

本文引文格式:吴雪,邹纯才,鄢海燕,等. Box-Behnken 响应面法优化瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸的提取工艺[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(2): 211-217, 233.

【论著与临床报道】

Box-Behnken 响应面法优化瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸的提取工艺

吴雪^{1,2}, 邹纯才¹, 鄢海燕¹, 刘静雨¹, 杨燕¹

- (1. 皖南医学院药学院, 安徽 芜湖 241002;
2. 安徽省芜湖市中医医院, 安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 采用 Box-Behnken 响应面法优化瓜蒌皮提取工艺, 以期最大程度同时保留瓜蒌皮提取物中总核苷和总氨基酸的含量。方法 采用紫外-可见分光光度法测定瓜蒌皮提取物中总核苷和总氨基酸的吸光度, 并在单因素试验的基础上, 以总核苷和总氨基酸吸光度为评价指标, 采用 Box-Behnken 响应面法考察与优化料液比($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)、超声提取时间(min)、醇沉浓度(%)、静置时间(h)对总核苷和总氨基酸提取量的影响。结果 最佳的提取工艺为选择料液比($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)为 1 : 15, 提取时间为 60 min, 醇沉浓度为 50%, 静置时间为 24 h。经 5 次平行验证试验结果表明, 总核苷吸光度平均值为 0.785, RSD=0.42%, 模型的预测结果为 0.788, 实际测定结果与模型预测结果差值为 0.003; 总氨基酸吸光度平均值为 2.112, RSD=0.07%, 模型的预测结果为 2.168, 实际测定结果与模型预测结果差值为 0.056。结论 采用 Box-Behnken 响应面法优化的提取工艺可同时最大程度保留瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸含量, 提取工艺稳定可靠, 可用于瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸的提取。

关键词:瓜蒌皮; 总核苷; 总氨基酸; Box-Behnken 响应面法

中图分类号:R285 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2022)02-0211-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.014

Optimization of the extraction technology for total nucleosides and total amino acids in *Trichosanthis Pericarpium* by Box-Behnken response surface methodology

Wu Xue^{1,2}, Zou Chuncai¹, Yan Haiyan¹, Liu Jingyu¹, Yang Yan¹

- (1. School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;
2. Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To optimize the technology for extracting *Trichosanthis Pericarpium* by Box-Behnken response surface methodology in order to retain the contents of total nucleosides and total amino acids in the extract of *Trichosanthis Pericarpium* to the greatest extent. **Methods** This study determined the absorbance of total nucleosides and total amino acids in *Trichosanthis Pericarpium* extract by UV-vis spectrophotometry. On the basis of single factor test, Box-Behnken response surface methodology was adopted to investigate and optimize the effects of solid/liquid ratio ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), ultrasonic extraction time (min), alcohol precipitation concentration (%) and standing time (h) on the extraction amount of total nucleosides and total amino acids, with the above-mentioned absorbance as the evaluation index. **Results** The optimum conditions for extraction were as follows: 1 : 15 as the solid-liquid ratio ($\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), 60 min as the extraction time, 50% as the alcohol precipitation concentration and 24 h as the standing time. The results of five parallel validation tests showed that the mean value of total nucleoside absorbance was 0.785, with RSD=0.42%. The predicted result of this model was 0.788, and the difference between the actually determined result and the predicted result was

基金项目:安徽高校省级自然科学研究重大项目(KJ2016SD60);皖南医学院大学生科研资助项目(WK2021XS42)

第一作者简介:吴雪(1990-),女,在读硕士研究生,主管药师,研究方向:新药研究与开发, E-mail:819052882@qq.com

通讯作者简介:邹纯才(1969-),男,本科,教授,研究方向:药物制剂及其质量标准研究, E-mail:zouchc@163.com

0.003. The mean value of total amino acid absorbance was 2.112, with RSD=0.07%. The predicted result of this model was 2.168, and the difference between the actually determined result and the predicted result was 0.056. **Conclusion** The extraction technology optimized by Box-Behnken response surface methodology can retain the contents of total nucleosides and total amino acids in *Trichosanthis Pericarpium* to the greatest extent. The extraction process is stable and reliable, which can be used for the extraction of total nucleosides and total amino acids in *Trichosanthis Pericarpium*.

Key words: *Trichosanthis Pericarpium*; total nucleosides; total amino acids; Box-Behnken response surface methodology

瓜蒌皮是瓜蒌成熟干燥果皮,具宽胸散结、清热化痰之功效,是中医临床治疗“胸痹”“心痛”的经典药材^[1-2]。瓜蒌皮中的化学成分及药理活性物质已经取得相关的研究进展^[3-6],如其中所含核苷类成分腺苷具有很强的抗血小板活性,而氨基酸是人体必需活性物质,也是瓜蒌皮注射液^[7-9]的质量评价指标。现已上市的瓜蒌皮注射液的提取工艺采用的是水提醇沉法对瓜蒌皮提取物进行精制,为同时兼顾核苷类物质和氨基酸这两类成分并使二者都最大程度地保留,需要进一步考察并优化瓜蒌皮的水提醇沉提取工艺。为此,本研究采用紫外-可见分光光度法测定瓜蒌皮提取物的总核苷和总氨基酸含量^[10-12],并以总核苷和总氨基酸为评价指标,通过响应面优化法^[13-17]优化瓜蒌皮的水提醇沉提取工艺,为瓜蒌皮药效成分的有效提取和利用提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 UV5100型紫外-可见分光光度计(日本株式会社日立高新技术科学那珂事业所);AUW-220D型电子天平(日本岛津公司);Heidolph-LR4010/4011旋转蒸发仪(德国海道尔夫公司);KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DF-1集热式磁力加热搅拌器(常州容华仪器制造有限公司);101-1-5型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);KNT-2-20科特宁纯水机(合肥科宁特水处理设备有限公司)。

