

· 中药工业 ·

Box-Benhken 响应面法优化微波提取黄精总皂苷的条件[△]赵丽蓉¹, 罗汉¹, 相英龙¹, 孙慧娟¹, 梅桂林², 方成武^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012;

2. 安徽省中医药科学院亳州中医药研究所, 安徽 亳州 236800)

[摘要] 目的: 优化微波提取黄精药材中总皂苷的工艺, 为黄精药材质量评价提供参考依据。方法: 以紫外分光光度法为检测手段, 采用单因素实验法与 Box-Benhken 响应面法相结合, 研究了料液比、提取时间、乙醇浓度和微波加热功率等工艺参数对黄精总皂苷得率的影响。通过全波长扫描比较了人参皂苷 Rb₁、薯蓣皂苷元和菝葜皂苷元三种对照品与样品最大吸收波长。结果: 响应面优化后得到的最佳提取条件为: 乙醇浓度为 50%, 料液比为 1:16, 提取时间为 40 s。扫描结果显示菝葜皂苷元和样品的最大吸收波长均为 460 nm。结论: 采用响应面法优化黄精总皂苷的提取方法切实可行, 为黄精的提取条件提供理论依据。

[关键词] 黄精; 总皂苷; 微波提取; 响应面

Optimization of Microwave Extracting Total Saponins from Rhizoma Polygonati by Box-Benhken Response Surface Method

ZHAO Li-rong¹, LUO Han¹, XIANG Ying-long¹, SUN Hui-juan¹, MEI Gui-lin², FANG Cheng-wu^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. Bozhou Institute of Traditional Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Bozhou 236800, China)

[Abstract] **Objective:** The process of extracting total saponins from Rhizoma Polygonati was optimized to provide reference for the quality evaluation. **Methods:** Based on the single-factor tests, extraction conditions of total saponins were optimized by Box-Benhken design, and the anti-inflammatory activity was assessed by *in vitro* inflammatory model of mouse macrophages. Ultraviolet spectrophotometry was used to determine the total saponins. The maximum absorption wavelength of ginsenoside Rb₁, diosgenin and sarasin was compared by the full wavelength scanning. **Results:** The optimum extraction condition after the response surface optimization was: ethanol concentration was 50%, the mixture ratio was 1:16, and the extraction time was 40 s. The results showed that the maximum absorption wavelength was 460 nm, and the maximum absorption wavelength was 460 nm. **Conclusion:** The response surface method was used to optimize the extraction of total saponins, and it was feasible to provide the theoretical basis for the extraction conditions of Rhizoma Polygonati.

[Keywords] Rhizoma Polygonati; total saponins; microwave extraction; response surface

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180310001

黄精为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red. 或多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 的干燥根茎^[1]。始载于《名医别录》, 黄精入药性平而润, 味甘而淡, 无毒而杀虫^[2]; 其功能补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾。用于脾胃气虚, 体倦乏力, 胃阴不足等^[1]。目前临床上多用于治疗糖尿病, 冠心病, 白细胞减少等症。现代药理研究表明, 黄精可降血糖, 降血脂, 能有效改善心血管功能, 增强免疫力以及延缓衰老^[3]。

目前考察黄精总皂苷的提取工艺中大多采用超声法、回流法, 优化方式多采用正交试验法。微波辅助提取法是近年来兴起的提取方法, 具有加热速度快, 提取时间较短, 提取效率高等优点^[4]。并且响应面优化方法相对于传统的正交法, 可以更加系统全面的考察因素与因素之间, 因素与响应面之间的交互作用^[5]。有关 Box-Benhken 响应面法优化微波提取黄精总皂苷的提取工艺的文献尚未报道, 因此本研究采用单因素与响应面优化相结合的方法,

[△] [基金项目] 中医药行业科研专项(201207002)

