

正交设计联用星点设计-效应面法优化雪胆炮制工艺

李艺丹¹, 张婷婷¹, 熊瑞¹, 郑凯旋¹, 赵永峰¹, 陈达¹, 孙继林², 胡昌江^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 四川辅正药业股份有限公司, 四川 成都 611730

摘要: 目的 优化甘草制雪胆的炮制工艺。方法 HPLC法测定雪胆素甲; 以雪胆素甲质量分数为指标, 采用正交试验考察闷润时间、烘干温度、烘干时间对甘草制雪胆炮制工艺的影响; 进一步采用星点设计-效应面法(CCD-RSM)考察闷润时间和烘干时间对该炮制工艺的影响。结果 正交试验确定的甘草制雪胆最佳炮制工艺为闷润7 h, 80 ℃烘干12 h; CCD-RSM确定最佳炮制工艺为闷润时间7.48~8.56 h, 烘干时间12.06~13.12 h。结论 本实验首次使用甘草汁炮制雪胆, 实验方法设计精确, 模型、数据可靠, 建立并优化了甘草制雪胆的炮制工艺。

关键词: 雪胆; 甘草; 星点设计-效应面法; 正交设计; 雪胆素甲; 炮制工艺

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)05-0913-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.012

Optimization of processing technology of *Hemsleya omeiensis* by orthogonal design and central-composite design-response surface methodology

LI Yi-dan¹, ZHANG Ting-ting¹, XIONG Rui¹, ZHENG Kai-xuan¹, ZHAO Yong-feng¹, CHEN Da¹, SUN Ji-lin², HU Chang-jiang¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Fuzheng Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611730, China

Abstract: Objective To optimize the processing technology of *Hemsleya omeiensis* processed by licorice juice. **Methods** HPLC was employed to determine the content of hemslecin A. Taking content of hemslecin A as index, the orthogonal test was adopted to optimize the covered moistening time, drying-time, and processing temperature. And the central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) was adapted to optimize moistening time and drying-time further. **Results** The optimum processing technology of *H. omeiensis* by the orthogonal test was covered moistening time of 7 h, drying-time of 12 h, and processing temperature at 80 ℃. The optimum processing technology by CCD-RSM was covered moistening time of 7.48—8.56 h, drying-time of 12.06—13.12 h, and processing temperature at 80 ℃. **Conclusion** The experimental design method is precise and the data are reliable with the model. It is the first time that *H. omeiensis* is processed with licorice juice. Besides, it establishes the processing technology of *H. omeiensis* and provides a theoretical basis for the processing technology of *H. omeiensis* with licorice juice.

Key words: *Hemsleya omeiensis* L. T. Shen et W. J. Chang.; *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; central composite design-response surface methodology (CCD-RSM); orthogonal design; hemslecin A; processing technology

雪胆为葫芦科雪胆属植物长果雪胆 *Hemsleya dolichocarpa* W. J. Chang、峨眉雪胆 *Hemsleya omeiensis* L. T. Shen et W. J. Chang 或巨花雪胆 *Hemsleya gigantea* W. J. Chang 的干燥块根, 别名金龟莲、金盆、罗锅底, 在《草木便方》《修订增补天宝本草》中均有记载; 本品味苦, 性寒, 有小毒,

具有清热解毒、利湿消肿、止痛止血的功效^[1]。现代研究表明雪胆除了有抗炎、抗菌、抗病毒作用外, 还具有良好的保肝、抗癌、抗动脉粥样硬化等作用^[2-7]。雪胆在临床上应用广泛, 具有疗效显著、服用剂量小、无耐药性等特点, 被称为“天然抗生素”。但雪胆味苦, 临床上顺应性较差尤其不能被儿

收稿日期: 2016-11-01

基金项目: 四川省2015年第一批科技计划项目“四川道地药材——雪胆创新炮制工艺技术标准与技术规范及质量标准”(2015SZ0107)

作者简介: 李艺丹(1991—), 女, 在读硕士, 从事中药炮制学和中药新制剂新技术研究。Tel: 15184479335 E-mail: 1013183878@qq.com

*通信作者 胡昌江(1952—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药炮制原理与质量标准研究。E-mail: hhccjj@hotmail.com

