

# Box-Behnken 效应面法优化地乌总皂苷提取工艺

余子川\*, 余捷婧, 韩建伟  
(湖北中医药大学, 武汉 430061)

[摘要] 目的: 优选地乌总皂苷的提取工艺条件。方法: 以总皂苷提取率为指标, 通过单因素试验和 Box-Behnken 效应面法考察加水量、提取时间、提取次数、浸泡时间等因素对提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 8.8 倍量水浸泡 90 min, 煎煮提取 2 次, 每次 2.5 h。地乌总皂苷提取率 11.23%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 数学模型的预测值与试验观察值相符。

[关键词] 地乌; 总皂苷; 提取工艺; Box-Behnken 效应面法

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)10-0050-04

[doi] 10.11653/syjf2013100050

## Optimization of Extraction Technology for Total Saponins from *Anemone flaccida* by Box-Behnken Response Surface Methodology

YU Zi-chuan\*, YU Jie-jing, HAN Jian-wei  
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total saponins from *Anemone flaccida*. **Method:** With extraction rate of total saponins as dependent variable, soaking time, the amount of water, extraction time as independent variables, effects of influencing factors on extraction technology was investigated by single factor test and Box-Behnken response surface methodology. **Result:** Optimum process parameters were obtained as followings: soaked 90 min with 8.8 times the amount of water, boiled 2 times with 2.5 hours per time. Extraction rate of total saponins was 11.23%. **Conclusion:** This optimized technology was stable and feasible, the predictive value of mathematical model and the experimental observation value was fitted.

[Key words] *Anemone flaccida*; total saponins; extraction technology; Box-Behnken response surface methodology

地乌为民间常用中药, 具有祛风湿、强筋骨、消肿止痛之功效<sup>[1]</sup>, 其有效成分为总皂苷, 主要为三萜皂苷类化合物。药理及临床研究发现, 地乌总皂苷具有抗肿瘤、抗炎、解热镇痛、镇静、抗惊厥及多途径抑制自身免疫反应等药理作用<sup>[2-4]</sup>。

提取工艺优选多采用正交设计或均匀设计<sup>[5]</sup>, 但该方法不能在给出的整个区域找到因素和响应值之间的一个明确的函数表达式, 从而无法找到整个区域中因素的最佳组合和响应的最优值。Box-Behnken 效应面法是统计设计试验技术的合成, 利用 Box-Behnken 设计并通过试验得到数据, 采用多元二次方程来拟合因素和效应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析以寻求最优工艺参数, 是解决多变量问题的一种统计方法<sup>[6]</sup>。本实验在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 效应面法优选地乌总皂苷的提取工艺, 并验证该试验设计法在中药提取工艺应用中的可行性, 为地乌总皂苷标准化生产提供实验依据。

[收稿日期] 20121130(007)

[基金项目] 湖北省科技厅自然科学基金研究计划项目 (981P1420)

[通讯作者] \* 余子川, 学士, 副研究员, 从事中药制剂与新剂型研究, Tel: 15802741509, E-mail: zch\_yu@126.com

## 1 材料

Spectrumlab 53 power 型紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)。地乌经湖北中医药大学药用植物鉴定教研室陈科力教授鉴定为毛茛科植物林荫银莲花 *Anemone flaccida* Fr. Schmidt 的干燥根茎。林荫银莲花皂苷 W3 对照品(湖北省中药化学与中药资源重点实验室,批号 20101127W3),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 地乌总皂苷的提取** 称取地乌药材适量,加入一定量水,煎煮提取一定时间,得地乌提取液,过滤,测定地乌总皂苷含量,计算地乌总皂苷提取率。

### 2.2 地乌总皂苷的含量测定

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取林荫银莲花皂苷 W3 对照品适量,加甲醇制成  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 准确称取地乌药材 5.0 g,加水 40 mL 煎煮,滤过,再加水 40 mL 煎煮,每次 2 h,合并 2 次滤液,浓缩至 20 mL,置分液漏斗中,加入氯化钠适量,用水饱和正丁醇振摇提取 4 次(20,20,10,10 mL),合并正丁醇提取液,减压回收正丁醇至干,残渣加甲醇定容至 10 mL 量瓶中,即得。

**2.2.3 标准曲线的绘制** 精密吸取林荫银莲花皂苷 W3 对照品溶液 10,20,30,40,50  $\mu\text{L}$  分别置于 15 mL 具塞试管内,热风吹干,加 5% 香草醛-高氯酸(1:4)混合液 1 mL,置水浴(60~65  $^{\circ}\text{C}$ )中加热 15 min,加冰乙酸 5 mL,摇匀;另取甲醇 40  $\mu\text{L}$ ,同法制成空白对照溶液,于 550 nm 处测定吸光度(A),得回归方程  $A = 3.006 \times 10^{-3} C - 2.7 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.9997$ ),表明林荫银莲花皂苷 W3 在 3.333~16.667  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性关系。