1.2 材料 瓜蒌皮(批号:20171202,河北安国市御颜坊中药材有限公司);乙醇(批号:20130513,天津市百世化工有限公司);腺嘌呤核苷(腺苷,批号:N68291,山东西亚化学股份有限公司);L-精氨酸(批号:20150528,国药集团化学试剂有限公司);水合三酮氢茛(茛三酮,批号:20200601,上海展云化工有限公司);其余试剂为分析纯,纯化水(自制)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 瓜蒌皮样品溶液的制备 取瓜蒌皮10.00 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按一定料液比加入水,按规定提取次数和提取时间超声提取(功率200 W,超声

频率40 Hz),合并滤液并减压浓缩至10 ml,得瓜蒌皮浓缩液。取瓜蒌皮浓缩液,按一定比例加95%乙醇至规定醇沉浓度,4℃醇沉至规定时间,取上清液,减压浓缩后加水定容至10 ml,得瓜蒌皮样品溶液,备用。

2.1.2 腺苷对照品溶液的制备 取腺苷对照品0.5013 g,精密称定,置5 ml量瓶中,加水定容至刻度制得浓度为0.1003 g·ml⁻¹的腺苷对照品溶液,备用。

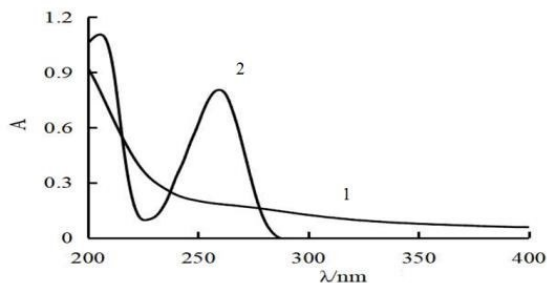
2.1.3 L-精氨酸对照品溶液的制备 取L-精氨酸对照品0.5001 g,精密称定,置5 ml量瓶中,加水定容至刻度制得浓度为0.1000 g·ml⁻¹的L-精氨酸对照品溶液,备用。

2.1.4 茛三酮溶液 取茛三酮1.0005 g,精密称定,置50 ml棕色量瓶中,以无水乙醇定容至刻度,即得。

2.2 总核苷和总氨基酸含量测定方法的建立

2.2.1 检测波长的选择

2.2.1.1 核苷测定波长的确定 精密量取“2.1.1”项下瓜蒌皮提取物样品溶液一定量,并用水稀释成一定浓度;另精密量取“2.1.2”项下腺苷对照品溶液0.5 ml置100 ml量瓶中加水定容至刻度,制得核苷对照品稀释液。以水为空白对照,照紫外-可见分光光度法,于200~400 nm范围内扫描。结果表明,腺苷和瓜蒌皮样品溶液在259 nm处均有最大吸收,因此选择259 nm作为总核苷的测定波长。见图1。

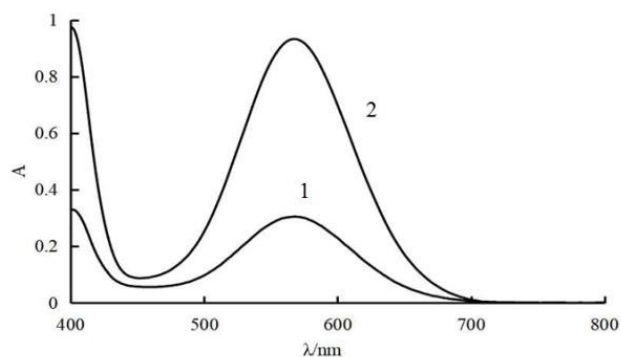


注:1为瓜蒌皮样品溶液,2为腺苷对照品。

图1 瓜蒌皮样品溶液与腺苷对照品紫外吸收图谱

2.2.1.2 总氨基酸测定波长的确定 精密量取“2.1.1”项下瓜蒌皮样品溶液0.1 ml置10 ml量瓶中,加水定容至刻度,得瓜蒌皮样品稀释溶液;精密量

取“2.1.3”项下 L-精氨酸对照品溶液 0.1 ml 置 10 ml 量瓶中,加水定容至刻度得 L-精氨酸对照品稀释溶液。取 1 ml 瓜蒌皮样品稀释溶液和 L-精氨酸对照品稀释溶液 1 ml 分别置 10 ml 量瓶中,加 0.5 ml 磷酸缓冲盐(pH=6.86)、0.5 ml 茚三酮溶液,水浴 15 min,迅速冷却至室温后用水定容至刻度。同法做空白,照紫外-可见分光光度法,于 400~800 nm 波长范围内进行扫描。结果表明,瓜蒌皮样品稀释溶液和 L-精氨酸对照品稀释溶液均在 568 nm 波长处有最大吸收,故选择 568 nm 作为总氨基酸含量的测定波长。见图 2。