童患者所接受。甘草汁作为一种常用的炮制辅料，具有清热解毒、矫味、调和诸药、缓解药物毒性作用。故本实验首次用甘草汁炮制雪胆，以期达到矫味、解毒、增效的效果。雪胆主要含雪胆素甲及少量雪胆素乙和皂苷成分，其中雪胆素甲和雪胆素乙为其主要有效成分^[8-9]。故本实验以雪胆中雪胆素甲为炮制工艺的评价指标，设计采用正交设计和星点设计-效应面法 (CCD-RSM)^[10-11] 联合运用对雪胆炮制工艺进行研究。

1 仪器与材料

仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪，包括 DAD 检测器，美国 Agilent 公司；SartoriusBS110S 十万分之一分析天平，德国赛多利斯公司；UPH-I-10T 优普系列超纯水器，成都超纯科技有限公司；KQ-300E 超声清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

雪胆素甲对照品，批号 111518-201103，质量分数 99.6%，购于中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。药材均购于成都荷花池市场，经成都中医药大学药学院生药教研室卢先明教授鉴定，雪胆为葫芦科雪胆属植物峨眉雪胆 *Hemsleya omeiensis* L. T. Shen et W. J. Chang 的干燥块根，甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

2 方法与结果

2.1 雪胆素甲定量分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 采用 HPLC 标准曲线法定量，色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水 (35:65)；DAD 检测器，检测波长为 210 nm；柱温度为 30 ℃；体积流量为 1.0 mL/min；进样体积为 10 μL。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定雪胆素甲对照品适量，甲醇定容，制成 1.484 mg/mL 的雪胆素甲对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取制雪胆 (过 2 号筛) 粉末 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声处理 (功率 250 W，频率 40 kHz) 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，用 0.45 μL 微孔滤膜滤过，取其续滤液作为供试品溶液，备用。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项对照品溶液，分别配制成质量浓度为 148.4、296.8、593.6、890.4、1 187.2、1 484.0 μg/mL 系列对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下分别进样 10 μL，以峰面积为纵坐标

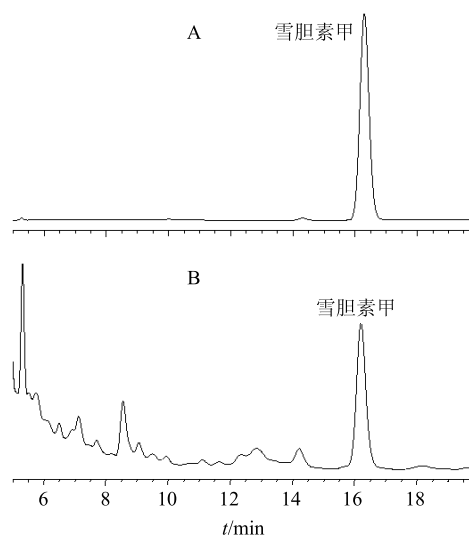


图 1 雪胆素甲对照品 (A) 和制雪胆 (B) 的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of hemislecicin A reference substance (A) and processed product (B)

(Y)，质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准工作曲线，线性方程为 $Y=504.86 X-535\ 805$ ， $R^2=0.999\ 4$ ($n=6$)。结果表明，雪胆素甲在 148.4~1 484.0 μg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次，记录雪胆素甲峰面积。雪胆素甲峰面积 RSD 为 1.66%，表明仪器的精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液，分别于 0、6、8、12 h 进样 10 μL，测定并记录雪胆素甲的峰面积。雪胆素甲峰面积 RSD 为 1.10%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取同一批制雪胆 6 份，各约 1 g，按“2.1.3”项方法制备供试品溶液分别进样 10 μL，按“2.1.1”项下色谱条件测定并记录雪胆素甲的峰面积，计算得其质量分数的 RSD 为 2.09%，表明该方法的重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知雪胆素甲质量分数的制雪胆共 6 份，精密称定，分别精密加入适量的雪胆素甲对照品，按“2.1.3”项方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样分析，计算雪胆素甲的回收率，平均回收率为 95.61%，RSD 为 2.18%。

2.2 辅料甘草与雪胆质量比的确定

2.2.1 辅料甘草汁的提取方法 取甘草 40 g，加 10 倍量水浸泡 1 h，煎煮 2 次，每次 30 min，合并煎液，浓缩至所需浓度^[12]。

2.2.2 甘草与雪胆质量比的确定 通过预试验对雪

胆的吸水率考察, 确定 0.8 倍量体积的甘草汁闷润雪胆。通过经典口尝法^[13]考察不同质量浓度(0.125、0.250、0.375、0.500、0.625 g/mL)的甘草汁对雪胆苦味降低的影响, 确定甘草与雪胆质量比为 2:5, 即用 0.8 倍量体积的生药量 0.5 g/mL 的甘草汁来炮制雪胆。

