

响应面法优选黄芪提取工艺

沈小钟^{1,2}, 杨帆³, 于荣敏^{2*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 暨南大学药学院, 广州 510632;
3. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121)

[摘要] 目的: 响应面法优选黄芪的渗漉提取工艺。方法: 采用三因素三水平 Box-Behnken 试验设计, 以乙醇体积分数、流速、乙醇用量为自变量, 黄芪甲苷提取率为因变量, HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量, 通过对自变量各水平的多元回归及二项式拟合, 用响应面法优选乙醇渗漉提取工艺, 并进行预测分析。结果: 最佳提取工艺条件为 30% 乙醇, 流速 $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, 乙醇用量为药材量 6.5 倍。在此条件下, 黄芪甲苷提取率理论值 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 实测值 $1.487 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 说明该优选工艺模型拟合度良好。结论: Box-Behnken 试验设计可用于黄芪渗漉提取工艺的优选, 该优选工艺简便、稳定。

[关键词] 黄芪甲苷; Box-Behnken 设计; 响应面法; 高效液相色谱法-蒸发光散射检测器法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0034-04

Optimization of Extration Technology for Astragaloside IV from *Asrtagalus membranacevs* by Response Surface Methodology

SHEN Xiao-zhong^{1,2}, YANG Fan³, YU Rong-min^{2*}

(1. Guang dong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
2. College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China;
3. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* by response surface methodology (RSM). **Method:** Three-factor and three-level Box-Behnken experimental design was employed with ethanol concentration, flow rate and liquid-solid ratios independence variables, extraction rate of astragaloside IV as dependent variable which was determined by HPLC-ELSD, experimental data obtained by multiple regression and binomial fitting of levels from independent variables, ethanol percocation extraction technology was optimized by RSM, and to predictive analysis. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: 30% ethanol as solvent, flow rate $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, liquid-solid ratio $6.5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$. Under these conditions, theoretical value of extraction rate of astragaloside IV $1.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, but measured value of $1.487 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, it showed optimized technology model fitted well. **Conclusion:** Box-Behnken experimental design could be used for extraction optimization of percocation extraction process for *A. membranaceus*, optimized technology was simple and stable.

[Key words] astragaloside IV; Box-Behnken experimental design; response surface methodology; HPLC-ELSD

黄芪味甘, 微温, 具有补气固表、利尿排毒、敛疮 生肌、益气补中的功效^[1]。其主要成分为皂苷、黄

[收稿日期] 20120313(013)

[基金项目] 广东省科技计划粤港关键领域项目(2009A030901011)

[第一作者] 沈小钟, 硕士研究生, 实验师, 主管药师, 从事新药开发及药品质量研究, Tel: 020-28854883, E-mail: shenzx@gdyzy.edu.cn

[通讯作者] * 于荣敏, 博士, 教授, Tel: 020-85220386, E-mail: tyrm@jnu.edu.cn

酮、多糖等,其中黄芪甲苷是黄芪增强机体免疫功能的主要活性成分之一,同时是多种黄芪制剂中定量指标成分^[2-5]。黄芪甲苷的提取方法常有水提(含碱水)和乙醇提取等^[6-10],乙醇提取多为回流提取和渗漉提取^[9-11]。为紧密结合工业生产,本试验采用乙醇渗漉法提取黄芪,选取乙醇体积分数,渗漉速度,溶液用量等为影响因素^[9],采用 Box-Behnken 设计,响应面法优选黄芪甲苷的提取工艺,目前类似的研究报道较少^[6-9]。

响应面法是通过响应面等值线的分析寻求最优工艺参数,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间函数关系的一种统计方法,具有直观、方便、高效的特点^[12-13]。本研究采用高效液相色谱法-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)测定黄芪甲苷含量,应用响应面法优选黄芪甲苷提取工艺,考察各因素对黄芪甲苷提取率的影响,旨在为黄芪甲苷提取工艺的优化提供试验依据。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent, Alltech3300 型蒸发光散射检测器), BT125D 型分析天平(Sartorius 公司),黄芪甲苷(中国药品生物制品检定所,批号 110781-200613),黄芪药材购自广东省药材公司,经广东省中药研究所蔡岳文教授鉴定为黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,按《中国药典》2010 年版一部黄芪项下规定检测,均符合要求,切成 2~5 mm 小块。甲醇、乙腈为色谱醇,水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