注:1 为瓜蒌皮样品溶液,2 为 L-精氨酸对照品。

图 2 瓜蒌皮样品溶液与 L-精氨酸对照品紫外吸收图谱

2.2.2 标准曲线的建立

2.2.2.1 腺苷标准曲线的建立 精密量取“2.1.2”项下腺苷对照品溶液 0.1 ml 置 100 ml 量瓶中,用水定容至刻度,得腺苷对照品稀释液,备用。分别精密量取腺苷对照品稀释液 0.2 ml、0.4 ml、0.8 ml、1.6 ml、3.2 ml 置 10 ml 量瓶中,加水定容至刻度,在 259 nm 处分别测定其吸光度。以吸光度值 A 为纵坐标(y),以腺苷浓度($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)为横坐标(x),建立回归方程为: $y=53.93x+0.0017, r=0.9995$ 。结果表明腺苷在 0.002~0.032 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.2.2 L-精氨酸标准曲线的建立 精密量取“2.1.3”项下 L-精氨酸对照品溶液 0.1 ml 置 100 ml 量瓶中,用水定容至刻度,得 L-精氨酸对照品稀释液,备用。分别精密量取 L-精氨酸对照品稀释液 0.25 ml、0.5 ml、1 ml、2 ml、4 ml 置 10 ml 量瓶中,加 0.5 ml 磷酸缓冲盐(pH=6.86)、0.5 ml 茚三酮溶液,水浴 15 min,迅速冷却至室温后用水定容至刻度,同法做空白,于 568 nm 处分别测定吸光度。以吸光度值 A 为纵坐标(y),以浓度($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)为横坐标(x),建立回归方程为: $y=53.63x+0.0094, r=0.9997$ 。结果表明 L-精氨酸在 0.0025~0.04 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 线性关系良好。

2.3 方法学验证

2.3.1 精密度试验

2.3.1.1 精密度试验(总核苷测定用) 取“2.1.1”项下瓜蒌皮样品溶液,按“2.2.2.1”项下方法平行测定 5 次,记录吸光度值。结果 5 次测定吸光度值的 RSD 值为 0.11%,表明该方法精密度良好。

2.3.1.2 精密度试验(总氨基酸测定用) 取“2.1.1”项下瓜蒌皮样品溶液,按“2.2.2.2”项下方法平行测定 5 次,记录吸光度值。结果 5 次测定吸光度值的 RSD 值为 0.34%,表明该方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

2.3.2.1 稳定性试验(总核苷测定用) 取“2.1.2”项下瓜蒌皮样品溶液 7 份,分别放置 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min、150 min、180 min,按“2.2.2.1”项下方法测其吸光度值 A,计算 RSD 值为 0.36%。结果表明该方法稳定性良好。

2.3.2.2 稳定性试验(总氨基酸测定用) 取“2.1.1”项下瓜蒌皮样品溶液 7 份,分别放置 0 min、30 min、60 min、90 min、120 min、150 min、180 min,按“2.2.2.2”项下方法测其吸光度值 A,计算 RSD 值为 3.07%。结果表明该方法稳定性良好。

2.3.3 重复性试验

2.3.3.1 重复性试验(总核苷测定用) 取瓜蒌皮(批号:20171202)5 份,分别按“2.1.1”项下方法制备瓜蒌皮样品溶液,按“2.2.2.1”项下方法测定吸光度值 A,计算 RSD 值为 0.61%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.3.2 重复性试验(总氨基酸测定用) 取瓜蒌皮(批号:20171202)5 份,分别按“2.1.1”项下方法制备瓜蒌皮样品溶液,按“2.2.2.2”项下方法测定吸光度值 A,计算 RSD 值为 0.10%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验

2.3.4.1 加样回收率(总核苷测定用) 取已知总核苷含量的样品溶液 9 份,分别精密量取适量的核苷对照品溶液置于样品溶液中(核苷质量分别为所取样品溶液中总核苷质量的 80%、100%和 120%,各 3 份),按“2.2.2.1”项下方法处理,记录吸光度值 A,计算样品加样回收率。见表 1。结果表明该方法测定结果准确可靠。

2.3.4.2 加样回收率(总氨基酸测定用) 取已知总氨基酸含量的样品溶液 9 份,分别精密量取适量的 L-精氨酸对照品溶液置于样品溶液中(L-精氨酸质量分别为所取样品溶液中总氨基酸质量的 80%、100%和 120%,各 3 份),按“2.2.2.2”项下方法处理,记录吸光度值 A,计算样品加样回收率。见表 2。结果表明该方法测定结果准确可靠。

