

# Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面与正交试验优化棘茎橐木总皂苷提取工艺及其比较研究

董满良\*, 董小萍, 李鸿翔, 谢运飞, 张仕瑾, 谭玉柱<sup>#</sup>(成都中医药大学, 成都 611137)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0227-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.12

**摘要** 目的: 优选棘茎橐木总皂苷(以下简称橐木总皂苷)提取工艺, 并对设计方法进行比较。方法: 采用 Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面设计(方法1)与正交试验设计(方法2)两种方法。方法1以橐木总皂苷质量分数为因变量, 料液比、提取时间和提取温度为自变量, 优选提取工艺; 方法2以橐木总皂苷质量分数为因变量, 以乙醇浓度、料液比、提取次数、提取时间为自变量, 优选提取工艺。结果: 方法1确定最佳工艺是加38倍量95%乙醇, 80℃提取2次, 每次3h; 方法2确定最佳工艺是加30倍量95%乙醇回流提取3次, 每次1h。结论: 方法1与方法2优选的最佳工艺比较, 橐木总皂苷质量分数相差不大, 但是前者试验精度和重复性高、可预测性好。

**关键词** Plackett-Burman 法; Box-Behnken 效应面法; 正交设计; 橐木总皂苷; 提取工艺

## Optimization of the Extraction Technology of Total Saponin from *Aralia echinocaulis* by Plackett-Burman Combined with Box-Behnken Response Surface Methodology vs. Orthogonal Experiment

DONG Man-liang, DONG Xiao-ping, LI Hong-xiang, XIE Yun-fei, ZHANG Shi-jin, TAN Yu-zhu (Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total saponin from *Aralia echinocaulis*, and to compare experimental design. METHODS: Plackett-Burman combined with Box-Behnken response surface design (first method) and orthogonal experiment (second method) were used. In first method, mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis* was used as dependent variable and ratio of liquid to solid, extraction time and temperature as independent variable to optimize the extraction technology; in second method, mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis* was used as dependent variable and concentration of ethanol, ratio of liquid to solid, extraction times and extraction time as independent variables to optimize the extraction technology. RESULTS: The optimal extraction technology of first method was as follows: 38-fold 95% ethanol, extracting for 2 times at 80℃, lasting for 3 h each time; the optimal extraction technology of second method was as follows: 30-fold 95% ethanol, extracting for 3 times, lasting for 1 h each time. CONCLUSION: First method is similar to second method in mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*, but first method is precise, reproducible and highly predictive.

**KEY WORDS** Plackett-Burman; Box-Behnken response surface methodology; Orthogonal design; Total saponin from *Aralia echinocaulis*; Extraction process

棘茎橐木 *Aralia echinocaulis* Hand. Mazz. 又称刺茎橐木、红橐木等(以下简称橐木), 主要以根皮入药, 主治跌打损伤、风湿痹痛、胃脘痛、疮疡肿毒等疾病<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 橐木总皂苷具有镇痛作用, 其皂苷元齐墩果酸有抗炎作用<sup>[2]</sup>。目前尚无有关橐木总皂苷含量及其提取工艺的研究报道。本研究旨在优化橐木根皮总皂苷提取工艺, 为该植物资源的开发利用提供依据。

Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面是国外常用的试验设计方法, 此种试验设计基于非线性模型设计, 以精度高和预测性强著称。笔者采用正交试验和 Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面两种方法, 优化橐木总皂苷的提取工艺, 并比较分析两种试验设计方法的差异性, 为探讨不同试验设计方法应用于优化中药提取工艺的可行性提供依据。

### 1 材料

\* 学士。研究方向: 中药有效成分及质量标准。E-mail: 787427316@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者: 助教。研究方向: 中药有效成分及质量标准。电话: 028-61800033。E-mail: 365762996@qq.com

UV1100 紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); FA1004N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110703-200322); 乙酸乙酯、甲醇、香草醛(成都市科龙化工试剂厂); 冰乙酸(天津市北方天医化学试剂厂); 高氯酸(成都市天华科技有限公司); 水为纯净水。

