

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.011

Box - Behnken 响应面法优选土茯苓七味汤提取工艺*

耿宏侠,王宇佳,于英杰,吴亚男,张新悦,严德康,郭睿博,李学涛,程 岚[△]

(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

摘要:目的 优化土茯苓七味汤的提取工艺。方法 以乙醇体积分数、乙醇用量、提取时间为自变量,以落新妇苷含量和干膏得率的总评归一值为因变量,采用 Box - Behnken 响应面法优选土茯苓七味汤的提取工艺,并进行验证。结果 最佳提取工艺为加 8 倍量 60% 乙醇,提取 3 次,每次 90 min。实测总评归一值为 0.938 4,与预测值 0.955 3 的相对偏差为 1.76%($n=3$)。结论 Box - Behnken 响应面法优选的提取工艺稳定、可靠,可为土茯苓七味汤的提取提供参考。

关键词:土茯苓七味汤;Box - Behnken 响应面法;落新妇苷;提取工艺

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)17-0042-04

Optimization of Extraction Process of Tufuling Qiwei Decoction by BBD - RSM

GENG Hongxia, WANG Yujia, YU Yingjie, WU Yanan, ZHANG Xinyue, YAN Dekang, GUO Ruibo, LI Xuetao, CHENG Lan

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian, Liaoning, China 116600)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Tufuling Qiwei Decoction. **Methods** The Box - Behnken design - response surface methodology (BBD - RSM) was used to optimize the extraction process of Tufuling Qiwei Decoction with the volume fraction of ethanol, the amount of ethanol and the extraction time as the independent variables, and with the overall desirability (OD) of astilbin content and dry extract yield as the dependent variable. Then the verification test was conducted.

Results The optimal extraction process was as follows: adding eight times the amount of 60% ethanol, and extracting three times with each time of 90 min. The measured OD was 0.938 4, and the relative deviation of that to the predicted OD 0.955 3 was 1.76% ($n=3$). **Conclusion** The extraction process optimized by the BBD - RSM is stable and reliable, which can provide a reference for the extraction of Tufuling Qiwei Decoction.

Key words: Tufuling Qiwei Decoction; BBD - RSM; astilbin; extraction process

土茯苓七味汤是蒙医传统药方,出自蒙医经典著作《珊瑚验方》^[1],别名陶匹浪-7,由土茯苓、金银花、诃子、川楝子、梔子、黄连、瞿麦 7 味中药材共研成细末制成汤剂^[2],主治血热引起的头痛、咽喉肿痛、面部疱疹、经血淋漓等诸血症。方中,君药土茯苓清热,性平,味甘淡,归肝、胃经,有除湿、解毒、通利关节功效;金银花、黄连、瞿麦和梔子清血热,为臣药;配以诃子和中,调理体质,川楝子祛巴达干、希拉,为佐使药。诸药合用,效力更佳^[3-4]。湿疹为常见炎性皮肤病,临床采用抗菌药物、激素、抗组胺药等治疗,对于疼痛、瘙痒有缓解作用,但易复发,长期应用易引发多种药品不良反应,且易产生依赖性。中医药治疗湿疹副作用小,复发率低,效果佳,可选择中药汤剂、中成药、外用中成药、中药提取物,以及中药塌渍疗法、中药药浴疗法、中药熏蒸疗法等中医特色疗法^[5-6]。土茯苓七味汤为蒙医经典方,临床应用广泛,治疗血热引起的面部疱疹和皮肤湿疹的疗效显著。目前,中药复方提取工艺的优化方法有正交试验^[7]、Box - Behnken 响应面法^[8]等。本研究中选择落新妇苷含量、干膏得率作为主要考察指标,并结合

Box - Behnken 响应面法优化土茯苓七味汤的提取工艺,为其后续研究提供试验数据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

FA1004 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司,精度为 0.1 mg);B220 型电热恒温水浴锅、DZF 型真空干燥箱(北京市永光明医疗仪器有限公司);20AT 型液相色谱仪(日本岛津公司),配有紫外检测器。