表 1 总核苷加样回收率试验结果

序号	样品 含量/mg	加入 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.0420	0.0336	0.0757	100.30		
2	0.0420	0.0336	0.0758	100.60		
3	0.0420	0.0336	0.0759	100.89		
4	0.0420	0.0420	0.0841	100.24		
5	0.0420	0.0420	0.0836	99.05	99.84	0.88
6	0.0420	0.0420	0.0837	99.29		
7	0.0420	0.0504	0.0927	100.60		
8	0.0420	0.0504	0.0914	98.02		
9	0.0420	0.0504	0.0922	99.60		

表 2 总氨基酸加样回收率试验结果

序号	样品 含量/mg	加入 量/mg	测得 量/mg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.0900	0.0720	0.1614	99.21		
2	0.0900	0.0720	0.1632	101.70		
3	0.0900	0.0720	0.1616	99.46		
4	0.0900	0.0900	0.1796	99.54	99.63	1.21
5	0.0900	0.0900	0.1792	99.14		
6	0.0900	0.0900	0.1798	99.74		
7	0.0900	0.1080	0.1995	101.42		
8	0.0900	0.1080	0.1963	98.43		
9	0.0900	0.1080	0.1959	98.09		

2.4 提取工艺的优化

2.4.1 单因素考察 主要考察料液比、提取次数、醇沉浓度、提取时间、静置时间对总核苷和总氨基酸含量的影响。在前期预试验的基础上,料液比($g \cdot ml^{-1}$)定为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25;超声提取次数定为 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次;超声提取时间定为 25 min、35 min、45 min、55 min、65min;加入 95%乙醇至醇沉浓度为 50%、60%、70%、80%、90%;静置时间为 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h。在各项考察条件中选一项最优条件作为后续提取条件并为最后的响应面提供依据。

2.4.2 料液比的单因素考察 按“2.1.1”项下提取方法,分别按料液比 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 加入纯水进行超声提取 3 次,提取时间为 45 min,提取次数为 3 次,醇沉浓度为 70%,静置 36 h,制备瓜蒌皮样品溶液。按“2.2.2”项下方法测定不同料液比下的总核苷及总氨基酸吸光度值。不同料液比($g \cdot ml^{-1}$)下总核苷和总氨基酸吸光度 A,见图 3。由图 3 可知,在料液比为 1:15 时,总核苷和总氨基酸吸光度较高且趋于平稳,暂定料液比为 1:15。

2.4.3 静置时间单因素考察 按“2.1.1”项下提取方法,按料液比 1:15($g \cdot ml^{-1}$)加水进行超声提取,提取次数为 3 次,提取时间为 45 min,醇沉浓度为 70%,分别静置 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h,制备瓜蒌皮样品溶液。按“2.2.2”项下方法测定不同静置时间下的总核苷及总氨基酸吸光度值。不同静置时间下总核苷和总

氨基酸吸光度 A,见图 4。图 4 可知,在静置时间为 36 h 时,总核苷和总氨基酸吸光度较高,暂定静置时间为 36 h。

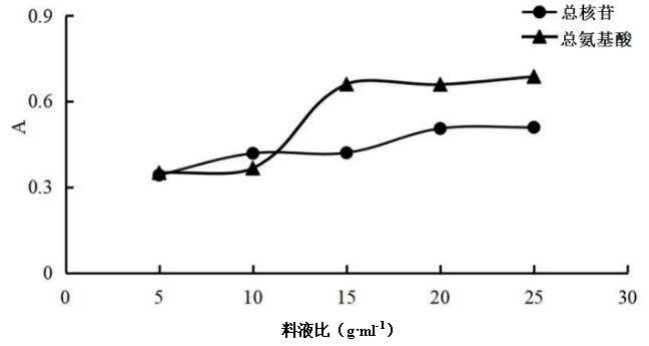


图 3 料液比单因素考察

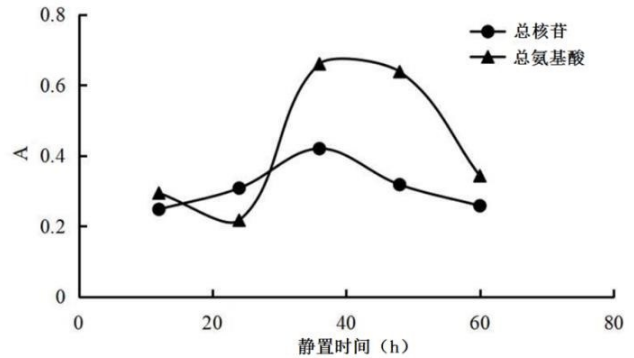


图 4 静置时间单因素考察

2.4.4 提取次数单因素考察 按“2.1.1”项下提取方法,按料液比 1:15 加入纯水进行超声提取,提取次数分别为 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次,提取时间为 45 min,醇沉浓度为 70%,静置 36 h,制备瓜蒌皮样品溶液。按“2.2.2”项下方法测定不同提取次数的总核苷及总氨基酸吸光度值。不同提取次数下总核苷和总氨基酸吸光度 A,见图 5。由图 5 可知,在提取次数为 4 次时,总核苷和总氨基酸吸光度较高,暂定提取次数为 4 次。

