

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

王永香^{1,2,3}, 米慧娟^{2,3}, 张传力^{2,3}, 胡杨^{2,3}, 施静^{2,3}, 毕宇安^{2,3}, 王振中^{2,3}, 萧伟^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210000
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 优化热毒宁注射液金银花和青蒿（金青）的醇沉工艺, 并获得关键工艺参数与质量属性的关系方程, 为醇沉过程自动化控制提供理论依据。方法 以新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷转移率及醇沉液中固含量为指标, 通过单因素试验设计, 考察醇沉前液相对密度、醇沉前液温度、醇沉终点乙醇体积分数、醇沉搅拌速度、加醇速度、静置温度、静置时间 7 个因素对醇沉工艺的影响趋势, 同时通过方差分析确定影响醇沉工艺的关键因素。再采用 Box-Behnken 响应面法对关键因素的参数范围进行进一步的研究与探讨。结果 单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法研究得到金青醇沉的最佳工艺参数: 搅拌速度为 550 r/min、加醇体积流量为 4.0 mL/s、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 30 °C、静置时间 24 h、醇沉前液相对密度 1.10 g/mL (25 °C)、醇沉前液温度 25 °C, 在此条件下新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷转移率分别为 94.8%、97.6%、97.4%、97.2%、96.1%, 醇沉液中固含量为 4.2%。结论 采用响应面法优化了热毒宁注射液金青的醇沉工艺, 有助于进一步提升金青醇沉工艺的稳定性。

关键词: 热毒宁注射液; 金银花; 青蒿; 醇沉工艺; 响应面法; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 断氧化马钱子苷

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)05-0671-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.05.010

Optimization on alcohol precipitation process for *Lonicerae Flos* and *Artemisiae Annuae Herba* in Reduning Injection by central composite design and response surface methodology

WANG Yong-xiang^{1,2,3}, MI Hui-juan^{2,3}, ZHANG Chuan-li^{2,3}, HU Yang^{2,3}, SHI Jing^{2,3}, BI Yu-an^{2,3}, WANG Zhen-zhong^{2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To optimize the alcohol precipitation process for *Lonicerae Flos* and *Artemisiae Annuae Herba* (LA) in Reduning Injection and obtain the relationship equation of the key process parameters and quality attributes, which could provided a theoretical basis of the control automization in the alcohol precipitation process. **Methods** With the transfer rates of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenin acid, caffeic acid, secoxyloganin and solid content in precipitation liquid as evaluation indexes, the effect of the seven factors, such as relative density and the temperature of LA in liquid phase before alcohol precipitation, alcohol concentration in the end of alcohol precipitation, stirring speed in alcohol precipitation, adding alcohol speed, standing temperature, and standing time, on the alcohol precipitation process was investigated by the single factor experiment. By analysis of variance, the key factors that could influence the alcohol precipitation process were determined. Then the range of parameters of key factors was further studied and explored by Box-Behnken response surface methodology. **Results** The optimum preparation

收稿日期: 2014-10-05

基金项目: 国家重大新药创制项目: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 王永香, 主要从事中药新药及中药制药新技术研究。E-mail: xiaoyu99201@163.com

*通信作者 萧伟, 研究员级高级工程师, 南京中医药大学博士生导师, 主要从事中药新药研究及中药制药新技术研究。

Tel: (0518)81152325 Fax: (0518)81152327 E-mail: wzzhz-nj@163.com

conditions of the alcohol precipitation process of LA were as follows: stirring speed was 550 r/min, adding alcohol speed was 4.0 mL/s, standing temperature was 30 °C, standing time was 24 h, alcohol concentration was 75%, the relative density of LA was 1.10, and the temperature of LA was 25 °C. Under these conditions, the transfer rates of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, and secoxyloganin were 94.8%, 97.6%, 97.4%, 97.2%, and 96.1%, and the solid content was 4.2%. **Conclusion** The alcohol precipitation process of LA have been optimized by the response surface method, which could help to enhance the stability of the process.

