

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)20-0046-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.010



主成分分析结合 Box - Behnken 响应面法优选旋覆代赭汤中 酚酸类及黄酮类成分纯化工艺*

郭曼曼, 刘菊, 汪怡, 张泽鹏, 徐韞妍, 徐诚[△]

(江苏省昆山市中医医院, 江苏 昆山 215300)

摘要:目的 优选旋覆代赭汤中酚酸类及黄酮类成分分离纯化工艺。方法 以洗脱流速、醇洗体积分数和醇洗体积为考察因素, 采用 Box - Behnken 响应面法设计试验, HPD400 型大孔树脂分离纯化旋覆代赭汤中酚酸类(6个)、黄酮类(3个)成分, 超高效液相色谱(UPLC)法测定洗脱液中各成分的含量, 紫外-可见分光光度(UV-Vis)法测定洗脱液中总黄酮质量分数。通过主成分分析结合 Box - Behnken 响应面法, 评价模型, 预测最佳纯化工艺并验证。结果 最佳纯化工艺为, 流速 2.6 mL/min, 醇洗体积分数 53%, 醇洗体积为 2.4 BV。经验证, 最佳纯化工艺下总黄酮质量分数为(69.33 ± 1.66)%, 绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5-二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素含量分别为(2.67 ± 0.04) μg/mg、(15.34 ± 0.27) μg/mg、(12.36 ± 0.17) μg/mg、(16.01 ± 0.22) μg/mg、(18.25 ± 0.22) μg/mg、(96.24 ± 1.44) μg/mg、(6.85 ± 0.07) μg/mg、(22.55 ± 0.35) μg/mg、(5.78 ± 0.07) μg/mg。结论 优选的大孔吸附树脂纯化旋覆代赭汤中酚酸、黄酮类成分工艺稳定可行, 可为进一步药效学研究提供参考。

关键词: 旋覆代赭汤; 酚酸类; 黄酮类; 大孔吸附树脂; Box - Behnken 响应面法; 主成分分析

Optimization of Purification Process of Phenolic Acids and Flavonoids in Xuanfu Daizhe Decoction by Principal Component Analysis Combined with Box - Behnken Design - Response Surface Methodology

GUO Manman, LIU Ju, WANG Yi, ZHANG Zepeng, XU Yunyan, XU Cheng

(Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Kunshan, Jiangsu, China 215300)

Abstract: Objective To optimize the separation and purification process of phenolic acids and flavonoids in Xuanfu Daizhe Decoction. **Methods** The Box - Behnken design - response surface methodology (BBD - RSM) was used to design the test with elution flow rate, ethanol elution volume fraction, and ethanol elution volume as the investigation factors. The HPD400 macroporous resin was used to separate and purify six phenolic acids and three flavonoids in Xuanfu Daizhe Decoction. The ultra - high - performance liquid chromatography (UPLC) method was used to determine the components in the eluent. The ultraviolet - visible spectrophotometry (UV - Vis) was used to determine the mass fraction of total flavonoids in the eluent. The principal component analysis combined with BBD - RSM was used to evaluate the model, predict the optimal purification process, and the verification test was carried out. **Results** The optimal purification process was as follows: the flow rate was 2.6 mL/min, the ethanol elution volume fraction was 53%, and the ethanol elution volume was 2.4 BV. After verification, the mass fraction of total flavonoids under the optimal purification process was (69.33 ± 1.66)%; the contents of chlorogenic acid, caffeic acid, isoquercitrin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, 1,5 - dcaffequinic acid, isorhamnoside, isochlorogenic acid C, and quercetin were (2.67 ± 0.04) μg/mg, (15.34 ± 0.27) μg/mg, (12.36 ± 0.17) μg/mg, (16.01 ± 0.22) μg/mg, (18.25 ± 0.22) μg/mg, (96.24 ± 1.44) μg/mg, (6.85 ± 0.07) μg/mg, (22.55 ± 0.35) μg/mg, (5.78 ± 0.07) μg/mg respectively. **Conclusion** The optimal purification process of phenolic acids and flavonoids in Xuanfu Daizhe Decoction by macroporous adsorption resin is stable and feasible, which can provide a reference for further pharmacological research.

