

响应面法优化川泽泻发汗工艺

罗鸾昀, 罗昕怡, 张亚琴, 文秋姝, 邓秋林, 陈兴福*

(四川农业大学农学院, 四川温江 611130)

摘要 [目的]用响应面法优化泽泻发汗加工工艺。[方法]通过标准分转换,以发汗泽泻的浸出物含量、23 乙酰泽泻醇 B 和 24 乙酰泽泻醇 A 含量的综合评分为考察指标,分别探究环境温度、发汗时间和含水量对综合评分的影响,在单因素试验确定的优化范围基础上,采用 3 因子二次回归正交旋转组合设计的响应面法优化了川泽泻的发汗工艺。[结果]川泽泻发汗的最佳工艺条件是环境温度 45 ℃、发汗时间 94 h、含水量 10%,此条件下综合评分为 94.02 ± 0.02 ,浸出物含量为 $(15.34 \pm 0.02)\%$,23 乙酰泽泻醇 B 含量为 (0.06 ± 0.02) mg/mL,24 乙酰泽泻醇 A 含量为 (0.02 ± 0.01) mg/mL。[结论]该研究建立的泽泻最佳发汗工艺能够提高泽泻质量,为川泽泻的开发和利用提供可靠方法。

关键词 川泽泻;发汗工艺;响应面法;工艺优化;综合评分

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)20-0180-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.20.048



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Diaphoretic Processing of *Alisma orientalis* by Response Surface Methodology

LUO Qian-yun, LUO Xin-yi, ZHANG Ya-qin et al (College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130)

Abstract [Objective] To optimize the diaphoretic processing of *Alisma orientalis* by response surface methodology. [Method] Through the conversion of standard scores, the comprehensive scores of the extract content, Alisol B 23 acetate and Alisol A 24 acetate were used as the investigation indicators, and the effects of environmental temperature, diaphoretic time and water content on the comprehensive score were explored respectively. Based on the optimization range determined by the single factor experiment, the diaphoretic processing of *Alisma orientalis* was optimized using the response surface method of the three-factor quadratic regression orthogonal rotation combination design. [Result] The best diaphoretic processing of *Alisma orientalis* were environmental temperature 45 ℃, diaphoretic time 94 h, and water content 10%. Under this condition, the comprehensive score was 94.02 ± 0.02 , the extract content was $(15.34 \pm 0.02)\%$, and Alisol B 23 acetate was (0.06 ± 0.02) mg/mL and Alisol A 24 acetate was (0.02 ± 0.01) mg/mL. [Conclusion] The best diaphoretic processing method established on this experiment could increase the quality of *Alisma orientalis*, providing reliable method for the expansion of the market.

Key words *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; Diaphoretic processing; Response surface methodology; Processing optimization; Comprehensive grade

泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎为常用大宗药材。现代药理研究表明,泽泻具有利尿、降血脂、降血糖、抗炎等功效,对心血管和免疫系统也具有一定的药理作用。泽泻也是六味地黄丸等中成药的主要原料之一,每年的需求量 6 000~8 000 t,应用广、出口量大,具有广阔的市场前景。泽泻为著名川产地道药材,主要产于四川、福建和江西,分别称为川泽泻、建泽泻和江泽泻,川泽泻目前已占泽泻市场用量的 70%~80%。泽泻质量是市场开发的关键,其质量指标主要包括灰分、浸出物、23 乙酰泽泻醇 B。萜类成分 24 乙酰泽泻醇 A 和 23 乙酰泽泻醇 B 是泽泻主要的利尿活性成分,常用于评价泽泻品质和相关药物生产。《中国药典》(2015 年版)规定,泽泻药材中醇溶性浸出物的含量不能低于 10%^[1],有研究发现市场上的川泽泻醇浸出物含量达标准,但其含量较建泽泻低 6% 左右;建泽泻中 23 乙酰泽泻醇 B 含量较高,而川泽泻中 24 乙酰泽泻醇 A 含量较高^[2-3]。因此,优化和改善川泽泻的加工工艺是进一步提高川泽泻市场竞争力的重要途径。

