

· 中药工业 ·

正交试验、响应面法优化加味三根汤的提取工艺比较[△]李华妮¹, 郑连营², 葛文静¹, 王艳艳¹, 刘长河^{1*}

1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004;

2. 河南省儿童医院/郑州大学附属儿童医院/郑州儿童医院, 河南 郑州 450003

[摘要] 目的: 优选加味三根汤水提工艺。方法: 以提取总皂苷的含量为指标, 采用正交设计法和响应面法对提取次数、提取时间和液料比等条件进行优化, 确定最优提取工艺。结果: 正交设计法分析的最佳提取工艺为液料比 10:1, 提取 2 次, 每次 1.5 h, 总皂苷的质量分数为 $2.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$; 响应面法分析的最优工艺为液料比 8:1, 提取 2 次, 每次 2 h。总皂苷的质量分数为 $3.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 两种方法生产耗能基本相同, 但响应面法提取的总皂苷含量比正交试验法提高了 10.7%, 更适合加味三根汤提取工艺。

[关键词] 加味三根汤; 正交试验; 响应面法; 总皂苷

[中图分类号] R284.2; R944 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)08-1089-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190107004

Comparison of Extraction Process of Jiawei Sangen Decoction Optimized by Orthogonal Experiment and Response Surface Methodology

LI Hua-ni¹, ZHENG Lian-ying², GE Wen-jing¹, WANG Yan-yan¹, LIU Chang-he^{1*}

1. Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Zhengzhou 450004, China;

2. Henan Children's Hospital, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University,
Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450003, China

[Abstract] **Objective:** To optimize water extraction process for the preparation of Jiaweisangen Decoction. **Methods:** The total saponin was selected as an indicator, the factors including extraction times, extraction time and the liquid to material ratio were investigated by means of orthogonal experiment and response surface methodology, respectively. **Results:** The extraction conditions optimized with orthogonal experiment for total saponin was extraction times of two, extraction time of 1.5 h, liquid to material ratio of 10:1 and the total saponin content was $2.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. The optimized process from response surface methodology was extraction times of two, extraction time of 2 h, liquid to material ratio of 8:1 and the total saponin content was $3.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** The two methods consume the same amount of energy, but the total saponin content extracted by the response surface methodology has increased by 10.7% compared with orthogonal experiment, is more suitable for the extraction process of Jiaweisangen decoction.

[Keywords] Jiawei Sangen decoction; orthogonal experiment; response surface methodology; total saponin

加味三根汤由西洋参、蒲公英、鲜白茅根和鲜芦根药食两用中药组成, 民间常用于预防感冒、小儿春季流行病。经过有关部门检测, 其水提取物具有提高机体免疫力作用。方中主药西洋参具有抗氧化、抗肿瘤、调节血糖、提高免疫力、保护心血管系统等功效^[14]。西洋参的主要活性成分为总皂苷,

其中人参皂苷 Re、Rb₁、Rg₁ 的含量较高^[5]。白茅根主要含有黄酮类、糖类、有机酸类、三萜类等化合物, 具有凉血止血、调节免疫、抗氧化、抗肿瘤等作用^[6]。芦根为禾本科植物芦苇的根茎, 也是一种常见的中药, 其含量较大的是多糖类成分, 还含有酚酸类、甾体类、黄酮类和蒽醌类等成分, 具有抗

[△] [基金项目] 河南科技攻关项目(2017ZY0506)

* [通信作者] 刘长河, 副研究员, 研究方向: 中药、天然药物的提取分离和中药新药研发; Tel: (0371)66331558, E-mail: liuchhn371@163.com

氧化和保肝的作用^[7-8]。蒲公英中主要成分有黄酮类、酚酸类、萜类及倍半萜类化合物,具有抗炎、抗肿瘤和抑菌等作用^[9-10]。目前,关于加味三根汤的提取工艺研究还未见报道。