Key words: Reduning Injection; *Lonicerae Flos*; *Artemisiae Annuae Herba*; alcohol precipitation process; response surface methodology; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; secoxyloganin

中药醇沉工艺起源于 20 世纪 50 年代^[1], 是利用中药有效成分能溶于乙醇, 而杂质不溶于乙醇的原理分离纯化有效成分的方法^[2-3]。因其具有操作步骤简单, 设备成本相对低廉, 能显著提高药液澄明度等优点, 被中药口服制剂和中药注射剂等有澄明度要求的中药制剂普遍用于有效成分的分离精制过程^[3-4]。醇沉过程包括加料、加醇、搅拌、静置、滤过等多个环节, 影响因素众多, 除加醇速度、醇沉搅拌速度、醇沉终点乙醇浓度、静置温度、静置时间等因素外, 醇沉前液组成和性质对醇沉效果也有显著影响^[5-6]。热毒宁注射液制备过程中对金银花和青蒿(金青)提取浓缩液(下文称金青醇沉前液)进行了醇沉纯化处理, 现对醇沉过程参数进行考察, 确定最佳参数范围。

中药通过多种化学成分作用于人体多个靶点而发挥药效^[7], 在研究中药制药过程时, 常需同时考虑多种与药品质量相关的指标, 进行多指标综合评价^[8-9]。热毒宁注射液是由青蒿、金银花和栀子 3 味中药组成的复方中药注射液, 具有清热、疏风、解毒之功效, 本课题组曾对热毒宁注射剂的相关工艺、化学成分和药理作用进行了系统研究^[10-13]。文献报道显示^[14-16], 青蒿、金银花 2 味药材中发挥清热解毒功效的指标成分主要为有机酸类、黄酮类、香豆素类等, 该品种药效物质基础研究结果显示, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷均具有较好的抗病毒作用及提高免疫的作用。本研究通过单因素试验结合 Box-Behnken 响应面法, 以新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷的转移率为指标表征醇沉液中有效成分的保留率, 同时以固含量为指标表征醇沉除杂率, 考察醇沉前液相对密度、醇沉前液温度、醇沉终点乙醇体积分数、醇沉搅拌速度、加醇速度、静置温度、静置时间对金青醇沉的影响, 找出金青醇沉关键工艺参数并获得关键工艺参数与关键质量属性的关系, 并对关键工艺参数进行优化。

1 仪器与试剂

D2015W 型电动搅拌器, 上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪、DAD 检测器, 美国安捷伦公司; BP211D 型万分之一电子天平、BT25S 型十万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司。

对照品绿原酸(批号 110753-201314, 质量分数 96.6%)、咖啡酸(批号 110885-200102, 质量分数 98.0%), 中国食品药品检定研究院; 对照品隐绿原酸(批号 101245643, 质量分数 ≥ 98.0%)、新绿原酸(批号 101212168, 质量分数 ≥ 98.0%), Sigma 公司; 对照品断氧化马钱子苷(批号 20120625, 质量分数 ≥ 98.0%), 上海永恒生物科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。

金青醇沉前液(z140528)来自江苏康缘药业股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 金青醇沉液制备

取金青醇沉前液 100 g 于洁净烧杯中, 在搅拌下向药液中匀速加入 95%乙醇, 加完后将烧杯封口, 室温下静置 24 h, 取上清液, 即得金青醇沉液。

2.2 定量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 洗脱剂为 0.1%磷酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱: 0~10 min, 15%~25%甲醇; 10~30 min, 25%~35%甲醇; 30~60 min, 35%~50%甲醇; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸的检测波长为 324 nm, 断氧化马钱子苷的检测波长为 237 nm, 进样量为 10 μL。色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷对照品, 精密称定, 加 50%甲醇制备成含新绿原酸 13.36 μg/mL、绿原酸 36.41 μg/mL、隐绿原酸 13.0 μg/mL、咖啡酸

