

Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺

陈林伟^{1,2}, 秦昆明^{1,2}, 王琴¹, 陈丹妮^{1,2}, 王彬¹, 蔡宝昌^{1,2*}

1. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023

2. 南京海昌中药集团有限公司 江苏省企业研究生工作站, 江苏 南京 210061

摘要: 目的 利用响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺。方法 采用单因素试验结合 Box-Behnken 中心组合设计方法, 对提取工艺中乙醇体积分数、溶剂倍量、渗漉速率 3 个因素进行考察, 以复方中 6 个指标性成分(人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷)及浸出物的质量浓度的综合评分作为考察指标进行提取工艺优化研究。结果 最佳提取工艺为以 10 倍量 48%乙醇, 1.4 mL/min 的体积流量渗漉提取。结论 响应面法优选气血双补酒提取工艺简便、合理可行, 具有较高的精确度, 可为工业化大生产提供科学的依据。

关键词: 气血双补酒; 响应面法; 渗漉工艺; 人参皂苷 Rb₁; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 阿魏酸; 二苯乙烯苷; 芍药苷; 橙皮苷
中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1151-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.010

Optimization of percolation extraction technology for Qixue Shuangbu Tinctura by Box-Behnken response surface methodology

CHEN Lin-wei^{1,2}, QIN Kun-ming^{1,2}, WANG Qin¹, CHEN Dan-ni^{1,2}, WANG Bin¹, CAI Bao-chang^{1,2}

1. Research Center for Normalization and Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Graduate Workstation of Enterprises in Jiangsu Province, Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China

Abstract: Objective To optimize the percolation extraction technology for Qixue Shuangbu Tinctura by response surface methodology (RSM). **Methods** The single factor experiment combined with Box-Behnken design was used to optimize the extracting technology, with six major characteristic components (ginsenoside Rb₁, calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside, ferulic acid, stilbene glucoside, paeoniflorin, hesperidin) and extract of Qixue Shuangbu Tinctura as indexes, in order to detect three factors, including the alcohol volume fraction, the dosage of ethanol, and the percolate speed, and optimize the extraction process of Qixue Shuangbu Tinctura. **Results** Optimum percolation process was added 10 times of the amount of 48% ethanol with percolation speed of 1.4 mL/min. **Conclusion** This optimized extraction technology of Qixue Shuangbu Tinctura is reasonable, stable, and feasible, and with high accuracy, which could be extended to the applications of large-scale production.

Key words: Qixue Shuangbu Tinctura; response surface methodology; percolation extraction technology; ginsenoside Rb₁; calycosin 7-O-β-D-glucopyranoside; ferulic acid; stilbene glucoside; paeoniflorin; hesperidin

气血双补酒是江苏省中医院名老中医孟景春教授的临床验方, 是由人参、黄芪、当归、白芍、陈皮、玉竹、黄精、制首乌、枸杞子 9 味中药组成的复方制剂, 具有补益气血、抗疲劳、增强免疫、抑制肿瘤生长, 治疗和缓解糖尿病症状的作用, 同时也具有扩张血管、抗急性心肌缺血、降血压、抗衰

老等作用^[1]。

目前, 尚没有关于气血双补酒提取工艺的研究报道, 而且用其中某一成分作为评价指标较为单一, 很难全面地评价该制剂的提取工艺。为了建立更加全面的气血双补酒的提取工艺, 提高其临床疗效, 经查阅文献选取单味药中药效明显的成分, 按君臣

收稿日期: 2014-11-29

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业专项(2015468002-3); 江苏省科技支撑计划——工业项目(BE2012011)

作者简介: 陈林伟(1989—), 男, 江苏赣榆人, 硕士, 研究方向为中药质量标准研究。Tel: 18351895532 E-mail: simply0518@126.com

*通信作者 蔡宝昌, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制机制及质量标准研究。Tel: (025)68193567 E-mail: bccai@126.com

佐使关系将人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷及浸出物的质量浓度分配权重系数综合评分，作为评价指标来考察影响渗漉提取工艺中乙醇体积分数、溶剂倍量、渗漉体积流量 3 个主要因素。考虑到影响渗漉提取工艺的因素皆为连续性变量，对于变量是连续性的多因素试验分析，Box-Behnken 响应面法分析是最佳选择^[2-3]。因此，本实验引入 Box-Behnken 响应面法优选气血双补酒的渗漉提取工艺，为进一步开发利用该处方提供参考依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱系统，日本岛津公司，包括岛津 LC-Solution 工作站、在线脱气机、SIL-20A 自动进样器、SPD-20A 紫外-可见光检测器、CTO-20A 柱温箱；BS2242S 电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；RE-52 旋转蒸发仪，瑞士 BUCHI 公司。