“发汗”是中药材产地加工中常用的方法之一。“发汗”是将鲜药材加热或半干燥后,密闭堆积发热,使其内部含水量向外蒸发,并凝结成水珠附于药材的表面,其目的是加快

药材的干燥,有利于药材的保存,适用于泽泻、厚朴、杜仲等药材。研究表明,“发汗”加工过程会在一定程度上对药材的外表性状、内在成分含量、药用疗效等方面有影响^[4]。通过市场调研得知,川泽泻主要药效成分含量也能够通过“发汗”得以提高,但产地发汗方法不规范、工艺参数还有待通过试验探究优化。该研究以川泽泻为研究对象,针对目前泽泻生产上发汗的实际情况,通过试验探究影响川泽泻质量的 3 个因素即环境温度、发汗时间和含水量,并利用响应面法优化发汗工艺,以期为提高川泽泻质量和功效奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试原料。川泽泻,产地为四川眉山市彭山区,经四川农业大学陈兴福教授鉴定为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎。

1.1.2 主要仪器。安捷伦 1120 4286AA 高效液相色谱仪,安捷伦公司;101-A3 型电热恒温鼓风干燥箱,上海捷呈有限公司;万能高速粉碎机,广东旭朗机械设备有限公司;FT10-2 高速台式离心机,北京金洋万达科技有限公司。

1.1.3 主要试剂。24 乙酰泽泻醇 A、23 乙酰泽泻醇 B 标准品购买于成都格利普生物科技有限公司;甲醇和乙腈(色谱纯),购买于南京化学试剂股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灰分含量测定。参考《中国药典》(2015 年版)“通则 2302 灰分测定法”中第一法测定^[1]。平行测定 3 次,即得。

基金项目 四川省大学生创新训练计划项目(S201910626133)。

作者简介 罗鸾昀(1999—),女,四川成都人,从事药用植物加工研究。

*通信作者,教授,博士生导师,从事药用植物栽培与加工研究。

收稿日期 2020-04-08

1.2.2 浸出物含量测定。参考《中国药典》(2015年版)“通则2201 浸出物测定法”中第二法测定^[1],平行测定3次,即得。

1.2.3 23 乙酰泽泻醇 B、24 乙酰泽泻醇 A 的含量测定。

1.2.3.1 标准溶液的制备。分别精密称取适量 24 乙酰泽泻醇 A 和 23 乙酰泽泻醇 B 标准品于 15 mL 容量瓶中,加入 10 mL 乙腈定容,摇匀,得到 24 乙酰泽泻醇 A 母液浓度为 0.02 mg/mL,23 乙酰泽泻醇 B 母液浓度为 0.03 mg/mL。

1.2.3.2 供试品溶液的制备。精密称取泽泻粉末 0.2~0.5 g 置离心管中,加入乙腈 10 mL,密塞,超声处理(75 W,45 kHz)20 min,冷却,在 4 000 r/min 条件下离心 20 min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

1.2.3.3 样品测定。采用高效液相色谱法测定样品中的 24 乙酰泽泻醇 A 和 23 乙酰泽泻醇 B 含量。色谱条件:色谱柱为 Eclipse Plus C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-水(V:V=78:22);流速 0.8 mL/min;柱温 25 ℃;检测波长 208 nm;进样量 10 μL。

1.2.4 浸出物综合评分方法。采用标准分转化的方法进行试验综合评分^[5]。浸出物、23 乙酰泽泻醇 B 和 24 乙酰泽泻醇 A 为泽泻的主要质量指标,因此以这 3 个指标的综合评分作为响应面设计中的响应值。对不同条件下发汗泽泻的浸出物、23 乙酰泽泻醇 B 和 24 乙酰泽泻醇 A 含量进行标准分转化,因该试验各指标最大值为最优,最大值计为 100 分,最小值计 0 分,根据药典各成分含量要求及实际应用价值,将浸出物权重比例设置为 40%,23 乙酰泽泻醇 B 设置为 50%,24 乙酰泽泻醇 A 设置为 10%。各试验项的得分(X_i)= $100 \times (X_i - X_{i\min}) / (X_{i\max} - X_{i\min})$ 。各指标结果按此公式转化为标准分后,按指标权重比例得到综合评分,其计算公式为: $X_i = 50\% \times 100 \times (X_{1i} - X_{1\min}) / (X_{1\max} - X_{1\min}) + 40\% \times 100 \times (X_{2i} - X_{2\min}) / (X_{2\max} - X_{2\min}) + 10\% \times 100 \times (X_{3i} - X_{3\min}) / (X_{3\max} - X_{3\min})$,式中, X_1 为浸出物, X_2 为 23 乙酰泽泻醇 B, X_3 为 24 乙酰泽泻醇 A。

