

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.010

正交试验与响应面法优选六月雪-葎草药对提取工艺比较*

范玲¹, 王鑫^{1△}, 胡风华², 金庆江¹, 尹浩¹, 骆建平¹, 薛毅¹

(1. 江苏省苏州市中西医结合医院, 江苏 苏州 215101; 2. 南京中医药大学翰林学院, 江苏 南京 225300)

摘要:目的 优选六月雪-葎草药对的最佳提取工艺。方法 以木犀草苷转移率及浸膏得率的综合评分为评价指标,以加水倍数(A)、提取时间(B)及提取次数(C)为考察因素,分别采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法和响应面法优选提取工艺,并进行比较。结果 正交试验法得到的最优提取工艺为加15倍水,提取3次,每次提取1.5 h,综合评分为91.36分;响应面法得到的最佳提取工艺为加18倍水,提取3次,每次提取0.8 h,综合评分为97.56分。结论 相比正交试验法,响应面法优选的提取工艺更适用于优化六月雪-葎草药对的提取工艺。
关键词:六月雪-葎草;木犀草苷;正交试验法;响应面法;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)10-0040-05

Comparison of Orthogonal Test and Response Surface Methodology in Optimizing the Extraction Process of *Serissa Japonica* - *Humulus Scandens*

FAN Ling¹, WANG Xin¹, HU Fenghua², JIN Qingjiang¹, YIN Hao¹, LUO Jianping¹, XUE Yi¹

(1. Suzhou Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Suzhou, Jiangsu, China 215101; 2. Hanlin College, Nanjing University of Chinese Traditional Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 225300)

Abstract: **Objective** To optimize the optimal extraction process of *Serissa Japonica* - *Humulus scandens*. **Methods** The comprehensive score obtained by integrating the transfer rate of luteolin and the extract yield was taken as the evaluation index, and the water addition (A), extraction time (B) and extraction times (C) were taken as the evaluation factors, the extraction process of the *Serissa japonica* - *Humulus scandens* was optimized by the methods of $L_9(3^4)$ orthogonal test and response surface methodology. The two methods were compared. **Results** The optimal process obtained by orthogonal test was as follows: adding 15 times of water, extracting 3 times, extracting 1.5 h each time, and the comprehensive score was 91.36 points. The optimal process obtained by response surface methodology was as follows: adding 18 times of water, extracting 3 times, extracting 0.8 h each time, and the comprehensive score was 97.56 points. **Conclusion** Compared with the orthogonal test, the response surface methodology is more suitable for the optimization of the extraction process of *Serissa Japonica* - *Humulus scandens*.

Key words: *Serissa Japonica* - *Humulus scandens*; luteolin; orthogonal test; response surface methodology; extraction process

糖尿病肾病是导致慢性肾脏病的第二位原因^[1],糖代谢紊乱是其主导因素^[2]。中医认为,脾肾受损、气阴两伤、亏虚不足、脉络瘀阻是糖尿病肾病的主要病因病机,常以补肾健脾、益气养阴、活血化瘀通络的药物进行调理。六月雪-葎草是苏州市中西医结合医院金庆江主任中医师治疗糖尿病肾病的经典药对,六月雪始载于《本草拾遗》,来源于茜草科植物小灌木白马骨 *Serissa serisoides* (DC.) Druce 的全草或根,性凉,味苦、微辛,归肺、脾、肝、胃经^[3]。六月雪含挥发油类^[4]、醌类^[5]、木脂素类^[6]、萜类^[7]、黄酮类^[8]等化学成分,具有抗病毒、抑菌等药理作用。葎草始载于《新修本草》,来源于桑科葎草属葎草 *Humulus scandens* (Lour.) Merr. 的全草,性寒,味甘、苦,归肺、肾经^[9]。葎草含黄酮类、甾体类^[10]等多种化学成分,有治疗急慢性肾炎、抗菌、抗炎等药理作用。现代药理学研究结果显示,六月雪能改善机体对抗原的清除作用,对受损的肾小球基底膜有一定修复作用,而