为了更好地开发该汤剂,得到安全、有效的保健食品,本实验以总皂苷提取量为评价指标,采用正交试验和响应面法优选加味三根汤的提取工艺,并将两种方法进行比较,确定适宜的提取方法,为加味三根汤的生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

紫外吸光光度计(岛津,日本);XAD205DU 电子分析天平(德国 METTLE TOLEDO 公司)。

1.2 材料

人参皂苷 Re(中国食品药品检定研究院,批号:110754-200822);其余试剂均为分析纯。

西洋参、蒲公英、鲜白茅根、鲜芦根等药材购于平顶山市仲华堂中药饮片有限公司,由河南省中医药研究院张留记研究员鉴定分别为五加科人参属多年生草本植物的干燥根、菊科植物蒲公英的干燥全草、禾本科植物白茅的新鲜根茎和禾本科植物芦苇的新鲜根茎。

2 方法

2.1 总皂苷测定方法的建立

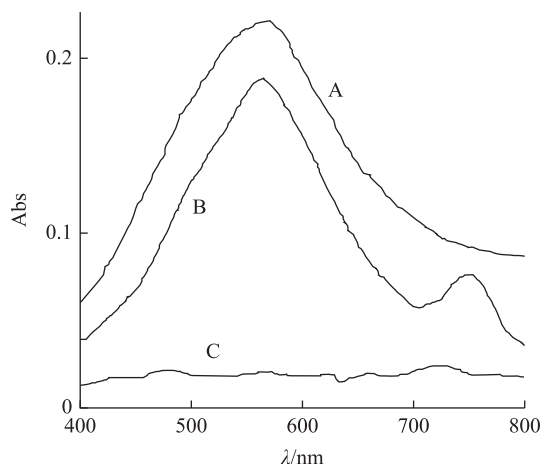
2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Re 对照品 8.1 mg,置 5 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 加味三根汤提取液的制备 按处方量(西洋参 9.0 g、鲜白茅根 50 g、鲜芦根 50 g、蒲公英 17.5 g)称取药材,用适量的水煎煮一定的时间,煎煮两次后将提取液合并,浓缩至约 1000 mL,转移至 1000 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,静置,作为储备液。

对照试验:按处方量(鲜白茅根 50 g、鲜芦根 50 g、蒲公英 17.5 g)称取药材,去掉西洋参,用适量的水煎煮一定的时间,煎煮两次后将提取液合并,浓缩至约 1000 mL,转移至 1000 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,静置,作为储备液。

2.1.3 测定方法 按照保健食品中总皂苷的含量测定方法(《保健食品检验与评价技术规范(2003年版)》)进行测定^[11]。用 10 mL 注射器作层析管,内

装 3 cmAmberlite-XAD-2 大孔树脂,上加 1 cm 中性氧化铝。先后用 25 mL 70% 乙醇和 25 mL 水洗柱,弃去洗脱液,精确加入 1.0 mL 已处理好的储备液,用 25 mL 水洗柱,弃去洗脱液,然后用 25 mL 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液于蒸发皿中,低温挥干,加入 0.2 mL 5% 香草醛冰乙酸溶液、0.8 mL 高氯酸,于 60 ℃ 水浴上加热 10 min,取出,冰浴冷却后,准确加入冰乙酸 5.0 mL,混匀后,在 400 ~ 800 nm 波长进行扫描,根据扫描图谱(见图 1),最终选取在 560 nm 波长处测定吸光度。



注: A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液。

图 1 对照品及样品波长扫描图

2.1.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取上述人参皂苷 Re 对照品溶液 10、20、40、60、80、100 μL 至蒸发皿中,低温挥干,用水 1 mL 使溶解。按 2.1.3 项下方法测定吸光度。标准曲线以人参皂苷 Re 浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标进行线性回归,标准曲线为 $Y=0.020\ 9X+0.017\ 1$, $r=0.995\ 4$,表明人参皂苷在 2.7 ~ 27.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。