1.2.5 单因素试验。《中国药典》(2015年版)中明确说明“发汗”加工法的操作方法,即直接将一定量的中药材堆积,进行“发汗”。该研究模拟药材真实发汗环境,全程用培养箱严格控制温度条件。

1.2.5.1 环境温度对发汗效果的影响。泽泻多于秋末冬初进行采收和加工,发汗常于室外进行。在泽泻样品含水量为 15%、发汗时间为 72 h 条件下,该试验在培养箱严格控制温度稳定的情况下,分别考察发汗时环境温度为 15、25、35、45、55 ℃时对泽泻质量综合评分的影响。

1.2.5.2 发汗时间对发汗效果的影响。取干燥泽泻适量,在环境温度为 25 ℃、含水量为 15%条件下,分别考察发汗时间为 24、36、72、108、144 h 时对泽泻质量综合评分的影响。

1.2.5.3 含水量对发汗效果的影响。取干燥泽泻适量,当泽泻含水量分别为 10%、15%、20%、25%、30%时,均在 25 ℃条件下发汗 72 h,考察不同原料泽泻的含水量对泽泻质量综合评分的影响。

1.2.6 响应面法优化泽泻发汗工艺。

1.2.6.1 响应面法优化工艺。根据单因素考察结果得到初步优化范围,采用响应面设计,对同一批次泽泻药材在培养箱内进行发汗处理,以浸出物、24 乙酰泽泻醇 A 和 23 乙酰泽泻醇 B 含量的综合评分为响应值,对环境温度(A)、发汗时间(B)、含水量(C)3 个因素进行优化。对试验数据进行二次多项式回归拟合分析(Design-Expert 8.0.6 软件),剔除影响不显著因素后,得到其数学模型。利用上述模型和方程分析预测最佳发汗工艺参数。

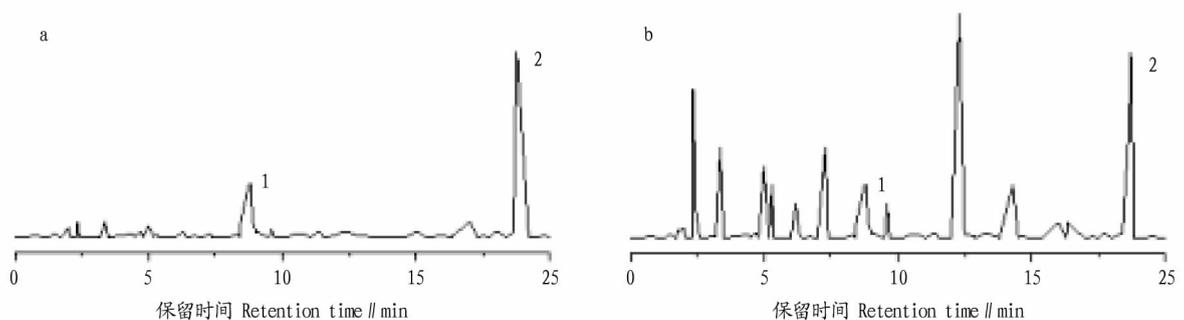
1.2.6.2 显著性检验。对回归方程进行方差和显著性分析。

1.2.6.3 模型的验证。根据回归模型优选出的最佳工艺,在此条件下进行验证试验,测定 3 次平行试验的综合评分,观察是否与预测值吻合,从而表明该试验所建立的数学模型的可靠性。

2 结果与分析

2.1 灰分和浸出物的含量测定 试验测得供试品中灰分含量均小于 5%,浸出物含量均大于 10%,符合药典规定标准。

2.2 23 乙酰泽泻醇 B、24 乙酰泽泻醇 A 的含量测定 标准品和供试样品的测定结果见图 1。由图 1 可见,供试品中含有测定目标成分,即在保留时间 8 min 左右出现 24 乙酰泽泻醇 A 的峰,18 min 左右出现 23 乙酰泽泻醇 B 的峰,因此测定数据可用于进一步分析。



注:1 为 24 乙酰泽泻醇 A;2 为 23 乙酰泽泻醇 B

Note:1 is Alisol A 24 acetate;2 is Alisol B 23 acetate

图 1 乙酰泽泻醇标准品溶液(a)和供试品溶液(b)HPLC 图

Fig.1 HPLC chart of standard solution of acetyl alsanol(a) and test solution(b)