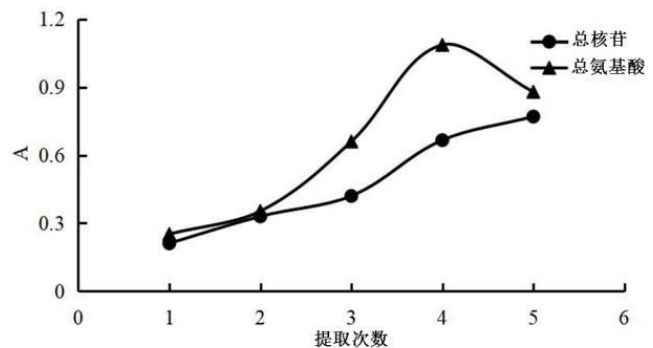


图 5 提取次数单因素考察

2.4.5 醇沉浓度单因素考察 按“2.1.1”项下提取方法,按料液比 1 : 15 加入纯水进行超声提取,提取次数分别为 4 次,提取时间为 45 min,醇沉浓度分别为 50%、60%、70%、80%、90%,静置 36 h,制备瓜蒌皮样品溶液。按“2.2.2”项下方法测定不同醇沉浓度下的总核苷及总氨基酸吸光度值。不同醇沉浓度下总核苷和总氨基酸吸光度 A,见图 6。由图 6 可知,在醇沉浓度为 60%时,总核苷和总氨基酸吸光度较高,暂定醇沉浓度为 60%。

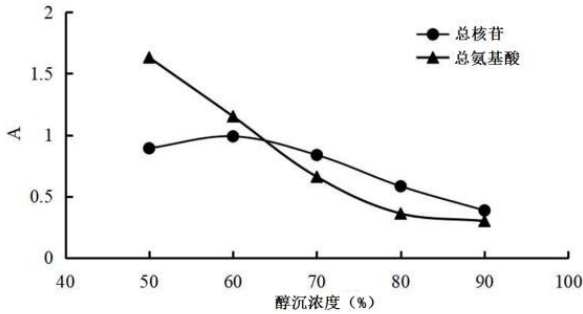


图 6 醇沉浓度单因素考察

2.4.6 提取时间单因素考察 按“2.1.1”项下提取方法,按料液比 1 : 15 加入纯水进行超声提取,提取次数分别为 4 次,提取时间为 25 min、35 min、45 min、55 min、65 min,醇沉浓度为 60%,静置 36 h,制备瓜蒌皮样品溶液。按“2.2.2”项下方法测定不同提取时间下的总核苷及总氨基酸吸光度值。不同提取时间下总核苷和总氨基酸吸光度 A,见图 7。由图 7 可知,在提取时间为 55 min,总核苷和总氨基酸吸光度较高,暂定提取时间为 55 min。

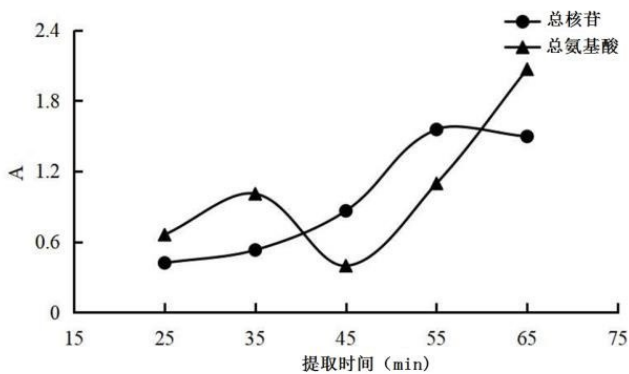


图 7 提取时间单因素考察

2.5 响应面优化设计 将单因素中获得的最优条件为 0 条件代码带入 Design-Expert 8.0.6 软件,选择料液比(A)、提取时间(B)、醇沉百分比(C)、静置时间(D)为考察因素,以总核苷和总氨基酸为评价指标,采

用四因素三水平 $L_{27}(3^4)$ 共计 29 组实验进行响应面优化,确定最佳提取工艺。

2.5.1 响应面优化设计 在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 响应面优化试验原理进行优化试验设计,选取影响总核苷和总氨基酸最大的 4 个因素:料液比(A)、提取时间(B)、醇沉浓度(C)、静置时间(D),并将这 4 个因素进行响应面优化试验组合,响应面分析因素水平设计见表 3。

表 3 响应面分析因素水平

水平	A:料液比/ (g · ml ⁻¹)	B:提取时 间/min	C:醇沉浓 度/%	D:静置时 间/h
-1	1 : 10	45	50	24
0	1 : 15	55	60	36
1	1 : 20	65	70	48

