

# Box-Behnken 设计优化庙宇党参中党参炔苷和党参总多糖提取工艺

冯彬彬<sup>1</sup>, 张建海<sup>1\*</sup>, 牛小花<sup>1</sup>, 祝慧凤<sup>2</sup>

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 西南大学, 重庆 400716)

**[摘要]** 目的: 优选庙宇党参中党参炔苷和党参总多糖的提取工艺条件, 为该药材的质量评价提供参考。方法: 在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 试验考察提取温度、超声时间、料液比对庙宇党参中党参炔苷和党参总多糖提取效率的影响。采用 RP-HPLC 测定党参炔苷的含量, 流动相乙腈-水(21:79), 检测波长 268 nm; 紫外分光光度法测定庙宇党参中总多糖的含量, 检测波长 490 nm。结果: 最佳提取工艺条件为提取时间 32 min, 料液比 1:26, 提取温度 52 ℃; 党参炔苷提取量和党参总多糖质量分数分别为  $(78.18 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $(21.02 \pm 0.13)\%$ , 与预测值的偏差较小。结论: Box-Behnken 试验可较好地应用于庙宇党参中党参炔苷和党参总多糖的提取, 优选的提取工艺合理、可靠, 有效成分提取率高。

**[关键词]** 庙宇党参; 总多糖; 党参炔苷; 超声法

**[中图分类号]** R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0018-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240018

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151028.1042.008.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-28 10:42

**Optimization of Extraction Technology of Lobetyolin and Total Polysaccharides from Miaoyu Codonopsis Radix by Box-Behnken Design** FENG Bin-bin<sup>1</sup>, ZHANG Jian-hai<sup>1\*</sup>, NIU Xiao-hua<sup>1</sup>, ZHU Hui-feng<sup>2</sup>  
(1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Southwest University, Chongqing 400716, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted extraction process of lobetyolin and total polysaccharides from Miaoyu Codonopsis Radix. **Method:** On the basis of single factor experiments, with yields of lobetyolin and total polysaccharides as indexes, Box-Behnken experimental design and response surface methodology was adopted to optimize extraction conditions by taking extraction temperature, extraction time and solid-liquid ratio as factors. RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometry was used to determine contents of lobetyolin and total polysaccharides, respectively. **Result:** Optimal extraction technology was as following: extraction temperature of 52 ℃, extraction time of 32 min and solid-liquid ratio of 1:26. Extracting amount of lobetyolin and mass fraction of total polysaccharides from Miaoyu Codonopsis Radix was  $(78.18 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  and  $(21.02 \pm 0.13)\%$ , respectively; which was consistent with these predicted values. **Conclusion:** This optimized extraction process is reasonable and reliable with high yield of effective components.