2.3 单因素试验

2.3.1 环境温度对发汗效果的影响。由图 2a 可知,随环境温度的增加,综合评分呈先上升后略下降的趋势,环境温度为 45 ℃ 时,综合评分达到最高值。这可能是环境温度的升高能够增强泽泻内源酶活性,从而促进相关的生化反应,当温度达到一定值后,可能会由于热胁迫而刺激泽泻的发汗产物进一步转化成次级代谢产物,如萜类等,从而对质量综合评分产生影响^[6]。试验中发现 15 ℃ 条件下泽泻无发汗表现,55 ℃ 条件下发汗泽泻表现出发霉严重的情况,因此选取 25、35、45 ℃ 为后续优化试验的 3 个水平。

2.3.2 发汗时间对发汗效果的影响。由图 2b 可知,随发汗

时间增长,综合评分呈先上升后略下降的趋势。这可能是随发汗时间延长,发汗过程中的生理生化反应进行得更彻底,从而提高了药材质量。试验研究发现,发汗时间为 108 h 时泽泻出现轻微发霉现象,至 144 h 时发汗泽泻发霉严重,因此选择 36、72、108 h 为后续优化试验的 3 个水平。

2.3.3 含水量对发汗效果的影响。由图 2c 可知,随含水量的增加,综合评分呈先上升后下降的趋势。这可能是含水量对泽泻内部酶活性有一定影响。试验发现 10% 含水量条件下发汗泽泻无明显发汗表现,30% 含水量条件下发汗泽泻出现较严重发霉情况,因此选择 10%、15%、20% 为后续优化试验的 3 个水平。

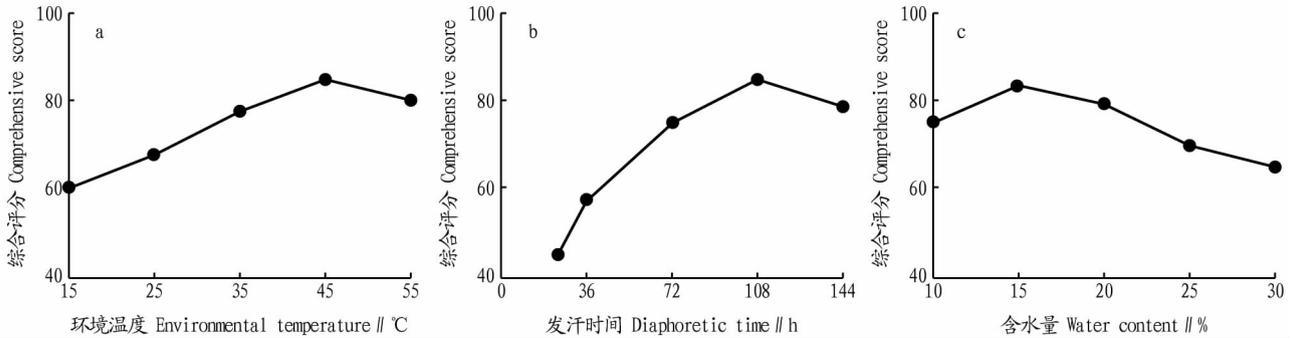


图 2 环境温度(a)、发汗时间(b)和含水量(c)对泽泻质量综合评分的影响

Fig.2 The effect of environmental temperature(a), diaphoretic time(b) and water content(c) on the comprehensive score of *Alisma orientale*

2.4 响应面法优化泽泻发汗工艺

2.4.1 回归分析。经回归分析得到响应面数学模型: $Y = 54.55 - 8.13A + 3.18B - 0.64C + 4.36AB - 22.15AC - 7.00BC - 1.70A^2 - 22.60B^2 - 7.21C^2$ 。由表 1 综合评分结果分析,最佳发汗工艺参数为环境温度 25 ℃、发汗时间 72 h、含水量 20%,此条件下综合评分为 86.31。结合上述回归模型分析预测,

