect of chitosan dosage on purifying

壳聚糖用量 / (mL·g ⁻¹)	固形物去 除率 / %	甲基莲心碱 保留率 / %	OD 值 / %
0.6	12.23	96.96	84.14
0.8	15.07	94.67	85.78
1.0	17.80	93.24	87.90
1.2	19.74	90.96	88.50
1.6	24.24	86.06	90.16
1.8	25.94	85.23	91.53

2.5.2 药液质量浓度、药液 pH 值、作用温度、搅拌时间考察 取莲子心提取液适量, 按单因素设计试验, 壳聚糖用量为 0.8 mL/g, 分别设置药液质量浓度为 1:5、1:6、1:8、1:10, 药液 pH 值为 3、4、5、6.2 (不调), 作用温度为 40、50、60、70、80 ℃, 搅拌时间为 10、20、30、40、60 min, 其余操作基本同“2.5.1”项下方法。结果表明药液质量浓度、作用温度对除杂效果影响较明显; 搅拌时间对除杂效果影响较小, 搅拌 20 min 即可; 药液 pH 值对固形物去除率及甲基莲心碱保留率影响较小, 且 pH 值越低, 药液中非水溶性物质易游离出来形成油状沉淀, 加大了后续滤过操作的难度, 故不考虑调节 pH 值。结果见表 2~5。

2.6 正交试验设计优选除杂工艺条件

由单因素试验得知, 药液质量浓度、壳聚糖用量、作用温度对澄清效果影响较显著, 而搅拌时间

表 2 药液质量浓度对除杂效果的影响
Table 2 Effect of sample concentration on purifying

药液质量浓度 / (g·mL ⁻¹)	固形物去 除率 / %	甲基莲心碱 保留率 / %	OD 值 / %
1 : 10	11.58	91.32	87.95
1 : 8	12.40	94.16	91.48
1 : 6	14.29	93.66	94.38
1 : 5	17.32	90.41	97.21

表 3 药液 pH 值对除杂效果的影响
Table 3 Effect of pH value on purifying

药液 pH 值	固形物去 除率 / %	甲基莲心碱 保留率 / %	OD 值 / %
3	16.10	95.24	99.80
4	16.04	95.35	99.77
5	15.42	95.48	98.70
6.2 (不调节)	14.85	94.25	96.74

表 4 作用温度对除杂效果的影响
Table 4 Effect of temperature on purifying

作用温度 / °C	固形物去 除率 / %	甲基莲心碱 保留率 / %	OD 值 / %
40	12.13	94.05	88.05
50	14.81	94.27	92.77
60	17.63	95.24	98.27
70	9.67	96.73	85.79
80	8.12	97.66	83.82

表 5 搅拌时间对除杂效果的影响
Table 5 Effect of stirring time on purifying

搅拌时间 / min	固形物去 除率 / %	甲基莲心碱 保留率 / %	OD 值 / %
10	14.77	93.23	95.99
20	15.46	94.36	98.14
30	14.81	94.84	97.23
40	11.18	96.93	91.69
60	11.06	96.89	91.43

对除杂效果影响较小, 搅拌 20 min 即可; 药液 pH 值对除杂效果影响也较小, 且 pH 越低, 溶液中非水溶性物质游离出来形成油状沉淀, 加大了后续过滤的难度, 故不考虑调节 pH 值。故选择药液质量浓度 (A)、澄清剂壳聚糖溶液用量 (B)、作用温度 (C) 3 个主要影响因素作为考察因素, 以 Y_1 与 Y_2 的综合评分 OD 作为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 加入壳聚糖溶液后搅拌 20 min, 静置 12 h 后滤过, 取滤液定容测定各指标, 正交试验设计与结果见表 6, 方差分析见表 7。由表 6 直观分析可知, 正交试验的极差所确定的主次因素顺序依次为 $B > C > A$, 即壳聚糖溶液用量 $>$ 作用温度 $>$ 药液质量浓度。由直观分析可知 $A_3B_3C_3$ 方案最佳, 方差分析表明因素 B、C 对除杂效果影响差异具有显著性 ($P < 0.05$), 因素 A 差异无显著性; 结合单因素试验优选出壳聚糖除杂工艺条件为 $A_3B_3C_3$, 以此最佳工艺条件进行验证试验, 结果见表 8。