**[Key words]** Miaoyu Codonopsis Radix; total polysaccharides; lobetyolin; ultrasonic method

庙宇党参又名单枝党, 是重庆巫山县庙宇镇独有的全国“四大名党”之一, 生长在巫山海拔 1 500 m 的深山中, 当地人称之为“庙党”。庙党以皮细肉白、

参气浓烈、肉实皮软、味香醇厚、嚼之化渣而著称, 作用补中和胃、清肺、补气益血、生津化痰, 还具有益智、延缓衰老、改善记忆力等功效。研究证明党参含

**[收稿日期]** 20150501(005)

**[基金项目]** 重庆市教委自然科学基金项目(KJ1402508); 巫山庙宇党参产业链工程项目(104290-41003012); 重庆三峡医药高等专科学校-西南大学校级横向课题(巫山庙宇党参保健品研发)

**[第一作者]** 冯彬彬, 博士, 副教授, 从事中药资源的开发利用研究, Tel:023-58567305, E-mail:fengbin1024@sina.com

**[通讯作者]** \* 张建海, 硕士, 教授, 从事药用植物栽培及有效成分分析研究, Tel:023-58567075, E-mail:zhjh200596@126.com

有丰富的多糖类和黄酮类化合物,其中党参总多糖具有预防老年痴呆症、调节免疫功能、促进造血功能的药理作用,党参炔苷对乙醇造成的胃黏膜损伤有很好的保护作用<sup>[14]</sup>。目前,庙宇党参已成功注册为地理标志商标,但其相关研究很少<sup>[5]</sup>。为优化庙宇党参的提取工艺,更有效地控制其内在质量,本实验采用超声辅助法提取庙宇党参中有效成分党参炔苷和党参总多糖,通过 Box-Behnken 试验优选提取工艺参数,为庙宇党参的质量评价提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),U-3010 型紫外分光光度计(日本日立公司),Sorvall Legend Micro 17 型离心机(美国 Thermo 公司),BSA224S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],Aquelix5 型纯水系统(美国 Millipore 公司)。庙宇党参产于重庆市巫山县庙宇镇,购自重庆市神女药业股份有限公司,经重庆三峡医药高等专科学校张建海教授鉴定为桔梗科植物川党参 *Codonopsis tangshen* 的根;党参炔苷、无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111732-201206,110833-201205),乙腈、甲醇为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 党参总多糖的含量测定<sup>[6-8]</sup>

**2.1.1 对照品溶液配制** 精密称取烘干至恒重的无水葡萄糖对照品 100 mg,移至 100 mL 量瓶中,加水定容,制成  $1.002 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液。

**2.1.2 标准曲线绘制** 分别吸取葡萄糖对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别加水补至 1.0 mL, 各加入 5% 苯酚 1.0 mL 和浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 以 1.0 mL 水为参比, 室温放置 25 min 后在 490 nm 处测定吸光度  $A$ , 以  $A$  为纵坐标, 葡萄糖质量浓度为横坐标, 得回归方程  $Y = 0.149X - 0.078$  ( $R^2 = 0.9995$ ), 线性范围 14.31 ~ 143.14  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.1.3 样品测定** 取干燥至恒重的党参总多糖提取物 0.1 g, 精密称定, 加水溶解于 100 mL 量瓶中, 量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 各取 1 mL 至具塞试管中, 按 2.1.2 项下操作, 测定样品的  $A$ , 根据标准曲线求算庙宇党参总多糖的含量。

### 2.2 党参炔苷的含量测定<sup>[9-11]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-水(21:79), 流速 1.0

$\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度 25  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长 268 nm, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 标准曲线的建立** 精密称取党参炔苷对照品 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得储备液。将该储备液配成质量浓度依次为 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件分析, 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得回归方程  $Y = 53.67X + 649.68$  ( $R^2 = 0.9991$ ), 线性范围 5.0 ~ 160.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.3 样品测定** 将庙宇党参药材清洗、阴干、粉碎、过筛(孔径 0.355 mm, 下同), 在 60  $^{\circ}\text{C}$  干燥。精密称取恒重后的庙宇党参药材粉末 10.0 g, 按设计的试验条件进行提取, 提取液过滤, 滤液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 按 2.2.1 项下色谱条件测定。

### 2.3 单因素试验分析

**2.3.1 提取温度** 精密称取庙宇党参药材粉末 10.0 g, 固定提取时间 20 min, 料液比 1:20, 分别于 30, 40, 50, 60, 70, 80  $^{\circ}\text{C}$  进行超声提取, 结果党参炔苷提取量分别为 44.26, 53.43, 75.85, 76.53, 75.47, 74.51  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 党参总多糖成分质量分数分别为 7.63%, 13.35%, 19.28%, 18.58%, 12.35%, 13.77%, 综合考虑, 选择提取温度 50  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.3.2 提取时间** 精密称取庙宇党参药材粉末 10.0 g, 固定提取温度 50  $^{\circ}\text{C}$ , 料液比 1:20, 分别超声提取 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min, 结果党参炔苷提取量分别为 29.27, 38.43, 60.78, 73.85, 72.46, 69.71, 68.07  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 党参总多糖质量分数分别为 7.36%, 11.53%, 15.81%, 17.68%, 20.25%, 23.17%, 19.46%, 故选择超声时间 30 min。