2.3 正交设计优选炮制工艺

取雪胆饮片, 加入适量“2.2.1”项下甘草汁拌匀, 进行闷润, 润透后, 烘干, 取出, 晾干, 即得。

在预试验的基础上, 以雪胆素甲为指标, 选择闷润时间(A)、烘干温度(B)、烘干时间(C)为考察因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验设计, 因素水平、试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

由表 1 中直观分析结果显示, 各因素对试验结果影响程度为 $B > C > A$; 方差分析结果表明, 各因素对试验结果影响均不显著, 以 $A_2B_3C_3$ 组合为佳, 即闷润 8 h, 80 °C 烘干, 烘干 12 h。按该工艺进行 3 次验证试验, 结果雪胆素甲量分别为 7.54、7.52、

7.59 mg/g, 平均质量分数为 7.55 mg/g, 表明优选的提取工艺稳定可行。

2.4 CCD-RSM 优化炮制工艺

雪胆中含大量的葫芦素烷型四环三萜皂苷, 而四环三萜皂苷类成分具有显著的抗炎、抗肿瘤、保肝、免疫调节等生物学活性, 是雪胆发挥其疗效的物质基础^[14-15]。有研究发现高温可能会降低皂苷类成分的量^[16-17], 所以本实验未继续考察烘干温度而是固定烘干温度为 80 °C, 采用 CCD-RSM 进一步优化炮制工艺。

2.4.1 因素水平编码 根据正交试验研究基础, 采用 CCD-RSM 进一步优化炮制工艺, 主要考察闷润时间(X_1)和烘干时间(X_2) 2 个因素, 固定烘干温度为 80 °C。根据效应面法设计原理, 参考正交试验的水平和结果, 每个因素设 5 个水平, 用代码 $-\sqrt{2}$ 、-1、0、1、 $\sqrt{2}$ 等来表示, 因素水平与编码见表 3。

表 3 CCD-RSM 试验设计及结果

Table 3 Design and observed values for CCD-RSM

试验号	X_1 /h	X_2 /h	雪胆素甲/(mg·g ⁻¹)
1	8.6 (1)	8.9 (-1)	7.14
2	7.5 (0)	11.0 (0)	7.57
3	8.6 (1)	13.1 (1)	7.83
4	6.0 ($-\sqrt{2}$)	11.0 (0)	7.34
5	7.5 (0)	14.0 ($\sqrt{2}$)	7.63
6	7.5 (0)	11.0 (0)	7.59
7	7.5 (0)	11.0 (0)	7.71
8	7.5 (0)	8.0 ($-\sqrt{2}$)	7.13
9	7.5 (0)	11.0 (0)	7.75
10	6.4 (-1)	13.1 (1)	7.33
11	9.0 ($\sqrt{2}$)	11.0 (0)	7.39
12	7.5 (0)	11.0 (0)	7.62
13	6.4 (-1)	8.9 (-1)	7.17

表 1 正交设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A/h	B/°C	C/h	D(误差)	雪胆素甲/(mg·g ⁻¹)
1	7 (1)	40 (1)	8 (1)	(1)	5.84
2	7 (1)	60 (2)	10 (2)	(2)	6.85
3	7 (1)	80 (3)	12 (3)	(3)	7.68
4	8 (2)	40 (1)	10 (2)	(3)	6.55
5	8 (2)	60 (2)	12 (3)	(1)	6.79
6	8 (2)	80 (3)	8 (1)	(2)	7.45
7	9 (3)	40 (1)	12 (3)	(2)	6.68
8	9 (3)	60 (2)	8 (1)	(3)	6.98
9	9 (3)	80 (3)	10 (2)	(1)	7.04
K_1	20.37	19.07	20.27	19.67	
K_2	20.79	20.62	20.44	20.98	
K_3	20.70	22.17	21.15	21.21	
R	0.42	3.10	0.88	1.54	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.032 60	2	0.071	无
B	1.601 67	2	3.481	无
C	0.145 27	2	0.316	无
D(误差)	0.460 07	2		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00$