* [通信作者] 方成武, 教授, 研究方向: 中药资源与质量研究; E-mail: cwfang1961@sina.com

以黄精总皂苷得率为指标,考察最佳提取条件,以期为黄精质量评价提供参考依据,同时也为黄精资源的开发利用提供理论基础。

1 仪器与试剂

UV-2012C 紫外-可见分光光度(上海皖宁精密科学仪器有限公司);UPC-50 实验室专用超纯水机(北京康铭时代环保科技有限公司);JP-031B 超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司);C 型-800Y 打粉机(南京威利朗食品机械有限公司);4-20R 通用离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司);美的 M3-L239C 微波炉(广东美的厨房电器制造有限公司);FA2004 万分之一电子天平(上海上平仪器有限公司);HWS-24 恒温水浴锅(上海一恒有限公司)。乙醇、甲醇、冰醋酸、高氯酸等试剂均为分析纯。

菝葜皂苷元对照品(批号:126-19-2)、人参皂苷 Rb₁ 对照品对照品(批号:41753-43-9),购于南京元宝峰医药科技有限公司;薯蓣皂苷元(批号:512-04-9),购于上海源叶生物科技有限公司。黄精样品采自2017年5月湖南岳阳市,经安徽中医药大学王德群教授鉴定为百合科植物多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 的干燥根茎。

2 溶液的配制

2.1 对照品溶液的制备

精密称取菝葜皂苷元对照品 2.0 mg,用甲醇定容至置 10 mL 容量瓶中,配得对照品浓度为 0.2 mg·mL⁻¹;精密称取薯蓣皂苷元对照品 2.5 mg,用甲醇定容至置 10 mL 容量瓶中,配得对照品浓度为 0.25 mg·mL⁻¹;精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品 10.0 mg,用甲醇定容至置 10 mL 容量瓶中,配得对照品浓度为 1 mg·mL⁻¹。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取黄精粉末 1 g(过四号筛),置 100 mL 锥形瓶中,加入 50% 乙醇 16 mL,振摇均匀后放入微波炉,设置 390 W 的功率,间歇式微波提取 40 S,平均每 10 S 拿出冷却后再次进行微波提取。抽滤后用 50% 乙醇洗涤 3 次,合并滤液与洗涤液,用 50% 乙醇定容在 25 mL 容量瓶中,作为供试品溶液。

3 方法

3.1 波长的选择

分别精密吸取薯蓣皂苷元对照品溶液和人参皂

苷 Rb₁ 对照品溶液各 250 μL,菝葜皂苷元对照品溶液 500 μL 和供试品溶液 250 μL 置于具塞试管内,在 60 ℃ 水浴条件下挥干,加入新鲜配制的 5% 香草醛冰醋酸溶液 0.2 mL,在冰浴条件下加入 0.8 mL 高氯酸,摇匀后在 60 ℃ 水浴条件显色 20 min,冷却 2 min 后加入 5 mL 冰醋酸,摇匀后静置,在 200 ~ 800 nm 条件下进行全波长扫描。空白对照为甲醇,同条件下显色。

3.2 标准曲线的配制

分别精密吸取菝葜皂苷元标准品 0.1、0.2、0.3、0.35、0.4 mL 置具塞试管中,在 60 ℃ 水浴条件下挥干,按 3.1 项下的显色方法进行显色。在 460 nm 下测量吸光度。以进样质量为横坐标,以吸光度为纵坐标建立标准曲线。空白对照为甲醇。

3.3 微波提取黄精总皂苷的单因素实验

通过前期查阅文献以及预实验,最终确定考察乙醇浓度,提取时间,料液比,微波功率四个因素,按上述条件进行样品制备。1)固定提取时间为 40 s,微波功率为 390 W,料液比为 1:16,设置乙醇浓度分别为 30%、40%、50%、60%、70% 五个水平;2)固定乙醇浓度为 50%,料液比为 1:16,微波功率为 390 W,设置提取时间为 20、30、40、50、60 s 五个水平;3)固定乙醇浓度为 50%,提取时间为 40 s,波功率为 390 W,设置料液比为 1:8,1:12,1:16,1:20,1:24 五个水平;4)固定乙醇浓度为 50%,提取时间为 40 s,料液比为 1:16,设置微波功率为 90、240、390、550、700 W 五个水平。

3.4 响应面法优化黄精总皂苷的提取方法

在单因素实验基础上,选择乙醇浓度,提取时间,料液比三个因素为自变量,黄精总皂苷得率为因变量,用响应面法设计三因素三水平的中心组合实验,以优化黄精总皂苷的提取方法。因素水平表见表 1。