橐木药材, 购于湖北恩施中药材公司, 经成都中医药大学生药教研室李敏教授鉴定为真品。

### 2 方法与结果

#### 2.1 橐木总皂苷的质量分数测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对照品 3.76 mg, 定容至 10 ml 量瓶中, 制成 0.376 mg/ml 的对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取橐木药材粉末约 1 g, 按各提取工艺制成提取液。精密吸取提取液 0.1 ml, 置具塞试管中, 水浴挥干甲醇, 加新鲜配制的 5% 香草醛-冰醋酸溶液 0.4 ml, 充分振摇, 再加高氯酸 1.6 ml, 加塞摇匀。70℃水浴保温加热 20 min, 冰水中冷却, 加乙酸乙酯 10 ml, 密塞、振摇, 即得

供试品溶液。

2.1.3 最大吸收波长的确定 分别取对照品、供试品溶液适量,采用紫外分光光度法,以溶剂为空白,在200~600 nm波长范围内扫描。结果,二者均在556 nm波长处有最大吸收,故确定最大吸收波长为556 nm。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,在556 nm波长处测定吸光度。以吸光度(y)为纵坐标,人参皂苷R<sub>g1</sub>质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=0.0349x+0.1062$ ( $r=0.9992, n=5$ )。结果表明,人参皂苷R<sub>g1</sub>质量浓度在75.2~376.0 μg/ml范围内与吸光度呈良好线性关系。

## 2.2 Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面优选椴木总皂苷提取工艺

2.2.1 Plackett-Burman 试验设计 选取对椴木总皂苷质量分数影响较大的提取方法(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)、提取次数(D)、提取时间(E)、提取温度(F)为考察因素,并设计5个空白因素,共进行12次试验。根据预试验结果,确定每个因素2个水平。用Design expert 7.1软件设计试验并进行数据处理。Plackett-Burman 试验的因素水平见表1(表中“-”表示无值)。

表1 Plackett-Burman 试验的因素水平

Table 1 Range and factors of Plackett-Burman design

水平	因素										
	A	B, %	C, 倍	D, 次	E, h	F, °C	G(空白)	H(空白)	I(空白)	J(空白)	K(空白)
-1	回流	65	20	1	1	60	-	-	-	-	-
1	超声	95	40	3	3	80	-	-	-	-	-

2.2.2 Plackett-Burman 试验结果及分析 按表1安排进行12次试验,每个试验重复3次,分别测定椴木总皂苷质量分数,取平均值作为响应值。运用Design expert 7.1软件对各因素进行显著性分析, $P<0.05$ 表示差异有显著性。响应值测定结果见表2;各因素显著性分析结果见表3。

表2 响应值测定结果

Tab 2 Results of response value test

试验号	响应值, %	试验号	响应值, %
1	6.53	7	7.96
2	9.97	8	6.64
3	4.35	9	7.67
4	3.40	10	1.54
5	7.24	11	6.96
6	6.58	12	4.78

表3 各因素显著性分析结果

Tab 3 Significance test of factors

因素	P	因素	P
A	0.0674	G	0.3241
B	0.2271	H	0.2862
C	0.0132	I	0.9410
D	0.1255	J	0.8242
E	0.0700	K	0.3646
F	0.0900		

由表3可知,各因素对响应值(椴木总皂苷质量分数)影响的大小顺序为料液比>提取方法>提取时间>提取温度>提

取次数>乙醇浓度。其中料液比对椴木总皂苷质量分数有显著性影响( $P<0.05$ ),此结论可为下一步Box-Behnken 效应面设计试验提供依据。

2.2.3 Box-Behnke 效应面设计 根据“2.2.2”项下结果,选取料液比( $X_1$ )、提取时间( $X_2$ )、提取温度( $X_3$ )为考察因素,以椴木总皂苷质量分数为响应值,优选工艺。Box-Behnken 效应面设计的因素水平见表4; Box-Behnken 效应面设计与结果见表5。

表4 Box-Behnken 效应面设计的因素水平

Tab 4 Factors and levels of Box-Behnken response surface design

编码水平	因素		
	$X_1$	$X_2, h$	$X_3, °C$
-1	20	1	60
0	30	2	70
1	40	3	80

表5 Box-Behnken 效应面设计与结果

Tab 5 Design and results of Box-Behnken response surface experimental

编号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	响应值, %
1	30	2	70	7.05
2	30	2	70	5.59
3	40	2	60	5.00
4	30	1	80	6.05
5	40	1	70	6.57
6	30	2	70	7.37
7	20	2	60	6.12
8	30	1	60	7.15
9	30	3	80	6.67
10	20	1	70	7.01
11	30	3	60	8.02
12	20	2	80	5.73
13	30	2	70	6.93
14	40	2	80	5.93
15	20	3	70	7.27
16	40	3	70	7.55
17	30	2	70	6.96