**2.3.3 料液比** 精密称取庙宇党参药材粉末 10.0 g, 固定超声提取时间 30 min, 提取温度 50  $^{\circ}\text{C}$ , 料液比分别为 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 结果党参炔苷提取量分别为 14.76, 25.31, 46.86, 67.92, 71.06, 71.27, 71.35  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , 党参总多糖质量分数分别为 6.85%, 12.21%, 16.36%, 20.31%, 19.43%, 18.35%, 18.21%, 故选择料液比 1:25。

**2.4 提取工艺优选** 在单因素试验基础上, 精密称取庙宇党参药材粉末 10.0 g, 根据各因素的特点及影响程度, 选择超声温度、提取时间、料液比为自变量, 党参炔苷提取量和总多糖质量分数为因变量, 采用三因素三水平 Box-Behnken 试验设计, 每组试验重复 3 次。试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 庙宇党参中总多糖及党参炔苷提取工艺的 Box-Behnken 试验分析

Table 1 Box-Behnken test analysis of extraction technology of lobetyolin and total polysaccharides from Miaoyu Codonopsis Radix

No.	A 超声温度 / °C	B 超声时间 / min	C 料液比 / g·mL <sup>-1</sup>	党参炔苷 / μg·g <sup>-1</sup>	党参总多糖 / %
1	40	30	1:35	69.37	16.25
2	50	30	1:25	76.86	21.57
3	50	30	1:25	76.44	20.63
4	50	30	1:25	78.11	21.09
5	40	30	1:35	63.26	15.76
6	50	40	1:35	68.64	17.45
7	60	20	1:25	64.91	14.59
8	50	40	1:15	67.13	16.48
9	40	20	1:25	58.04	13.97
10	60	40	1:25	72.93	15.76
11	40	30	1:15	59.67	14.27
12	60	30	1:15	67.98	14.97
13	50	20	1:15	60.39	13.76
14	50	30	1:25	77.19	20.49
15	50	30	1:25	77.43	20.73
16	40	40	1:25	62.51	15.34
17	50	20	1:35	65.54	17.64

由方差分析可知,以党参炔苷提取量为指标,  $A, B, C, AB, BC, A^2, B^2, C^2$  为显著性影响因素;以总多糖质量分数为指标,  $B, C, BC, A^2, B^2, C^2$  为显著性影响因素。采用 Design-Expert 7.1 软件对试验数据

表 2 回归方程方差分析

Table 2 Variance analysis of regression equation

方差来源	党参炔苷					党参总多糖				
	<i>f</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>f</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	9	737.19	81.91	149.53	0.000 1	9	119.74	13.30	71.72	0.000 1
<i>A</i>	1	125.69	125.69	229.46	0.000 1	1	0.62	0.62	3.35	0.109 9
<i>B</i>	1	62.33	62.33	113.79	0.000 1	1	3.21	3.21	17.32	0.004 2
<i>C</i>	1	16.94	16.94	30.92	0.000 9	1	7.26	7.26	39.13	0.000 4
<i>AB</i>	1	3.15	3.15	5.75	0.047 6	1	$1.0 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-2}$	0.054	0.823 0
<i>AC</i>	1	1.21	1.21	2.21	0.180 8	1	0.011	0.011	0.059	0.814 4
<i>BC</i>	1	3.31	3.31	6.05	0.043 5	1	2.12	2.12	11.41	0.018 8
<i>A</i> <sup>2</sup>	1	176.90	176.90	322.94	0.000 1	1	51.68	51.68	278.61	0.000 1
<i>B</i> <sup>2</sup>	1	158.05	158.05	288.54	0.000 1	1	25.97	25.97	140.00	0.000 1
<i>C</i> <sup>2</sup>	1	134.61	134.61	245.75	0.000 1	1	18.32	18.32	98.77	0.000 1
残差	7	3.83	0.55			7	1.30	0.19		
失拟项	3	2.26	0.75	1.97	0.268 7	3	0.54	0.18	0.96	0.492 9
纯误差	4	1.57	0.39			4	0.75	0.19		
总差	16	741.02				16	121.04			