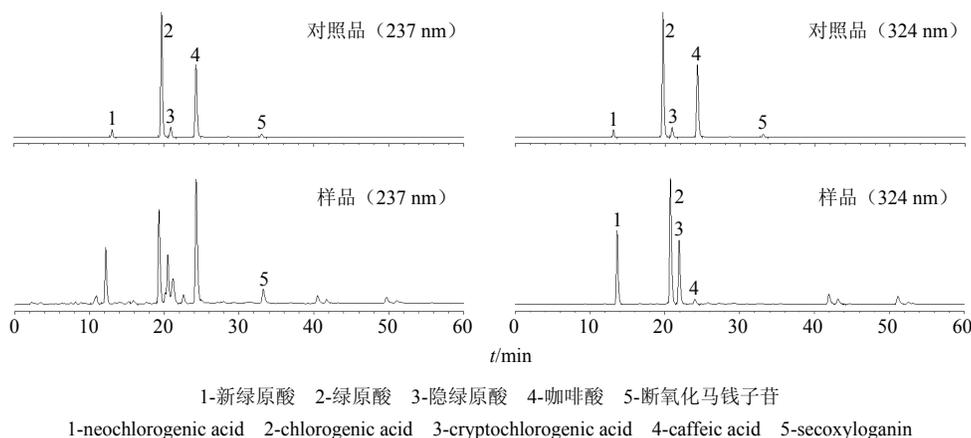


图1 混合对照品及样品的HPLC图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances and samples

10.56 μg/mL 和断氧化马钱子苷 10.88 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取金青醇沉上清液 1 g (或金青醇沉前液 0.25 g), 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即得。

2.2.4 标准曲线的制备 分别精密称取新绿原酸 12.50 mg、绿原酸 20.78 mg、隐绿原酸 10.87 mg、咖啡酸 1.8 mg 和断氧化马钱子苷 6.49 mg 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。对混合对照品进行 0、2.5、5、10、20、40 倍稀释, 分别精密吸取上述系列混合对照品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪进行测定, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得新绿原酸回归方程 $Y=0.5671X-0.8703$, $r=0.9999$, 线性范围 12.50~500.00 μg/mL; 绿原酸回归方程 $Y=0.7849X-0.8451$, $r=1.0000$, 线性范围 20.78~831.2 μg/mL; 隐绿原酸回归方程 $Y=0.6925X-0.6437$, $r=1.0000$, 线性范围 10.87~434.80 μg/mL; 咖啡酸回归方程 $Y=0.7843X-0.5429$, $r=1.0000$, 线性范围 1.8~72.0 μg/mL; 断氧化马钱子苷回归方程 $Y=0.4873X-0.2581$, $r=0.9999$, 线性范围 6.49~259.60 μg/mL。

2.2.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液 (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷的质量浓度依次为 25.0、41.6、21.7、3.6、13.0 μg/mL) 连续进样 6 次, 5 种成分峰面积的 RSD 依次为 0.54%、0.35%、0.41%、0.63%、1.23%, 均小于 2%, 说明该方法精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取金青醇沉上清液 1 g, 按“2.2.3”项的方法平行制备 6 份供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积, 计算质量浓度。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷质量浓度的 RSD 依次为 1.23%、1.03%、1.32%、0.98%、1.43%, 说明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 按“2.2.3”项方法制备供试品溶液, 分别于室温下放置 0、4、8、12、16、20、24 h, 按“2.2.1”项色谱条件进行测定, 记录峰面积。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷峰面积的 RSD 依次为 0.78%、0.86%、0.57%、1.05%、1.31%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 取金青醇沉上清液 1 g, 置于 50 mL 量瓶中, 分别精密加入样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷 5 种成分量的 100% 的对照品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 计算回收率, 结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷的平均回收率分别为 98.57%、101.38%、100.87%、97.44%、98.64%, RSD 分别为 1.04%、1.23%、1.07%、0.97%、1.37%, 均小于 3%, 说明在该色谱条件下, 测定样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸和断氧化马钱子苷的准确度符合要求。

2.2.9 物质转移率的测定 取金青醇沉前液和金青醇沉液, 各样品按“2.2.3”项方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷的量, 并按下式计算各物质的转移率。

$$\text{转移率} = \frac{\text{醇沉液中物质量}}{\text{醇沉前液中物质量}}$$

2.3 固含量测定

精密称取金青醇沉液 10 g, 置于干燥至恒定质量的蒸发皿中, 水浴蒸干后于 105 °C 常压干燥箱中干燥至恒定质量, 取出, 于干燥器中冷却 30 min, 精密称定, 根据干燥恒定的质量, 计算金青醇沉液的固含量。

固含量 = 干燥后醇沉干膏质量 / 醇沉液取样量

2.4 单因素试验设计及结果

以新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、断氧化马钱子苷的转移率、固含量为指标, 考察醇沉前液相对密度、醇沉前液温度、醇沉终点乙醇体积分数、醇沉搅拌速度、加醇速度、静置温度、静置时间对醇沉效果的影响, 为响应面试验因素水平的选择提供依据。根据单因素试验设计 (表 1) 进行试验, 每个试验水平设 3 个平行组, 实验中所用乙醇均为 95% 乙醇 (室温放置)。

