

Box-Behnken 响应面法优选金樱子抗糖尿病活性部位提取工艺

柴思佳, 齐海艳, 邓翀*
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 优选金樱子抗糖尿病活性部位的提取工艺。方法: 以体外抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性的综合评分为因变量, 乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为自变量, 采用 Design Expert 8.05 软件分析试验数据, 建立多元二次回归方程, 采用 Box-Behnken 响应面法优选金樱子抗糖尿病活性部位的提取工艺。结果: 最佳提取工艺为加 11 倍量 85% 乙醇提取 2 次, 每次 120 min; α -淀粉酶活性平均抑制率 95.39%, RSD 4.59%, DPPH 自由基平均清除率 91.47%, RSD 4.12%, 综合评分 0.967 2, 与预测值 0.977 8 吻合程度良好。结论: 通过生物活性评价优选的提取工艺更科学合理, 符合临床应用。

[关键词] 金樱子; Box-Behnken 试验设计; 响应面法; 综合评分; α -淀粉酶; DPPH 自由基清除率

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0026-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160026

Optimization of Extraction Process for Anti-diabetic Active Parts from *Rosae Laevigatae Fructus* by Box-Behnken Response Surface Methodology

CHAI Si-jia, QI Hai-yan, DENG Chong*
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of anti-diabetic active parts from *Rosae Laevigatae Fructus*. **Method:** With composite score of *in vitro* anti- α -amylase and anti-oxidation activities as dependent variable, ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction time and times as independent variables, test data were analyzed by Design Expert 8.05 software, then multivariate quadratic regression equation was established,

[收稿日期] 20131215(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81374028, 30902002, 81273750); 陕西省中医药管理局项目(13-ZY014); 陕西省重点科技创新团队计划项目(2013KCT-26)

[第一作者] 柴思佳, 在读硕士, 从事防治老年病的中草药开发研究, Tel: 029-38185165, E-mail: csj4181@126.com

[通讯作者] * 邓翀, 博士, 副教授, 从事中药炮制学研究, Tel: 029-38185165, E-mail: fmmudz217@126.com

盐酸小檗碱和芍药苷是加味败藤颗粒的有效成分, 在减压浓缩过程中相对稳定; 含固量虽不能反映有效成分的含量, 但可作为工艺筛选的参考指标。综合考虑各指标反映提取效果的程度, 将盐酸小檗碱与芍药苷的权重系数均设为 0.4, 含固量的权重系数设定 0.2, 将三者进行加权综合评分较单一评价指标更具全面性和合理性。

[参考文献]

- [1] 许亦韬, 项迎春. 红藤合剂口服联合红藤汤灌肠治疗慢性盆腔炎 86 例疗效观察[J]. 海峡药学, 2013, 25(3): 155.
- [2] 徐文峥, 江伟华. 红藤汤中药配方颗粒治疗慢性盆腔

炎的临床观察[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1386.

- [3] 傅红梅. 中药红藤败酱汤灌肠治疗盆腔炎性包块 38 例分析[J]. 江苏医药, 2010, 36(7): 848.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 医疗机构制剂注册管理办法(试行)[Z]. 北京: 中华人民共和国国务院公报, 2006.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 10.
- [6] 吴雪丹, 丁宝月, 傅应华. HPLC 法测定复方苦参洗剂中盐酸小檗碱和黄芩苷[J]. 中成药, 2012, 34(5): 868.

[责任编辑 刘德文]

Box-Behnken response surface methodology was adopted to optimize extraction process of anti-diabetic active parts from *Rosae Laevigatae Fructus*. **Result:** Optimal process parameters were as follows: extracted twice with 11 times the amount of 85% ethanol for 120 min per time; average inhibition rate of α -amylase was 95.39% with RSD of 4.59%, average clearance rate of DPPH was 91.47% with RSD of 4.12%, composite score was 0.967 2, which was fit with its predictive value of 0.977 8. **Conclusion:** Optimization of extraction process was scientific and conformed with clinical practical application by biological activity evaluation.