2.1.5 方法学考察 专属性实验表明,阴性对照对总皂苷的测定无干扰,该测定方法精密度良好(RSD 为 1.21%),重复性较好(RSD 为 1.58%),平均加样回收率为 98.10%,RSD 为 1.01%,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好(RSD 为 1.07%),精密吸取加味三根汤提取液 1 mL,低温挥干,残渣加水 1 mL 使溶解,按照 2.1.3 项下的方法进行测定。由外标一点法计算样品中的总皂苷浓度,再按公式计算总皂苷含量。

$$\text{总皂苷含量}(\%) = \frac{(\text{总皂苷浓度} \times \text{稀释倍数} \times \text{溶液体积})}{\text{样品质量}} \times 100 \quad (1)$$

2.1.6 正交试验设计 根据预实验结果,以提取次数(A)、提取时间(B)、液料比(C)为考察因素,选

用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 因素水平见表 1。正交试验采用电热套加热烧瓶内回流提取, 煎煮过程水分不损失, 与生产过程相似。

表 1 正交试验因素与水平

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 液料比/g·mL ⁻¹
1	3	0.5	6:1
2	2	1.5	8:1
3	1	2.5	10:1

2.1.7 响应面试验设计 利用 Box-Behnken 响应面法的设计原理, 以提取次数、提取时间、液料比为自变量, 确定响应面试验各参数, 见表 2。

表 2 响应面试验因素与水平

水平	因素		
	A 提取次数/次	B 提取时间/h	C 液料比/g·mL ⁻¹
-1	1	1	6:1
0	2	1.5	8:1
1	3	2	10:1

2.1.8 数据统计与分析 采用 SPSS 软件对正交试验数据进行统计分析; 采用 Design expert 8.0.6 软件对响应面试验数据进行分析。

3 结果与分析

3.1 正交试验的结果与分析

正交试验采用电热套加热烧瓶内回流提取, 煎煮过程水分不损失, 与生产过程相似。以总皂苷的含量为指标, 进行分析, 结果及方差分析见表 3~4。

表 3 正交试验结果

试验号	A	B	C	空白	总皂苷质量分数/mg·g ⁻¹
1	1	1	1	1	2.61
2	1	2	2	2	2.83
3	1	3	3	3	2.88
4	2	1	2	3	2.71
5	2	2	3	1	3.00
6	2	3	1	2	2.64
7	3	1	3	2	2.39
8	3	2	1	3	2.10
9	3	3	2	1	2.06
K ₁	2.77	2.57	2.45	2.56	
K ₂	2.78	2.64	2.53	2.62	
K ₃	2.18	2.53	2.76	2.56	
R	0.60	0.11	0.31	0.06	

表 4 方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.708	2	101.143	*
B	0.021	2	3.000	
C	0.151	2	21.571	
误差	0.000	2		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$, * 差异有统计学意义; $F_{0.01}(2, 2) = 99$, ** 差异有统计学意义。

表 3 中的 K_1 、 K_2 、 K_3 分别表示每个因素的 3 次试验所得的总皂苷含量的平均值, R 表示平均数的极差。由表 3 极差 R 可得到各因素对总皂苷含量的影响顺序为提取次数>液料比>提取时间。由表 4 方差分析结果可知, 提取次数对总皂苷含量的影响较显著, 提取时间和液料比对总皂苷含量的影响则不显著。直观根据 3 个因素的 K_1 、 K_2 、 K_3 , 确定最佳提取工艺为 $A_2B_2C_3$, 即水提取正交试验最佳提取工艺为: 液料比 10:1, 提取 2 次, 每次 1.5 h。根据最佳提取条件进行验证实验, 所得总皂苷质量分数的平均值为 $2.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($\text{RSD} = 2.1\%$), 总皂苷含量数据稳定, 提示工艺稳定可靠。