2.5.2 Box-Behnken 试验结果 通过响应面优化设计,共进行 29 组试验,结果见表 4。

表 4 Box-Behnken 试验安排及结果

序 号	A:料液比/ (g · ml ⁻¹)	B:提取时 间/min	C:醇沉浓 度/%	D:静置时 间/h	总核苷 吸光度	总氨基 酸吸光度
1	1 : 20	65	60	36	0.632	1.657
2	1 : 10	45	60	36	0.501	1.211
3	1 : 15	55	60	36	0.768	1.401
4	1 : 15	55	60	36	0.668	1.188
5	1 : 15	55	70	48	0.645	0.899
6	1 : 20	55	50	36	0.489	1.240
7	1 : 15	45	50	36	0.632	1.450
8	1 : 20	55	60	24	0.695	1.715
9	1 : 10	55	50	36	0.530	0.945
10	1 : 15	65	70	36	0.742	0.969
11	1 : 15	65	60	48	0.634	0.848
12	1 : 10	65	60	36	0.750	1.328
13	1 : 10	55	70	36	0.504	1.018
14	1 : 10	55	60	48	0.630	0.852
15	1 : 15	45	70	36	0.512	1.013
16	1 : 15	55	70	24	0.323	0.848
17	1 : 20	55	70	36	0.459	0.919
18	1 : 20	45	60	36	0.275	0.671
19	1 : 15	45	60	24	0.292	0.835
20	1 : 15	55	60	36	0.710	0.992
21	1 : 15	55	60	36	0.638	1.129
22	1 : 15	45	60	48	0.522	0.903
23	1 : 15	55	50	48	0.650	0.911
24	1 : 10	55	60	24	0.602	1.599
25	1 : 15	65	60	24	0.693	1.328
26	1 : 20	55	60	48	0.471	0.920
27	1 : 15	65	50	36	0.531	1.307
28	1 : 15	55	50	24	0.840	2.168
29	1 : 15	55	60	36	0.799	1.118

2.5.3 响应面回归模型各项方差分析

2.5.3.1 总核苷响应面回归模型各项方差分析 使

用 Design-Expert 8.0.6 软件对 Box-Behnken 设计数据处理,以总核苷吸光度为指标进行线性、2FI、二项式、三项式方程拟合。总核苷吸光度以二项式回归为最优,其回归方程分别为:总核苷 = $0.72 - 0.04A + 0.10B - 0.041C + 8.917 \times 10^{-3} D + 0.027AB - 1.000 \times 10^{-3} AC - 0.063AD + 0.083BC - 0.072BD + 0.13CD - 0.11A^2 - 0.084B^2 - 0.066C^2 - 0.048D^2$ 。见表 5。

由表 5 方差分析和显著性检验结果可知,对于核苷模型 $F = 2.5, P < 0.05$,说明实验采用的二次多项式回归方程模型是显著的;失拟项 $P = 0.1324$,无显著性差异,说明此回归模型拟合程度较好,因此可通过这个模型来反映瓜蒌皮中总核苷的提取工艺中各因素与响应值之间的关系。

表 5 核苷响应面回归模型各项方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P	
模型	0.41	14	0.03	2.50	0.0487	significant
A:料液比	0.021	1	0.021	1.74	0.2087	
B:提取时间	0.13	1	0.13	11.00	0.0051	
C:醇沉百分比	0.02	1	0.02	1.67	0.2166	
D:静置时间	9.54×10^{-4}	1	9.54×10^{-4}	0.081	0.7803	
AB	2.92×10^{-3}	1	2.92×10^{-3}	0.25	0.6269	
AC	4.00×10^{-6}	1	4.00×10^{-6}	3.39×10^{-4}	0.9856	
AD	0.016	1	0.016	1.34	0.2656	
BC	0.027	1	0.027	2.32	0.1500	
BD	0.021	1	0.021	1.77	0.2048	
CD	0.066	1	0.066	5.55	0.0336	
A ²	0.073	1	0.073	6.15	0.0265	
B ²	0.045	1	0.045	3.84	0.0704	
C ²	0.028	1	0.028	2.39	0.1446	
D ²	0.015	1	0.015	1.29	0.2754	
残差	0.17	14	0.012			
失拟项	0.15	10	0.015	3.27	0.1324	not significant
纯误差	0.018	4	4.50×10^{-3}			
总和	0.58	28				

2.5.3.2 总氨基酸响应面回归模型各项方差分析
使用 Design-Expert 8.0.6 软件对 Box-Behnken 设计数据处理,以总氨基酸吸光度为指标进行线性、2FI、二项式、三项式方程拟合。总氨基酸吸光度以二项式回归为最优,其回归方程分别为:总氨基酸 = $1.17 + 0.013A + 0.11B - 0.2C - 0.26D + 0.22AB - 0.099AC + 0.025BC - 0.14BD + 0.33CD + 0.027A^2 - 0.040B^2$

$- 0.019C^2 - 3.883 \times 10^{-3} D^2$ 。见表 6。由表 6 方差分析和显著性检验结果可知,对于氨基酸模型 $F = 2.49, P < 0.05$,说明实验采用的二次多项式回归方程模型是显著的;失拟项 $P = 0.1116$,无显著性差异,说明此回归模型拟合程度较好,因此可通过这个模型来反映瓜蒌皮中总氨基酸的提取工艺中各因素与响应值之间的关系。

表 6 氨基酸响应面回归模型各项方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P	
模型	2.21	14	0.16	2.49	0.0497	significant
A:料液比	1.98×10^{-3}	1	1.98×10^{-3}	0.031	0.8625	
B:提取时间	0.15	1	0.15	2.41	0.1431	
C:醇沉百分比	0.46	1	0.46	7.28	0.0173	
D:静置时间	0.84	1	0.84	13.23	0.0027	
AB	0.19	1	0.19	2.97	0.1066	
AC	0.039	1	0.039	0.61	0.4473	
AD	9.92×10^{-4}	1	9.92×10^{-4}	0.016	0.9023	

