

星点设计-效应面法优化茵陈蒿汤配方颗粒提取工艺

刘斯琪¹, 高明阳¹, 胡昌江^{1*}, 崔园园¹, 李文兵², 吴文辉²

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137; 2. 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 四川 成都 610081)

摘要: **目的** 通过星点设计-效应面法优化茵陈蒿汤(茵陈、栀子、大黄)配方颗粒的提取工艺。**方法** 在单因素试验基础上,以绿原酸、栀子苷、6, 7-二甲氧基香豆素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚含量和干膏收率为指标,以茵陈先煎时间、后下煎煮时间、加水量为因素,星点设计-效应面法对提取工艺进行优化。**结果** 最佳条件为茵陈先煎时间 46 min,后下煎煮时间 23 min,加水量 730 mL,总评“归一值”0.794,与预测值(0.813)相当。**结论** 该方法简便可靠,重复性好,可用于优化茵陈蒿汤配方颗粒的提取工艺。

关键词: 茵陈蒿汤颗粒; 提取工艺; 星点设计-效应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)09-1938-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.013

Optimization of extraction for Granulated Yinchenhao Decoction by central composite design-response surface method

LIU Si-qi¹, GAO Ming-yang¹, HU Chang-jiang^{1*}, CUI Yuan-yuan¹, LI Wen-bing², WU Wen-hui²

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Chengdu 610081, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the extraction technique for Granulated Yinchenhao Decoction (*Artemisiae Scopariae Herba*, *Gardeniae Jasminoidis Fructus* and *Rhei Radix et Rhizoma*) by central composite design-response surface method. **METHODS** On the basis of single factor test, with the contents of chlorogenic acid, geniposide, 6, 7-dimethoxy-2-benzopyrone, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and dry extract yield as indices, the extraction was optimized through control of different administration timing (decocting of *Artemisiae Scopariae Herba* prior to or later than other drugs) and water consumption of *Artemisiae Scopariae Herba* by central composite design-response surface method. **RESULTS** The best conditions were determined to be 46 min pre-decocting time and 23 min delayed casting of *Artemisiae Scopariae Herba*, and 730 mL of water consumption. The 0.794 overall desirability value approximated the predictive value (0.813). **CONCLUSION** This simple, reliable and well reproducible method can be used to optimize the extraction technique for Granulated Yinchenhao Decoction.

KEY WORDS: Granulated Yinchenhao Decoction; extraction; central composite design-response surface method

茵陈蒿汤首载于《伤寒论》,由茵陈、栀子、大黄 3 味药组成,是治疗湿热黄疸的代表方,现代药理研究表明,其在保肝、利胆、抗炎、解热、抗菌、镇痛、抗病毒等方面均有治疗作用。方中茵陈

所含绿原酸和 6, 7-二甲氧基香豆素是主要入血成分,保肝作用较强;栀子所含栀子苷能入血分以清血热散瘀结,具有利胆、解热、抗炎和轻泻作用;大黄所含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚可

收稿日期: 2015-12-29

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2009BAI84B04)

作者简介: 刘斯琪(1992—),女,硕士生,从事中药炮制学和中药新制剂新技术研究。Tel: 13550178655, E-mail: 571417634@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

起清气分邪热，散瘀热而导出^[1]。古方记载，茵陈蒿汤煎煮方法为“上三味，以水一斗二升，先煮茵陈，减六升，内二味，煮取三升，去滓，分三服^[2]”，目前临床应用也多以煎汤内服，茵陈蒿汤中有效成分较多，但古方操作没有量化，而配方颗粒是工业化大生产，有别于患者自己煎煮，其规范化的提取工艺显得尤为重要。故本实验选取方中以上 7 种有效成分含有量和干膏收率作为指标，采用单因素实验结合星点设计-效应面法进行工艺优选，确定最佳提取工艺条件，为实际生产提供一定参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪，配置 Agilent ChemStation 工作站（美国 Agilent 公司）；BP211D 电子天平（德国 Sartorius 公司）。茵陈、栀子、大黄药材均由四川新绿色科技发展股份有限公司提供，按 2010 年版《中国药典》规定检验合格^[3]。绿原酸（批号 110753-201314）、6, 7-二甲氧基香豆素（批号 111740-200501）、栀子苷（批号 110749-201316）、芦荟大黄素（批号 110795-200605）、大黄酸（批号 110757-200206）、大黄素（批号 110756-200110）、大黄酚（批号 110796-200514）对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 定量测定