按表 1 中的工艺参数进行金青醇沉试验, 各醇沉样品的指标测定结果见表 2, 并将各结果进行 z-score 标准化处理^[17-18], 正相关指标数据 (物质转移率) 的标准化处理公式为新数据 = (原数据 - 算术平均数) / 标准差; 负相关指标数据 (固含量) 的标准化处理公式为新数据 = (算术平均数 - 原数据) / 标准差, 将各指标数据的标准化处理进行加和, 得到综合评分, 各指标数据的综合评分结果见表 2。运用 SPSS 17.0 软件对各单因素试验结果进行单因素 ANOVA 方差分析, 分析结果见表 3。

由表 3 可知, 加醇体积流量、静置时间对新绿原酸转移率等 6 个指标的 ANOVA 方差分析的 *P* 值均 > 0.05, 故在试验水平范围内, 加醇体积流量和静置时间对金青醇沉效果无显著影响; 搅拌速率和醇沉终点乙醇体积分数除对固含量的 ANOVA 方差分析的 *P* 值 < 0.05, 对其他 5 个指标的 ANOVA 方差分析的 *P* 值均 > 0.05, 故可认为在试验水平范围内, 搅拌速率和醇沉终点乙醇体积分数对金青醇沉效果无显著影响; 而静置温度、醇沉前液相对密度和醇沉前液温度对新绿原酸转移率等 6 个指标的 ANOVA 方差分析的 *P* 值均 < 0.05, 表明在试验水平范围内, 静置温度、醇沉前液相对密度和醇沉前液温度对金青醇沉效果具有显著影响, 故需进一步优化该 3 个因素。

在上述分析基础上, 结合表 3 综合评分的结果, 确定 7 个考察因素的水平为搅拌速度 550 r/min, 加醇体积流量 4.0 mL/s, 静置时间 20 h, 醇沉终点乙醇体积分数 75%, 静置温度 20~40 °C, 醇沉前液相对密度 1.08~1.12 g/mL, 醇沉前液温度 20~30 °C。

2.5 醇沉工艺的响应面优化试验设计及结果

在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 响应面法设计原理, 设计 17 个试验点 (5 个零点) 的响应面分析试验, 对静置温度 (A)、醇沉前液相对密度 (B)、醇沉前液温度 (C) 进行考察, 实验设计及结果见表 4。

表 1 单因素试验设计

Table 1 Design of single factor tests

考察因素	固定因素
搅拌速率 150、250、350、450、550 r·min ⁻¹	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、醇沉前液温度 25 °C、加醇体积流量 5 mL·s ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 20 °C、静置时间 24 h
加醇体积流量 7.0、5.5、4.0、2.5、1.0 mL·s ⁻¹	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、醇沉前液温度 25 °C、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 20 °C、静置时间 24 h
静置温度 4、10、20、30、40 °C	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、醇沉前液温度 25 °C、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、加醇体积流量 4 mL·s ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置时间 24 h
静置时间 10、20、30、40、50 h	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、醇沉前液温度 25 °C、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、加醇体积流量 5 mL·s ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 20 °C
醇沉终点乙醇体积分数 71%、73%、75%、77%、79%	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、醇沉前液温度 25 °C、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、加醇体积流量 5 mL·s ⁻¹ 、静置温度 20 °C、静置时间 24 h
醇沉前液相对密度 1.16、1.14、1.12、1.10、1.08 g·mL ⁻¹	醇沉前液温度 25 °C、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、加醇体积流量 5 mL·s ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 20 °C、静置时间 24 h
醇沉前液温度 15、20、25、30、35 °C	醇沉前液相对密度 1.14 g·mL ⁻¹ 、搅拌速率 550 r·min ⁻¹ 、加醇体积流量 5 mL·s ⁻¹ 、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度 20 °C、静置时间 24 h