表 1 Box-Benhken 实验设计因素与水平表

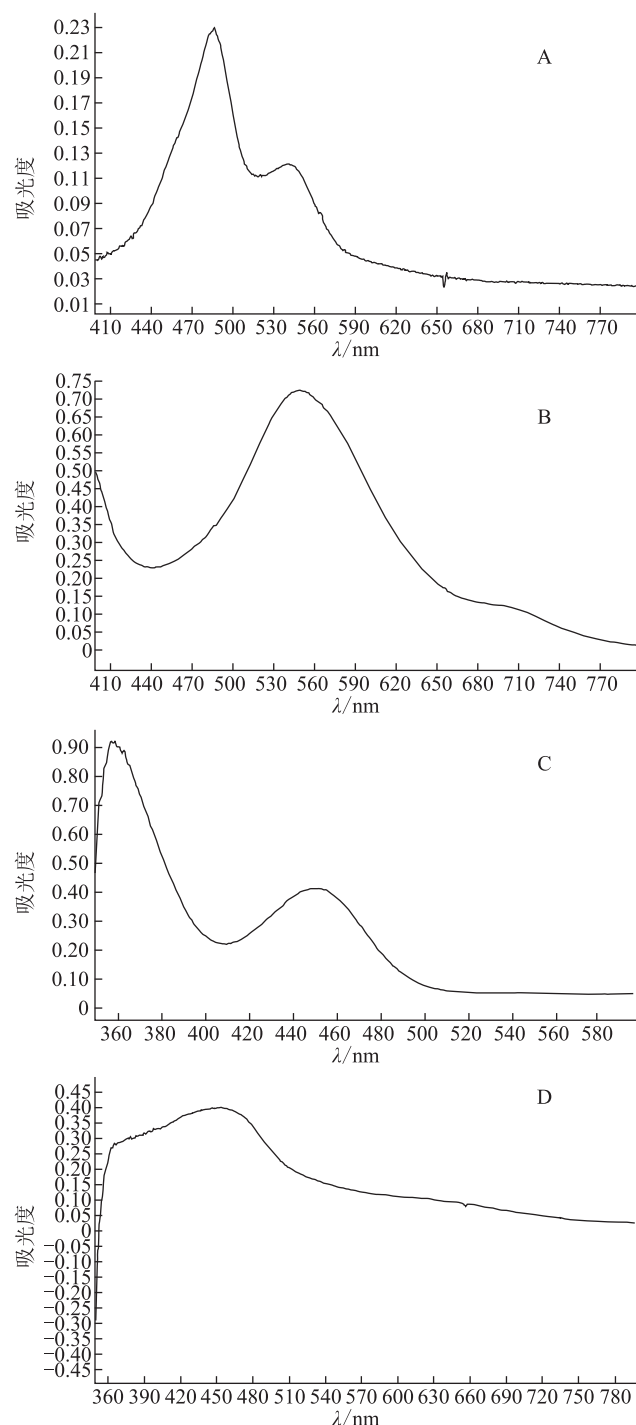
水平	因素		
	A 乙醇浓度(%)	B 料液比/g·mL ⁻¹	C 提取时间/s
-1	30	8	20
0	50	16	40
1	70	24	60

4 结果与分析

4.1 黄精皂苷提取方法的确立

4.1.1 波长的选择 经全波长扫描得出菝葜皂苷元

最大吸收波长为 460 nm, 薯蓣皂苷元为 540 nm, 人参皂苷 Rb_1 为 550 nm, 黄精皂苷样品为 460 nm 左右, 结果显示, 菝葜皂苷元与样品的最大吸收波长一致, 因此选用菝葜皂苷元作为对照品。结果如图 1 所示。



注: A. 薯蓣皂苷元; B. 人参皂苷 Rb_1 ; C. 菝葜皂苷元; D. 样品。

图 1 对照品及样品补偿扫描图

4.1.2 标准曲线 选用菝葜皂苷元标准品绘制标准曲线, 所得线性回归方程为 $Y=1.7818X-0.0792$, 相关系数 $r=0.999$, 表明线性关系良好。