表 6(续) 氨基酸响应面回归模型各项方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	P	
BC	2.45×10^{-3}	1	2.45×10^{-3}	0.039	0.8471	
BD	0.075	1	0.075	1.180	0.2952	
CD	0.43	1	0.430	6.740	0.0212	
A ²	4.81×10^{-3}	1	4.81×10^{-3}	0.076	0.7871	
B ²	0.011	1	0.011	0.170	0.6902	
C ²	2.44×10^{-3}	1	2.44×10^{-3}	0.038	0.8475	
D ²	9.78×10^{-5}	1	9.78×10^{-5}	1.54×10^{-3}	0.9692	
残差	0.89	14	0.063			
失拟项	0.80	10	0.080	3.560	0.1116	not significant
纯误差	0.09	4	0.022			
总和	3.10	28				

2.5.4 响应面分析与优化 使用 Design-Expert 8.0.6 软件,选择对各指标有显著影响的 2 个因素,根据总核苷和总氨基酸模型回归方程分别绘制料液比、提取时间、醇沉浓度、静置时间对总核苷和总氨基酸吸光度值的响应面图。从图 8 和图 9 三维效应图可知各影响因素间的交互作用对响应值的影响,曲面越陡说明影响越大。从图 8 可知总核苷吸光度值 A 受料液比和提取时间影响较大。从图 9 可知总氨基酸吸光度值 A 受静置时间和醇沉浓度影响较大。

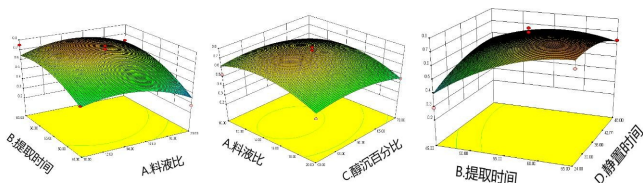


图 8 各因素交互作用对总核苷的影响

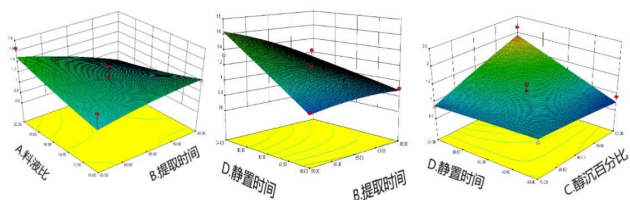


图 9 各因素交互作用对总氨基酸的影响

2.6 优选工艺的验证 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对提取工艺进行优化,得到的优化工艺条件为 A = 1 : 16.60, B = 62.32 min, C = 50%, D = 24 h。根据实验的实际操作情况,确定最佳工艺条件为 A = 1 : 15, B = 60 min, C = 50%, D = 24 h, 即选择料液比 ($g \cdot ml^{-1}$) 为 1 : 15, 提取时间为 60 min, 醇沉浓度为 50%, 静置时间为 24 h。根据该工艺条件,经 5 次平行验证试验,总核苷吸光度 A 平均值为 0.785, RSD = 0.42%, 模型的预测结果为 0.788, 结果显示实际测定

结果与模型预测结果差值为 0.003; 总氨基酸吸光度 A 平均值为 2.112, RSD = 0.07%, 模型的预测结果为 2.168, 结果显示实际测定结果与模型预测结果差值为 0.056, 表明优化后的提取工艺可行。

3 讨论

瓜蒌皮注射液为瓜蒌皮经水煎煮 4 次共计 4 h 后减压浓缩并加入 90% 乙醇使含醇量为 70%, 静置 72 h 后进一步精制后制得的灭菌溶液。鉴于瓜蒌皮注射液用药不便, 本研究后期拟对瓜蒌皮注射液进行剂型改进制备瓜蒌皮缓释微丸。鉴于瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸的生理活性, 本研究拟在瓜蒌皮提取的过程中, 同时最大可能地保留总核苷和总氨基酸的含量。为此, 对瓜蒌皮的提取工艺进行了考察。课题组前期比较了回流提取和超声提取对瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸含量的影响, 发现无统计学意义。但超声提取法提取时间短、提取效率高, 有其独特的优势, 为此, 本研究采用了超声提取法提取瓜蒌皮中总核苷和总氨基酸。

瓜蒌皮样品溶液在 259 nm 处的吸收峰不明显, 可能原因是瓜蒌皮中多种核苷类物质在 259 nm 附近的光谱叠加所致。结合课题组前期采用薄层色谱-紫外光谱联用^[18-20]对核苷的分离分析和本文的方法学验证可知, 选择 259 nm 作为总核苷的测定波长方法可靠。瓜蒌皮中的氨基酸虽然较稳定, 但在测定过程中受水浴的影响, 各组需要降至相同温度后进行定容, 减小温度波动对量瓶体积的影响, 降低测量误差。在前期大量预实验的基础上, 先进行了各影响因素较大梯度的考察, 再进行单因素考察并通过 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面优化获得最佳提取工艺。利用该提取工艺可最大程度地保留瓜蒌皮提取物中总核苷和总氨基酸的含量, 为后期的瓜蒌皮提取物的深入研究和开发利用奠定了基础。

(下转第 233 页)

tion in predicting fluid responsiveness under different ventilation modes in anaesthetized dogs[J]. Clin pharmacol physiol, 2018, 45(9):983-988.