表 2 单因素试验结果
Table 2 Results of single factor tests

因素	水平	转移率/%					固含量/%	综合评分
		新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	断氧化马钱子苷		
搅拌速度/(r·min ⁻¹)	150	81.1	78.9	81.3	98.2	88.4	4.5	0.55
	250	80.0	77.7	80.2	96.6	86.4	4.3	-7.98
	350	81.0	78.4	81.1	98.0	87.7	4.2	-0.15
	450	81.3	78.8	81.5	97.5	87.8	4.2	0.98
	550	81.8	79.4	82.0	98.6	88.2	4.0	6.60
加醇体积流量/(mL·s ⁻¹)	7.0	76.4	74.1	76.9	93.8	76.2	4.1	-4.65
	5.5	79.6	77.0	80.3	98.2	78.6	4.3	3.73
	4.0	80.5	77.9	81.4	97.4	78.7	4.3	4.68
	2.5	77.7	75.0	78.2	95.7	76.6	4.3	-2.93
	1.0	78.4	76.1	79.1	95.4	77.5	4.3	-0.84
静置温度/°C	4	78.0	74.5	77.3	92.9	73.7	4.2	-4.21
	10	79.4	75.8	78.3	94.2	74.3	4.3	-2.62
	20	80.6	77.3	79.8	95.4	74.9	4.4	-0.79
	30	81.5	79.2	81.8	100.0	76.2	4.6	1.23
	40	84.0	81.9	84.5	103.0	78.3	4.6	6.39
静置时间/h	10	80.6	76.7	79.3	98.6	85.6	4.7	1.79
	20	80.9	77.1	79.5	98.9	86.8	4.7	3.59
	30	80.0	76.5	79.0	98.2	86.3	4.6	2.07
	40	79.8	76.1	78.5	97.4	85.7	4.6	-0.73
	50	78.5	74.8	77.2	95.7	84.1	4.6	-6.71
醇沉终点乙醇体积分数/%	71	81.1	77.6	79.2	97.7	85.4	5.2	-5.88
	73	82.4	78.6	81.3	100.4	87.8	4.7	4.31
	75	82.4	78.7	81.6	100.2	87.6	4.3	5.06
	77	81.1	77.0	79.5	99.3	86.0	4.1	-2.42
	79	80.7	76.8	79.5	99.8	86.8	3.5	-1.08
醇沉前液相对密度/(g·mL ⁻¹)	1.16	83.8	81.5	81.4	89.7	85.0	3.4	-4.99
	1.14	83.9	81.6	81.8	90.3	85.7	3.5	-4.76
	1.12	90.3	88.6	89.9	108.8	91.6	3.8	1.93
	1.10	92.3	91.5	92.3	110.0	95.6	3.8	4.18
	1.08	90.1	89.6	89.6	101.3	93.0	3.2	3.64
醇沉前液温度/°C	15	83.8	81.9	84.8	94.4	90.6	4.3	-2.25
	20	86.9	84.2	88.0	96.3	92.3	4.5	1.28
	25	89.3	87.3	91.8	104.0	96.5	4.6	7.97
	30	85.1	83.3	86.3	96.1	90.8	4.8	-1.43
	35	75.6	81.1	85.6	96.2	91.6	5.5	-5.57

对表 4 中的试验数据进行 z-score 标准化处理^[17-18], 正相关指标数据(物质转移率)的标准化处理公式为:新数据=(原数据-算术平均数)/标准差; 负相关指标数据(固含量)的标准化处理公式

为新数据=(算术平均数-原数据)/标准差, 并将各指标数据的标准化处理进行加和, 得到综合评分, 各指标数据的标准化处理和综合评分结果见表 4。利用 Design-Expert 8.0.5b 软件对综合评分结果进行

表 3 单因素试验方差分析
Table 3 Analysis of variance of single factor tests

因素	P 值					
	新绿原酸转移率	绿原酸转移率	隐绿原酸转移率	咖啡酸转移率	断氧化马钱子苷转移率	固含量
搅拌速度	0.706	0.726	0.706	0.764	0.571	0.000
加醇体积流量	0.096	0.092	0.059	0.124	0.282	0.522
静置温度	0.030	0.002	0.004	0.000	0.032	0.002
静置时间	0.459	0.484	0.476	0.403	0.433	0.666
醇沉终点乙醇体积分数	0.640	0.517	0.364	0.466	0.475	0.000
醇沉前液相对密度	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
醇沉前液温度	0.000	0.021	0.005	0.001	0.037	0.000

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果 (括号内为标准化处理后的试验数据)
Table 4 Design and results of Box-Behnken test (brackets for standardized processing of test data)