2.4.2 模型建立及显著性检验 将所得数据利用 Design-Expert 8.0.6 软件, 以雪胆素甲质量分数为效应值(Y), 利用最小 2 阶乘法对各因素(自变量)进行多元线性回归和 2 项式方程拟合, 对比各模型拟合参数(表 4), 结果表明 2 次多项式回归模型较优。以 ANOVA 分析效应面回归参数, 建立 Y 对自变量 X_1 、 X_2 的 2 次方程为 $Y = 0.442 79 + 1.256 89 X_1 + 0.320 99 X_2 + 0.057 870 X_1 X_2 - 0.122 39 X_1^2 - 0.030 093 X_2^2$ ($R^2 = 0.932 3$, $S/N = 11.899 > S/N_{\text{临界}} = 4$)。

表 4 多种模型拟合分析

Table 4 Sequential model sum of squares for CCD

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	备注
平均模型 vs 总计	737.71	1	737.71			
线性模型 vs 平均模型	0.18	2	0.09	2.24	0.156 6	
双因素 vs 线性模型	0.05	1	0.05	1.14	0.313 6	
2 次方程 vs 双因素	0.29	2	0.15	14.25	0.003 4	建议采用 2 次方程 vs 双因素
3 次方程 vs 2 次方程	0.06	2	0.03	10.77	0.015 4	
剩余方差	0.01	5	7.35			
总计	738.31	13	57.87			

2.4.3 方差分析和显著性检验 经检验本实验模型具有统计学意义 ($P < 0.05$), 失拟 ($P > 0.05$) 不显著, 说明本实验模型拟合程度良好, 实验误差小, 可以使用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析评价 (表 5)。本模型响应面分析见图 2。

2.4.4 最佳工艺条件的预测与检验结果 通过回归模型的预测, 最佳工艺范围 X_1 : 7.48~8.56 h, X_2 : 12.06~13.12 h。结合前期基础研究与实际操作的方便性, 得到甘草制雪胆的最佳炮制工艺为闷润时间为 7.5 h, 烘干温度为 80 °C, 烘干时间为 12 h, 预测响应值为 7.71 mg/g。为检测可靠性, 采用上述的最优条件进行 3 次验证实验, 结果雪胆素甲量分别为 7.74、7.68、7.63 mg/g, 在此条件下得到的响应值平均为 7.68 mg/g, 与理论值相差 0.03 mg/g。

3 讨论

正交设计试验是中药研究常用优选方法, 但其采用线性模型进行分析, 结果代表的是各因素点水平效应, 难以全面预测各因素水平间的效应变化,

表 5 2 次多项式方程模型方差分析

Table 5 ANOVA for response surface reduced quadratic model

项目	均方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.65	5	0.13	19.29	0.000 6	显著
X_1	0.04	1	0.04	5.44	0.052 4	
X_2	0.30	1	0.30	45.13	0.000 3	
$X_1 X_2$	0.07	1	0.07	10.46	0.014 4	
X_1^2	0.14	1	0.14	21.11	0.002 5	
X_2^2	0.13	1	0.13	18.95	0.003 3	
残差	0.05	7	18.23			
失拟检验	0.02	3	20.38	1.23	0.4090	不显著
纯误差	0.02	4	16.61			
总误差	0.69	12				

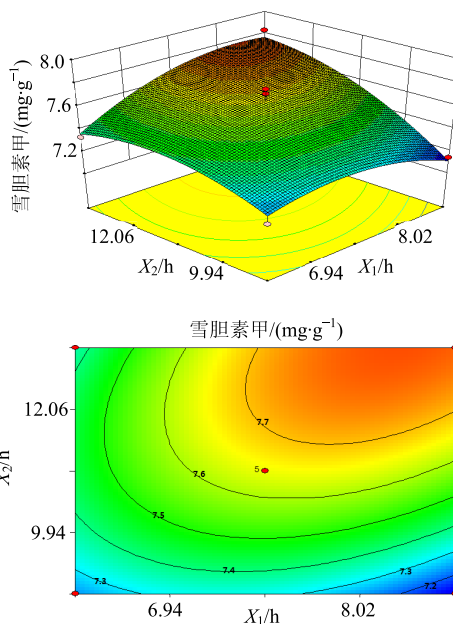


图 2 雪胆素甲对 X_1 、 X_2 的立体分析图及等高线图

Fig. 2 3D surface map and contour map of hemislectin A to X_1 and X_2

存在一定局限。响应面优化法采用多元线性和二次项模型拟合, 分析各因素水平对应的响应值变化, 预测优化各因素水平的趋势, 优化工艺参数, 更好优选工艺条件, 提高中药产品质量^[18-19]。在本实验中, 先利用了正交简便的优点初步确定了雪胆的炮制工艺, 然后在其基础上利用星点设计的非线性模型优点对其炮制工艺进一步优化, 两种实验设计所优化的炮制工艺条件基本相似, 但在正交基础上的星点效应面法进一步优化了雪胆的炮制工艺。