表 6 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Table 6 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B / (mL·g ⁻¹)	C / °C	D (空白)	Y_1 / %	Y_2 / %	OD / %
1	1 : 7 (1)	0.8 (1)	40 (1)	(1)	13.92	94.59	89.57
2	1 : 7 (1)	1.0 (2)	50 (2)	(2)	16.45	93.63	92.43
3	1 : 7 (1)	1.2 (3)	60 (3)	(3)	21.16	90.70	96.89
4	1 : 6 (2)	0.8 (1)	50 (2)	(3)	14.75	94.62	90.76
5	1 : 6 (2)	1.0 (2)	60 (3)	(1)	18.89	92.88	95.31
6	1 : 6 (2)	1.2 (3)	40 (1)	(2)	19.39	88.24	92.58
7	1 : 5 (3)	0.8 (1)	60 (3)	(2)	17.36	94.06	94.02
8	1 : 5 (3)	1.0 (2)	40 (1)	(3)	19.37	89.82	93.72
9	1 : 5 (3)	1.2 (3)	50 (2)	(1)	21.31	88.21	95.26
K_1	92.963	91.450	91.957	93.380			
K_2	92.883	93.820	92.817	93.010			
K_3	94.333	94.910	95.407	93.790			
R	1.450	3.460	3.450	0.780			

表7 正交试验方差分析

Table 7 Analysis of variance in orthogonal test

误差来源	偏平方和	自由度	F 值	显著性
A	3.986	2	4.366	
B	18.777	2	20.566	$P<0.05$
C	19.350	2	21.194	$P<0.05$
D(误差)	0.910	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.00 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.00$$

表8 正交验证试验

Table 8 Verification test of orthogonal test

试验号	固形物去除率 / %	甲基莲心碱保留率 / %
1	22.85	90.34
2	22.07	90.32
3	22.89	89.91

2.7 响应面法优选除杂工艺条件

2.7.1 响应面分析因素水平的选取 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 在单因素考察的基础上, 选择药液质量浓度(A)、壳聚糖用量(B)、作用温度(C) 3个因素作为考察因素, 以 Y_1 与 Y_2 的综合评分 OD 作为评价指标, 采用 3 因素 3 水平的响应面分析方法安排试验, 试验按“2.5”项下方法进行, 响应面分析方案见表 9。

表9 响应面分析试验设计与结果

Table 9 Design and results of RSM

试验号	A	B / (mL·g ⁻¹)	C / °C	Y_1 / %	Y_2 / %	OD / %
1	1 : 7 (-1)	0.8 (-1)	50 (0)	13.84	94.20	88.09
2	1 : 5 (1)	0.8 (-1)	50 (0)	16.74	92.96	91.18
3	1 : 7 (-1)	1.2 (1)	50 (0)	17.79	91.66	91.93
4	1 : 5 (1)	1.2 (1)	50 (0)	19.27	89.51	92.15
5	1 : 7 (-1)	1.0 (0)	40 (-1)	15.69	92.90	89.69
6	1 : 5 (1)	1.0 (0)	40 (-1)	17.66	91.26	91.21
7	1 : 7 (-1)	1.0 (0)	60 (1)	17.51	92.92	92.21
8	1 : 5 (1)	1.0 (0)	60 (1)	20.62	93.19	96.70
9	1 : 6 (0)	0.8 (-1)	40 (-1)	15.71	94.43	90.84
10	1 : 6 (0)	1.2 (1)	40 (-1)	19.55	90.79	93.47
11	1 : 6 (0)	0.8 (-1)	60 (1)	18.61	95.58	94.30
12	1 : 6 (0)	1.2 (1)	60 (1)	21.74	91.52	97.03
13	1 : 6 (0)	1.0 (0)	50 (0)	16.38	94.63	91.91
14	1 : 6 (0)	1.0 (0)	50 (0)	16.21	94.40	91.50
15	1 : 6 (0)	1.0 (0)	50 (0)	17.14	93.95	92.46
16	1 : 6 (0)	1.0 (0)	50 (0)	16.78	94.21	92.15
17	1 : 6 (0)	1.0 (0)	50 (0)	16.61	94.83	92.37