试验号	A/°C	B/ (g·mL ⁻¹)	C/°C	转移率/%					固含量/%	综合评分
				新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	断氧化马钱子苷		
1	20 (-1)	1.12 (1)	25 (0)	89.3 (-1.070)	93.6 (0.165)	93.3 (-0.270)	97.4 (0.289)	94.2 (-0.593)	4.7 (-1.260)	-2.738
2	30 (0)	1.10 (0)	25 (0)	94.4 (1.058)	98.2 (1.803)	98.3 (1.777)	97.2 (0.128)	96.2 (1.158)	4.2 (1.019)	6.941
3	40 (1)	1.10 (0)	30 (1)	92.3 (0.182)	93.4 (0.094)	92.2 (-0.720)	98.1 (0.853)	93.4 (-1.294)	4.6 (-0.804)	-1.689
4	30 (0)	1.08 (-1)	20 (-1)	88.7 (-1.321)	90.6 (-0.902)	90.4 (-1.456)	96.5 (-0.436)	93.7 (-1.031)	4.2 (1.019)	-4.128
5	30 (0)	1.10 (0)	25 (0)	93.5 (0.682)	96.1 (1.055)	97.2 (1.326)	98.4 (1.095)	96.3 (1.245)	4.2 (1.019)	6.422
6	20 (-1)	1.10 (0)	20 (-1)	91.2 (-0.277)	91.4 (-0.618)	92.3 (-0.679)	96.8 (-0.194)	93.1 (-1.556)	4.7 (-1.260)	-4.584
7	30 (0)	1.08 (-1)	30 (1)	90.8 (-0.444)	91.2 (-0.689)	92.6 (-0.556)	97.2 (0.128)	94.1 (-0.663)	4.8 (-1.715)	-3.940
8	30 (0)	1.12 (1)	30 (1)	89.3 (-1.070)	91.4 (-0.618)	92.5 (-0.597)	95.6 (-1.161)	94.7 (-0.156)	4.4 (0.107)	-3.494
9	30 (0)	1.10 (0)	25 (0)	95.7 (1.600)	96.5 (1.197)	97.3 (1.367)	98.2 (0.933)	95.3 (0.370)	4.3 (0.563)	6.031
10	20 (-1)	1.10 (0)	30 (1)	88.3 (-1.488)	89.2 (-1.401)	91.3 (-1.088)	95.6 (-1.161)	96.5 (1.420)	4.2 (1.019)	-2.698
11	40 (1)	1.08 (-1)	25 (0)	93.1 (0.515)	92.3 (-0.297)	94.9 (0.385)	94.8 (-1.805)	93.9 (-0.856)	4.4 (0.107)	-1.950
12	40 (1)	1.10 (0)	20 (-1)	88.7 (-1.321)	91.5 (-0.582)	95.6 (0.672)	95.9 (-0.919)	95.6 (0.632)	4.3 (0.563)	-0.955
13	30 (0)	1.10 (0)	25 (0)	95.2 (1.392)	96.4 (1.162)	96.1 (0.876)	96.8 (-0.194)	96.4 (1.333)	4.2 (1.019)	5.587
14	30 (0)	1.10 (0)	25 (0)	94.3 (1.016)	97.8 (1.660)	96.4 (0.999)	97.5 (0.370)	95.4 (0.457)	4.2 (1.019)	5.521
15	20 (-1)	1.08 (-1)	25 (0)	91.7 (-0.069)	90.1 (-1.080)	91.2 (-1.129)	96.1 (-0.758)	94.4 (-0.418)	4.5 (-0.348)	-3.803
16	30 (0)	1.12 (1)	20 (-1)	92.0 (0.056)	91.9 (-0.440)	93.5 (-0.188)	99.8 (2.222)	93.8 (-0.943)	4.6 (-0.804)	-0.096
17	40 (1)	1.12 (1)	25 (0)	93.2 (0.557)	91.7 (-0.511)	92.2 (-0.720)	97.8 (0.611)	95.9 (0.895)	4.7 (-1.260)	-0.427

二次多元回归拟合, 得到综合评分结果对 A、B 和 C 的二次多项回归模型方程: $Y=6.10+1.10 A+0.88 B-0.26 C+0.11 AB-0.65 AC-0.90 BC-3.95 A^2-4.38 B^2-4.63 C^2$, $R^2=0.985 3$, 接近 1, 说明通过二次回归得到综合评分模型与试验拟合较好。同时, 响应面二次回归方程方差分析结果见表 5, 结果显示综合评分结果建立的回归整体模型达到极显著 ($P<0.01$), 失拟项不显著 ($P>0.05$), 因此模型成立。