1.2 试药

落新妇苷对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号为 29838-67-3,纯度大于 98%);冰醋酸、甲醇、乙醇均为分析纯,水为纯净水;土茯苓(产地广西,批号为 210301),诃子(产地广东,批号为 210115),梔子(产地河南,批号为 210101),川楝子(产地安徽,批号为 210103),黄连(产地四川,批号为 210313),瞿麦(产地河北,批号为 201101),均购自安徽道源堂中药饮片有限公司;金银花(亳州市康易饮生物科技有限公司,产地安徽,批号为 210310)。上述中药材均经辽宁中医药大学药学院许亮教授鉴定为正品,符合 2020 年版《中国

*基金项目:辽宁省“百千万人才工程”资助项目[2020921099]。

第一作者:耿宏侠,女,在读硕士研究生,研究方向为中药制剂,(电子信箱)851871858@qq.com。

[△]通信作者:程岚,女,博士研究生,教授,研究方向为中药制剂,(电话)0411-85890145(电子信箱)sychenglan@163.com。

药典(一部)》相关项下要求。

2 方法与结果

2.1 干膏得率测定

按处方比例精密称取土茯苓、金银花、诃子、栀子、川楝子、黄连、瞿麦7味药材共41 g,置圆底烧瓶中,加入适量乙醇,回流提取3次,滤过,合并滤液,浓缩滤液,置坩埚中,65℃减压干燥至恒重,计算干膏得率。

2.2 落新妇苷含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%冰醋酸溶液(36:64, V/V);流速:1 mL/min;柱温:30℃;检测波长:291 nm^[9]。

2.2.2 溶液制备

取落新妇苷对照品0.2 mg,精密称定,加60%甲醇1 mL,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得对照品溶液。按处方比例精密称取土茯苓、金银花、诃子、栀子、川楝子、黄连、瞿麦7味药材共41 g,置圆底烧瓶中,加入适量乙醇,回流提取3次,滤过,合并滤液,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。按处方比例精密称取缺土茯苓的其余6味药材,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2.2项下3种溶液各适量,按2.2.1项下色谱条件进样测定。结果分离度良好,且阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:取落新妇苷对照品适量,精密称定,加60%甲醇制成质量浓度分别为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/mL的系列对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件进样测定,以落新妇苷质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.07E + 07X + 98409$, $R^2 = 0.9991$ ($n = 6$)。结果表明,落新妇苷质量浓度在0.1~3.0 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限确定:取对照品溶液,用甲醇逐级

稀释,按2.2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(S/N)为3:1和10:1的质量浓度计算检测限和定量限。结果落新妇苷的检测限为0.23 μg/mL,定量限为0.76 μg/mL。

精密度试验:精密吸取对照品溶液10 μL,按2.2.1项下色谱条件在同1 d内连续进样测定6次,计算日内精密度;连续测定3 d,每天2次,计算日间精密度。结果日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为0.97%和1.68% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品,精密称定,按Box-Behnken试验3号方案平行制备供试品溶液6份,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为1.28% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

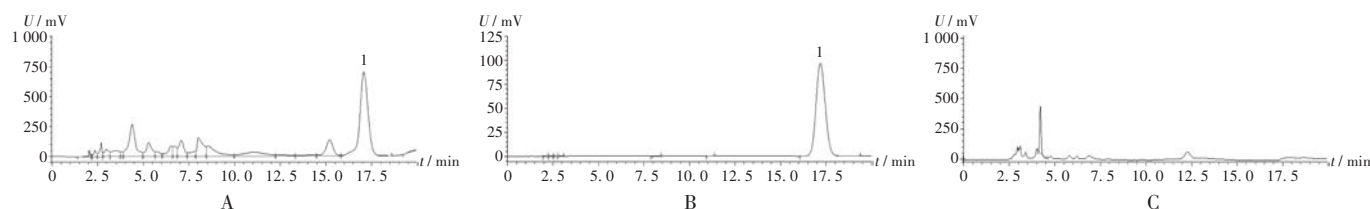
稳定性试验:取样品,精密称定,按Box-Behnken试验3号方案制备供试品溶液,于室温放置0、4、8、12、16、24 h,按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为1.20% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品,精密称定,按Box-Behnken试验3号方案平行制备供试品溶液6份,按1:1的比例加入对照品溶液(质量浓度为2 mg/mL),按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果落新妇苷的平均加样回收率为99.33%, RSD 为1.89% ($n = 6$),表明方法准确度良好。