[**Key words**] *Rosae Laevigatae Fructus*; Box-Behnken experimental design; response surface methodology; composite score; α -amylase; DPPH radical scavenging

金樱子味酸、涩、性平,无毒,主治脾泻下痢、利小便、涩精气,久服令人耐寒轻身、补血益精,具有抗氧化、免疫调节、降糖降脂、保护肾脏等药理作用^[1-4]。 α -淀粉酶是一种糖苷水解酶,可促进人体中淀粉类食物的消化吸收;清除 DPPH 自由基的能力在某种程度上可反映物质抗氧化的总能力^[5]。研究显示人类长期摄入一定量的 α -淀粉酶抑制剂和抗氧化剂可有效降低糖尿病的发病率^[6]。故本实验以体外抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性的综合评分为考察指标,采用 Box-Behnken 响应面法考察乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数对金樱子中抗糖尿病活性部位提取工艺的影响,为该药材抗糖尿病新产品的开发和临床应用提供参考。

1 材料

ELX-808 型自动酶标仪(美国宝特公司),BS110S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),800 型离心机(江苏金坛正基仪器有限公司),CB-150 型二氧化碳培养箱(德国宾得公司)。

金樱子购于西安万寿路药材市场,经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为蔷薇植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥成熟果实; α -淀粉酶(北京奥博星生物技术有限公司,批号 20130305),1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,日本东京化成工业株式会社),可溶性淀粉(天津市天力化学试剂有限公司),3,5'-二硝基水杨酸(DNS,上海科丰化学试剂有限公司),试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 金樱子提取液的制备 称取粉碎的金樱子 5 g,加入一定体积分数的乙醇,按一定料液比于 80 °C 提取一定次数,每次提取一定时间,滤去药渣,合并提取液,浓缩至干,加一定体积分数乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,于 4 °C 冷藏待测。

2.2 溶液的配制

2.2.1 α -淀粉酶溶液 准确称取 α -淀粉酶 12 mg,

用 pH 6.8 的磷酸-磷酸钠缓冲液定容至 100 mL,即得。

2.2.2 DPPH 溶液 精密称取 DPPH 20 mg,加无水乙醇溶解并定容于 250 mL 量瓶中,即得。低温避光保存,每次试验前需用现配制。

2.3 金樱子提取液对 α -淀粉酶的抑制作用 精密量取金樱子提取液 50 μ L 和 α -淀粉酶溶液 5 μ L 置于试管中,37 °C 恒温 10 min,加入可溶性淀粉溶液 100 μ L,于 37 °C 恒温 10 min,加入 DNS 显色剂 200 μ L 于沸水浴中静置 5 min,冰浴终止反应,加水 1.3 mL 稀释,以 6 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,将上清液移入 96 孔板中于 660 nm 处测定吸光度(A),按 $[A_{\text{未加样品组}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}})]/A_{\text{未加样品组}} \times 100\%$ 计算 α -淀粉酶活性抑制率。

2.4 金樱子提取液抗氧化活性考察 精密移取金樱子提取液 20 μ L 置 96 孔板中,加入 DPPH 溶液 80 μ L,加水 50 μ L 稀释,振荡后反应 30 min,于 517 nm 处测定 A。空白组以无水乙醇代替 DPPH,按 $[A_{\text{未加样品组}} - (A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}})]/A_{\text{未加样品组}} \times 100\%$ 计算 DPPH 自由基的清除率。

2.5 方法学考察 线性范围考察以 A 为纵坐标,无水葡萄糖或 DPPH 质量浓度(C)为横坐标,结果显示 α -淀粉酶和 DPPH 自由基标准曲线线性关系良好,回归方程分别为 $A = 0.286\ 4C - 0.018$, $A = 26.315C - 0.015\ 8$,线性范围分别为 0.3 ~ 2.1, 0.007 5 ~ 0.031 $g \cdot L^{-1}$,说明可运用该方法筛选抗糖尿病活性部位。在室温下放置一定质量浓度的 α -淀粉酶溶液和 DPPH 无水乙醇溶液 120 min,每隔 20 min 测定 1 次 A,结果 RSD 分别为 1.95% 和 2.07%,表明二者在 120 min 内稳定性良好。

2.6 提取工艺优选 根据 Box-Behnken 响应面设计原理,选择乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数 4 个因素为自变量,以体外抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性的综合评分(OD)为因变量,采用四因素三水平的响应面分析方法,因素水平见