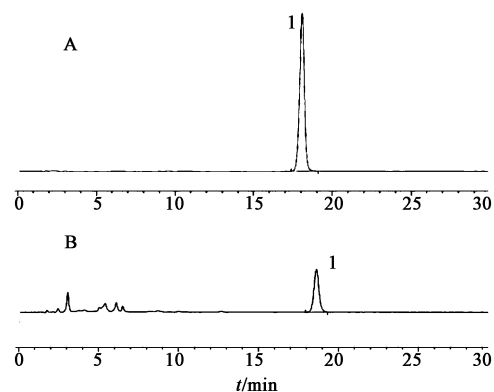
2.1 黄芪甲苷提取率 黄芪甲苷提取率按下列公式进行测算

$$\text{提取率} = \frac{C \times V}{m} \times 100\%$$

C 为黄芪甲苷质量浓度; V 为药液体积; m 为药材质量。

2.2 含量测定 安捷伦 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相水-乙腈(68:32),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,蒸发光散射检测器漂移管温度 60 °C,载气 N₂ 流速 2.0 L·min⁻¹。黄芪甲苷回归方程 $Y = 1.8024X + 2.5181$ ($r = 0.9999$),线性范围 1.1161~6.6963 μg,重复性 RSD 0.53%,精密密度 RSD 1.34%,稳定性 RSD 0.20%。见图 1。

2.3 响应面法优选 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数,渗漉速度,渗漉体积为影响因素,试验



A. 对照品; B. 样品; 1. 黄芪甲苷

图 1 黄芪乙醇渗漉提取物中黄芪甲苷 HPLC

设计采用 Box-Behnken (BBD) (Design-Expert 7.1.3 软件),以黄芪甲苷提取率 Y 为因变量,建立数学模型优化试验方案,编码水平及安排见表 1。分别取黄芪药材 400 g,选择乙醇体积分数 10%~50%,渗漉速度 1.0~2.5 mL·min⁻¹·cm⁻²,溶液用量 1.6~3.2 L 3 个因素按试验设计 Design-Expert 7.1.3 软件设计参数进行,渗漉体积折成药材质量 4~8 倍。

表 1 黄芪甲苷提取工艺 Box-Behnken 试验设计

No.	X ₁ 乙醇体积 分数/%	X ₂ 渗漉速度 /mL·min ⁻¹	X ₃ 渗漉 体积/L	Y/g·L ⁻¹
1	-1(10)	0(1.75)	1(3.2)	1.4407
2	1(50)	0(1.75)	1(3.2)	1.4546
3	0(30)	-1(1.00)	-1(1.6)	1.3164
4	-1(10)	-1(1.00)	0(2.4)	1.3536
5	0(30)	1(2.50)	-1(1.6)	1.4837
6	0(30)	0(1.75)	0(2.4)	1.4999
7	0(30)	0(1.75)	0(2.4)	1.5028
8	-1(10)	0(1.75)	-1(1.6)	1.4329
9	0(30)	0(1.75)	0(2.4)	1.4842
10	0(30)	-1(1.00)	1(3.2)	1.4245
11	-1(10)	1(2.50)	0(2.4)	1.4042
12	1(50)	1(2.50)	0(2.4)	1.4261
13	0(30)	0(1.75)	0(2.4)	1.4943
14	0(30)	0(1.75)	0(2.4)	1.4815
15	0(30)	1(2.50)	1(3.2)	1.4273
16	1(50)	-1(1.00)	0(2.4)	1.3353
17	1(50)	0(1.75)	-1(1.6)	1.3768

采用 Design-Expert 7.1.3 软件进行回归方程拟合和数据分析,将表 1 中数据进行多元回归拟合,得二次回归方程模型 $Y = 1.493 - 0.00483X_1 + 0.03894X_2 + 0.01716X_3 + 0.01005X_1X_2 + 0.017$

$5X_1X_3 - 0.04113X_2X_3 - 0.04973X_1^2 - 0.06301X_2^2 - 0.01656X_3^2$, 对该数学模型进行方差分析, 以检验方程的有效性和各因子偏回归系数, 结果见表 2。