2.3 提取工艺优选

2.3.1 试验设计

应用三因素三水平的Box-Behnken响应面法评估和优化过程变量的影响,以乙醇体积分数(因素A)、乙醇用量(因素B)、提取时间(因素C)作为影响因素。考虑提取次数为非连续变量,难以进行回归处理,结合相关文献初步设定为3次,各因素设3个水平,分别用-1、0、1表示^[10],因素与水平见表1。以落新妇苷含量和干膏得率的总评归一值(OD)为评价指标,落新妇苷含量为主要指标,权重系数设为0.8;干膏得率为次要指



1. 落新妇苷

A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Astilbin

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

Fig. 1 HPLC chromatograms

标,权重系数设为 0.2。试验设计与结果见表 2,计算公式如下^[11-13]。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \tag{1}$$

$$OD = d_1^{0.8} \times d_2^{0.2} \tag{2}$$

式(1)中, $Y_{\max}$ 为指标最大值, $Y_{\min}$ 为指标最小值, Y_i 为指标*i*测定值, d_i 为落新妇苷含量归一值;式(2)中, d_1 为落新妇苷含量归一值, d_2 为干膏得率归一值。

表 1 因素与水平

Tab.1 Factors and their levels

水平	因素 A(%)	因素 B(倍)	因素 C(min)
- 1	40	6	60
0	60	8	90
1	80	10	120

表 2 Box – Behnken 试验设计与结果

Tab.2 Design and results of the BBD

序号	因素			落新妇苷 含量(%)	干膏得率 (%)	OD
	A	B	C			
1	0	1	1	1.84	13.66	0.725
2	1	0	1	1.88	10.37	0.528
3	0	0	0	2.31	13.61	0.996
4	0	- 1	1	2.07	10.56	0.640
5	0	1	- 1	1.63	10.23	0.400
6	0	0	0	2.23	11.56	0.823
7	- 1	0	1	1.18	11.29	0.228
8	1	- 1	0	1.57	10.11	0.358
9	- 1	1	0	1.11	13.27	0.210
10	- 1	- 1	0	1.05	12.54	0.158
11	1	0	- 1	1.26	9.66	0.000
12	0	0	0	1.57	12.84	0.927
13	- 1	0	- 1	0.90	12.56	0.000
14	1	1	0	1.43	10.80	0.354
15	0	0	0	1.46	12.87	0.952
16	0	- 1	- 1	1.35	11.81	0.353
17	0	0	0	1.24	12.29	0.888

2.3.2 模型拟合与方差分析

使用 Design – Expert V8.0.6 统计软件,以 OD 为因变量对各因素进行二次多项式拟合,得拟合方程 $Y = 0.92 + 0.081A + 0.023B + 0.17C - 0.014AB + 0.075AC + 9.500E - 003BC - 0.49A^2 - 0.15B^2 - 0.23C^2$ ($r = 0.9942, P < 0.05$)。 $P < 0.05$ 为对结果有显著影响, $P < 0.01$ 为对结果有极显著影响^[14]。方差分析结果见表 3。可见,回归模型 $P < 0.0001$,表明回归模型显著;各因素影响程度由大至小依次为因素 C > 因素 A > 因素 B,即提取时间 > 乙醇体积分数 > 乙醇用量,其中 A, C, A^2 , B^2 , C^2 对结果有极显著影响($P < 0.01$),AC 对结果有显著影响($P < 0.05$),B, AB, BC 对结果的影响不显著($P > 0.05$)。

表 3 方差分析结果

Tab.3 Results of the ANOVA

方差来源	SS	df	MS	F 值	P 值
模型	1.79	9	0.20	66.26	< 0.0001
A	0.052	1	0.052	17.31	0.0042
B	0.00405	1	0.00405	1.35	0.2829
C	0.23	1	0.23	78.13	< 0.0001
AB	0.000784	1	0.000784	0.26	0.6246
AC	0.022	1	0.022	7.51	0.0289
BC	0.000361	1	0.000361	0.12	0.7386
A^2	1.03	1	1.03	342.97	< 0.0001
B^2	0.099	1	0.099	33.07	0.0007
C^2	0.23	1	0.23	77.23	< 0.0001
残差	0.021	7	0.002994		
失拟项	0.003716	3	0.001239	0.29	0.8332
纯误差	0.017	4	0.004311		
总离差	1.81	16			