葎草有治疗肾炎的作用,二者相须,联用效果更甚。本研究探讨了六月雪-葎草药对的提取工艺,旨在为该药对的物质基础研究提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);FA2004 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);GM-0.33A 型隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司);B-260 型恒温水浴锅(上海亚荣生化仪器厂);KQ5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DW-2 型调温电热套(南通市张芝山镇决心化工电器厂)。

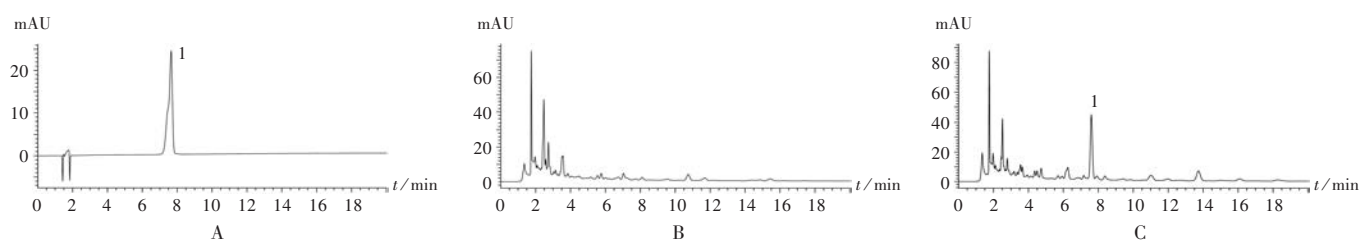
1.2 试剂

木犀草苷对照品(西安菲德生物科技有限公司,批号为 19070302,含量为 99.40%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,试验用水为娃哈哈纯净水;六月雪、

*基金项目:姑苏卫生人才培养项目[GSWS2019089];江苏省苏州市中西医结合医院院级课题[YJ2020004]。

第一作者:范玲,女,硕士,主管药师,研究方向为药剂学,(电子信箱)fl861031@126.com。

△通信作者:王鑫,男,博士,副主任中医师,研究方向为肾病与中药物质基础,(电子信箱)frogprince417@sina.com。



1. 木犀草苷
A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. luteolin

A. Reference solution B. Negative reference solution C. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

葎草药材均购于苏州天灵中药饮片有限公司,经苏州市中西医结合医院于栋伟主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 木犀草苷含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Poroshell 120 EC-C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 4 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(17:83, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:350 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

取木犀草苷对照品 3.0 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得对照品溶液。分别称取六月雪 10 g、葎草 5 g,回流提取,滤过,合并滤液,浓缩后作提取液。精密量取样品溶液 10 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。称取六月雪药材 10 g,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取 2.1.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置处有吸收峰,阴性对照无干扰。理论板数按木犀草苷峰计应不低于 3 000,分离度均大于 1.5,基线分离良好。见图 1。

线性关系考察:精密量取 2.1.2 项下木犀草苷对照品溶液适量,加流动相制成质量浓度分别为 6, 12, 15, 24, 30 μg/mL 的系列对照品溶液,置容量瓶中。按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。以待测成分质量浓度为横坐标(X)、峰面积值为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 22.34X + 17.65$, $r = 0.999$ ($n = 5$)。结果表明,木犀草苷质量浓度在 6~30 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定:取 2.1.2 项下木犀草苷对照品溶液适量,加甲醇逐级稀释,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比(S/N)为 3:1