4.2 单因素实验结果与分析

4.2.1 乙醇浓度对黄精皂苷提取率的影响 如图 2 所示, 固定其他条件不变, 黄精总皂苷的得率随乙醇浓度的增大而增大, 当增加到 50% 时, 总皂苷得率达到最大值, 当乙醇浓度超过 50% 时, 总皂苷得率随乙醇浓度的增大而减小。其原因可能是微波提取相对于其他提取法, 在较短时间内达到预定温度, 而乙醇浓度越高溶剂的沸点越低, 达到预定温度的时间越短, 平衡加热的时间也就越长。在大于 50% 的浓度条件下, 总皂苷提取率较高。因此选用 50% 的乙醇浓度作为最佳提取浓度。

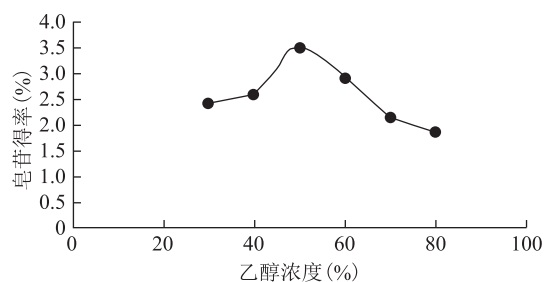


图 2 乙醇浓度对黄精总皂苷得率的影响

4.2.2 提取时间对黄精总皂苷提取率的影响 如图 3 所示, 固定其他条件不变, 在 20 ~ 40 s 的微波时间内黄精总皂苷的得率逐渐增大, 在超过 40 s 的提取时间内黄精总皂苷的得率逐渐减小。原因可能是微波加热的时间过长, 导致黄精总皂苷的结构成分改变, 得率因此降低。所以选用 40 s 作为最佳提取时间。

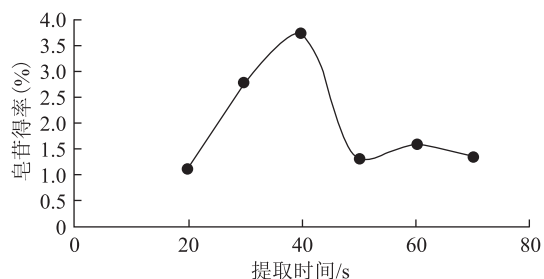


图 3 提取时间对黄精总皂苷得率的影响

4.2.3 料液比对黄精总皂苷提取率的影响 如图 4 所示, 固定其他条件不变, 料液比在 1:8 ~ 1:24 范围内, 在 1:16 时黄精总皂苷得率达到最大值。原因可能是当料液比较低时黄精总皂苷的溶液达到饱和,

提取率不完全所致；当料液比增大时，结果表明皂苷得率波动不大，对提取率的影响不大，反而增加了浓缩时间。因此选用料液比为 1:16 时较为合适。

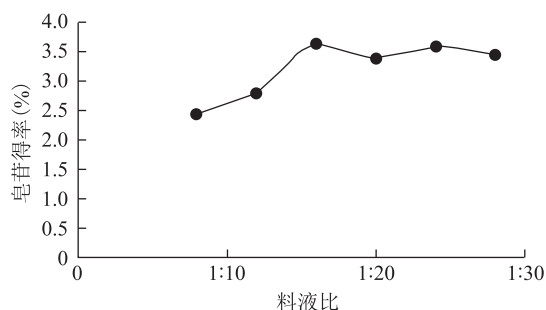


图4 料液比对黄精总皂苷得率的影响

4.2.4 微波功率对黄精总皂苷提取率的影响 如图5所示，固定其他条件不变，设置微波功率范围为 90~700 W，当功率在 390 W 时，黄精总皂苷得率达到最大值，其他功率皂苷得率都有降低。分析原因可能是随着微波功率的增大，电磁波发射出的频率越大，物质内部产生的热能越大，皂苷溶质逐渐溶出。提取率逐渐增大；而功率过高，有效成分破坏，提取率逐渐减小。综合考虑，选用 390 W 作为最佳提取功率。