2.3.3 工艺条件优化与预测

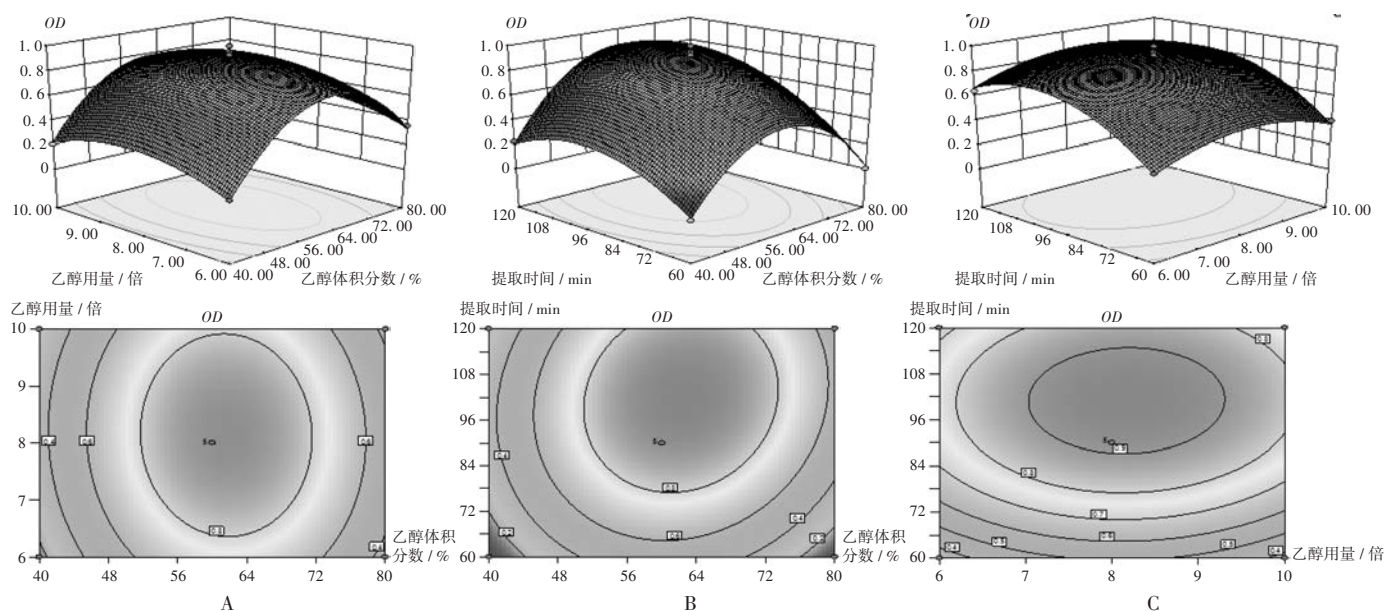
各因素对 OD 影响的三维响应面图和二维等高线图见图 2。可见,因素 B 对 OD 的影响较小,因素 A 和因素 C 对 OD 的影响显著;上述交互因素中,因素 A 与因素 C 的响应面形状较陡峭,等高线呈椭圆形,表明因素 A 与因素 C 的交互作用更明显。利用 Design – Expert V8.0.6 统计软件预测出的最优提取工艺为加 8.16 倍量 62.2% 乙醇,提取 3 次,每次 101.52 min,OD 的预测值为 0.9553。

2.4 验证试验

通过 Box – Behnken 响应面法得到了最优提取工艺,为方便试验操作,将提取条件调整为加 8 倍量 60% 乙醇,提取 3 次,每次 90 min,进行 3 次验证试验。结果 OD 的预测值为 0.9553,实测值分别为 0.9521,0.9245,0.9387,平均为 0.9384,与预测值的相对偏差为 1.76% ($< 5\%$),表明所建立的模型预测性良好。

3 讨论

参照 2020 年版《中国药典(一部)》土茯苓含量测定项下色谱条件,以甲醇 – 0.1% 冰醋酸溶液(39:61, V/V) 为流动相^[9],考察色谱分离情况,结果落新妇苷色谱峰与其他杂质色谱峰分离效果不理想;后以甲醇 – 0.1% 冰醋酸溶液(36:64, V/V) 为流动相,结果落新妇苷色谱峰分离度良好,保留时间适宜,理论板数较高,在本试验确定的色谱条件下,理论板数按落新妇苷峰计不低于 5000。故确定流动相为甲醇 – 0.1% 冰醋酸溶液(36:64, V/V)。本研究中采用高效液相色谱法测定土茯苓七味汤中落新妇苷的含量,方法学考察结果均良好。该方法简便快捷、灵敏度高、准确可靠、适用性强,可用于落新妇苷的含量测定。