3.2 响应面试验结果与分析

3.2.1 响应面试验结果 在正交试验的基础上, 利用 Box-Behnken 响应面法的设计原理, 以提取次数、提取时间、液料比为自变量, 以总皂苷的含量为响应值设计 3 因素 3 水平 (17 个试验点) 的响应面分析试验, 这 17 个试验点分为 12 个析因点 (表中编号 1~3、5~7、9~10、14~17) 和 5 个中心点 (表中编号 4、8、11~13), 试验的方案及结果见表 5。

表 5 Box-Behnken 设计与结果

试验号	A/次	B/h	C/g·mL ⁻¹	总皂苷质量分数/mg·g ⁻¹
1	0	-1	1	3.10
2	-1	-1	0	2.74
3	-1	0	1	2.80
4	0	0	0	3.02
5	0	1	1	3.17
6	-1	0	-1	2.50
7	1	0	1	3.02
8	0	0	0	3.21
9	-1	1	0	2.76
10	1	0	-1	3.02
11	0	0	0	3.32
12	0	0	0	3.21
13	0	0	0	3.26
14	0	-1	-1	3.13
15	1	1	0	3.24
16	1	-1	0	3.11
17	0	1	-1	3.08

表6 方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.72	9	0.080	9.09	0.004 1
A	0.32	1	0.32	36.06	0.000 5
B	3.612×10^{-3}	1	3.612×10^{-3}	0.41	0.541 3
C	0.016	1	0.016	1.85	0.216 1
AB	3.025×10^{-3}	1	3.025×10^{-3}	0.35	0.575 3
AC	0.022	1	0.022	2.57	0.153 1
BC	3.600×10^{-3}	1	3.600×10^{-3}	0.41	0.542 0
A ²	0.29	1	0.29	33.30	0.000 7
B ²	1.992×10^{-3}	1	1.992×10^{-3}	0.23	0.648 1
C ²	0.056	1	0.056	5.57	0.050 4
残差	0.061	7	8.764×10^{-3}		
失拟修正	0.011	3	3.608×10^{-3}	0.29	0.834 3
误差	0.051	4	0.013		
总误差	0.78	16			

3.2.2 模型的建立和显著性分析 采用 Design-Expert

8.0.6.1 响应面分析软件对表5中的17组试验数据进行分析,得到的二元回归方程: $Y = 3.204 + 0.19875A - 0.02125B + 0.045C + 0.0275AB - 0.075AC + 0.03BC - 0.26325A^2 + 0.02175B^2 - 0.10575C^2$ 。由表6方差分析结果可知,模型差异有统计学意义($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),以上数据充分说明了该模型的拟合度较好,可以用该模型表示响应值(总皂苷的含量)与自变量(提取次数、提取时间、液料比)间的多元回归关系。在各个作用因素中,一次项提取次数差异有统计学意义($P < 0.01$),提取时间、液料比差异无统计学意义,并且3个影响因素的交互作用不显著,并由表6中的F值可知,各因素对总皂苷含量的影响顺序为提取次数 > 液料比 > 提取时间,所得的结论与正交试验是相符的。二次项中,只有A²(提取次数和提取次数交互作用)差异具有统计学意义,其余均没有统计学意义。

3.2.3 响应面的交互作用分析 在提取次数、提取时间、液料比3个因素中任意取两个分别作为X和Y,以总皂苷的含量作为Z,采用 Design-Expert 8.0.6.1 响应面分析软件作出相应的三维图。通过响应面和等高线可以直观的分析因素的交互作用对总皂苷含量的影响。在响应面图中,曲面表现越陡峭,则该因素对总皂苷含量的影响越大^[12-14];由图2可知,提取次数和液料比对总皂苷含量的影响较大,表现为随着提取次数和液料比的增加或减少,

总皂苷含量变化较大。提取时间对总皂苷含量的影响较小,表现为随着提取时间的增加或减少,总皂苷含量变化较小。提取次数和提取时间(图2A)、提取时间和液料比(图2C)的响应曲面表现的较为平滑,说明这些因素的交互作用不明显;提取次数和液料比的响应面(图2B)表现的比较陡峭,并且其等高线图也最接近椭圆形,说明这两个因素间的交互作用较强。由此可见,提取次数和液料比对总皂苷含量的影响较大,提取时间对总皂苷含量的影响较小,但是提取时间对总皂苷含量也有一定的协同作用。