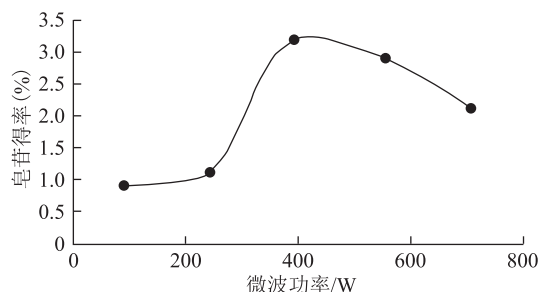


图5 微波功率对黄精总皂苷得率的影响

4.3 响应面法实验结果与分析

根据单因素结果，选取乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)三个因素进行 Box-Behnken 响应面优化，其中 1~12 组实验为析因设计，13~17 组实验为中心设计；零点实验共设计五组，用以估算实验误差。响应面设计以 A、B、C 为自变量，以总皂苷得率(Y)为因变量，设计方案如表2所示。

对表2中的数据进行回归分析，得出回归方程为 $Y = 3.72 - 0.2A - 0.074B - 0.067C - 2.5AB - 0.03AC + 0.01BC - 0.91A^2 - 0.62B^2 - 0.77C^2$ 并作出响应面图和等值线图。对该模型进行响应面分析，

得出二次响应回归模型的方差分析，分析结果如表3所示。

表2 微波提取黄精总皂苷的响应面分析方案与结果

编号	A 乙醇浓度 (%)	B 料液比 /g·mL ⁻¹	C 提取时间 /s	Y 总皂苷含量 (%)
1	-1	-1	0	2.18
2	1	-1	0	2.32
3	-1	1	0	2.25
4	1	1	0	3.72
5	-1	0	-1	2.06
6	1	0	-1	1.95
7	-1	0	1	2.22
8	1	0	1	3.78
9	0	-1	-1	2.31
10	0	1	-1	3.71
11	0	-1	1	2.46
12	0	1	1	2.34
13	0	0	0	3.74
14	0	0	0	2.51
15	0	0	0	1.86
16	0	0	0	1.76
17	0	0	0	3.65

表3 模型各项的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值	显著性
模型	8.920	9	0.99	386.63	<0.0001	极显著
A	0.331	1	0.33	128.62	<0.0001	
B	0.044	1	0.04	16.85	0.0045	
C	0.036	1	0.04	14.12	0.0071	
AB	2.500×10^{-5}	1	2.51×10^{-5}	9.68×10^{-3}	0.9244	
AC	3.600×10^{-3}	1	3.60×10^{-3}	1.39	0.2763	
BC	4.100×10^{-4}	1	4.11×10^{-4}	0.15	0.7056	
A ²	3.520	1	3.52	1361.48	<0.0001	
B ²	1.611	1	1.61	624.29	<0.0001	
C ²	2.510	1	2.50	969.94	<0.0001	
残差	0.018	7	2.58×10^{-3}			
失拟项	9.075×10^{-3}	3	3.03×10^{-3}	1.34	0.3785	不显著
纯误差	9.000×10^{-3}	4	2.25×10^{-3}			
总离差	8.930	16				

由方差分析结果可见，该模型的显著性检验中 $F = 383.63$ ， $P < 0.01$ 表明该模型具有统计学意义；

而在失拟项中 $F = 383.63$, $P > 0.05$ 表明失拟项无统计学意义。且该模型的校正决定性系数 $R_{Adj}^2 = 0.9954$, 表明该实验模型对本实验的拟合度较好, 能够较好的反映提取时间、乙醇浓度、料液比三个因素对黄精总皂苷得率的影响。另外, 分析结果中, 回归方程的一次项 A、B、C 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 的 P 值均小于 0.05 或 0.01, 说明各个因素对结果的影响不是简单的线性关系。由 F 值可知 $A > B > C$, 表明各单因素对实验结果的影响顺序为: 乙醇浓度 > 料液比 > 提取时间^[6-8]。