人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷对照品购自南京森贝伽生物科技有限公司，批号分别为 0762-131210、0460-130312、0001-131002、0362-130517、0834-131089、0369-131023，上述对照品质量分数均 ≥ 98%。甲醇、氯仿、正丁醇，分析纯，南京化学试剂有限公司；乙腈，色谱纯，美国天地公司；水，杭州娃哈哈公司。

所用药材饮片购自南京海源中药饮片有限公

司，并经南京中医药大学陈建伟教授鉴定，人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎，当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根，黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao. 的干燥根，白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，制首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 干燥块根的加工炮制品，玉竹为百合科植物玉竹 *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce 的干燥根茎，黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥根茎，陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮，枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 指标成分的定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Merck C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；检测波长 203 nm；柱温 35 °C；体积流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL；流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液，梯度洗脱：0~12 min, 1%~13%乙腈；12~16 min, 13%~18%乙腈；16~50 min, 18%~31%乙腈；50~60 min, 31%~42%乙腈；60~70 min, 42%~90%乙腈；对照品及样品的色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取各对照品适量，精密

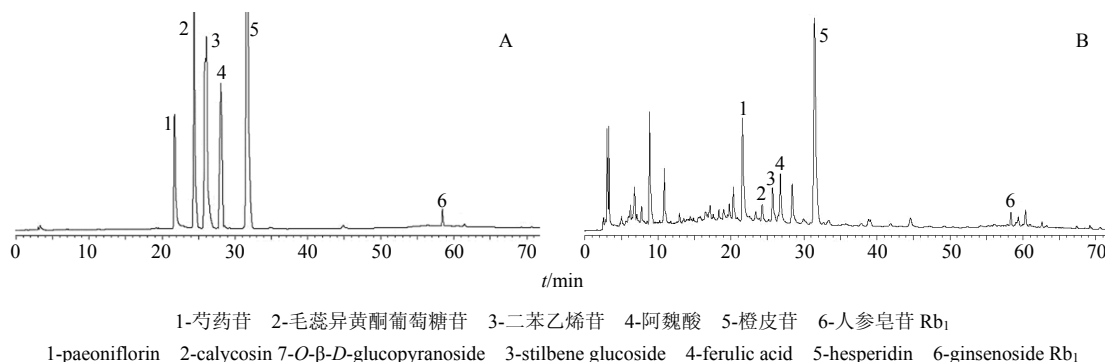


图 1 混合对照品 (A) 和气血双补酒样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and Qixue Shuangbu Tinctura sample (B)

称定，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，即得含人参皂苷 Rb₁ 104.4 μg/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 44.91 μg/mL、阿魏酸 20.53 μg/mL、二苯乙烯苷 89.07 μg/mL、芍药苷 72.03 μg/mL、橙皮苷 111.7 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 将各药材粉碎过 24 目

筛，精密称量人参 9 g、当归 6 g、黄芪 6 g、白芍 6 g、陈皮 3 g、黄精 9 g、玉竹 6 g、制首乌 6 g、枸杞子 6 g，平行称量 17 份，进行渗漉提取，收集渗漉液定容即得气血双补酒。精密量取酒样品 50 mL，水浴蒸至无醇味，加入三氯甲烷振荡萃取 2 次，每次 20 mL，弃去三氯甲烷液。水液加入水饱和正丁

醇振荡萃取2次,每次20 mL,合并正丁醇液减压蒸干,残渣加甲醇溶解定容至5 mL量瓶中,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按1、2、4、6、8、10、20 μL进样,在高效液相色谱仪上分析。结果表明,人参皂苷 Rb₁ 线性方程为 $Y=49\ 822 X+49\ 741$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 104.4~2 088.0 μg; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷线性方程为 $Y=761\ 212 X+39\ 459$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 44.91~898.20 μg; 阿魏酸线性方程为 $Y=990\ 870 X-261\ 251$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 20.53~410.60 μg; 二苯乙烯苷线性方程为 $Y=727\ 957 X+204\ 946$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 89.07~1 781.00 μg; 芍药苷线性方程为 $Y=347\ 626 X+662\ 323$, $r=0.999\ 8$, 线性范围 72.03~1 441.00 μg; 橙皮苷线性方程为 $Y=2\ 000\ 000 X-356\ 284$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 111.7~2 234.0 μg。