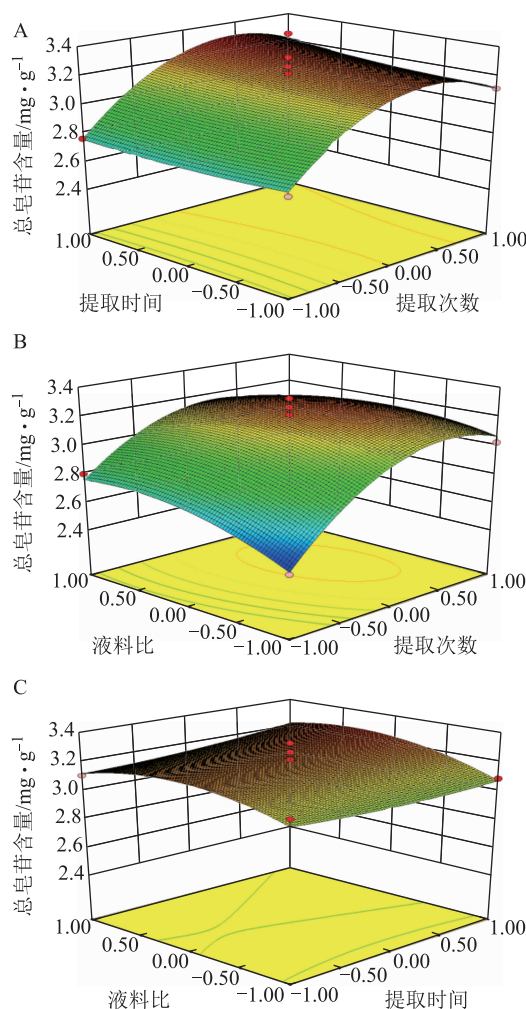


图2 两因素交互作用对总皂苷含量的响应面图

3.3 最佳条件的确定及验证

通过 Design-Expert 8.0.6.1 响应面分析软件求解回归方程,得到加味三根汤的最佳提取条件是:液料比8.42:1,提取2.4次,每次2h,在此提取条件下所得的理论总皂苷质量分数为 $3.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,为方便实验操作,将上述提取条件修正为液料比8:1,提取2次,每次2h进行验证实验,平行3次所得的

总皂苷质量分数的平均值为 $3.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ($\text{RSD} = 1.11\%$), 与理论总皂苷提取值相差 2.7% , 由此可见, 该多元二次方程建立的响应面模型预测总皂苷含量是可行的。

4 讨论

本研究采用的是《保健食品检验与评价技术规范(2003年版)》中总皂苷的含量测定方法, 其精密度、稳定性、重复性、加样回收率试验的 RSD 分别是 1.21% 、 1.07% 、 1.58% 、 2.31% , 以上数据说明仪器的精密度良好, 加味三根汤供试品溶液稳定性较好, 该方法用于总皂苷的测定是可行的。此外, 扣除掉西洋参药材, 其他3种药材同法制备成供试品溶液, 结果表明鲜白茅根、鲜芦根和蒲公英对总皂苷的测定无干扰。

正交试验最佳提取工艺为: 液料比 $10:1$, 提取2次, 每次 1.5 h , 所得总皂苷质量分数的平均值为 $2.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。响应面法得到加味三根汤的最佳提取条件: 液料比 $8:1$, 提取2次, 每次 2 h , 所得的理论总皂苷质量分数为 $3.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 响应面法的液料比(8倍量)小于的正交试验法液料比(10倍量), 其提取时间(4 h)则大于响应面法的加热时间(3 h), 所以两种方法生产耗能基本相同。两种方法得到的结论也是基本一致的: 提取次数对总皂苷含量影响显著, 各因素对总皂苷含量的影响顺序为提取次数 $>$ 液料比 $>$ 提取时间, 但是响应面法提取的总皂苷含量较正交试验法提高了 10.7% , 更适合加味三根汤提取工艺。