雪胆富含雪胆素, 在临床上具有极高的药用价值。当前有研究发现, 雪胆有良好的抗炎、镇痛、抗癌、保肝等作用。但关于其炮制工艺的研究尚未见报道。本实验通过正交试验联合星点设计-效应面法优化甘草制雪胆的炮制工艺。本实验首次使用甘

草汁炮制雪胆, 利用甘草味甘, 清热解毒的特点来炮制雪胆, 以期达到矫味、解毒、增效的目的。甘草作为辅料炮制药物的减毒增效多有研究^[20-21], 现代研究认为甘草的减毒物质基础为甘草甜素及其水解后的甘草次酸和葡萄糖醛酸, 其中甘草酸是甘草甜味的有效成分^[22-23]。本实验利用辅料甘草的矫味功能, 结合甘草和雪胆相同的清热解毒的功效, 运用正交-星点设计效应面法优选出雪胆的最佳炮制工艺, 为本课题相关质量标准研究、药理研究等做了前期的铺垫, 制定的工艺适合大生产。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999.
- [2] Tian R R, Chen J C, Zhang G H, *et al.* Anti-HIV-1 activities of hemslecins A and B [J]. *Chin J Nat Med*, 2008, 6(3): 214-218.
- [3] Boykin C, Zhang G, Chen Y H, *et al.* Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(5): 781-789.
- [4] 杨雪, 胡荣, 黄文涛, 等. 雪胆总皂苷抗家兔动脉粥样硬化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 788-793.
- [5] 何健. 雪胆素甲对脂多糖活化的巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应的影响及其机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [6] 宛蕾, 覃仁安. 雪胆提取物对实验性胃溃疡作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 266-268.
- [7] 高申, 于孟可, 魏佳慧, 等. 雪胆甲素对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 69-71.
- [8] 施亚琴, 杨培全, 陈玲, 等. 峨眉雪胆的化学成分研究 [J]. 中草药, 1995, 26(12): 619-621.
- [9] 李莹, 徐晓婷, 郑重飞, 等. 雪胆属植物的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2800-2808.
- [10] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药理学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 455-457.
- [11] 姜雯, 曾诚, 于宁, 等. 星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物复合磷脂脂质体制备工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 57-64.
- [12] 贵州省食品药品监督管理局编. 贵州省中药饮片炮制规范 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2005.
- [13] Ishizaka T, Miyanaga Y, Mukai J, *et al.* Bitterness evaluation of medicines for pediatric use by a taste sensor [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(8): 943-948.
- [14] 朱靖静, 邹坤. 葫芦素类四环三萜化合物的研究进展 [J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2009, 31(5): 82-87.
- [15] 李博, 金国泰, 代龙. 四环三萜皂苷类活性成分体外转化研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(5): 102-105.
- [16] 王庆芝, 丁青龙, 李莹. 绞股蓝胶囊中绞股蓝总皂苷的稳定性研究 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(20): 48-49.
- [17] 郑娜, 师亚玲, 吉艳霞, 等. 温度和酸度对黄芪皂苷 IV, III, I 稳定性和转化的影响 [J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1062-1065.
- [18] 丁璞, 宋新, 李先宽, 等. 星点及正交试验优化五味子藤茎提取工艺研究 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2534-2537.
- [19] 王文娣, 王阳, 王丽峰, 等. 星点设计-效应面法及正交实验设计优化淫羊藿提取工艺的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2766-2768.
- [20] 郭娟. 远志炮制品减毒增效的对比实验研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2004.
- [21] 马哲, 张颖, 梁茂新. 雷公藤配伍甘草治疗类风湿关节炎减毒增效作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(8): 9-11.
- [22] 韩瑶琳, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2499-2505.
- [23] 李志华, 颜苗, 张毕奎, 等. 基于药动学的甘草配伍减毒机制研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3611-3616.