2.1.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样6次,记录HPLC色谱图。人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷的色谱峰面积 RSD 均小于1.4%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取1号试验样品,制备6份供试品溶液,进行测定,记录HPLC色谱图。人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷的质量浓度 RSD 均小于1.9%,表明重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取1号试验样品制备成的供试品溶液,分别在0、2、4、6、8、10、12、24 h进行HPLC色谱分析。人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷的色谱峰面积 RSD 均小于1.7%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取1号试验样品50 mL,精密加入“2.1.2”项下混合对照品溶液2 mL,制备成供试品溶液,平行操作6份。进样测定,6种成分的平均回收率在99.56%~100.89%,RSD在1.24%~1.98%。

2.1.9 浸出物的测定 精密移取“2.1.3”项下气血双补酒10 mL,置已干燥至恒定质量的蒸发皿中,水浴上蒸干后,于105 ℃干燥3 h,置干燥器中冷却30 min,迅速精密称定质量。

2.2 单因素试验^[4-5]

经查阅文献和预试验确定影响渗漉提取工艺的因素主要包括乙醇体积分数、溶剂倍量、渗漉体积流量,综合评分设定满分为100分,根据君臣佐使关系划分人参皂苷 Rb₁、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、二苯乙烯苷、芍药苷、橙皮苷及浸出物权重系数分别为30、15、15、10、10、10、10。在此基础上进行总加权评分,利用综合评分值(P)对试验结果进行分析:以 Y 表示试验中指标成分的测定值,以各指标的最大值(Y_{\max})作为参照对同一指标的各数据进行标准化处理, D 表示试验中该指标成分测定值的标准化数据($D=Y/Y_{\max}$),综合评分 $P=D_{\text{人参皂苷 Rb}_1} \times 30 + D_{\text{毛蕊异黄酮葡萄糖苷}} \times 15 + D_{\text{阿魏酸}} \times 15 + D_{\text{二苯乙烯苷}} \times 10 + D_{\text{芍药苷}} \times 10 + D_{\text{橙皮苷}} \times 10 + D_{\text{浸出物}} \times 10$ 。

2.2.1 乙醇体积分数 按照“2.1.3”项下方法称取一定量的复方组成的药材粉末,分别加入体积分数为30%、40%、50%、60%、70%的10倍量乙醇,以渗漉体积流量为2 mL/min提取,分别取一定量渗漉液同法制备成供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,综合评分结果表明乙醇体积分数为40%~60%提取率最好,故选择乙醇体积分数50%作为中心点。

2.2.2 溶剂倍量 在选择乙醇体积分数50%为中心点的基础上,按照“2.1.3”项下称取一定量的复方组成的药材粉末,分别加入6、8、10、12、14倍量乙醇,以渗漉体积流量为2 mL/min提取,分别取定量渗漉液同法制备成供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,综合评分结果表明溶剂倍量为8~12倍最佳,故选10倍量溶剂为中心点。

2.2.3 渗漉体积流量 在选择乙醇体积分数中心点为50%、溶剂倍量中心点为10倍量的基础上,分别以体积流量为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min渗漉提取,分别取定量渗漉液同法制备成供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件测定,综合评分结果表明渗漉体积流量1.0~2.0 mL/min最佳,故选渗漉速度1.5 mL/min为中心点。

2.3 响应曲面优化试验设计及结果^[6-7]

根据Box-Behnken中心组合试验设计原理,综合单因素影响试验结果,选取乙醇体积分数(X_1)、溶剂倍量(X_2)和渗漉体积流量(X_3)作为考察对象,采用Design Expert 8.0统计分析软件的响应面分析法安排试验,以获取最适工艺参数。采用3因素3水平的响应面分析法进行试验设计,试验设计

与结果见表 1。

使用统计软件 Design Expert 8.0 对表 1 中各指标性成分量的综合权重数据进行多元回归拟合, 得到综合评分对编码自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的二次多项回

归方程 $Y = -721.018 + 15.569 X_1 + 57.749 X_2 + 169.005 X_3 + 0.0517 X_1 X_2 - 1.275 X_1 X_3 - 6.863 X_2 X_3 - 0.01392 X_1^2 - 2.476 X_2^2 - 14.775 X_3^2$ 。方差分析及回归系数显著性检验结果见表 2。所建立的二次多项