Key words: Xuanfu Daizhe Decoction; phenolic acids; flavonoids; macroporous adsorption resin; Box - Behnken design - response surface methodology; principal component analysis

旋覆代赭汤源自张仲景《伤寒论》,“伤寒发汗,若吐若下,解后心下痞硬,噫气不除者,旋覆代赭汤主之”。该方由旋覆花、代赭石、清半夏、人参、生姜、炙甘草和大枣等7味中药组方,临床多用于胆汁反流性胃炎、反流性食管炎、呃逆及慢性呼吸系统疾病的治疗^[1-2]。现代研究发现,旋覆代赭汤具有抗炎、改善食管

* 基金项目:江苏省自然科学基金[BK20180265];江苏省苏州市科技发展计划项目[SYSD2019199];江苏省昆山市科技专项[KS2234];北京医学奖励基金会项目[H - BJYX01]。

第一作者:郭曼曼,女,硕士,主管药师,研究方向为中药化学,(电子信箱)gmm228@163.com。

[△]通信作者:徐诚,男,大学本科,副主任中药师,研究方向为药事管理与中药化学,(电子信箱)37328633@qq.com。

黏膜病变、增进胃动力和镇吐等药理作用^[3],其主要有效化学成分包括黄酮类、酚酸类、生物碱类、三铁皂苷类、三氧化二铁(代赭石)等^[4-5],其中黄酮和酚酸类有效成分有显著抗炎、抗菌、抗氧化等作用^[6-8],但目前鲜有此两类成分分离纯化工艺的报道。鉴于此,本研究中在前期预试验基础上选择大孔树脂吸附法分离纯化旋覆代赭汤中酚酸、黄酮类成分,以醇洗流速及醇洗体积分数和醇洗体积为考察因素,采用Box - Behnken响应面法进行试验设计,测定了洗脱液中主要酚酸、黄酮类成分含量,通过主成分分析确定评价指标,筛选最优工艺,以期提高酚酸、黄酮类成分的纯度,为进一步药效学研究提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity UPLC H - Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);UV 2600 型紫外 - 可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司);BT 25S 型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);DW - 2K 型调温电热器(南通市通州申通电热器厂);DHG - 9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);HWS - 24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);N - 1200B EYELA 型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为 MUST - 22111711)、咖啡酸对照品(批号为 MUST - 22062118)、异槲皮苷对照品(批号为 MUST - 20042613)、异绿原酸 B 对照品(批号为 MUST - 21030602)、异绿原酸 A 对照品(批号为 MUST - 21102611)、1,5 - 二咖啡奎宁酸对照品(批号为 MUST - 22072012)、异鼠李苷对照品(批号为 MUST - 20070311)、异绿原酸 C 对照品(批号为 MUST - 22081001)、槲皮素对照品(批号为 MUST - 22042012),均购自成都曼斯特生物科技有限公司,含量均大于 98%;芦丁对照品(批号为 100080 - 201811),购自中国食品药品检定研究院,含量 > 92%;旋覆花(批号为 200515)、代赭石(批号为 200728)、生姜(批号为 200526)、半夏(批号为 200314)、人参(批号为 200216)、炙甘草(批号为 200716)、大枣(批号为 200706)药材饮片,均购自苏州市天灵中药饮片有限公司,经我院药学部李青松主任中药师鉴定为正品;乙腈、磷酸、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 大孔树脂的前处理及上样液制备

称取大孔树脂适量于烧杯中,无水乙醇浸泡使充分溶胀,玻璃棒不断搅拌除去气泡,湿法装柱,无水乙醇冲洗至流出液体,在 200 ~ 300 nm 波长处无吸收,蒸馏水冲洗至流出液体无醇味。

2.2 酚酸、黄酮类成分含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC®BEH C₁₈柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A) - 0.1% 磷酸水溶液(B) - 甲醇(C),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);流速:0.1 mL/min;检测波长:350 nm;柱温:35 °C;进样量:1 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)	时间(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0~5	5→12	90→80	5→8	60~65	12→20	65→55	23→25
5~35	12	80	8	65~68	20→80	55→10	25→10
35~40	12	80→68	8→20	68~78	80	10	10
40~50	12	68	20	78~80	80→5	10→90	10→5
50~55	12	68→65	20→23	80~90	5	90	5
55~60	12	65	23				