2.7.2 方差分析和回归方程 回归方程各项的方差分析见表 10。由 Box-Behnken 设计拟合, 得响应值(Y)对编码自变量的二次多项回归方程为 $Y=92.08+1.16 A+1.27 B+1.88 C-0.72 AB+0.74 AC+0.025 BC-1.35 A^2+0.11 B^2+1.72 C^2$ 。

对该模型进行回归方差分析和显著性检验, 结果见表 10。结果表明, 该模型 F 值为 35.18, 概率 $P<0.000 1$, 表明模型极显著; 模型的确定系数 R_{adj}^2 值为 0.950 6, 说明方程的因变量与全体自变量间线性关系显著, 响应值的变化有 95.06%来源于所选自变量, 即药液质量浓度、壳聚糖用量及作用温度。模型的变异系数为 0.53%, 说明模型的精密度好。同时, 方程的失拟项 F 值为 2.39, 概率 $P>0.05$, 失拟项不显著, 说明回归方程在整个回归区域的拟合情况良好, 可用该回归模型代替实验真实点对实验结果进行分析。

由表 10 可知, 对响应值作用显著的是 A、B、C、AB、AC、 A^2 、 C^2 , 因素 A、C 平方项的影响较大, 说明响应值与因素之间并不是简单的线性关系; 药液质量浓度与壳聚糖用量、药液质量浓度与温度对响应值有较强交互作用。

2.7.3 等高线图和响应面图分析 回归优化响应面曲面图见图 1。

根据二次多项回归方程, 固定作用温度(因素

表10 响应面法方差分析

Table 10 Analysis of variance in RSM

方差来源	平方和	自由度	F 值	显著水平
模型	75.55	9	35.18	$P<0.000 1$
A	10.86	1	45.50	$P=0.000 3$
B	12.93	1	54.18	$P=0.000 2$
C	28.24	1	118.34	$P<0.000 1$
AB	2.06	1	8.63	$P=0.021 8$
AC	2.21	1	9.24	$P=0.018 8$
BC	2.50×10^{-3}	1	0.01	$P=0.921 3$
A^2	7.66	1	32.11	$P=0.000 8$
B^2	0.05	1	0.21	$P=0.662 4$
C^2	12.51	1	52.42	$P=0.000 2$
残差	1.67	7		
失拟项	1.07	3	2.39	$P=0.209 8$
纯误差	0.60	4		
总和	77.22	16		

$P<0.001$ 为极显著; $P<0.05$ 为显著

$P<0.001$ is highly significant; $P<0.05$ is significant

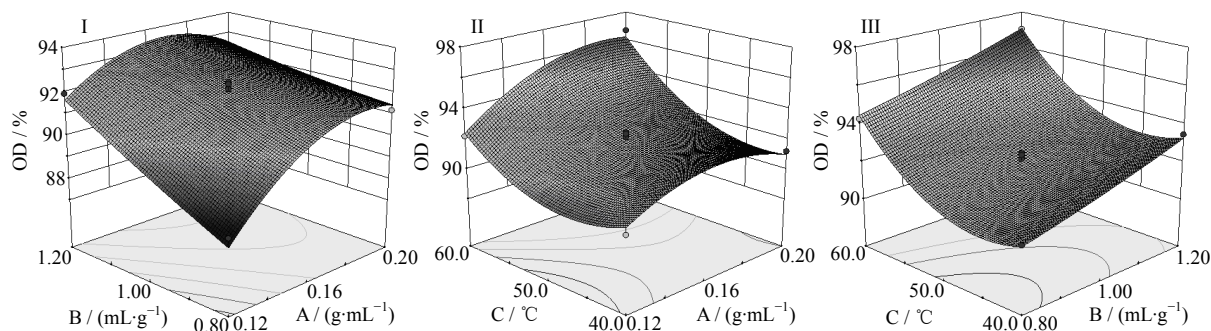


图 1 药液质量浓度 (A) 与壳聚糖用量 (B) (I)、药液质量浓度 (A) 与作用温度 (C) (II) 和壳聚糖用量 (B) 与作用温度 (C) (III) 对除杂效果的影响