最佳发汗工艺参数为环境温度 45 ℃、发汗时间 94 h、含水量 10%,此条件下综合评分为 93.10。

由图 3 中的三维响应曲面图可得,发汗时间和含水量对整个发汗工艺影响显著,环境温度对整个工艺影响不显著,环境温度和含水量交互作用显著。

表 1 响应面试验设计和结果分析

Table 1 Response surface test design and result analysis

序号 No.	A(环境温度 Environmental temperature//℃)	B(发汗时间 Diaphoretic time//h)	C(含水量 Water content %)	浸出物 Extractum %	乙酰 24 乙酐泽泻醇 A Alisol A 24 acetate//mg/mL	23 乙酐泽泻醇 B Alisol B 23 acetate//mg/mL	综合评分 Comprehensive score
1	0(35)	0(72)	0(15)	14.07	0.015 2	0.050 2	80.82
2	1(45)	0	-1(10)	14.37	0.014 7	0.046 2	75.98
3	0	0	0	14.07	0.015 2	0.050 2	80.82
4	-1(25)	1(108)	0	12.98	0.014 1	0.045 5	52.31
5	-1	0	1(20)	15.03	0.014 6	0.047 5	86.31
6	0	-1(36)	-1	12.93	0.013 2	0.042 4	32.36
7	0	1	-1	13.89	0.013 8	0.043 6	60.62
8	0	0	0	14.07	0.015 2	0.050 2	80.82
9	0	0	0	14.07	0.015 2	0.050 2	80.82
10	-1	-1	0	12.74	0.013 1	0.036 8	30.47
11	-1	0	-1	12.11	0.014 4	0.044 3	40.39
12	0	1	1	12.45	0.012 2	0.032 5	14.61
13	1	0	1	12.59	0.012 7	0.027 8	12.36
14	0	0	0	14.07	0.015 2	0.050 2	80.82
15	1	1	0	14.58	0.017 7	0.054 2	73.97
16	0	-1	1	12.93	0.013 2	0.042 4	41.87
17	1	-1	0	12.66	0.012 3	0.033 7	19.59

2.4.2 显著性检验。对回归方程进行方差和显著性分析,结果发现,模型的 $F = 7.60$ 、 $P = 0.007 0$,说明选用的模型具有显

著性。发汗时间和含水量的二次项的 $P < 0.05$,说明发汗时间和含水量对整个发汗工艺影响显著;环境温度及其二次项的

$P>0.05$,因此环境温度对整个工艺影响不显著。环境温度和含水量交互项的 $P<0.05$,表明温度和含水量交互作用显著,

其他因素间的交互作用不显著。这与图 3 显示的结果基本一致。

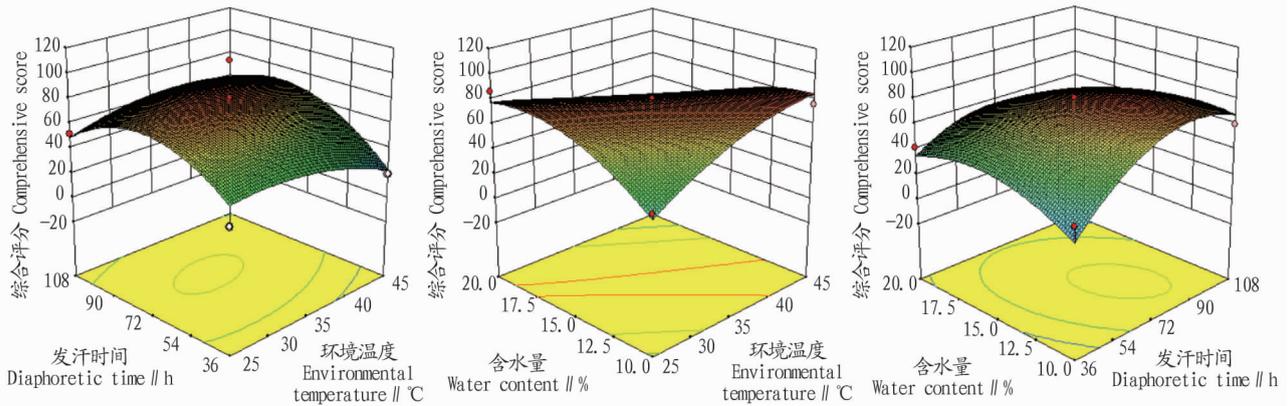


图 3 环境温度 (a)、发汗时间 (b) 和含水量 (c) 的交互作用响应面

Fig.3 Response surface of the interaction of environmental temperature (a), diaphoretic time (b) and water content (c)

2.4.3 模型的验证。根据回归模型优选出的最佳工艺,在此条件下进行验证试验,3次平行试验的综合评分为 94.02 ± 0.02 ,此时发汗泽泻浸出物含量为 $(15.34 \pm 0.02)\%$,23 乙酰泽泻醇 B 含量为 $(0.06 \pm 0.02) \text{ mg/mL}$,24 乙酰泽泻醇 A 含量为 $(0.02 \pm 0.01) \text{ mg/mL}$,与预测值吻合,表明该试验所建立的数学模型准确可靠,优化出的一体化最佳工艺重现性好,表明该最佳工艺切实可行、可操作性强。