将表5数据进行方差分析,经F检验显示,模型方程具有显著性( $P<0.05$ ),且提取时间、料液比与提取温度交互作用显著。 $r=0.9888$ ,表明该模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,能准确预测实际情况。其校正决定系数为0.9445,表明94.45%的试验数据的变异性可由此回归模型来解释。预测系数为0.7990,表明该模型具有较好的实际预测能力。回归方程为 $Y=-11.413+0.319X_1-3.850X_2+0.463X_3+0.018X_1X_2+3.3\times 10^{-3}X_1X_3-6.25\times 10^{-3}X_2X_3-0.01X_1^2+1.02X_2^2-3.83X_3^2$ 。把响应值与某2个因素拟合为三维响应面图及等高线图(见图1)。因只能表达含2个因素变量的函数,故固定3个变量中的一个为中值,再以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量响应面图,在图上选取较佳工艺范围—— $X_1:30\sim 40, X_2:2\sim 3 h, X_3:70\sim 80 °C$ 。根据Design expert 7.1软件分析结果及综合考虑工业生产中的实际情况,选取椴木总皂苷的最佳提取工艺为加38倍量95%乙醇,80 °C回流提取2次,每次3 h。

2.2.4 工艺验证试验 根据优选出的提取工艺进行3次验证试验,比较椴木总皂苷质量分数的预测值与真实值。结果,预

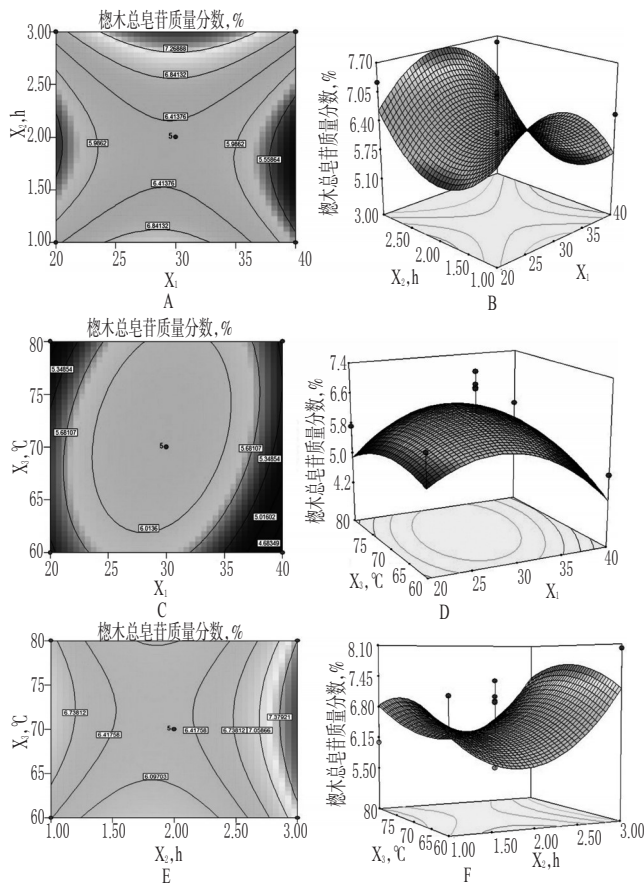


图1 三维响应面与等高线图

A. 料液比与提取时间对榉木总皂苷质量分数影响的等高线; B. 料液比与提取时间对榉木总皂苷质量分数影响的三维效应面; C. 料液比与提取温度对榉木总皂苷质量分数影响的等高线; D. 料液比与提取温度对榉木总皂苷质量分数影响的三维效应面; E. 提取时间与提取温度对榉木总皂苷质量分数影响的等高线; F. 提取时间与提取温度对榉木总皂苷质量分数影响的三维效应面

Fig 1 Three-dimensional response surface and contour map

A. contour of the effect of ratio of liquid to solid and extraction time on mass fraction of total saponin from *Aralia echinocaulis*; B. three-dimensional response surface of the effect of ratio of liquid to solid and extraction time on mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*; C. contour of the effect of ratio of liquid to solid and extraction temperature on mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*; D. three-dimensional response surface of the effect of ratio of liquid to solid and extraction temperature on mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*; E. contour of the effect of extraction time and extraction temperature on mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*; F. three-dimensional response surface of extraction time and extraction temperature on mass fraction of total saponin from *A. echinocaulis*;