2.2.2 溶液制备

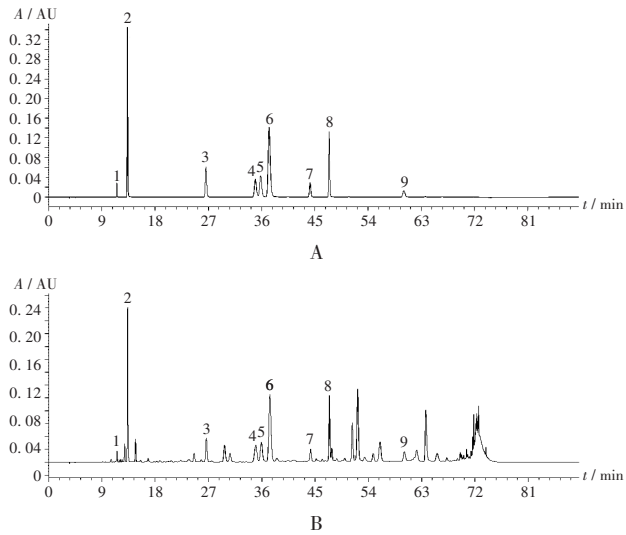
称取绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素对照品各适量,精密称定,置同一 10 mL 容量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为 50.00, 391.00, 199.00, 225.00, 242.00, 753.00, 103.00, 288.00, 50.60 μg/mL 的混合对照品溶液。按汤剂处方称取药材(生姜 50 g,代赭石、半夏、炙甘草各 30 g,人参、大枣各 20 g,代赭石 10 g),加 8 倍水浸泡 30 min,水煎提取 2 次,每次 1 h,浓缩,离心,取上清液,乙酸乙酯多次萃取,蒸干回收溶剂,20% 乙醇溶解,即得上样液;上样量为每 8 g 大孔树脂 15 mL 上样液,根据实验条件收集乙醇洗脱液,蒸干,称定质量,得干浸膏质量,加乙醇溶解并定容至 10 mL,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液和供试品溶液各 1 μL,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液在与混合对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰,分离度良好。详见图 1。

线性关系考察:分别取 2.2.2 项下混合对照品溶液 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2 mL,置 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容,即得系列质量浓度混合对照品溶液。按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围。详见表 2(a - i 分别为绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素。表 4、表 6 同)。

精密度试验:取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素峰面积的 RSD 分



1. 绿原酸 2. 咖啡酸 3. 异槲皮苷 4. 异绿原酸 B 5. 异绿原酸 A 6. 1,5 - 二咖啡奎宁酸 7. 异鼠李苷 8. 异绿原酸 C 9. 槲皮素
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 超高效液相色谱图

1. Chlorogenic acid 2. Caffeic acid 3. Isoquercitrin 4. Isochlorogenic acid B 5. Isochlorogenic acid A 6. 1,5 - Dicaffeoylquinic acid 7. Isorhamnoside 8. Isochlorogenic acid C 9. Quercetin
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 UPLC chromatograms

表2 线性关系考察结果 (n = 6)

Tab. 2 Results of the linear relation test (n = 6)

待测成分	回归方程	R ²	线性范围(μg/mL)
a	$Y_1 = 12\ 130X_1 + 45.71$	0.999 8	2.00~22.00
b	$Y_2 = 18\ 971X_2 - 2\ 562.5$	0.999 9	19.00~209.00
c	$Y_3 = 18\ 790X_3 - 3\ 946.2$	0.999 9	7.96~87.56
d	$Y_4 = 13\ 891X_4 - 3\ 466.6$	0.999 9	9.00~99.00
e	$Y_5 = 16\ 571X_5 - 9\ 908.5$	0.999 5	9.68~106.48
f	$Y_6 = 18\ 045X_6 - 36\ 805$	0.999 5	30.12~331.32
g	$Y_7 = 14\ 414X_7 - 4\ 814.1$	0.999 8	5.20~57.20
h	$Y_8 = 18\ 686X_8 - 10\ 748$	0.999 9	11.52~126.72
i	$Y_9 = 24\ 601X_9 - 6\ 797.6$	0.999 5	2.02~44.52