3 结论与讨论

发汗时间、环境温度和含水量的交互效应对泽泻发汗工艺效率影响均较为显著。该试验以环境温度、发汗时间和含水量为考察因素,以浸出物、23 乙酰泽泻醇 B 和 24 乙酰泽泻醇 A 含量加权所得到的综合评分为指标,通过响应面优化试验建立泽泻发汗加工的最佳工艺为环境温度 45°C 、发汗时间 94 h 、含水量 10% 。得到的最佳工艺数据对泽泻产地加工中的发汗过程有重要指导意义,以此可规范泽泻发汗加工方法,也可为建设产地发汗加工设施与加工设备提供参考,以提高泽泻加工的产业化水平。

该试验研究了影响发汗效果的主要关键因素。发汗过程受到温度、水分、时间、堆积量等条件因素的影响^[7],该研究选择了温度、水分和时间 3 个因素进行探究,主要基于堆积量通过温度、水分影响发汗效果,根据具体条件在有效控制温度、水分情况下,选择适宜的规程量。于凡等^[8]在探究不同发汗条件对丹参品质影响的研究中采用了温度和水分 2 个相同探究因素,也得到显著结果,说明通过改变发汗条件提高中药材品质的方法具有普遍可行性。其他中药材如杜仲等,产地加工中进行发汗处理,也得到与该试验研究相同的效果。

“发汗”是提高药材产地加工质量的一种有效方法,药材发汗加工后多有外观性状和化学成分的变化^[3]。近年来关于“发汗”对药材影响方面的文献主要涉及化学成分和药理作用 2 个方面^[9],如厚朴经发汗加工过程后,厚朴酚总量比未发汗前增加了 7.94% ^[10],续断发汗后用于治疗白血病的活

性物质川续断皂苷 VI 的含量也有一定提升^[11]。该试验研究也证实了通过发汗能够提高泽泻质量。目前研究者们对发汗加工的研究方向多集中在观察加工过程前后中药材活性有效成分的含量变化,且多数研究也表明发汗过程对药材化学成分含量有一定的影响,为以后对发汗更深入的研究提供了较好的试验基础,未来对发汗的研究应转向对其过程中内在作用机制的探究,从而为发汗加工法在市场中推广和产地应用提供可靠的理论依据^[12]。

在试验研究过程中发现发汗时环境温度过高、时间过长或含水量过多时,发汗泽泻都会出现发霉的情况,影响泽泻质量和安全性。实际生产过程中环境温度过高,也会增加发汗成本,不符合提高经济效益要求。增加发汗环境空气的通透性,提高环境温度,以缩短发汗时间、提高发汗质量有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2015年版,一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:212-213.
- [2] 罗永东,邱丽莉,许文,等.不同产地泽泻 4 个三萜类成分含量比较[J].中药材,2010,33(12):1849-1851.
- [3] 彭国平,潘林梅,文红梅.泽泻的对照品研究[J].南京中医药大学学报(自然科学版),2001,17(3):154-156.
- [4] 陈茹,陈成,杨兴鑫,等.中药“发汗”炮制法的现代研究进展[J].中草药,2018,49(2):489-493.
- [5] 刘东平,张文朋,李端.多指标试验结果的数据处理[J].包头医学院学报,2015,31(10):127-128.
- [6] 刘红亮,晏仁义,邵爱娟,等.中药材“发汗”对药材质量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(24):349-352.
- [7] 段金殿,宿树兰,严辉,等.药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨[J].中草药,2013,44(10):1219-1225.
- [8] 于凡,邱镇,李国转,等.不同发汗条件对发汗丹参中丹参酮类含量的影响[J].安徽中医药大学学报,2017,36(5):73-77.
- [9] 段金殿,宿树兰,吕洁丽,等.药材产地加工传统经验与现代科学认识[J].中国中药杂志,2009,34(24):3151-3157.
- [10] 刘德文,龚千锋,刘强,等.泽泻的采收、产地加工、炮制及质量评价研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(16):203-211.
- [11] 顾宁宁,王玉龙,陈志明,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与 HPLC 对厚朴进行成分分析及含量测定[J].现代中药研究与实践,2018,32(1):10-12.
- [12] 张树平,陈兴福,杨文钰,等.不同产地川泽泻中人体必需微量元素的含量分析[J].药物分析杂志,2010,30(7):1213-1217.