表 1。根据因变量对提取工艺影响程度给予抗淀粉酶活性和抗氧化活性的权重系数分别为 0.7,0.3, $OD = 0.7M_i/M_{max} + 0.3N_i/N_{max}$, 其中 M_i 为第 i 次试验的 α -淀粉酶活性抑制率, N_i 为第 i 次试验的 DPPH 自由基清除率, M_{max} 为 α -淀粉酶活性抑制率的最大值(98.86%), N_{max} 为 DPPH 自由基清除率的最大值(94.05%), 试验安排及结果见表 2。

表 1 金樱子抗糖尿病活性部位提取工艺
Box-Behnken 响应面试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 液料比	C 提取时间 /min	D 提取数 /次
-1	50	8:1	30	1
0	75	11:1	75	2
1	100	14:1	120	3

利用 Design Expert 8.05 软件对试验数据进行回归分析, 得回归方程 $OD = 0.93 + 1.692 \times 10^{-3}A - 0.038B + 0.071C - 1.651 \times 10^{-3}D - 0.012AB + 0.050AC + 6.543 \times 10^{-3}AD + 0.050BC - 0.022BD - 0.074CD - 0.091A^2 - 0.077B^2 - 0.013C^2 - 0.075D^2$, 为检验方程的有效性, 对该回归模型进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 模型的 $F = 2.5176, P = 0.0476 < 0.05$, 表明该模型显著, 提示试验结果可靠。自变量作用显著的是一次项 C 和二次项 A^2, B^2, D^2 , 说明各自变量对响应值的影响不是简单的线性关系。模型的相关系数 0.846, 说明该模型能较好地反映因变量与各自变量的关系。

2.7 验证试验 通过回归模型的预测, 得金樱子抗糖尿病活性部位的最佳提取工艺为乙醇浓体积分数 83.10%, 料液比 1:10.52, 提取时间 116.53 min, 提取数 1.65 次, 结合实际操作考虑, 各参数调整为乙醇体积分数 85%, 料液比 1:11, 提取时间 120 min, 提取次数 2 次。为检验该工艺的可靠性, 按优选的工艺进行 3 次验证试验, 结果 α -淀粉酶活性平均抑制率 95.39%, RSD 4.59%, DPPH 自由基平均清除率 91.47%, RSD 4.12%, 综合评分 0.9672, 与预测值 0.9778 吻合程度良好。

3 讨论

α -淀粉酶是饮食中消化、吸收碳水化合物的关键酶, DPPH 是人体氧化代谢产生的一种自由基, α -淀粉酶作用和自由基过剩均为导致糖尿病发生的主要原因^[7]。 α -淀粉酶抑制剂使得胰液和唾液中 α -淀粉酶活性得到有效抑制, 减少或延缓了食物中

表 2 金樱子抗糖尿病活性部位提取工艺
Box-Behnken 响应面试验安排

No.	A	B	C	D	综合评分 (OD)
1	0	0	0	0	0.921
2	1	0	0	1	0.714
3	0	1	0	1	0.674
4	-1	0	0	-1	0.839
5	0	0	1	-1	0.929
6	-1	-1	0	0	0.730
7	1	-1	0	0	0.830
8	1	0	0	-1	0.863
9	0	0	0	0	0.923
10	-1	1	0	0	0.759
11	1	0	1	0	0.898
12	0	-1	-1	0	0.891
13	0	1	0	-1	0.696
14	1	1	0	0	0.812
15	0	1	1	0	0.900
16	0	-1	0	-1	0.783
17	-1	0	0	1	0.664
18	0	1	-1	0	0.693
19	0	0	0	0	0.934
20	0	-1	0	1	0.851
21	0	0	-1	1	0.942
22	-1	0	1	0	0.901
23	0	0	0	0	0.935
24	0	0	0	0	0.936
25	0	0	1	1	0.910
26	0	-1	1	0	0.900
27	0	0	-1	-1	0.665
28	1	0	-1	0	0.595
29	-1	0	-1	0	0.800