别为 1.07%, 0.31%, 0.46%, 0.22%, 0.16%, 0.21%, 0.55%, 0.24%, 0.46% (n = 6), 表明方法精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,室温放置0,3,6,9,12,24 h时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.96%, 0.37%, 0.92%, 0.33%, 0.36%, 0.28%, 0.62%, 0.61%, 1.31% (n = 6), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:按同一洗脱条件制备供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、

异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素含量分别为 2.23, 20.57, 7.47, 11.83, 10.69, 33.77, 5.36, 13.79, 3.58 μg / mg, RSD 分别为 0.83%, 0.11%, 0.50%, 0.10%, 0.20%, 0.14%, 0.71%, 0.54%, 1.75% (n = 6), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品 6 份,分别加入与各待测成分约等量的对照品,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、1,5 - 二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸 C、槲皮素的平均加样回收率分别为 99.46%, 102.43%, 102.72%, 103.34%, 103.08%, 102.24%, 101.86%, 101.99%, 101.11%, RSD 分别为 2.51%, 2.10%, 1.79%, 2.37%, 2.12%, 2.18%, 1.11%, 2.73%, 1.00% (n = 6)。

含量测定:取样品适量,精密称定,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。公式为,样品含量 = 待测成分质量(μg) / 干浸膏质量(mg)。

2.3 总黄酮含量测定^[9]

溶液制备:称取芦丁对照品 14.76 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇定容,配制成芦丁质量浓度为 295.2 μg / mL 的对照品溶液。分别精密量取适量,置 25 mL 容量瓶中,各加水至 6.0 mL,制成芦丁质量浓度为 49.2, 98.4, 147.6, 196.8, 246.0, 295.2 μg / mL 的系列对照品溶液。按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液。

方法学考察:1)线性关系考察。取系列对照品溶液及 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,静置 6 min;加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,混匀,静置 6 min;各加入氢氧化钠试液 10 mL,加水定容,摇匀,静置 15 min,以相应的试剂为空白,在 510 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标、芦丁质量浓度(C, μg / mL)为横坐标进行线性回归,经拟合后得回归方程为 $A = 0.002\ 5\ C + 0.006\ 7$ (R² = 0.999 9, n = 6)。结果显示,芦丁质量浓度在 49.2 ~ 295.2 μg / mL 范围内与吸光度呈良好线性关系。2)精密度、稳定性、重复性试验。按相关要求进行操作,结果的 RSD 均小于 1%,表明仪器精密度良好,供试品溶液室温放置 6 h 内基本稳定,方法重复性良好。

含量测定:取供试品溶液 1 mL,采用亚硝酸钠 - 硝酸铝 - 氢氧化钠显色法测定总黄酮质量并计算其质量分数。公式为,总黄酮质量分数(%) = 测得总黄酮质量 / 干浸膏质量 × 100%。

2.4 响应面法试验

试验设计与结果:以醇洗流速、醇洗体积分数、醇洗体积为影响因素,每个因素取 3 个水平(见表 3)。以 9 种成分含量及总黄酮质量分数为考察指标,利用 Design - Expert 8.0.6 软件设计 Box - Behnken 试验。

17组试验纯化得到的供试品中绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、异绿原酸A、1,5-二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸C、槲皮素的含量范围分别为1.57~4.02 μg/mg、14.57~31.89 μg/mg、5.62~11.54 μg/mg、9.04~19.92 μg/mg、7.80~16.38 μg/mg、24.15~51.08 μg/mg、4.22~8.76 μg/mg、10.00~20.75 μg/mg、1.17~5.42 μg/mg,总黄酮质量分数为45.47%~76.26%。试验设计与结果见表4。