- [4] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组,《中华胰腺病杂志》编辑委员会,《中华消化杂志》编辑委员会. 中国急性胰腺炎诊治指南(2019, 沈阳)[J]. 中华胰腺病杂志, 2019, 19(5):321-331.
- [5] 洪毅,叶建荣,郑宏,等. 每搏变异度与维持低中心静脉压对半肝切除术患者肝肾功能和出血量的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(9):844-846.
- [6] 谢文强,张强,李长科,等. 基于每搏变异度的液体疗法对老年患者术后认知功能障碍的防治效果观察[J]. 现代诊断与治疗, 2019, 30(15):2657-2659.

- [7] 苏建伟,周喜汉,黄桂柳,等. 低分子肝素钙在急性胰腺炎治疗中的应用效果[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(5):529-531.
- [8] 陈鹏,徐颖鹤,张超,等. 每搏变异度对有自主呼吸的感染性休克患者容量反应预测[J]. 浙江医学, 2015, 37(9):724-727,737.
- [9] 罗彦,黄建会,李兰兰. 每搏变异度在脓毒症机械通气患者液体复苏中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(15):2141-2143.
- [10] 李跃东,周翔,王亚朋. 每搏变异度、脉搏压变异度的变化评价感染性休克患者容量反应性的临床研究[J]. 中国医刊, 2016, 51(10):91-94.

收稿日期:2021-10-27;修回日期:2021-11-19

(上接第 217 页)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020:116.
- [2] 杨发满,黄新,敬泽慧. 瓜蒌皮注射液治疗老年急性缺血性脑病患者应用分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(6):1415-1417.
- [3] 郭玉洪,赵洋洋,刘原,等. 瓜蒌皮治疗心血管疾病的作用机制及临床应用概况[J]. 中国药房, 2019, 30(21):3013-3018.
- [4] 刘岱琳,曲戈霞,王乃利,等. 瓜蒌的抗血小板聚集活性成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(12):1334-1336.
- [5] 胡超群,薛慧文,郑书臣,等. 瓜蒌皮提取物对缺血缺氧心肌细胞保护效果及抗氧化能力研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(3):15-18.
- [6] 倪杰,周果,顾建国. 瓜蒌皮注射液在冠心病慢性心力衰竭患者中的疗效观察[J]. 南通大学学报(医学版), 2020, 40(6):586-587.
- [7] 瓜蒌皮注射液. 国家药品标准[S]. 北京:国家食品药品监督局, 2008:10, 27.
- [8] 洪国君,鄢海燕,邹纯才. Box-Behnken 响应面优化瓜蒌中皂苷的提取工艺研究[J]. 皖南医学院学报, 2019, 38(5):421-424.
- [9] 洪燕龙,杜守颖,杨刚,等. 瓜蒌皮药材及其注射液中总氨基酸的含量测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3):10-12.
- [10] 徐汝明,陆阳,陈泽乃. 紫外分光光度法测定贝母中腺苷、胸苷含量[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(11):42-43.
- [11] 杨丽,王伯初. 瓜蒌皮与薤白提取物中主要物质含量测定条件的优化[J]. 食品工业, 2017, 38(6):200-205.
- [12] 胡京枝,董小海,余大杰. 紫外分光光度法测定含乳饮料中游离氨基酸含量[J]. 中国食品添加剂, 2007(6):164-166.
- [13] 王辉,句荣辉,王丽,等. 响应面法优化柿子多糖脱蛋白工艺研究[J]. 北京农业职业学院学报, 2021, 35(5):77-83.
- [14] 符玉将,姜熙林,张帅,等. 响应面法优化海南砂仁多糖的提取工艺研究[J]. 海南医学院学报, 2021, 27(6):467-471, 476.
- [15] 黄金月,崔英芳,郑时嘉,等. 响应面优化黄精根茎总皂苷、总黄酮提取方法及其在不同产地黄精成分含量比较中的应用[J]. 中医药学报, 2021, 49(9):56-61.
- [16] 孙科,李德慧,孙铂铭,等. 灵香草中多酚提取工艺优化研究[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(3):245-249.
- [17] 潘廷啟,文全泰,肖林彬,等. 正交设计优化金樱子多糖的超声提取工艺[J]. 右江民族医学院学报, 2012, 34(4):465-467.
- [18] 黄红兵,江英桥. 赤芝子实体总核苷的含量测定及薄层色谱鉴别[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(3):61-62.
- [19] 曾棋平,曹毅祥,黄丽珊,等. 复方首乌藤合剂的薄层鉴别和总黄酮的含量测定[J]. 药学实践杂志, 2016, 34(5):424-427.
- [20] 尚莹莹,胡辉,刘源才. 金樱子配方颗粒提取工艺优化及质量标准、指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2018, 29(14):1922-1927.

收稿日期:2021-12-02;修回日期:2022-01-17