表 1 响应面法试验设计方案及结果

Table 1 Design and results of response surface method

试验号	$X_1/\%$	$X_2/\text{倍}$	$X_3/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$	质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)								综合评分
				人参皂苷 Rb ₁	毛蕊异黄酮	葡萄糖苷	阿魏酸	二苯乙烯苷	芍药苷	橙皮苷	浸出物	
1	40	10	1.0	0.464 3	0.507 2	0.362 9	0.535 6	1.564	2.012	723.5	62.12	
2	50	8	2.0	0.547 4	0.563 5	0.543 5	0.633 2	1.643	2.232	916.4	73.79	
3	50	8	1.0	0.819 9	0.604 7	0.754 3	0.835 3	1.689	2.345	933.5	68.05	
4	60	12	1.5	0.464 5	0.403 8	0.668 9	0.653 7	1.503	2.235	799.5	64.53	
5	50	10	1.5	0.841 0	0.863 3	0.953 4	0.789 5	1.853	2.504	999.0	85.01	
6	40	8	1.5	0.563 4	0.465 4	0.589 7	0.535 3	1.346	2.364	855.5	62.17	
7	50	12	1.0	0.695 8	0.543 6	0.743 6	0.732 5	1.456	2.442	936.3	85.07	
8	60	8	1.5	0.584 4	0.668 2	0.805 4	0.732 4	1.674	2.346	875.6	62.25	
9	40	12	1.5	0.363 3	0.324 8	0.434 2	0.532 2	1.234	2.142	969.7	60.43	
10	50	10	1.5	0.947 9	0.854 7	0.856 4	0.825 3	1.864	2.521	994.5	85.03	
11	60	10	2.0	0.484 9	0.779 1	0.563 3	0.526 8	1.626	2.294	801.3	62.24	
12	40	10	2.0	0.598 7	0.430 7	0.505 4	0.358 3	1.321	2.121	962.4	67.51	
13	60	10	1.0	0.764 3	0.636 7	0.676 5	0.832 5	1.521	2.349	839.4	82.35	
14	50	10	1.5	0.812 8	0.823 5	0.954 3	0.798 5	1.906	2.494	989.3	90.89	
15	50	10	1.5	0.877 3	0.754 3	0.758 9	0.832 6	1.842	2.511	993.4	85.35	
16	50	12	2.0	0.474 3	0.363 6	0.603 3	0.752 2	1.425	2.279	810.1	63.37	
17	50	10	1.5	0.895 8	0.853 3	0.865 4	0.881 7	1.874	2.521	988.6	84.57	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	925.00	9	31.54	<0.000 1	X_1^2	810.10	1	120.11	<0.000 1
X_1	45.74	1	6.74	0.035 6	X_2^2	413.12	1	60.92	0.000 1
X_2	6.39	1	0.94	0.364 1	X_3^2	57.45	1	8.47	0.022 6
X_3	44.08	1	9.14	0.009 1	残差	14.00	7		
$X_1 X_2$	4.06	1	0.60	0.464 4	失拟项	19.32	3	0.91	0.509 5
$X_1 X_3$	162.56	1	23.97	0.001 8	净误差	8.16	4		
$X_2 X_3$	188.24	1	27.75	0.001 2	总离差	2.66	16		

式模型具有高度的显著性 ($P < 0.001$), 模型决定系数 $R^2 = 0.973 6$, 表明模型拟合度良好。将因变量与另外两因素拟合为三维曲面图, 因只能表达含 2 个因素变量的函数, 故固定 3 个因素之一为中值, 将中心点值代入二次回归模型方程得到新方程, 根据新模型方程得到响应面三维图, 结果见图 2, 经过中心组合设计优化提取条件, 得到最佳提取工艺条件: 乙醇体积分数为 48.04%, 溶剂倍量为 10.12,

渗漉体积流量为 1.42 mL/min。

2.4 验证试验

根据 Design-Expert 软件计算出最佳提取工艺为乙醇体积分数为 48.04%, 溶剂倍量为 10.12, 渗漉体积流量为 1.42 mL/min, 考虑实验条件可操作性, 精密平行称定 5 份一定比例复方药材粉末按乙醇体积分数为 48%, 溶剂倍量为 10, 渗漉体积流量为 1.4 mL/min 检验试验结果的可靠性, 综合评分结果见表 3, 与理论