表 5 的结果显示, A、A²、B²、C² 项达到极显

著水平 ($P<0.01$), B 项达显著水平 ($P<0.05$)。同时由 F 值大小可推断, 在所选择的试验范围内, 3 个因素对综合评分的影响为 A>B>C, 因素 A 与 B 的交互作用为主要交互作用。

利用 Design-Expert 8.0.5b 软件, 根据拟合模型绘制不同影响因素对综合评分的三维曲线图见图 2, 了解各因素的交互作用对综合评分的影响。图 2-a 显示, 综合评分随 A 的增加先增后减, 随 B 的增加先增后减。图 2-b 显示, 综合评分随 A 的增加先迅速增加后缓慢减少, 随 C 的增加缓慢增加。图

表5 响应面二次回归方程方差分析

Table 5 ANOVA for quadratic regression equations of response surface

差异来源	平方和	自由度	F 值	P 值	差异来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	286.00	9	52.12	<0.000 1	A ²	65.65	1	107.68	<0.000 1
A	9.69	1	15.89	0.005 3	B ²	80.83	1	132.59	<0.000 1
B	6.24	1	10.23	0.015 1	C ²	90.39	1	148.27	<0.000 1
C	0.53	1	0.87	0.382 4	残差	4.27	7		
AB	0.05	1	0.09	0.777 2	失拟项	2.85	3	2.69	0.181 6
AC	1.72	1	2.81	0.137 4	纯误差	1.41	4		
BC	3.21	1	5.27	0.055 3	总差	290.27	16		

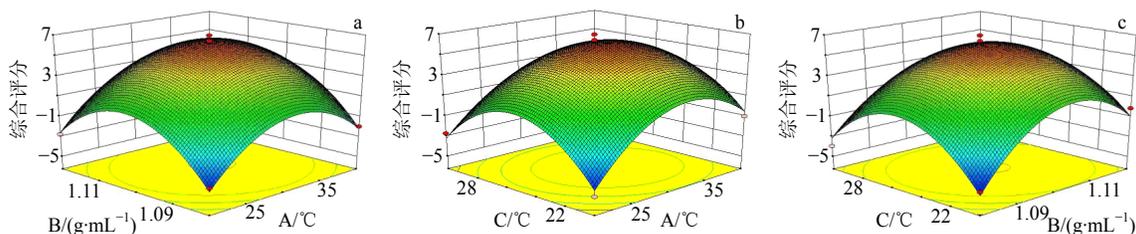


图2 静置温度、醇沉前液相对密度和醇沉前液温度对综合指标的响应面

Fig. 2 Response surface plot for effect of standing temperature, temperature of LA in liquid phase before alcohol precipitation, and relative density of LA in liquid phase before alcohol precipitation on comprehensive indexes

2-c 显示, 综合评分随 B 的增加先迅速降低后缓慢增加, 随 C 的增加缓慢增加。

2.6 金青醇沉工艺优化结果和验证

对于多参数的优化过程应在相应影响因素等高线图(图 2-a~c 底部平面图)重合区域进行考察^[19], 因此, 在上述响应面模型分析的基础上, 利用 Design-Expert 8.0.5b 软件对综合指标的二次回归方程求解, 得最佳工艺条件为 A(静置温度)31.45 °C, B(醇沉前液相对密度)1.10, C(醇沉前液温度)24.76 °C, 综合评分为 6.23。

为检验预测的结果, 需对预测的最佳工艺条件

进行验证。为方便实际操作, 将验证条件修正为静置温度 30 °C, 醇沉前液相对密度 1.10, 醇沉前液温度 25 °C。按此工艺条件进行金青醇沉, 平行操作 3 次, 结果见表 6。对结果的均值进行标准化处理, 得综合评分为 6.42, 与预测值 6.23 相比, 实际综合评分与预测综合评分的偏差为 3.4%。

本研究得到金青醇沉的最佳工艺条件为搅拌速率 550 r/min、加醇体积流量 4.0 mL/s、静置时间 24 h、醇沉终点乙醇体积分数 75%、静置温度为 30 °C、醇沉前液相对密度为 1.10 g/mL、醇沉前液温度为 25 °C。