的质量浓度为检测限, S/N 为 10:1 时的质量浓度为定量限。结果检测限和定量限分别为 0.603 2 μg/mL 和 2.084 9 μg/mL。

精密度试验:精密量取已知含量(15 μg/mL)的对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。于 1 d 内连续进样 6 次,测定峰面积,结果的 RSD 为 0.36% ($n = 6$),表明该方法日内精密度良好。于 1 d 内连续进样 2 次,连续 3 d,测定峰面积,结果的 RSD 为 0.98% ($n = 6$),表明该方法日间精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,室温下分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按 2.1.1 项下色谱条件测定。结果的 RSD 为 1.87% ($n = 6$),表明室温下供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取同一供试品溶液 6 份,依法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果的 RSD 为 0.52% ($n = 6$),表明该方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知质量浓度的供试品溶液(木犀草苷质量浓度为 11.57 μg/mL)6 份,每份 10 mL,置蒸发皿中,水浴蒸干,残渣用甲醇溶解并定容,分别精密量取 10 mL,各加入 0.12 mg 木犀草苷对照品。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果见表 1。

2.2 正交试验

2.2.1 试验设计

根据预试验结果,以加水倍数(A)、提取时间(B)及

表 1 加样回收试验结果($n = 6$)
Tab. 1 Results of the recovery test($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.115 7	0.12	0.235 4	99.75	99.12	0.69
0.115 7	0.12	0.235 5	99.83		
0.115 7	0.12	0.234 4	98.92		
0.115 7	0.12	0.235 0	99.42		
0.115 7	0.12	0.233 3	98.00		
0.115 7	0.12	0.234 3	98.83		

提取次数(C)为考察因素,以木犀草苷提取综合评分为考察指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优选木犀草苷的提取工艺。因素与水平见表2。药对中六月雪、葎草比例为2:1,即六月雪10g、葎草5g。试验过程中煎煮时使用电热套加热圆底烧瓶内回流提取,整个过程水分不流失。最后以木犀草苷转移率及水煎液浸膏得率的综合评分进行分析,综合评分=木犀草苷转移率/木犀草苷转移率的最大值 $\times 70$ +浸膏得率/浸膏得率的最大值 $\times 30$ 。其中木犀草苷转移率(%)=提取液中木犀草苷含量 $\times 100\%$ /按药典测定的饮片木犀草苷含量;浸膏得率(%)= $L \times (m_2 - m_1) / 5 \times 1 / m \times 100\%$ 。 L 为煎煮后提取液总体积(mL), m_2 为含提取液的蒸发皿的质量(g), m_1 为蒸发皿净质量(g), m 为煎煮饮片总质量(g)。正交试验设计与结果见表3,方差分析结果见表4。

由表3可见,各因素对试验检测指标的影响强度高

表2 正交试验因素水平表

Tab. 2 The factors and levels of the orthogonal test

水平	因素 A(倍)	因素 B(h)	因素 C(次)
1	10	0.5	1
2	15	1.0	2
3	20	1.5	3

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of the $L_9(3^4)$ orthogonal test

序号	A	B	C	D	综合评分(分)
1	1	1	1	1	46.16
2	1	2	2	2	58.79
3	1	3	3	3	100.00
4	2	1	2	3	78.49
5	2	2	3	1	82.77
6	2	3	1	2	48.56
7	3	1	3	2	82.12
8	3	2	1	3	40.25
9	3	3	2	1	80.71
K_1	204.95	206.77	134.97	209.64	
K_2	209.82	181.81	217.99	189.47	
K_3	203.08	229.27	264.89	218.74	
R	2.25	15.82	43.31	9.76	

表4 正交试验方差分析结果

Tab. 4 ANOVA results of the orthogonal test

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	8.07	2	4.04	0.05	0.949
B	375.74	2	187.87	2.51	0.285
C	2885.68	2	1442.84	19.29	0.049
误差	149.60	2	74.80		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ 。

低顺序为 $C > B > A$;由表4可见,因素C对检测结果有显著影响。提取次数是影响综合评分的关键因素。分析得到的六月雪-葎草药对的最优提取工艺条件为 $A_2B_3C_3$,即加15倍水,提取3次,每次提取1.5h。