进行三元二次多项式逐步回归拟合,得党参炔苷提取量和总多糖质量分数的回归方程分别为  $Y = 77.21 + 3.96A + 2.79B + 1.46C + 0.89AB - 0.55AC - 0.91BC - 6.48A^2 - 6.13B^2 - 5.65C^2$ ,  $Y = 20.90 + 0.28A + 0.63B + 0.95C - 0.050AB - 0.053AC - 0.73BC - 3.50A^2 - 2.48B^2 - 2.09C^2$ 。为了更直观地表现各因素与因变量的相互关系,拟进行响应面分析,见图 1。表明各因素中  $AB$  和  $BC$  对党参炔苷交互作用显著; $BC$  对党参多糖含量交互作用显著。

**2.5 验证试验** 通过 Design Expert V8.0.6.1 软件进行响应面设计优化,确定党参炔苷最佳提取工艺条件为温度 53.19 °C,超声时间 32.44 min,料液比 1:25.93,党参炔苷提取量理论值 78.25 μg·g<sup>-1</sup>;党参总多糖最佳提取工艺条件为温度 50.38 °C,超声时间 30.96 min,料液比 1:27.11,党参总多糖质量分数理论值 21.04%。结合实际操作考虑,将党参炔苷和党参总多糖的共同提取工艺条件修正为温度 52 °C,超声时间 32 min,料液比 1:26。精密称取庙宇党参药材粉末 10.0 g,按该工艺进行 5 次验证试验,结果党参炔苷提取量和党参总多糖质量分数分别为  $(78.18 \pm 0.21) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  和  $(21.02 \pm 0.13)\%$ ,与预测值基本一致,表明该三元二次方程与实际情况拟合较好,充分验证了所建模型的准确性。