2.1.1 对照品溶液制备

2.1.1.1 绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷对照品溶液配制 精密称取绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷适量，甲醇溶解，制成含绿原酸 82.1 μg/mL、6,7-二甲氧基香豆素 384.62 μg/mL、栀子苷 449.23 μg/mL 的混合对照品溶液。

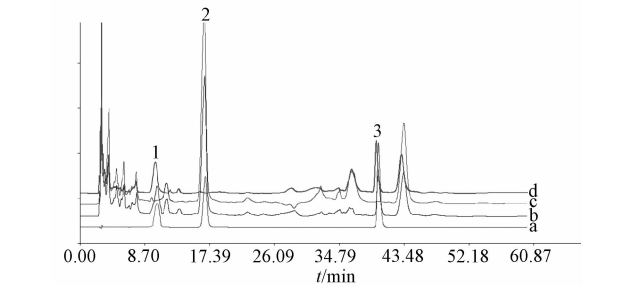
2.1.1.2 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚对照品溶液配制 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚适量，甲醇溶解，制成含芦荟大黄素 18.16 μg/mL、大黄酸 18.88 μg/mL、大黄素 19.2 μg/mL、大黄酚 16.88 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 将茵陈蒿汤煎煮液在 50℃ 下浓缩至 1 g/mL，参照文献 [4-5] 制备。

2.2 色谱条件

2.2.1 绿原酸、6, 7-二甲氧基香豆素、栀子苷 Thermo C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液（30：70）；检测波长

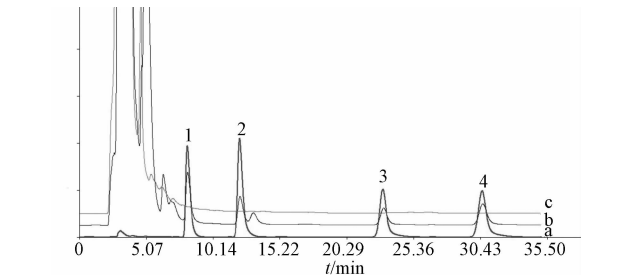
254 nm；柱温 30℃；进样量 10 μL。该色谱条件下，被检测组分可以分离，而且无阴性干扰，见图 1。



1. 绿原酸 2. 栀子苷 3. 6,7-二甲氧基香豆素
a. 混合对照品 b. 样品 c. 缺茵陈阴性对照 d. 缺栀子阴性对照
1. chlorogenic acid 2. geniposide 3. 6,7-dimethoxy-2-benzopyrone
a. mixed reference substances b. sample c. negative control without Artemisiae Scopariae Herba d. negative control without Gardeniae Jasminoidis Fructus

图 1 HPLC 色谱图（茵陈、栀子）
Fig.1 HPLC chromatogram (Artemisiae Scopariae Herba and Gardeniae Jasminoidis Fructus)

2.2.2 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚 Thermo C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液（70：30）；检测波长 254 nm；柱温 30℃；进样量 10 μL。该色谱条件下，被检测组分可以分离，而且无阴性干扰，见图 2。



1. 芦荟大黄素 2. 大黄酸 3. 大黄素 4. 大黄酚
a. 混合对照品 b. 样品 c. 缺大黄阴性对照
1. aloe-emodin 2. rhein 3. emodin 4. chrysophanol
a. mixed reference substances b. sample c. negative control without Rhei Radix et Rhizoma.

图 2 HPLC 色谱图（大黄）
Fig.2 HPLC chromatogram (Rhei Radix et Rhizoma)

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线

2.3.1.1 绿原酸、6, 7-二甲氧基香豆素、栀子苷 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 2.00、

5.00、8.00、12.00、15.00、25.00、35.00、45.00 μL 进样，在“2.2.1”项色谱条件下测定，以峰面积为纵坐标（Y），进样量（μg）为横坐标（X）进行回归，结果见表1，表明各成分在各自范围内呈良好的线性关系。

表 1 绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷的线性关系
Tab. 1 Linear relationships of chlorogenic acid, 6,7-dimethoxy-2-benzopyrone and geniposide

成分	回归方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y = 108.97X - 18.472$	0.999 1	0.15 ~ 3.70
6,7-二甲氧基香豆素	$Y = 1\ 193.3X - 58.527$	0.999 9	0.75 ~ 17.40
栀子苷	$Y = 746.21X + 143.63$	0.999 1	0.88 ~ 20.30

2.3.1.2 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚
测定方法同“2.3.1.1”项，结果见表2，表明各成分在各自范围内呈良好的线性关系。

表 2 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的线性关系
Tab. 2 Linear relationships of aloe-emodin, rhein, emodin and chrysophanol