A. 乙醇体积分数 - 乙醇用量 B. 乙醇体积分数 - 提取时间 C. 乙醇用量 - 提取时间

图2 两因素交互作用对总评归一值影响的响应面三维图和等高线图

A. Volume fraction of ethanol - amount of ethanol B. Volume fraction of ethanol - extraction time C. Amount of ethanol - extraction time

Fig. 2 Three-dimensional diagrams and contour diagrams of response surface of the effects of the two-factor interaction on the OD

Box - Behnken 响应面法可连续分析试验的各个水平,找到整个区域中因素的最佳组合和响应的最优值。相较于正交设计法和均匀设计法,试验次数少,试验精度高,所得结果更合理可靠、清晰直观,但其局限性为最优条件要在设计的因素水平范围内^[15]。本研究中确定了土茯苓七味汤的最优提取工艺为加8倍量60%乙醇,提取3次,每次90 min。与文献^[16-17]优选工艺相比,所得落新妇苷提取率较高,且实测值与预测值相符,表明 Box - Behnken 响应面法优选得到的提取工艺可靠,具有一定的实际应用价值,可为土茯苓七味汤的后续研究提供参考。

参考文献

- [1] 巴盟临河县人民医院蒙医科. 蒙医药简编[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1976: 107.
- [2] 白清云. 中国医学百科全书·蒙医学(上)[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1986: 737.
- [3] 董鑫垚, 王蔼明. 蒙成药土茯苓-7味汤的概况[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(42): 243.
- [4] 照日格图·其乐木格. 蒙药土茯苓七味汤散的研究进展[J]. 世界中医药, 2015(A1): 475.
- [5] 郭菁怡, 张明. 中医药治疗湿疹临床进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(3): 240-244.
- [6] 阿不地力木·赛米, 古丽巴哈尔·伊明. 中医药治疗湿疹的临床疗效探究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(54): 208.
- [7] 张昕原, 许良, 邵文全, 等. 正交设计研究广枣三味汤黄酮及生物碱提取工艺[J]. 中成药, 2001, 23(10): 12-14.

- [8] 许晓辉, 杜清, 徐媛, 等. 基于星点设计-效应面法优化化学药物复方制剂 HPLC 分析方法[J]. 转化医学电子杂志, 2017, 4(11): 82-85.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 19.
- [10] PASANDIDE B, KHODAIYAN F, MOUSAVI Z, et al. Pectin extraction from citron peel: optimization by Box - Behnken response surface design[J]. Food Sci Biotechnol, 2018, 27(4): 997-1005.
- [11] 李晓霞, 王志萍, 蒋雅娟, 等. 金母颗粒提取工艺的优化[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2561-2565.
- [12] 刘伟, 刘志刚, 孙维峰, 等. Box - Behnken 效应面法优化复方土茯苓颗粒提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 16-19.
- [13] 刘颖新, 刘利利, 喻祖文, 等. 星点设计-响应面法优化厚朴提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 27-30.
- [14] 唐春丽, 甄丹丹, 刘巧明, 等. 星点设计-效应面法优化四妙凉血颗粒的提取工艺[J]. 华西药学杂志, 2020, 35(2): 149-152.
- [15] 马赞, 李存玉. Box - Behnken 响应面法优选生化汤智能提取工艺[J]. 中国药业, 2022, 31(2): 36-40.
- [16] LU CL, ZHU YF, HU MM, et al. Optimization of astilbin extraction from the rhizome of Smilax glabra, and evaluation of its anti-inflammatory effect and probable underlying mechanism in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages[J]. Molecules, 2015, 20(1): 625-644.
- [17] 魏玉娇, 郭晓强, 杨淞瑞, 等. 基于响应面法的土茯苓中落新妇苷提取工艺研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2019, 38(3): 251-255.

(收稿日期: 2021-09-14; 修回日期: 2022-03-15)