采用 Design-Expert 8.0 软件对结果进行响应面分析, 结果如图 6~8。

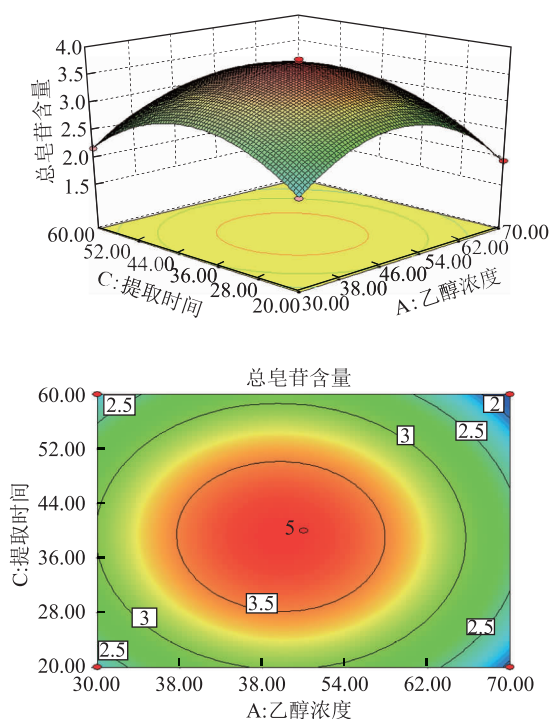


图6 乙醇浓度与提取时间的响应面与等值线

图 6~8 表示当 A、B、C 中任意一个因素变为 0 时, 其他两个因素对提取率的影响以及交互作用。由图 6 可知, 固定料液比不变时, 黄精总皂苷得率随乙醇浓度和提取时间的增大而增大, 当乙醇浓度范围在 38%~58%, 提取时间范围在 28~50 s 时, 总皂苷含量最大, 超过此范围含量降低; 由图 7 可知, 固定提取时间不变时, 黄精总皂苷得率随乙醇浓度和料液比的增大而增大, 当乙醇浓度范围在 38%~58%, 料液比范围在 1:11~1:21 时, 总皂苷含量最大, 超过此范围含量降低; 由图 8 可知, 固定乙醇浓度不变时, 黄精总皂苷得率随料液比和提取时间的增大而增大, 当料液比范围在 1:13~1:19