Fig. 1 Effects of extract concentration (A)-chitosan dosage (B) (I), extract concentration (A)-temperature (B) (II), and chitosan dosage (B)-temperature (C) (III) on purifying

C), 取中间值 50 °C, 可作出药液质量浓度 (因素 A) 和壳聚糖用量 (因素 B) 两因素的交互图, 见图 1-I。由该图可知, 随着药液质量浓度升高, 响应值为一曲面, 在药液质量浓度为 0.18 g/mL (即 1 : 5.5) 时, 存在极大值, 而壳聚糖用量与响应值成正比, 壳聚糖用量越大, 响应值越大, 当壳聚糖用量为 1.2 mL/g 时, 响应值最大。该图中曲线坡度较陡, 表明因素 A 和因素 B 交互作用明显。

同理, 根据二项多次回归方程, 固定壳聚糖用量 (因素 B), 取中间值 1.0 mL/g, 可以作出药液质量浓度 (因素 A) 和作用温度 (因素 C) 两因素之间的交互图, 见图 1-II。在该图中, 随着药液质量浓度增加, 响应值仍为一曲面, 而随着温度升高, 响应值为一不对称马鞍面, 温度为 60 °C 时, 响应值最高。两曲面坡度较陡, 表明因素 A 和 C 之间交互作用较明显。

同理, 将药液质量浓度 (因素 A) 固定为 1 : 6, 可作出壳聚糖用量 (因素 B) 和作用温度 (因素 C) 之间的交互图, 见图 1-III。该图曲面平缓, 表明因素 B 和 C 之间交互作用较小。

通过软件分析, 回归模型预测的最佳除杂工艺为药液质量浓度为生药 0.18 g/mL (即 1 : 5.5), 壳聚糖用量为 1.2 mL/g, 作用温度为 60 °C。以此最佳工艺进行验证试验, 结果见表 11。

3 讨论

3.1 评价指标的选择

澄清剂能选择性地除去莲子心药液中胶质、蛋白质、叶绿素、果胶、鞣质等成分, 所以选取固形物去除率作为评价除杂效果的指标。同时, 为避免有效成分的损失, 故又选取甲基莲心碱保留率一同

表 11 响应面法验证试验

Table 11 Verification test of RSM

试验号	固形物去除率 / %	甲基莲心碱保留率 / %
1	22.66	90.72
2	22.82	89.78
3	22.19	91.51

作为指标进行综合评分。鉴于两指标间的矛盾性, 在数理统计时根据其重要程度给每个指标一个权重, 用权重影响该指标在方案得分中所占的分值。在处理试验数据时笔者引入了综合评分这一概念, 从而可以方便的将不同考察范围的指标转变成一个数值, 从而可能预测出综合最优的除杂工艺条件时各因素的取值。

3.2 药液 pH 值的选择

经单因素考察, 药液 pH 值为 3~4 时, 固形物去除率较 pH 值 5~6 时略偏高, 但该因素对固形物去除率及甲基莲心碱保留率影响均不显著, 且 pH 值越低, 溶液中非水溶性物质游离出来形成油状沉淀, 加大了后续过滤的难度, 故不考虑调节 pH 值。

3.3 正交设计与响应面法比较

正交设计能够较为全面的考察多因素多水平, 具有试验次数较少, 方法简便, 结果准确可靠等优点, 能筛选出影响指标的显著因素并给出最佳因素水平组合^[18], 但存在无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的缺点^[19], 多采用线性模型, 与实际情况可能有偏差, 比如本实验中正交设计结果药液质量浓度为 1 : 5, 而响应面设计结果选择 1 : 5.5, 固形物去除率一致, 但甲基莲心碱保留率稍偏高。