测值为7.08%,真实值为(7.18±0.05)%,RSD=0.5%,预测值与真实值之间的偏差为-0.10%。

### 2.3 正交试验设计优选榉木总皂苷提取工艺

榉木总皂苷可溶于水、甲醇,易溶于乙醇。根据预试验和笔者经验,选取乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取次数(C)、提取时间(D)为考察因素,每个因素选3个水平,以榉木总皂苷质量分数为评价指标,用 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,优选工艺。正交试验的因素水平见表6;正交试验结果见表7;方差分析结果见表8。

表6 正交试验的因素水平

Tab 6 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素			
	A,%	B,倍	C,次	D,h
1	65	20	1	1
2	75	30	2	2
3	95	40	3	3

表7 正交试验结果

Tab 7 Results of orthogonal test

试验号	因素				榉木总皂苷质量分数(Y),%		
	A	B	C	D	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$
1	1	1	1	1	8.50	8.60	8.40
2	1	2	2	2	7.40	7.60	7.50
3	1	3	3	3	7.80	8.00	7.90
4	2	1	2	3	5.80	5.80	5.90
5	2	2	3	1	9.60	9.70	9.60
6	2	3	1	2	5.10	5.40	5.30
7	3	1	3	2	8.50	8.60	8.60
8	3	2	1	3	8.20	8.00	8.10
9	3	3	2	1	8.90	9.00	9.00
$R_1$	7.967	7.289	7.289	9.033			
$R_2$	6.911	8.411	7.433	7.111			
$R_3$	8.544	7.378	8.700	7.278			
R	0.099	0.047	0.074	0.137			

表8 方差分析结果

Tab 8 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	12.347	2	6.173 5	913.370	<0.01
B	5.214	2	2.607 0	385.699	<0.01
C	10.850	2	5.425 0	802.575	<0.01
D	20.414	2	10.207 0	1 510.082	<0.01
重复试验	0.045	2	0.022 5	3.342	0.061

注: $F_{0.01}(2,2)=99.00$

note: $F_{0.01}(2,2)=99.00$

由表7、表8可知,各因素影响榉木总皂苷质量分数的大小顺序为D>A>C>B,最佳提取工艺为 $A_3B_2C_3D_1$ ,即加30倍量95%的乙醇回流提取3次,每次1h。按此工艺进行3次验证试验,结果榉木总皂苷平均质量分数为7.26%,RSD=1.35%。

### 3 讨论

笔者曾进行预试验考察回流法与超声法的优劣,发现回流法比较声法好。综合考虑工业生产中的适用性、可控性,最终选择回流法进行提取。

两种优选工艺均表明榉木总皂苷的质量分数较高,不低于7%。同时经比较发现,Plackett-Burman 联用 Box-Behnken design 效应面工艺下的榉木总皂苷质量分数与正交试验设计工艺下的榉木总皂苷质量分数差异不大,但前者重复性较后者明显提高,试验预测能力优于后者。

试验结果显示,料液比在两种工艺筛选中均为主要影响因素;而提取时间影响的显著性在 Plackett-Burman 试验设计与正交试验设计的结果有差异,笔者认为此种差异可能与各自适用条件有关。前者是在各影响因素之间无交互作用时适用,而后者可以考虑各因素的交互作用。在工艺优化试验设计中,为了全面、科学地筛选最佳工艺,不能忽略因素的交互作用。因此,如果预知试验因素交互影响显著,笔者认为仅以 Plackett-Burman 试验设计筛选主要影响因素有所不妥,可通过正交试验结合 Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素。在本

# 正交试验优选连翘提取工艺

孔燕芳<sup>1\*</sup>, 吴彩丽<sup>2</sup>, 段晓颖<sup>2</sup>(1.深圳健安医药有限公司, 广东深圳 518027; 2.河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

中图分类号 R284.2; R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0230-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.13

**摘要** 目的: 优选连翘提取工艺。方法: 以连翘苷转移率和干膏得率为评价指标, 以加水量、煎煮时间和煎煮次数为考察因素, 采用正交试验优选工艺。结果: 连翘的最佳提取工艺为加8倍量水, 煎煮3次, 每次2 h。结论: 所选工艺合理、可行, 可作为连翘的提取工艺。