**2.2.4 样品测定** 取上述供试品溶液 40  $\mu\text{L}$ ,对照品溶液 30  $\mu\text{L}$ ,空白对照溶液 40  $\mu\text{L}$ ,按 2.2.3 项下方法测定 A,按回归方程计算地乌总皂苷含量。

### 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 加水量** 固定浸泡时间 30 min,煎煮时间 1 h,提取数 2 次,取地乌饮片 5 份,每份 10 g,分别加 4,6,8,10,12 倍量水浸泡,考察加水量对地乌总皂苷提取率的影响,结果分别为 4.35%,6.87%,8.15%,8.18%,8.21%,故选择 8 倍量水。

**2.3.2 提取时间** 取地乌饮片 5 份,每份 10 g,分别加 8 倍量水浸泡 30 min,提取 2 次,考察不同煎煮时间(30,60,90,120,150 min)对地乌总皂苷提取率

的影响,结果分别为 5.14%,7.86%,9.23%,11.21%,11.23%,故选取提取时间 120 min。

**2.3.3 浸泡时间** 取地乌饮片 5 份,每份 10 g,分别加 8 倍量水浸泡 30,60,90,120,150 min,提取时间 120 min,提取 2 次,考察浸泡时间对地乌总皂苷提取率的影响,结果分别为 4.86%,8.31%,8.65%,8.61%,8.67%,故选择浸泡时间 90 min。

**2.3.4 提取次数** 取地乌饮片 10 g,加 8 倍量水浸泡 90 min,提取 2 h,药渣加 8 倍量水提取第 2 次,同法提取第 3 次和第 4 次,考察提取次数对地乌总皂苷提取率的影响,结果分别为 8.36%,2.34%,1.32%,0.25%,结合实际生产考虑,选择提取 2 次为宜。

**2.4 Box-Behnken 效应面法优选<sup>[7]</sup>** 在单因素试验基础上,固定提取数为 2 次,选取浸泡时间、加水量与提取时间为考察因素,每个自变量的低、中、高水平分别以 -1,0,1 进行编码,以地乌总皂苷提取率为响应值,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 地乌总皂苷的提取工艺优选 Box-Behnken 试验因素水平

水平	A 浸泡时间/h	B 加水量/倍	C 煎煮时间/h
-1	0	6	1
0	1	8	2
1	2	10	3

表 2 地乌总皂苷的提取工艺优选 Box-Behnken 试验安排

No.	A	B	C	总皂苷提取率/%
1	0	0	0	10.86
2	1	0	-1	8.32
3	0	1	1	10.68
4	-1	0	-1	8.16
5	-1	1	0	9.65
6	1	0	1	10.25
7	-1	-1	0	8.78
8	0	1	-1	8.25
9	0	0	0	10.87
10	-1	0	1	10.45
11	0	0	0	10.86
12	0	-1	1	8.94
13	0	0	0	10.85
14	0	-1	-1	8.21
15	1	1	0	10.21
16	0	0	0	10.88
17	1	-1	0	8.86

利用 ANOVA 分析效应面的回归参数。采用 Design-Expert 8. 05b 软件对表 2 数据进行多元线性回归拟合, 得二次多项回归模型方程  $Y = -12. 392 + 6. 834A + 3. 173B + 2. 341C + 0. 120AB - 0. 180AC + 0. 213BC - 2. 428A^2 - 0. 221B^2 - 0. 962C^2$  (相关系数  $R^2 = 0. 988 6$ , 校定系数  $= 0. 974 0$ ), 说明该模型拟合度良好, 试验误差小, 可用此模型对地乌总皂苷提取进行分析 and 预测。对该模型进行方差分析, 结果见表 3。

表 3 回归方程的显著性检验及方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	19. 37	9	2. 15	67. 55	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
A	0. 045	1	0. 045	1. 41	0. 273 4
B	2. 00	1	2. 00	62. 79	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
C	6. 81	1	6. 81	213. 73	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
AB	0. 058	1	0. 058	1. 81	0. 220 6
AC	0. 032	1	0. 032	1. 02	0. 346 8
BC	0. 72	1	0. 72	22. 68	0. 002 1 <sup>2)</sup>
A <sub>2</sub>	1. 55	1	1. 55	48. 70	0. 000 2 <sup>1)</sup>
B <sub>2</sub>	3. 28	1	3. 28	102. 83	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
C <sub>2</sub>	3. 90	1	3. 90	122. 33	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
残差	0. 22	7	0. 032		
失拟性	0. 22	3	0. 074	570. 38	<0. 000 1 <sup>1)</sup>
纯误差	$5. 20 \times 10^{-4}$	4	$1. 30 \times 10^{-4}$		
总差	19. 59	16			