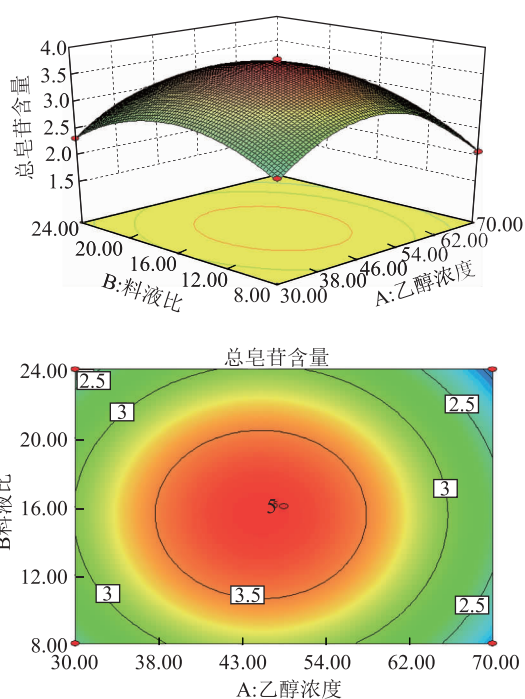


图7 乙醇浓度与料液比的响应面与等值线

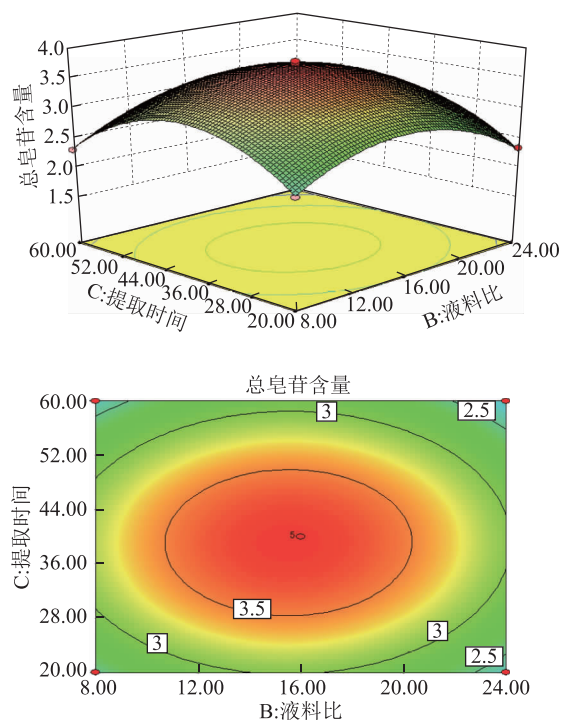


图8 料液比与提取时间的响应面与等值线

时, 提取时间范围在 29~49 s, 总皂苷含量最大, 超过此范围含量降低^[9-10]。

经 Design-Expert 8.0 软件分析, 黄精总皂苷最佳提取工艺条件为: 乙醇浓度为 50%, 料液比为 1:16, 提取时间为 40 s。预测值为 3.72%。

4.4 验证实验

基于上述分析结果得出的最佳提取工艺,进行微波提取黄精总皂苷,平行三次实验。三次实验所得结果的平均值为3.70%,与模拟预测值接近。说明该模型优选出的最佳提取工艺真实可靠,具有实际意义。

5 讨论

本实验以紫外分光光度法为检测手段,考察了微波提取黄精总皂苷的最佳工艺,以香草醛-冰醋酸法进行显色。将薯蓣皂苷元、菝葜皂苷元、人参皂苷Rb₁三种标准品与黄精样品的最大吸收波长进行对比,确定以菝葜皂苷元作为对照品;根据单因素实验结果,确定乙醇浓度、提取时间、料液比三个因素进行三水平三因素的响应面优化,最后用Design-Expert 8.0软件对结果进行分析。优选出最佳提取工艺为乙醇浓度为50%,料液比为1:16,提取时间为40 s。方差分析结果表明:该模型对本实验的拟合度较好,可以较为准确的预测结果,具有实际意义。

致谢: 本次实验所用黄精药材由王德群教授的学生彭星于2017年5月采自湖南岳阳市,特此感谢。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北

京:中国医药科技出版社,2015:306.

- [2] 胡轶娟,竺佳佳. 浙江多花黄精及长梗黄精的鉴定研究[J]. 浙江中医杂志,2011,46(8):612-613.
- [3] Liu J,Zhang H, Ji B, et al. A diet formula of Puerariae radix, Lycium barbarum, Crataegus pinnatifida, and Polygonati rhizoma alleviates insulin resistance and hepatic steatosis in CD-1 mice and HepG2 cells. [J]. Food & Function, 2014, 5(5):1038.
- [4] 李丽,李玲,丘贤,等. 微波辅助黄精总黄酮提取工艺研究[J]. 保山学院学报,2014,33(5):39-42.
- [5] 刘梦迪,梁德勤,金传山,等. Box-Benken 响应面法优化超声提取天冬中皂苷的工艺[J]. 安徽中医药大学学报, 2016,35(5):89-93.
- [6] 郭丹丹,成乐琴,李玲,等. 响应曲面法优化微波辅助提取人参须根粉中人参皂苷 Rg5 的工艺研究[J]. 食品工业科技,2017,38(11):229-234.
- [7] 王威,孙晓丽. 响应面法优化剪刀股中总皂苷的提取工艺[J]. 中国现代中药,2017,19(7):1021-1025.
- [8] 黄玉兰,殷奎德,岳才军,等. 响应面法优化微波提取绞股蓝愈伤组织中人参皂苷 Rb1 的工艺研究[J]. 激光生物学报,2013,22(6):521-527.
- [9] 李露,吴文锦,黄凤洪,等. 响应面法优化微波提取竹节参总皂苷的工艺条件[J]. 食品科技,2010,35(6):222-226.
- [10] 于爽,高剑,郝婧玮,等. 微波辅助提取白头翁皂苷研究[J]. 湖北农业科学,2016,55(20):5348-5351.

(收稿日期 2018-03-10)