表6 验证实验结果 (括号内为标准化处理后的试验数据)

Table 6 Results of verification (brackets for standardized processing of test data)

试验号	转移率/%					固含量/%	综合评分
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	断氧化马钱子苷		
1	94.8 (1.224)	98.2 (1.802)	95.7 (0.713)	97.5 (0.370)	96.4 (1.333)	4.2 (1.001)	6.44
2	94.6 (1.141)	97.9 (1.696)	98.0 (1.654)	96.8 (-0.194)	95.8 (0.807)	4.2 (1.001)	6.10
3	95.1 (1.349)	96.8 (1.304)	98.6 (1.899)	97.3 (0.208)	96.2 (1.158)	4.3 (0.548)	6.47
平均值	94.8 (1.224)	97.6 (1.589)	97.4 (1.408)	97.2 (0.128)	96.1 (1.070)	4.2 (1.001)	6.42

3 讨论

热毒宁注射液金青醇沉工艺的生产环境温度因季节不同差异较大, 冬季基本在 15~20 °C, 夏季基本在 40~50 °C, 因此不同季节醇沉前液温度和

静置温度存在差异, 而二者是影响醇沉效果的关键因素之一, 也是目前金青醇沉生产过程需要关注的质控因素。

本研究通过单因素试验结合 Box-Benknken 响

应面法,对影响醇沉工艺的7个因素进行考察,获得金青的最佳醇沉工艺。研究结果显示,运用响应面法建立质控指标与关键工艺参数的数学模型,并运用该模型对最佳工艺的结果进行预测,结果显示预测值与实际值的偏差在5%以内,表明其相关性良好,说明对金青醇沉工艺进行响应面法优化合理可行。本实验研究结果为控制金青醇沉生产过程关键参数波动范围提供参考,有助于进一步提升金青醇沉工艺的稳定性。

参考文献

- [1] 曹春林. 中药制剂汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [2] 赵陆军, 徐思康, 张保献. 中药水提取液常用精制方法概述 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(11): 47-48.
- [3] 杜松, 罗爱勤, 刘美凤. 中药浸膏醇沉工艺中醇浓度概念与计算方法辨析 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1652-1655.
- [4] 陈勇, 李页瑞, 金胤池, 等. 中药醇沉工艺及装备研究进展与思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(5): 16-19.
- [5] 闫安忆, 龚行楚, 瞿海斌. 一种中药醇沉前浓缩液关键质量控制指标的辨析方法 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1558-1563.
- [6] 闫安忆. 冠心宁注射液醇沉工艺的质量控制技术研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [7] Efferth T, Koch E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(1): 122.
- [8] 袁佳, 李页瑞, 陈勇, 等. 多指标综合评价法优选红花提取液醇沉工艺 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2011, 40(1): 27.
- [9] 熊吟, 肖小河, 鄢丹, 等. 综合量化集成的中药品质评控策略: 中药效应成分指数 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 1-7.
- [10] 杜文俊, 刘雪松, 陶玲艳, 等. 热毒宁注射液金银花和青蒿(金青)醇沉过程中多指标的近红外快速检测 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 61-66.
- [11] 王永香, 张卫平, 张庆芬, 等. 聚砜超滤膜对热毒宁注射液脱炭液的纯化工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1905-1910.
- [12] 李海波, 于洋, 王振中, 等. 热毒宁注射液抗病毒活性成分研究 (I) [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1682-1688.
- [13] 曹泽戎, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗A16型柯萨奇病毒的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [14] 胡媛. 青蒿研究进展 [J]. 海峡药学, 2010, 22(11): 4.
- [15] 李海波. 热毒宁注射液药效物质基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [16] 李海波, 于洋, 王振中, 等. 热毒宁注射液抗病毒活性成分研究 (I) [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1682-1688.
- [17] 熊皓舒, 傅迎, 聂晶, 等. 中药生产多工序多指标统计质量控制 (MMSQC) 方法 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1935-1940.
- [18] 黄志奇. 面向支持向量机的样本集预处理相关研究与应用 [D]. 上海: 华东师范大学, 2014.
- [19] 王明艳, 鲁加峰, 王晓顺, 等. 响应面法优化天冬多糖的提取条件 [J]. 食品科学, 2010, 31(6): 91-95.