成分	回归方程	r	线性范围/μg
芦荟大黄素	$Y = 6\ 038.3X - 12.495$	0.999 9	0.03 ~ 0.73
大黄酸	$Y = 7\ 176X - 9.012\ 3$	0.999 9	0.03 ~ 0.76
大黄素	$Y = 4\ 695.7X - 62.539$	0.999 6	0.03 ~ 0.77
大黄酚	$Y = 6\ 448.2X - 114.36$	0.999 6	0.03 ~ 0.68

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测得绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 0.53%、0.98%、0.62%、1.03%、1.19%、0.96%、1.25%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按方中比例称取各饮片，平行 5 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，测得绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 0.94%、1.21%、0.35%、0.78%、0.62%、1.04%、0.81%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL，分别于 0、2、4、6、8、12、24、36 h 进样，测得绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚峰面积 RSD 分别为 0.51%、1.02%、0.76%、1.82%、1.26%、1.04%、1.33%，表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 按方中比例称取各饮片，平行 5 份，精密加入绿原酸、6,7-二甲氧基香豆

1940

素、栀子苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚对照品适量，按“2.1.2”项下方法煎煮，测得绿原酸、6,7-二甲氧基香豆素、栀子苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚的平均回收率分别为 100.32%、100.21%、101.03%、99.16%、99.98%、99.31%、99.42%，RSD 分别为 1.66%、1.32%、2.03%、1.14%、1.23%、1.18%、1.21%。

2.4 干膏收率测定 取茵陈蒿汤提取液适量，定容至 400 mL，量取 25 mL 置于已干燥至恒重的蒸发皿中，水浴蒸干，105 ℃烘箱中干燥 3 h，取出，冷却至室温，计算干膏收率。

2.5 单因素试验

2.5.1 加水量 按方中配比称取 3 味药材，平行 5 份，分别加入 165、330、660、990、1 320 mL 水，按“2.1.2”项下方法煎煮，在“2.2.1”项色谱条件下测定 7 种有效成分含有量。最终确定，加水量为 330 ~ 990 mL。

2.5.2 浸泡时间 按方中配比称取 3 味药材，平行 5 份，分别浸泡 20、30、40、60、70 min，按“2.1.2”项下方法煎煮，在“2.2.1”项色谱条件下测定 7 种有效成分含有量。结果，浸泡时间超过 60 min 后变化不大，故最终确定浸泡时间为 60 min。

2.5.3 茵陈先煎时间 按方中配比称取 3 味药材，平行 5 份，加入 660 mL 水，茵陈分别煎煮 15、30、45、60、75 min，栀子大黄后下，共煎 15 min，方法同“2.1.2”项，在“2.2.1”项色谱条件下测定 7 种有效成分含有量，最终确定，茵陈先煎时间为 30 ~ 60 min。

2.5.4 后下煎煮时间 按方中配比称取 3 味药材，平行 5 份，加入 660 mL 水，茵陈先煎时间为 30 min，再加入栀子和大黄分别共煎 5、15、25、35、45 min，方法同“2.1.2”项，在“2.2.1”项色谱条件下测定 7 种有效成分含有量。最终确定，共煎时间 15 ~ 35 min。

2.6 星点设计-效应面法

2.6.1 试验设计 结合单因素试验结果，选取后下煎煮时间（A）、茵陈先煎时间（B）、加水量（C）作为因素，指标选取绿原酸、栀子苷、6,7-二甲氧基香豆素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚含有量和干膏收率的总评 OD 值^[6-7]，因素水平见表 3，结果见表 4。

2.6.2 模拟拟合 实验所得数据采用 Hassan 法进行归一化处理，运用 SPSS 19.0 软件对各考察指标

表 3 因素水平
Tab. 3 Factors and levels

因素	水平				
	-1.682	-1	0	1	1.682
后下煎煮时间/min(A)	15	19	25	31	35
茵陈先煎时间/min(B)	30	36	45	54	60
加水量/mL(C)	330	462	660	858	990