表3 因素水平表

Tab. 3 Factors and their levels

水平	A(mL/min)	B(%)	C(BV)
-1	2	50	2
0	4	70	3
1	6	90	4

表4 Box - Behnken 试验设计与结果

Tab. 4 Design and results of Box - Behnken test

序号	因素			成分含量(μg/mg)										总黄酮质量分数(%)
	A	B	C	a	b	c	d	e	f	g	h	i		
1	-1	0	1	2.44	20.12	7.34	11.47	10.32	32.89	5.07	13.20	3.56	54.71	
2	0	0	-1	2.31	19.91	7.21	11.06	10.04	31.84	5.00	12.77	3.06	49.58	
3	1	-1	0	2.95	24.00	9.02	14.45	12.44	39.06	6.11	15.64	2.41	63.60	
4	-1	1	0	2.58	18.51	6.53	9.50	8.60	27.47	4.64	11.16	3.74	45.89	
5	0	0	0	2.86	19.91	7.13	10.88	9.57	30.43	4.87	12.14	3.40	51.87	
6	1	1	0	2.01	17.31	6.32	9.27	8.33	26.36	4.22	10.49	4.00	48.67	
7	0	-1	1	2.58	22.80	8.14	12.77	11.51	36.37	6.22	14.63	3.01	57.34	
8	0	1	1	1.85	17.54	6.46	9.37	8.81	28.21	4.66	11.23	4.63	45.47	
9	0	1	-1	2.30	17.96	6.46	10.03	9.07	28.82	5.31	11.75	4.26	48.03	
10	0	0	0	3.22	20.01	8.28	14.40	11.98	37.77	6.54	15.45	2.91	60.16	
11	0	0	0	2.65	21.29	7.44	12.03	10.39	32.68	5.71	13.20	3.33	49.42	
12	0	0	0	2.54	22.13	7.99	12.88	11.27	35.47	6.09	14.27	3.41	55.19	
13	1	0	1	2.44	21.04	8.00	12.88	11.09	34.67	6.08	14.16	3.58	52.64	
14	0	0	0	2.64	22.90	8.28	13.30	11.61	36.69	6.32	14.78	3.52	50.74	
15	-1	-1	0	2.99	29.52	11.30	17.90	16.16	50.20	8.76	20.75	5.42	76.26	
16	0	-1	-1	4.02	31.89	11.54	19.92	16.38	51.08	8.34	20.31	1.17	64.15	
17	1	0	-1	1.57	14.57	5.62	9.04	7.80	24.15	4.43	10.00	1.25	49.96	

主成分分析:将表4结果导入SPSSAU在线软件,标准化处理后进行主成分分析,得到主成分的特征值及方差(见表5)、主成分的载荷矩阵(见表6)及17组试验主成分得分和综合得分情况(见表7)。以提取特征值大于1为标准,提取了2个主成分,累计方差贡献率达94.403%。表6可知,成分1的信息主要受除槲皮素含量外指标的影响,成分2的信息主要受槲皮素含量的影响。

响应面法试验结果与数据处理:将表7中17组试验综合评分导入Design - Expert 8.0.6软件进行分析,得到因变量(Y,综合评分)与自变量(各影响因素)之间的多元回归拟合方程, $Y = 50.12 - 5.41A - 0.64B - 6.33C + 0.02AB + 1.00AC + 0.06BC + 0.03A^2 + 0.0018B^2 -$

表5 主成分的特征值及方差

Tab. 5 Eigenvalues and variances of principal components

成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	总计	方差百分比(%)	累计百分比(%)	总计	方差百分比(%)	累计百分比(%)
1	8.385	83.849	83.849	8.385	83.849	83.849
2	1.055	10.554	94.403	1.055	10.554	94.403

表6 主成分的载荷矩阵

Tab. 6 Loading matrix of the principal components

成分	指标									总黄酮质量分数
	a含量	b含量	c含量	d含量	e含量	f含量	g含量	h含量	i含量	
1	0.857	0.970	0.996	0.993	0.997	0.997	0.972	0.995	-0.108	0.893
2	-0.224	0.017	0.034	-0.085	0.032	0.039	0.095	0.064	0.984	0.117