**关键词** 连翘; 连翘苷; 正交试验; 高效液相色谱法

## Optimization of the Extraction Technology of *Forsythia suspensa* by Orthogonal Design

KONG Yan-fang<sup>1</sup>, WU Cai-li<sup>2</sup>, DUAN Xiao-ying<sup>2</sup> (1. Shenzhen Jian'an Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Shenzhen 518027, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan Collage of TCM, Zhengzhou 450000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of *Forsythia suspensa*. METHODS: The orthogonal test was used to optimize the extraction technology with amount of water, decocting time and decocting times as factors using the transfer rate of phillyrin and extract yield as index. RESULTS: The optimum condition was as follows: adding 8 times amount of water, extracting for 3 times, 2 hour for each time. CONCLUSION: The extraction technology is reasonable and feasible, and it can be used as extraction technology of *F. suspensa*.

**KEY WORDS** *Forsythia suspensa*; Phillyrin; Orthogonal test; HPLC

连翘是木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。秋季果实初熟尚带绿色时采收, 除去杂质, 蒸熟, 晒干, 习称“青翘”; 果实熟透时采收, 晒干, 除去杂质, 习称“老翘”。其性微寒, 味苦, 有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功, 用于治疗痈疽、乳痈、丹毒、风热感冒、温病初起、温热入营、高热烦渴、神昏发斑、热淋涩痛等证。连翘主要含有木脂素类、苯乙醇苷类、黄酮类、三萜类及挥发性成分。木脂素类

成分是其较早被认识的一类活性成分, 主要有连翘苷、连翘酯苷、牛蒡子苷元、牛蒡子苷等<sup>[1]</sup>, 其中连翘苷是代表性成分, 也被《中国药典》作为连翘质量标准的指标性成分。本试验以连翘苷转移率和干膏得率为指标, 采用正交试验优选连翘的水提取工艺。

### 1 材料

LC-10A 高效液相色谱 (HPLC) 仪 (日本岛津公司);

试验选取因素时, Box-Behnken 效应面和正交试验设计两种方法均提取了“料液比”和“提取时间”两个影响因素作为考察对象, 这样就避免了片面单一的因素筛选, 使工艺更加合理。

国内文献对于提取工艺的研究报道大多采用均匀试验设计和正交试验设计, 然而这些试验设计大都是基于线性模型设计的方法。事实上, 大部分试验因素与效应值之间并不是简单的线性模型, 如果直接用线性模型来拟合它们之间的关系, 就会造成预测值与理论值之间很大偏差, 试验精度不高<sup>[9]</sup>。响应面分析法采用多元二次回归的方法, 将各因子指标的相互关系用多项式近似拟合, 通过对函数响应面和等高线的分析, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系<sup>[10]</sup>; 同时, 基于非线性模型进行的试验设计, 试验精度显著优于一般线性模型设计方法, 它已经广泛应用于药材提取工艺。Plackett-Burman 是基于因素间无交互影响时, 优选因素主效应而进行的多因素、高、低两个水平的试验设计, Box-Behnken 效应面设计是基于三水平的二次式试验设计, 该设计具有可旋转性, 因此试验精

度较高<sup>[6]</sup>。同时, 对于三因素试验设计, Box-Behnken 效应面设计与其他效应面方法如 Central Composite Design (CCD) 比较, 试验次数较少, 优越性更明显。Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面设计可以在提高试验精度的基础上, 进一步提高试验的预测性。

### 参考文献

- [1] 包柏林, 王忠壮. 棘茎楸木的资源学和生药学研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 508.
- [2] 任风芝, 栾新慧, 屈会化. 楸木属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 广州化工, 2000, 28(4): 130.
- [3] 刘泽玉, 苏柘僮, 杨明, 等. 联用 Plackett-Burman 与 Box-Behnken 设计控制青黛制备过程中靛玉红的生成[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2 555.
- [4] 徐金龙, 张红梅, 徐秀泉. 响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J]. 中国药房, 2011, 22(27): 2 538.
- [5] 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): 296.

(收稿日期: 2012-02-13 修回日期: 2012-05-14)

\* 讲师, 硕士。研究方向: 临床药理。电话: 0755-82101886-363。  
E-mail: kay24680@163.com