的总评 OD 值(Y) 进行多元线性回归和二次项拟合^[8], 得多元线性回归方程为 $Y=0.176-0.014A+$

表 4 星点设计结果

Tab. 4 Results of central composite design

编号	因素			OD 值								总评 OD 值
	后下煎煮时 间/min(A)	茵陈先煎时 间/min(B)	加水量/ mL(C)	绿原酸	栀子苷	6,7-二甲氧 基香豆素	芦荟大 黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	干膏收率	
1	19	36	462	0.307 1	0	1.126 3	0.630 8	0.560 7	0.319 7	0.201 8	0.312 2	0.00
2	31	36	462	0.382 3	0.285 4	1.003 9	0.106 0	0.061 9	0.039 2	0.031 4	0.123 8	0.14
3	19	54	462	0.433 5	0.470 6	1.652 4	0.527 7	0.492 5	0.304 2	0.457 9	0.264 1	0.46
4	31	54	462	0.709 1	0.618 4	1.759 9	0.498 1	0.407 3	0.372 5	0.206 9	0.112 3	0.49
5	19	36	858	0.615 6	0.574 1	1.920 2	0.839 2	0.797 5	0.803 3	0.206 3	0.306 2	0.74
6	31	36	858	0.523 5	0.460 1	1.450 4	0.464 7	0.262 1	0.140 9	0.206 3	0.184 3	0.33
7	19	54	858	0.762 3	0.587 4	1.513 9	0.582 0	0.536 1	0.348 6	0.456 9	0.229 4	0.54
8	31	54	858	0.674 7	0.462 7	1.421 7	0.481 9	0.203 6	0.134 2	0.162 1	0.196 5	0.34
9	14.91	45	660	0.983 6	0.875 1	1.863 2	0.328 7	0.239 7	0.127 6	0.237 8	0.296 2	0.43
10	35.09	45	660	0.893 2	0.675 2	2.039 7	0	0	0	0	0.362 9	0.00
11	25	29.86	660	0.367 6	0.286 7	1.081 3	0.531 3	0.532 4	0.385 3	0.360 5	0.274 9	0.43
12	25	60.14	660	0.890 2	0.739 6	1.793 2	0.552 4	0.345 3	0.314 1	0.326 2	0.347 5	0.54
13	25	45	327.01	0	0.243 8	0	0.469 2	0.245 3	0.091 8	0.206 9	0	0.00
14	25	45	992.99	0.621 2	0.473 2	1.090 4	0.331 2	0.317 8	0.242 3	0.124 9	0.192 7	0.34
15~20	25	45	660	0.843 8	0.559 8	2.582 2	0.807 4	0.756 6	0.777 4	0.764 7	0.292 4	0.77

2.6.3 回归系数显著性检验 对二次项回归方程进行失拟检验(表5), 发现无显著性差异($P>0.05$), 表明模型拟合度良好, 能较真实地反映考察指标与选取因素的关系。再对其进行回归系数检验, 发现除 AB 回归系数不显著外, 其他均达到显著水平, 表明选取因素可靠。

表 5 失拟项检验结果

Tab. 5 Results of lack of fit tests

项目	自由度	离均差平方和	均方	F	P
残差	10	0.094	0.009 4	—	—
失拟	5	0.067	0.013 4	2.481	0.171
纯误差	5	0.027	0.005 4	—	—

2.6.4 效应面优化和预测 采用 Origin 8.0 软件, 得到三维效应面及等高线, 见图 3~5, 得到最佳提取条件为加水量 730.258 mL, 茵陈先煎时间 45.89 min, 后下煎煮时间 22.870 9 min。结合实际, 最终确定为加水量 730 mL, 茵陈先煎时间 46 min, 后下煎煮时间 23 min。

2.6.5 验证试验 按方中配比称取药材, 平行 3

$0.007B+0.001C$ ($r^2=0.209$, $r=0.457$), 二次项回归方程为 $Y=-9.457\ 75+0.262\ 04A+0.126\ 76B+0.011\ 948C+2.708\ 33\times10^{-4}AB-8.217\ 59\times10^{-5}AC-6.965\ 49\times10^{-5}BC-0.004\ 686\ 3A^2-8.993\ 35\times10^{-4}B^2-4.717\ 7\times10^{-6}C^2$ ($r^2=0.935$, $r=0.967$, $P<0.01$), 发现后者相关系数更高, 拟合度和预测性更好, 因此选择二次项回归方程进行拟合。

份, 按“2.6.4”项下优选工艺进行提取。结果, 总评“归一”值为 0.794, 与预测值 0.813 相当($RSD=0.35\%$), 表明该模型预测性良好。

3 讨论和结论

本实验选用星点设计-效应面法优选茵陈蒿汤配方颗粒提取工艺, 该方法具有精度高、预测更接近实际值等优点, 对非线性模型拟合尤为适宜, 是近年来工艺提取及处方筛选的常用方法。本实验在单因素试验基础上, 采用星点设计, 对各指标进行“归一化”处理, 消除了评价指标不同所带来的影响^[9]。再运用总评 OD 值对多个有效成分进行综合评分及非线性拟合, 建立数学模型, 描绘其响应面, 预测并验证最佳工艺条件。