注: <sup>1)</sup> 为极显著性, <sup>2)</sup> 为非常显著性。

由表 3 可知, 煎煮时间一次项和加水量一次项对地乌总皂苷提取率达极显著水平, 加水量和液煎煮时间对地乌总皂苷提取率具有显著性影响, 加水量和煎煮提取时间的交互相对其有显著影响, 二次项的偏回归系数达极显著水平, 其他各项的偏回归系数均未达到显著水平。回归方程失拟检验不显著, 说明未知因素对试验结果干扰很小。拟合检验极显著, 说明该方程与实际情况拟合很好, 较好地反映了地乌总皂苷提取率与浸泡时间、加水量和煎煮提取时间的关系, 因此, 所得的回归方程能较好地预测地乌总皂苷提取率随各参数的变化规律。该模型的变异系数 (1. 84%) 也在可接受范围内。采用 Design-Expert 软件作出相应的曲面图和等高线图, 见图 1 ~ 6。

由图 1 ~ 2 可知, 在提取时间为 2 h 条件下, 地乌总皂苷提取率随加水量的增加呈线性增加, 浸泡时间则对其基本无影响, 当浸泡时间约 1. 5 h 时, 地

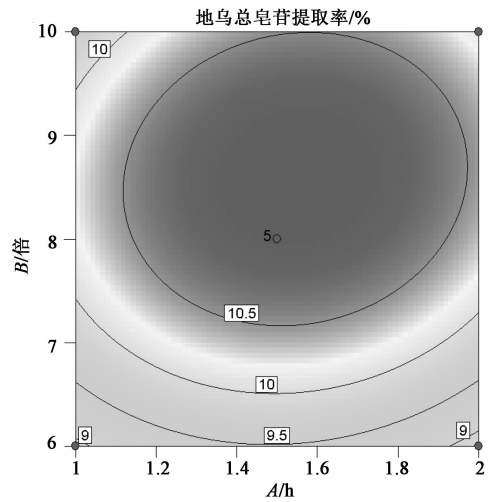


图 1 浸泡时间与加水量对地乌总皂苷提取率影响等高线

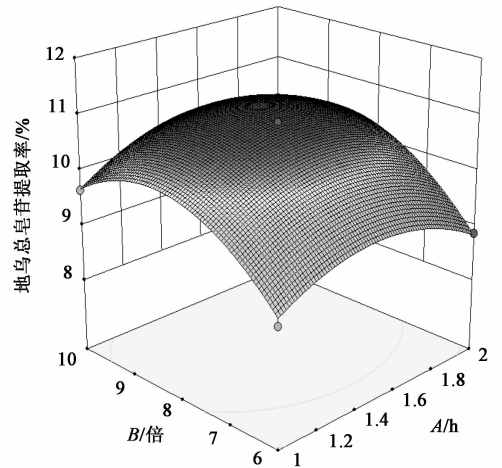


图 2 浸泡时间与加水量对地乌总皂苷提取率影响效应面

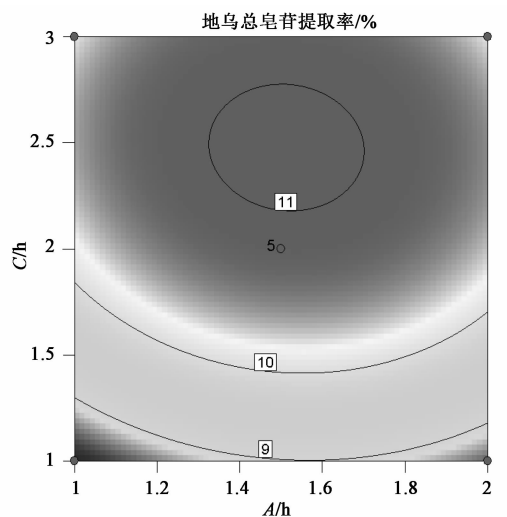


图 3 浸泡时间与提取时间对地乌总皂苷提取率影响等高线

乌总皂苷提取率达最大值。由图 3 ~ 4 可知, 在加水量为 8 倍条件下, 考察浸泡时间与煎煮时间对地乌总皂苷提取率的影响。由图 5 ~ 6 可知, 在浸泡时间