2.2.2 验证试验

以最优提取工艺进行验证试验,所得综合评分的平均值为91.36分, RSD 为0.97%,数据稳定,表明此提取工艺稳定可靠。

2.3 响应面试验

2.3.1 试验设计、结果与分析

依照 Box Behnken 响应面法的设计原理,利用 Design Expert 8.0.6.1 软件设计了以加水倍数(因素A)、提取时间(因素B)、提取次数(因素C)为自变量,以木犀草苷转移率及提取液的浸膏得率的综合评分为考察指标,进行三因素、三水平响应面法试验。因素及水平见表5,响应面设计方案及试验结果见表6,模型分析及方差分析结果见表7。

进行多元回归拟合分析,得综合评分对3个因素的二次多项回归方程为 $R_1 = 82.92 + 7.94A + 0.39B + 21.81C - 5.13AB + 2.75AC - 1.48BC - 11.93A^2 - 1.78B^2 - 9.21C^2$ 。由表6可知,加水倍数和提取次数对水煎液提取的影响极显著,而交互项(AB , AC , BC)均无显著影响。二次项中, A^2 及 C^2 对水煎液提取的影响极显著。模型决定系数 R^2 为0.9380,模型的失拟项 $F = 6.26$,显著性水平 $P = 0.0543 > 0.05$,失拟项并不显著,表明此模型拟合效果好,可很好地反映综合评分与3个因素的关系。综上所述,对综合评分影响强弱顺序为 $C > A > B$ 。

表5 响应面试验因素水平表

Tab. 5 The factors and levels of the response surface methodology

水平	因素 A(倍)	因素 B(h)	因素 C(次)
-1	10	0.5	1
0	15	1.0	2
1	20	1.5	3

表6 响应面试验设计方案与结果

Tab. 6 Design and results of the response surface methodology

序号	因素 A	因素 B	因素 C	综合评分(分)	序号	因素 A	因素 B	因素 C	综合评分(分)
1	1	1	0	80.71	10	1	0	-1	40.25
2	-1	1	0	64.46	11	0	0	0	77.01
3	0	-1	-1	50.83	12	0	0	0	86.97
4	-1	0	1	77.81	13	0	0	0	85.78
5	1	-1	0	84.21	14	-1	-1	0	47.43
6	0	1	1	90.06	15	1	0	1	88.53
7	0	1	-1	48.56	16	0	-1	1	98.24
8	-1	0	-1	40.52	17	0	0	0	83.79
9	0	0	0	81.03					

表7 模型分析及方差分析结果
Tab. 7 Results of model analysis and ANOVA

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	5 499.44	9	611.05	11.76	0.001 9
A - A	503.71	1	503.71	9.69	0.017 0
B - B	1.19	1	1.19	0.02	0.884 2
C - C	3 805.41	1	3 805.41	73.23	<0.000 1
AB	105.37	1	105.37	2.03	0.197 5
AC	30.20	1	30.20	0.58	0.470 8
BC	8.73	1	8.73	0.17	0.694 1
A ²	599.19	1	599.19	11.53	0.011 5
B ²	13.40	1	13.40	0.26	0.627 1
C ²	357.10	1	357.10	6.87	0.034 3
残差	363.75	7	51.96		
失拟修正	299.91	3	99.97	6.26	0.054 3
纯误差	63.84	4	15.96		
总和	5 863.19	16			

2.3.2 响应面图分析

响应面三维图^[11]见图2。

由图2A可见,提取时间为0.5~1.0 h时,综合评分随着加水倍数的增大而逐渐升高,当提取时间超过1 h时,综合评分随加水倍数的变化而呈缓慢升高-降低的趋势;加水倍数为10~15倍时,综合评分随提取时间的延长而呈明显升高趋势,而当加水倍数超15倍时,综合评分随提取时间的延长呈升高-降低趋势。

由图2B可见,加水倍数和提取次数对综合评分的影响较大。当加水倍数为10~15倍时,综合评分随提取次数的增加而显著升高;提取次数为1~2次时,综合评分随加水倍数的增加而升高,提取次数超过2次时,综合评分随加水倍数的增加而呈缓慢升高-降低的趋势。