表 2 回归方程方差分析

来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.05387	9	0.0060	48.5613	<0.0001 ³⁾
X_1	0.000186	1	0.0002	1.51105	0.2587
X_2	0.01213	1	0.0121	98.4055	<0.0001 ³⁾
X_3	0.002356	1	0.0024	19.1181	0.0033 ²⁾
X_1X_2	0.000404	1	0.0004	3.2778	0.1131
X_1X_3	0.001225	1	0.0012	9.9387	0.0161 ¹⁾
X_2X_3	0.006765	1	0.0068	54.8864	0.0001 ³⁾
X_1^2	0.01041	1	0.0104	84.4909	<0.0001 ³⁾
X_2^2	0.01672	1	0.0167	135.617	<0.0001 ³⁾
X_3^2	0.001154	1	0.0012	9.3652	0.0183 ¹⁾
残差	0.000863	7	0.00012		
失拟项	0.000509	3	0.00017	1.92	0.2684
净差	0.000354	4	8.85×10^{-5}		
总差	0.054732	16			

注: ¹⁾表示显著, ²⁾表示高度显著, ³⁾表示极显著。

由表 2 可知, 模型极其显著, 失拟项不显著, 残差由随机误差产生, 拟合的多元相关系数 $r = 0.9640$, 表示该模型拟合度良好, 仅 3.60% 试验不在设计模型中, 变异系数 0.77, 说明试验操作可预测性好, 该模型可用于黄芪的提取工艺优化。

2.4 响应面分析 根据 Design-Expert 7.1.3 软件绘制乙醇体积分数和乙醇用量, 流速和溶液用量, 乙醇体积分数和流速的响应面图及等高图, 见图 2 ~ 4, 图 2 所示乙醇体积分数约为 30%, 溶液用量约为 2400 mL 时黄芪甲苷提取率有极大值, 图 3 所示流速约 $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, 乙醇用量约为 2.4 L 时黄芪甲苷提取率有极大值, 图 4 所示流速约 $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, 乙醇体积分数约 30% 时黄芪甲苷提取率有极大值。

2.5 验证试验 使用 Design-Expert 软件计算最佳提取条件为乙醇体积分数 30.34%, 流速 $1.92 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, 乙醇用量 2.589 L, 折合药材用量为生药量 6.47 倍, 理论黄芪甲苷提取率 $1.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 结合工业生产, 优化参数为乙醇体积分数 30%, 流速 $1.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 乙醇用量为药材量 6.5 倍。按上述优化条件进行 3 次验证试验, 结果黄芪甲苷提取率分别为 1.48, 1.49, 1.49 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 平均值 $1.487 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