在正交试验中, 提取次数对总皂苷含量的影响差异有统计学意义($P < 0.01$), 提取时间、液料比则不显著, 但是在响应面法中还发现提取次数和液料比存在较强的交互作用, 对总皂苷含量的影响较大, 因此这3种因素对总皂苷含量的影响不是简单的线性关系。因此, 两种方法相比较, 响应面法能更好地解释多因素与响应值之间的关系, 特别是因素之间存在交互作用的。在当前的药材提取工艺研究中, 正交试验的应用较多^[15-18], 该方法得出的结果直观易分析, 但是它得到的优选值, 只能是试验所用水平的某一种组合, 具有局限性。响应面法是将一系列的实验数据用多项式进行拟合, 得出回归方程, 然后将函数以图形的方式表现出来, 从而能直观地分析出各个因素与响应面之间的关系以及因素之间的交互关系。所以响应面法用于多因素影响的提取工艺分析更为科学、合理。

参考文献

- [1] 赵兰婷, 咎香怡, 高莉萍, 等. 西洋参防护 X 线辐射对小鼠肺的过氧化损伤[J]. 中成药, 2017, 39(12): 2576-2579.
- [2] 陈锐, 陈德经, 张建新, 等. 西洋参多糖肽对糖尿病小鼠降血糖血脂及抗氧化作用研究[J]. 西北农业学报, 2013, 22(11): 195-201.
- [3] 许力军, 段秀梅, 钱东华, 等. 西洋参茎叶皂苷对 CPHD 患者细胞免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(8): 901-903.
- [4] 魏春雁, 李向高, 杜雪荣, 等. 国产西洋参叶总黄酮对心血管作用的药理研究[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 229-230.
- [5] 唐艳, 闫述模, 汪静静, 等. 基于 UPLC 及多成分分析的西洋参质量评价[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1678-1684.
- [6] 刘金荣. 白茅根的化学成分、药理作用及临床应用[J]. 山东中医杂志, 2014, 33(12): 1021-1024.
- [7] 王中华, 郭庆梅, 周凤琴. 芦根化学成分、药理作用及开发利用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(12): 81-83.
- [8] 孙淑玲. 中药芦根的药理作用及临床应用[J]. 中西医结合心血管病杂志, 2016, 4(36): 165.
- [9] 于立恒. 蒲公英药理作用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(7): 617-620.
- [10] 丁惠, 张馨方, 纪文华, 等. 蒲公英药用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(9): 156-159.
- [11] 卫生部法监司. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京: 卫生部法监司, 2003: 97-104.
- [12] 兰卫, 王莹, 胡江兰, 等. 德国洋甘菊中总黄酮提取工艺的响应面法优选[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(5): 1086-1088.
- [13] 盛云杰, 赵天文, 方大宽, 等. 响应面法优化白花蛇舌草中总黄酮的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(6): 1284-1286.
- [14] 李岩, 赵宏, 王宇亮, 等. 响应面法优化白藜多糖的闪式提取工艺[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(1): 246-249.
- [15] 阎思彤, 李胜, 于浩森, 等. 正交试验优选藤三七提取工艺[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(1): 35-36.
- [16] 文喜艳, 邵晶, 王兰霞, 等. 正交设计结合3种比色法优选黄芪多糖提取工艺[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1562-1565.
- [17] 段晓颖, 郭娇, 马秋莹, 等. 灵芝多糖提取及纯化工艺[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(1): 58-60.
- [18] 张玲昂, 王俊杰, 张松亮, 等. 正交实验法优选归生血口服液提取工艺[J]. 实用医药杂志, 2018, 35(9): 813-817.

(收稿日期: 2019-01-07 编辑: 王笑辉)