### 3 讨论

本文以党参总多糖和党参炔苷含量为考核指标,在单因素试验基础上,探索了采用 Box-Behnken

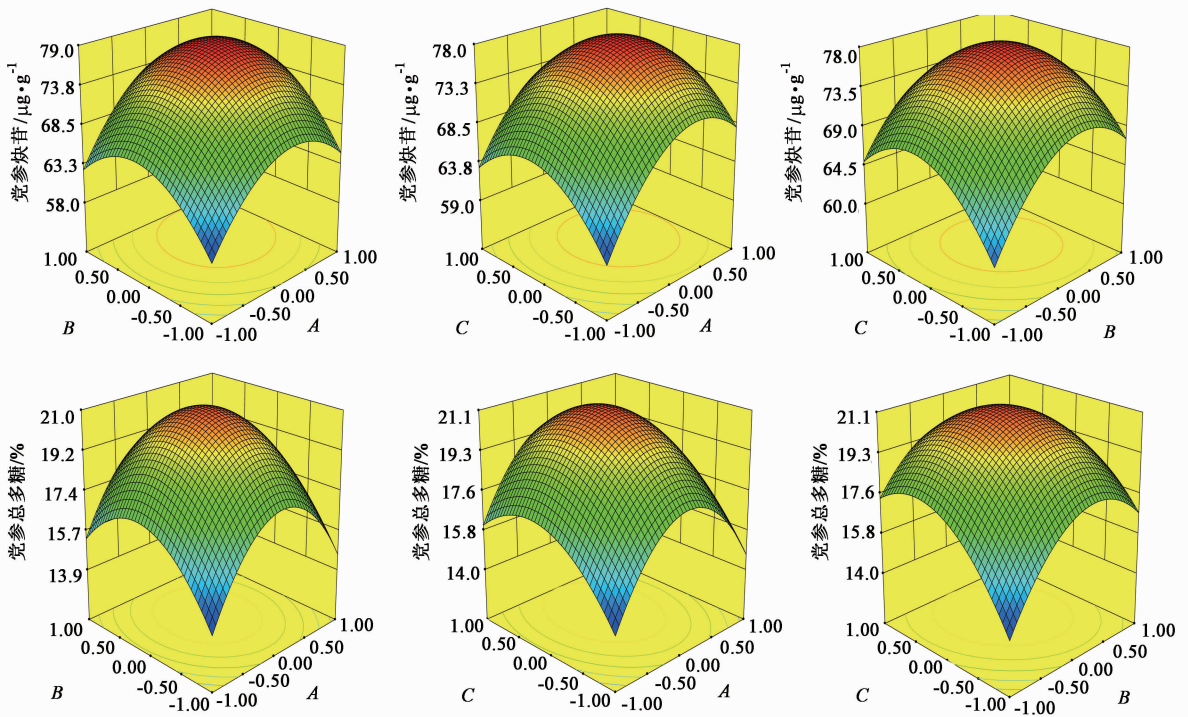


图 1 提取温度、超声时间和料液比对党参炔苷和党参总多糖提取工艺影响的效应面

Fig.1 Response surfaces of effects of extraction temperature, time and ratio of solid to liquid on extraction process of lobetyolin and total polysaccharides from Miaoyu Codonopsis Radix

效应面法优选庙宇党参的最优提取工艺参数的可行性,取得了较满意的效果。通过模型方程拟合,优化了提取条件,得到效应面预测值与实测值差异较小,试验结果较为合理。在提取过程中,党参炔苷和党参总多糖含量往往相互影响,因此,需采取综合模式优化提取工艺,在最佳提取工艺条件下验证得到的预测值与真实值吻合程度较好,说明 Box-Behnken 效应面法在庙宇党参提取工艺应用中的可行性较好。

文献报道党参炔苷可作为党参的一个重要鉴别和质量评价指标,党参炔苷的提取多采用有机溶剂<sup>[9]</sup>。党参总多糖是党参重要的功能成分之一。本文探讨党参炔苷和党参总多糖的共提工艺对进一步开发庙宇党参有重要意义,为更有效地控制该药材内在品质提供参考。

[参考文献]

[1] 李艳,孙萍,刘霞,等. 新疆党参总黄酮与多糖的微波提取及其含量测定[J]. 中医药学刊,2004,22(7): 1222-1225.  
[2] 贺庆,朱恩圆,王峥涛,等. 党参中党参炔苷 HPLC 分析[J]. 中国药学杂志,2005,40(1):56-58.  
[3] 陈敏,熊元君,李晓瑾,等. 新疆党参和潞党参对小鼠脑 SOD、MDA 的影响[J]. 中草药,2000,31(4):

280-281.  
[4] 晏永新,张丽,贾海芳,等. 党参多糖口服液对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国兽药杂志,2013,47(3): 18-20.  
[5] 陈前锋,林智斌,陶则梯,等. 庙宇产川党参挥发油稳定性的研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2014,36(8):206-210.  
[6] 张锐,张旭,刘建群,等. 党参的亚临界水提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):34-37.  
[7] 王秀文,王颖莉,裴晓丽,等. 均匀设计法优选党参茯苓水溶性多糖的微波提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):24-27.  
[8] 郑义,李勇,王卫东,等. Box-Behnken 设计优化益智仁多糖的提取及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2013,39(8):245-249.  
[9] 宋丹,程雪梅,李隆云,等. HPLC 测定不同产地川党参中党参炔苷的含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(17):2133-2135.  
[10] 孙庆文,黄敏,何顺志. HPLC 测定 7 种党参类植物中的党参炔苷[J]. 华西药学杂志,2009,24(3): 290-292.  
[11] 邹元锋,刘莎,陈兴福,等. HPLC 同时测定党参中党参炔苷与苍术内酯Ⅲ[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):923-926.

[责任编辑 刘徳文]