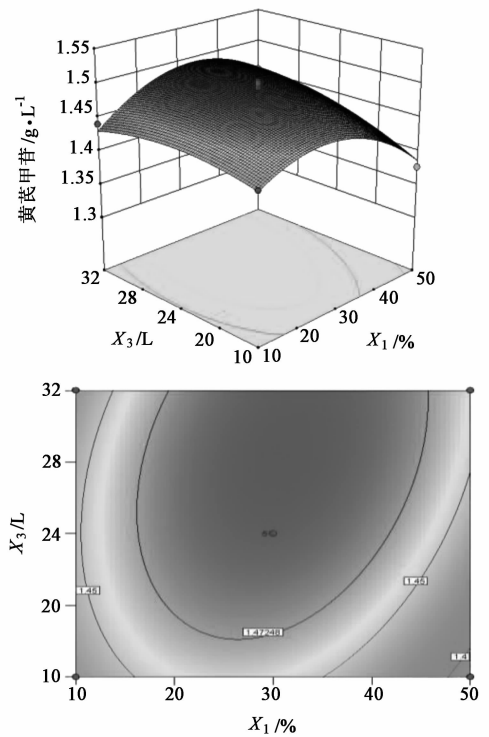


图 2 乙醇体积分数和乙醇用量的响应面及等高线

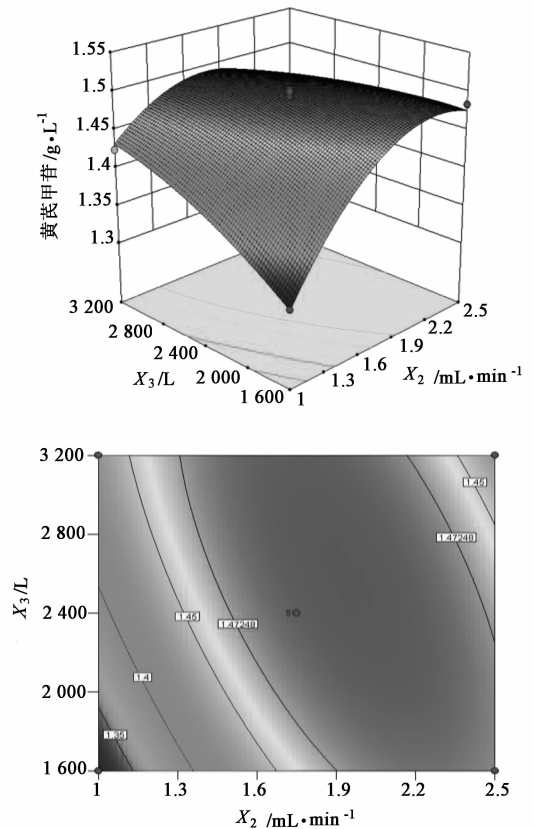


图 3 流速和乙醇用量的响应面及等高线

3 讨论

目前中药提取工艺优选常用正交设计和均匀设计, 试验次数较少, 但精度不够。BBD-响应面法优

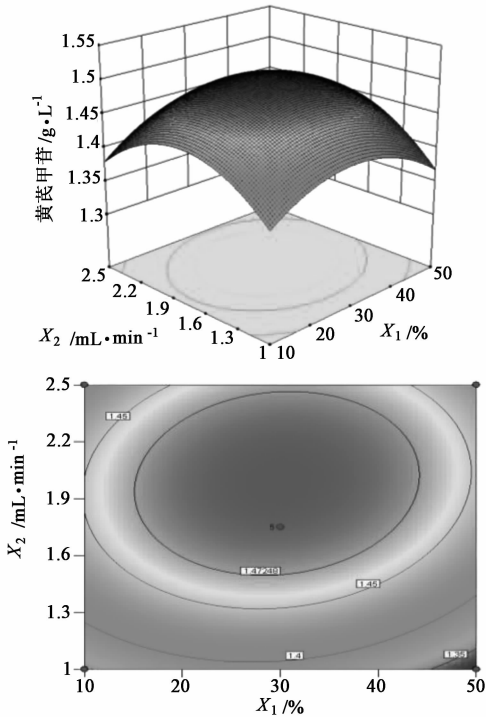


图4 乙醇体积分数和流速的响应面及等高线

化试验设计属于效应面法的一种设计,其可在因素与响应值之间建立数学模型,通过对数学模型的处理得出多变量之间的相互关系与影响因素^[13]。本试验以黄芪为原料,黄芪甲苷含量为指标,通过对自变量乙醇的体积分数,流速及乙醇用量各水平的多元回归及二项拟合建立黄芪甲苷与各因素的回归方程,得到以黄芪甲苷含量为响应面值的响应面图和等高图,通过对试验结果的分析,确定了最佳工艺,该模型拟合度较高,试验结果可为实际生产提供参考。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010;283.
- [2] 管丽霞.黄芪的乙醇提取工艺优化研究[J].安徽农业科学,2009,37(9):41101.
- [3] 王鑫,张振秋,吕佳,等.黄芪提取工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):17.
- [4] 陈涛,李进,褚治德,等.黄芪药材的微波提取工艺研究[J].时珍国医国药,2009,20(2):349.
- [5] 管日增,胡万杨,余跃,等.黄其中主要活性成分提取工艺的研究[J].中华中医药学刊,2010,28(12):2570.
- [6] 杨晓雷,曹云.从黄芪生药中提取黄芪甲苷的工艺研究[J].现代化工,2008,28增刊(2):373.
- [7] 蒋鸣,刘汉清,韩晓珂,等.正交试验法优选芪黄片中黄芪的提取工艺[J].现代中药研究与实践,2010,24(1):47.
- [8] 郑晓峰.正交试验优选黄芪甲苷的分离纯化工艺[J].中国药房,2008,19(21):1630.
- [9] 张士翠,沙莉莉.中风益气活络方中黄芪甲苷渗漉提取工艺实验研究[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(12):192.
- [10] 赵强强,韩丽,谢兴亮,等.田口试验设计法优选黄芪皂苷的提取工艺[J].中成药,2010,32(11):1988.
- [11] 叶迎九,黄新兰,赵沈娟,等.黄芪精的质量标准研究[J].实用临床医药杂志,2009,13(3):60.
- [12] 黄元红,卫天喜,张发生,等.星点设计-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.
- [13] 蒋志华,俞力超,冯子旺,等.响应面法优化仙鹤草总黄酮的超声提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):17.

[责任编辑 全燕]