响应面优化法以回归方法作为函数估算工具,

将多因子试验由回归因子与试验结果的相互关系用多项式近似把因子与试验结果的关系函数化,能在整个区域上找到因素和响应值之间明确的函数表达式即回归方程,从而得到整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值^[13,18],试验精度更高,具有更好的预测性。与正交试验相比,其优势是:在试验条件寻优过程中,可以连续的对实验的各个水平进行分析,而正交试验只能对一个个孤立的试验点进行分析。但是响应面法仍有其局限性,该方法的前提是设计的试验点应包括最佳的试验条件,如果试验点的选取不当,响应面优化法是不能得到很好的优化结果的。

两种方法优化得到的除杂工艺条件为药液质量浓度为1:5或1:5.5,壳聚糖用量为1.2 mL/g,作用温度为60℃。通过本实验的比较,两种方法得到的结果基本一致,均可用于除杂工艺条件的优化;但正交试验的试验次数相对较少,方法简便,更加适合于壳聚糖除杂工艺条件的优化。

参考文献

- [1] Guo Z B, Li Q, Cao H Y, *et al.* Antiarrhythmic efficacy of neferine assessed by programmed electrical stimulation in a canine model of electropharmacology [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2002, 11(2): 35-42.
- [2] 王嘉陵, 宗贤刚, 姚伟星, 等. 甲基莲心碱对心肌细胞 I_{Na} 、 I_{Ca-L} 及稳态外向 K^+ 电流的影响 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 357-360.
- [3] Pan Y, Cai B C, Wang K L, *et al.* Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(1): 98-102.
- [4] 喻晶, 胡文淑. 甲基莲心碱对血小板聚集和胞浆游离钙离子浓度的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10(2): 120-122.
- [5] 唐小卿, 曹建国. 甲基莲心碱的药理作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 8-10.
- [6] 石书红, 张辉, 庄英帆, 等. 甲基莲心碱对长春新碱抑制人胃癌细胞增殖作用的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(5): 427-431.
- [7] 王晓静, 刘青山, 钱树德. 莲心碱与叶绿素膜分离的初步实验研究 [J]. 化工进展, 2006, 25(2): 196-199.
- [8] 任红莉, 阿依努尔, 宋达. 壳聚糖用于银杏叶提取液澄清工艺的研究 [J]. 西北药学杂志, 2009, 24(1): 25-26.
- [9] 蒋敏, 夏新华. 壳聚糖用于湘A-2号颗粒的絮凝工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 33-36.
- [10] 盛华刚, 朱立俏, 林桂涛. 壳聚糖澄清剂对枳实薤白桂枝汤颗粒提取液的纯化工艺研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 15-17.
- [11] 杨洁红, 张宇燕, 万海同, 等. 正交试验优选大孔树脂吸附纯化乌头碱工艺 [J]. 中国药师, 2008, 11(12): 1415-1417.
- [12] 刘泽峰, 何屹. 响应面法优化中药片剂薄膜包衣工艺研究 [J]. 中医药导报, 2009, 15(12): 67-69.
- [13] 欧阳辉, 田启建, 余估, 等. 酶法辅助提取绞股蓝中总黄酮工艺优化 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 886-889.
- [14] 陈敬, 温庆果, 刘韶, 等. ZTC1+1-II型澄清剂应用于莲子心提取液的除杂工艺研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(12): 908-912.
- [15] 严建业, 颜红, 夏新华, 等. II型ZTC1+1天然澄清剂用于驴胶补血颗粒水提液的澄清工艺研究 [J]. 中南药学, 2008, 6(5): 519-523.
- [16] 葛少祥, 彭代银, 刘金旗. 多指标综合水平正交设计优选连钱草提取工艺的实验研究 [J]. 安徽医药, 2007, 11(6): 490-491.
- [17] 王宁, 王建新, 宋崎, 等. 正交设计多指标综合评价法优化救心速释片处方 [J]. 中成药, 2003, 25(3): 179-182.
- [18] 李春英, 李晓娟, 杨磊, 等. 响应面分析法优化甘草酸和甘草黄酮联合提取工艺 [J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2009, 26(3): 390-395.
- [19] 王振忠, 武文洁. 野菊花总黄酮提取工艺的响应面设计优化 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 648-650.