表7 主成分得分与综合得分

Tab. 7 Principal component score and comprehensive score

编号	主成分得分		综合得分	编号	主成分得分		综合得分
	1	2			1	2	
1	0.201	-0.789	-0.679	10	-0.483	1.491	1.270
2	-0.296	-1.283	-1.173	11	-0.126	-0.530	-0.485
3	-0.762	2.002	1.693	12	0.137	0.389	0.361
4	0.090	-2.427	-2.145	13	0.277	0.072	0.095
5	-0.199	-1.191	-1.081	14	0.167	0.658	0.603
6	0.530	-3.069	-2.666	15	2.503	6.044	5.648
7	-0.179	0.731	0.630	16	-1.999	6.650	5.683
8	1.179	-2.887	-2.433	17	-1.795	-3.726	-3.510
9	0.756	-2.135	-1.811				

$0.37C^2 (r = 0.9518)$ 。3个影响因素对综合评分的3D响应面图见图2,可见,A、B两个因素对结果影响显著,AC交互作用显著。方差分析结果见表8,可见,模型拟合良好,误差较小。通过软件预测最佳工艺为,流速2.6 mL/min,醇洗体积分数53%,醇洗体积为2.4 BV。

2.5 验证工艺

根据筛选的总黄酮最佳分离纯化工艺进行试验,平行3次,计算得总黄酮质量分数为 $(69.33 \pm 1.66)\%$,绿原酸、咖啡酸、异槲皮苷、异绿原酸B、异绿原酸A、1,5-二咖啡奎宁酸、异鼠李苷、异绿原酸C、槲皮素含量分别为 $(2.67 \pm 0.04)\mu\text{g/mg}$ 、 $(15.34 \pm 0.27)\mu\text{g/mg}$ 、 $(12.36 \pm 0.17)\mu\text{g/mg}$ 、 $(16.01 \pm 0.22)\mu\text{g/mg}$ 、 $(18.25 \pm 0.22)\mu\text{g/mg}$ 、 $(96.24 \pm 1.44)\mu\text{g/mg}$ 、 $(6.85 \pm 0.07)\mu\text{g/mg}$ 、 $(22.55 \pm 0.35)\mu\text{g/mg}$ 、 $(5.78 \pm 0.07)\mu\text{g/mg}$;综合评分为 (6.10 ± 0.10) 分,RSD为1.78%,结果表明该纯化工艺稳定可行,建立的模型准确可信。

3 讨论

旋覆代赭汤为中药传统名方,疗效确切,临床应用广泛。酚酸、黄酮类成分为其主要有效成分,具有抗炎抑菌、抗氧化等显著药效。此两类成分主要来自方中旋覆花、甘草和大枣等药,包含绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、

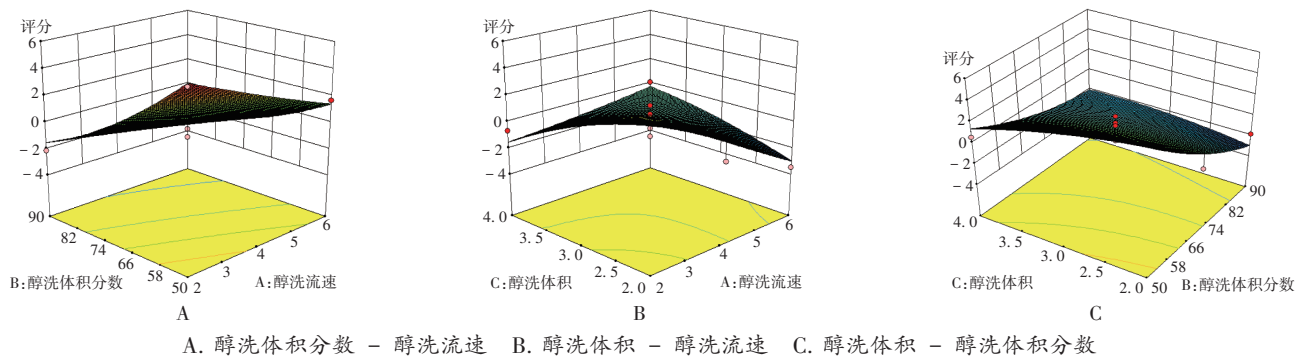


图2 各因素响应面图

A. Ethanol elution volume fraction - ethanol elution flow rate B. Ethanol elution volume - ethanol elution flow rate C. Ethanol elution volume - ethanol elution volume fraction