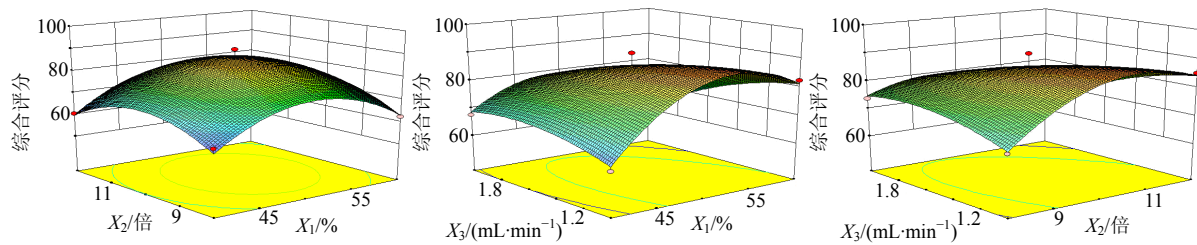


图2 三维效应面图

Fig. 2 3D response surface

表3 提取工艺验证结果

Table 3 Varification of extracting process

试验号	质量浓度/(mg·L ⁻¹)							综合评分
	人参皂苷 Rb ₁	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	阿魏酸	二苯乙烯苷	芍药苷	橙皮苷	浸出物	
1	0.851 2	0.812 7	0.787 2	0.782 6	1.763	2.462	981.7	85.91
2	0.864 2	0.811 6	0.792 6	0.734 2	1.716	2.404	957.3	85.27
3	0.917 9	0.824 7	0.776 4	0.805 2	1.832	2.541	994.5	87.15
4	0.847 3	0.804 3	0.788 9	0.812 6	1.738	2.393	977.2	85.31
5	0.875 8	0.813 5	0.795 4	0.831 7	1.827	2.499	989.1	86.24

值的相对误差为2.5%，说明验证值与回归方程预测值吻合较好，优化后的渗漉提取工艺对实际工业生产具有一定的指导意义。

3 讨论

对于评价指标及权重系数的选择依据，君药人参补气养血，其有效成分主要为人参皂苷；臣药为具有补血功效的当归和具有补气作用的黄芪，其指标性成分分别为阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷；佐药为制首乌、黄精、白芍、玉竹、枸杞子；使药为具有行气、引药入经作用的陈皮。复方中玉竹、黄精、枸杞主要成分为多糖，植物多糖具有较强抗疲劳、增强免疫作用，且浸出物是中药复方的药效物质基础，浸出物量的变化会影响有效成分的量，并最终影响药物的临床疗效^[8]。故按君臣佐使关系对所选取指标成分进行权重系数分配，使得用综合评分去评价提取工艺更加合理，且能全面反映提取物有效成分的信息，更符合中医用药的整体观。

本实验对渗漉提取工艺中乙醇体积分数、溶剂用量、渗漉速度3个因素进行考察，但这3个因素皆为连续性变量，对于变量是连续性的多因素试验分析，Box-Behnken 响应面法分析是最佳选择。Box-Behnken 响应面法通过非线性模型拟合得出最优提取条件更接近客观实际，避免了传统的正交设计和均匀设计法的不足，具有实验精度高、模型预测性好的优点，为气血双补酒工业化大生产提供科学的依据。

参考文献

- [1] Chen L W, Qin K M, Wang Q, *et al.* Determination of major and minor elements in Qixue Shuangbu Tincture by ICP-AES with microwave digestion [J]. *Lat Am J Pharm*, 2015, 34 (2): 370-376.
- [2] 吴振, 李红, 陈岗, 等. 星点设计-响应面优化大黄酚葡聚糖复合物的制备工艺 [J]. *中草药*, 2014, 45(11): 1540-1544.
- [3] 周欣, 陈华国, 黄志金, 等. 响应面法优选虎耳草抗前列腺癌活性部位提取工艺 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1768-1773.
- [4] Banerjee C, Singh R, Jha A, *et al.* Effect of inulin on textural and sensory characteristics of sorghum based high fibre biscuits using response surface methodology [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(10): 2762-2768.
- [5] 鲁劲松, 王红芬, 李云霞. 藿香正气水中陈皮渗漉工艺的优化 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1096-1101.
- [6] Xu Q, Shen Y, Wang H, *et al.* Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from fructus sophorae [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2122-2129.
- [7] 林小玲, 田成旺, 张铁军. 星点设计-效应面法优选参芪消岩颗粒渗漉提取工艺 [J]. *中草药*, 2013, 44(4): 430-433.
- [8] Lu J M, Yao Q, Chen C. Ginseng compounds: An update on their molecular mechanisms and medical applications [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2009, 7(3): 293-302.