由图2C可见,响应曲面图所呈现的曲面较平滑,表示此交互项的作用并不明显,但也有一定协同作用。

从以上试验可知,从六月雪-葎草药对水煎液中提取木犀草苷且提高浸膏得率的理论最佳工艺条件为加

18.21倍水,提取2.95次,每次0.78 h。此条件下综合评分为98.73分。

2.3.3 验证试验

为保证试验的可行性,将上述工艺条件修正为:加18倍水,提取3次,每次0.8 h。按此条件进行电热套加热圆底烧瓶内回流提取六月雪-葎草药对木犀草苷试验和浸膏试验,实测综合评分平均值为97.56分, *RSD*为1.24%,数据稳定,且与预测值相比,相对误差较小,表明建立的模型和实际情况基本吻合。

2.4 浸膏得率

取供试品溶液分别精密量取5 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿,水浴蒸干。再于105℃干燥3 h,立即置于干燥器中静置冷却30 min。然后迅速精密称量,记录,并计算浸膏得率。

2.5 两种试验方法比较

由前文可知,按最优工艺条件提取时,响应面法所得综合评分高于正交试验法。正交试验中,3个因素中仅提取次数对综合评分有显著影响($P < 0.05$),在响应面法中提取次数和加水倍数均对综合评分有显著影响。表明响应面法相对更能体现多因素与响应值间的关系。

正交试验法相较于响应面法,试验组数少,更简单易行,但有一定局限性;响应面法试验组数较多,但更加精确,三维图分析更直观,预测能力更强,得率也更高。响应面法依据试验结果拟合出模型来进行工艺优化,是在一个连续区域内筛选的最优方案,这可能是响应面法与正交试验法相比更能精确地优化提取工艺的原因^[12]。但响应面法需通过更多试验组合来进行模型拟合及响应值预测,其工作量要远大于正交试验法^[13]。因此,对于影响因素较少且不需太精确的工艺可使用正交试验法进行优选,但对于影响因素较多且各因素间关系较复杂的工艺则建议使用响应面法试验进行优化。

3 讨论

六月雪-葎草药对治疗糖尿病肾病是多种成分及物质共同作用的结果,因此应综合考虑浸膏得率。药对中的六

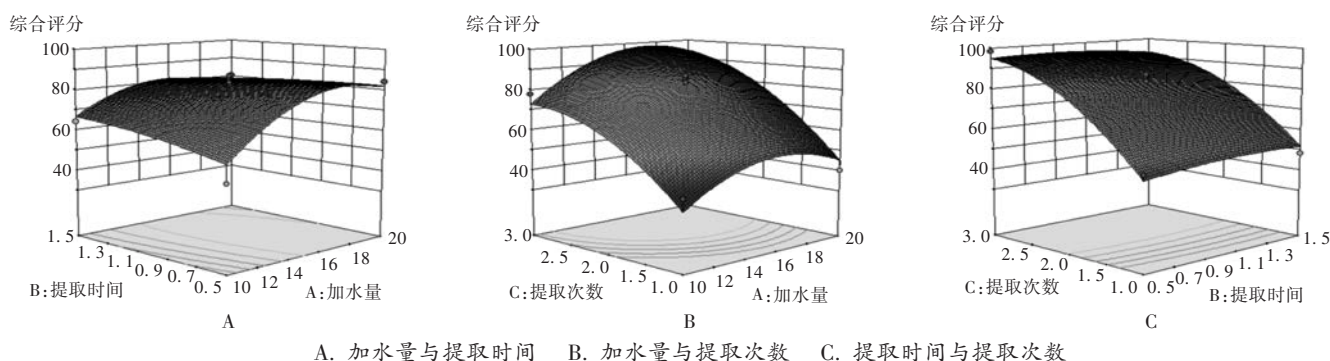


图2 综合评分影响因素三维图

A. water addition and extraction time B. water addition and extraction times C. extraction time and extraction times

Fig. 2 Three dimensional diagram of comprehensive score of influencing factors