碳水化合物的分解和消化, 使葡萄糖的产生和吸收减少, 可降低糖尿病患者餐后血糖升高及碳水化合物引起的脂肪增加; 抗氧化剂可降低人体内自由基水平, 使机体代谢过程恢复自由基产生与清除的动态平衡, 减轻自由基对机体的损伤。所以 α -淀粉酶抑制剂和抗氧化剂常被用于防治糖尿病, 通过有效降低糖尿病患者的体内血糖水平, 有效地减少糖尿病的发生率, 故本文选择体外抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性为考察指标。

关于金樱子提取工艺的报道主要采用正交试验

表3 回归方程方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.218 5	14	0.015 6	2.517 6	0.047 6
A	3.44×10^{-5}	1	3.44×10^{-5}	0.005 5	0.941 7
B	0.017 0	1	0.017 0	2.744 8	0.119 8
C	0.060 6	1	0.060 6	9.770 1	0.007 4
D	3.27×10^{-5}	1	3.27×10^{-5}	0.005 3	0.943 1
AB	0.000 5	1	0.000 5	0.087 8	0.771 3
AC	0.010 1	1	0.010 1	1.636 0	0.221 7
AD	0.000 2	1	0.000 2	0.027 6	0.870 4
BC	0.009 8	1	0.009 8	1.581 2	0.229 2
BD	0.002 0	1	0.002 0	0.326 1	0.577 0
CD	0.021 9	1	0.021 9	3.530 7	0.081 2
A ²	0.053 5	1	0.053 5	8.627 0	0.010 8
B ²	0.038 1	1	0.038 1	6.151 2	0.026 5
C ²	0.001 2	1	0.001 2	0.189 0	0.670 4
D ²	0.036 6	1	0.036 6	5.902 7	0.029 2

指标优选^[8-11],而响应面法可通过非线性模型拟合来预测最佳工艺,改善了传统的正交设计等线性模型拟合的缺点,而且响应面法能提供更大的信息量和更精确的试验结果。

中药质量评价包括化学成分和药理效应两层含义^[12],药物质量评价的最终目标是疗效考察,现阶段以中药化学组分为考核指标的中药质量评价体系并未能从根本意义上达到质量控制的最终目的。依据生物活性为评价标准,符合以临床应用评价中药质量的要求。故本文从抗糖尿病活性部位入手,以抗 α -淀粉酶活性和抗氧化活性为评价指标,筛选金樱子抗糖尿病提取工艺参数,针对抗糖尿病药理作

用的活性部位筛选提取工艺,使得筛选的提取工艺更贴近临床应用。

[参考文献]

- [1] 周钰娟,罗玉平,许金华,等.金樱子提取液体外抗氧化作用研究[J].现代生物医学进展,2012,12(36):7057.
- [2] 吴玉兰,曹运长.中药金樱子的化学成分及其药理作用研究进展[J].微量元素与健康研究,2012,29(1):53.
- [3] 周钰娟,罗玉萍,廖前进,等.金樱子对实验性糖尿病大鼠肾脏氧化应激反应的影响[J].中南医学科学杂志,2012,40(5):452.
- [4] 秦振启,周钰娟,张秋菊,等.金樱子对实验性糖尿病大鼠肝脏和血液中脂质的影响[J].云南中医中药杂志,2009,30(1):46.
- [5] 刘迪,尚华,宋晓宇.杜仲叶多酚体内和体外抗氧化活性[J].食品研究与开发,2013,34(9):5.
- [6] 寇秀颖. α -淀粉酶抑制剂制备方法研究进展[J].食品工业科技,2008,29(11):287.
- [7] 许扬,刘春丽,刘彪,等.WX-JT复方降血糖作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):161.
- [8] 陈英文,黄明宏.金樱叶总皂苷的提取纯化工艺研究[J].光明中医,2011,26(2):229.
- [9] 林芳花,彭永宏,蔡烂光,等.金樱子体外抗氧化提取工艺的研究[J].惠州学院学报:自然科学版,2010,30(3):46.
- [10] 陈英文,黄明宏.金樱叶总皂苷的提取纯化工艺研究[J].光明中医,2011,26(2):229.
- [11] 陈英文,陈木水.正交试验法优选金樱叶总黄酮提取工艺[J].中国实用医药,2010,5(30):47.
- [12] 肖小河,金城,赵中振,等.论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J].中国中药杂志,2007,32(14):1377.

[责任编辑 刘德文]