Fig. 2 Response surface diagrams of various factors

表8 方差分析结果

Tab. 8 Results of analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	96.07	9	10.67	7.49	0.0073
A	10.54	1	10.54	7.39	0.0298
B	64.46	1	64.46	45.21	0.0003
C	2.69	1	2.69	1.88	0.2122
AB	2.95	1	2.95	2.07	0.1936
AC	8.73	1	8.73	6.12	0.0426
BC	4.91	1	4.91	3.44	0.1059
A ²	0.039	1	0.039	0.027	0.8739
B ²	1.92	1	1.92	1.35	0.2841
C ²	0.52	1	0.52	0.36	0.5653
残差	9.98	7	1.43		
失拟项	6.56	3	2.19	2.56	0.1933
误差	3.42	4	0.86		
总离差	106.05	16			

异绿原酸A、1,5-二咖啡奎宁酸、异绿原酸C、异槲皮苷、异鼠李苷、槲皮素、芦丁、柚皮素、儿茶素、甘草素和异甘草素等成分^[5,10-12]。此外,酚酸类和黄酮类成分良好的离域度和大 π 键共轭体系,可与金属元素如代赭石中主要存在的Fe形成配位结构,产生药效活性^[5]。本研究选取方中6个酚酸类成分(绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、1,5-二咖啡奎宁酸、异绿原酸C)和3个黄酮类成分(异槲皮苷、异鼠李苷、槲皮素)进行试验。根据预试验考察结果,选用乙腈-0.1%磷酸水溶液-甲醇为流动相、350 nm检测波长条件检测,各成分峰形较佳、分离度良好。汤剂中总黄酮含量的测定采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,其原理是金属离子与酮羰基、邻位羟基配合形成稳定结构,在510 nm波长处有最大紫外吸收。该方法简单便捷,准确可靠,适用于旋覆代赭汤中总黄酮含量的快速测定。

大孔树脂吸附法在中药提取液有效成分的分

离纯化研究中应用广泛,具有吸附速度快、解吸条件温和以及可再生等优点,尤其适用于中药中酚酸、黄酮类成分的分

离纯化^[13-15]。预试验中考察了10种常用大孔树脂型号(HPD100、HPD400、HPD600、D101、AB-8、S-8、X-5、ADS-17、NKA-9、DM130),其中HPD400型大孔树脂表现出良好的吸附和解吸能力,故选择。正交试验和响应面试验设计常用于中药提取分离纯化工艺研究,前者优点为均匀分散、整齐可比,但不能保证最佳点选择准确,而后的准确度和可预测性更高,利于最优条件的筛选^[16-18],但也有操作次数相对较多,操作点选择不易等问题。因此,试验前期对可能影响结果各因素,包括水洗体积、水洗流速、醇洗体积、醇洗体积分数、醇洗流速等进行了单因素考察。结果显示,上样后水洗除杂过程中水洗体积和速率对汤剂中总黄酮质量分数和各成分含量几乎无影响,选择3BV水洗体积,2 mL/min水洗流速;而醇洗流速、醇洗体积分数、醇洗体积等因素对总黄酮质量分数和各成分含量有显著影响,醇洗流速2~6 mL/min、醇洗体积分数50%~90%、醇洗体积在2~4 BV范围内对试验结果影响较大,且总黄酮质量分数和各成分含量相对较高,条件范围利于方中酚酸和黄酮类成分纯化。因此,本研究选取醇洗流速(2,4,6 mL/min),醇洗体积分数(50%,70%,90%),醇洗体积(2,3,4 BV)进行三因素三水平试验,进一步筛选最佳纯化条件。

旋覆代赭汤水煎液经乙酸乙酯萃取后,所得成分亲脂性较强,在大孔树脂分离前采用20%乙醇进行溶解,预试验发现,该溶液体系不影响分离纯化效果。经Box-Behnken响应面法优化最佳工艺后,纯化得到总黄酮质量分数达69.33%,酚酸和黄酮类成分含量相对较高,说明模型可靠,预测价值高,分离得到的精制酚酸类和黄酮类成分将为下一步药效学研究提供参考。

参考文献

[1] 常燕磊,代二庆,袁红霞. 旋覆代赭汤临床应用及实验研究