实验结果显示, 优选的茵陈蒿汤配方颗粒提取工艺操作简便, 预测性较好, 但该结果仅是小试数据, 有待放大生产作进一步验证。此外, 本实验还对大黄中的大黄素甲醚进行测定, 发现该成分在煎煮过程中不稳定, 后续实验还将对其继续进行研究^[10]。

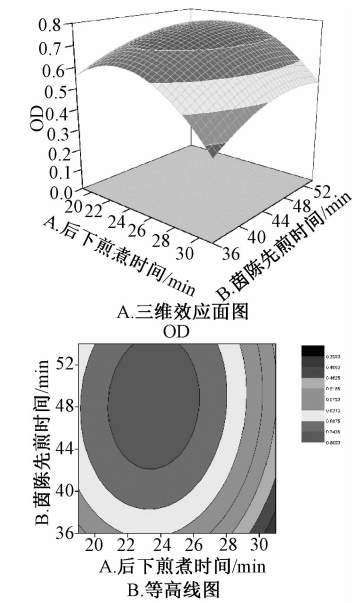


图 3 后下煎煮时间和茵陈先煎时间

Fig. 3 Later administration time and pre-decocting time of *Artemisiae Scopariae Herba*

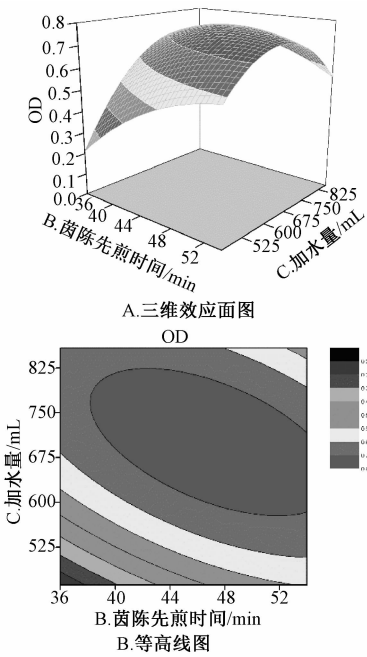


图 5 茵陈先煎时间和加水量

Fig. 5 Pre-decocting time of *Artemisiae Scopariae Herba* and water consumption

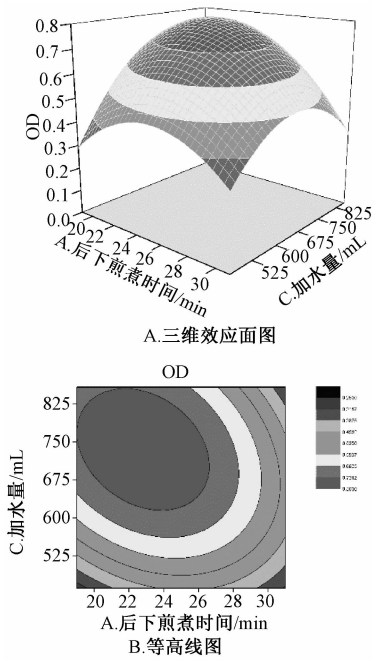


图 4 后下煎煮时间和加水量

Fig. 4 Later administration time and water consumption

参考文献:

[1] 窦志华, 罗琳, 侯金燕, 等. 茵陈蒿汤保肝退黄药效部

位筛选[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2371-2373.
[2] 梁会, 曹佩雪, 潘卫东, 等. 不同工艺制备茵陈蒿汤化学成分的比较[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1453-1456.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
[4] 高雅言, 孙盼盼, 张超, 等. 茵陈蒿方传统与现代浸提方法对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 18-22.
[5] 叶殷殷. 大黄配方颗粒制备工艺及质量标准的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
[6] 杨秀梅, 欧小群, 谭茂兰, 等. 星点设计-效应面法优化加味圣愈汤的提取工艺[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2512-2516.
[7] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 530-533.
[8] 俞文婕, 王添敏, 翟延君, 等. 星点设计-效应面法优化胡桃楸茎枝中总鞣质提取工艺[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1419-1424.
[9] 陈苑, 肖凤霞, 张杰, 等. 响应面法优化四逆汤煎煮工艺探讨[J]. 中药材, 2015, 38(6): 1299-1302.
[10] 窦志华, 罗琳, 姜晓燕, 等. 方剂配伍对茵陈蒿汤中 15 种成分提取率的影响[J]. 中草药, 2015, 46(12): 1753-1758.