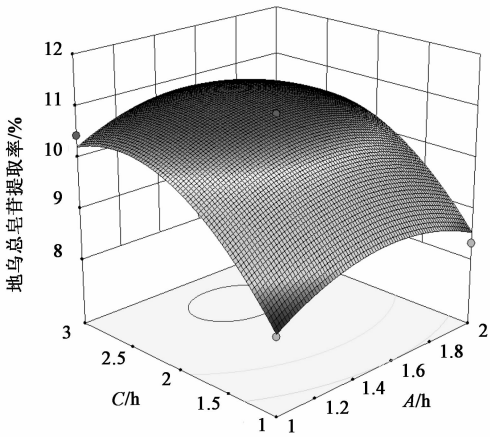


图4 浸泡时间与提取时间对地乌总皂苷提取率影响效应面

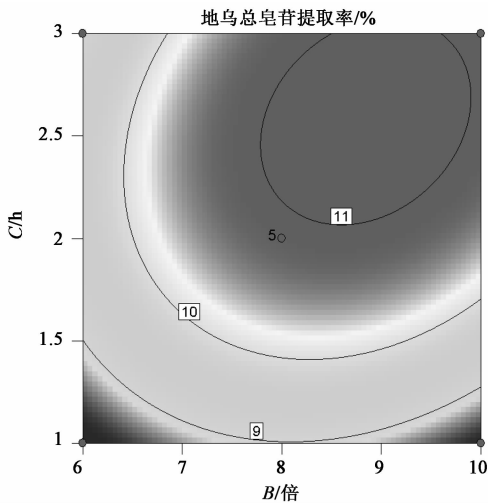


图5 加水量与提取时间对地乌总皂苷提取率影响等高线

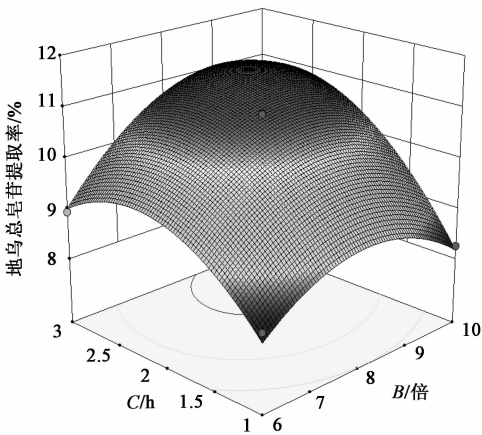


图6 加水量与提取时间对地乌总皂苷提取率影响效应面

1 h 条件下,煎煮时间对地乌总皂苷提取率的影响呈近二次关系,在煎煮时间约 2.5 h 时,地乌总皂苷

提取率达最大值。

**2.5 验证试验** 根据二次多项式回归模型的数据分析结果,预测最佳提取工艺参数为浸泡时间 1.53 h,加水量 8.85 倍,煎煮时间 2.57 h,在此条件下,地乌总皂苷理论提取率 11.236%。按最佳提取工艺参数进行 3 次验证试验,结果总皂苷平均提取率 11.193% (RSD 0.367%),偏差率 0.377%。表明所建立的数学模型具有良好预测性,优选的工艺条件重复性良好。

### 3 讨论

大多数情况下,各因素对效应的影响并非线性,国内一般普遍采用正交设计和均匀设计优化工艺处方,即用线性数学模型进行拟合,试验次数虽少,但精度较低,选择的试验条件只是预设值的最佳组合,而无法精确找到最佳点。而采用 Box-Behnken 效应面法试验预测的最佳提取工艺参数与单因素试验结果有一定差异,这是因为单因素试验存在误差,Box-Behnken 效应面法更精准,具有更强的指导性<sup>[8-9]</sup>。

### [参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:28.
- [2] 邴飞虹. 地乌总皂苷抗炎免疫作用研究[J]. 湖北中医杂志,1995,17(8):82.
- [3] 邴飞虹,江俊. 地乌总皂苷抗炎免疫作用研究[J]. 湖北中医杂志,1997,14(11):33.
- [4] 陈龙,蔡宝昌,马骋,等. 草乌几种炮制品的镇痛作用比较[J]. 中国中药杂志,1995,20(1):20.
- [5] 孙振球. 医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:181.
- [6] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学:药学分册,2000,27(5):292.
- [7] 张弛. 六西格玛试验设计[M]. 广州:广东经济出版社,2003:289.
- [8] 柳俊,张建军. Box-Behnken 效应面法优化白芍配方颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):9.
- [9] 黄元红,卫天喜,张发生,等. 星点设计与效应面法优选丹参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):28.

[责任编辑 仝燕]