

Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺

李洁^{1,2}, 石晓峰^{1,2,3*}, 叶倩女², 董学风², 张家旭², 马趣环^{2,3}, 刘东彦^{2,3}(1.兰州市食品药品检验检测研究院, 甘肃省种植中药材外源性污染物监测工程研究中心, 兰州 730050; 2.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 3.甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050)

摘要: 目的 优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺。方法 以 HPLC 测得的芍药苷和白藜芦醇得率为指标, 采用综合评分法, 在提取功率、液料比、提取温度、提取时间、乙醇浓度和提取次数 6 个单因素试验的基础上, 通过 Plackett-Burman 试验从中遴选显著因素, 进而采用 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺。结果 优化得到的超声提取工艺为乙醇浓度 75%、液料比 30 mL·g⁻¹、提取功率 210 W、温度 50.0 °C、提取 50 min、提取 2 次。在此最佳工艺下, 芍药苷和白藜芦醇的得率分别为 5 472.43, 1 633.11 μg·g⁻¹, 实测值与预测值基本相符。结论 优化得到的紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺合理, 可为其后续的应用研究提供参考。

关键词: 紫斑牡丹籽壳; 超声提取工艺; 芍药苷; 白藜芦醇; Plackett-Burman 试验; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0068-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.008

引用本文: 李洁, 石晓峰, 叶倩女, 等. Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 68-74.

Optimization of the Ultrasonic Extraction Process of the Seed Coat from *Paeonia rockii* (S. G. Haw. et. Laeuner) T. Hanget. T. J. Li by Plackett-Burman Design Combined with Box-Behnken Response Surface Method

LI Jie^{1,2}, SHI Xiaofeng^{1,2,3*}, YE Qiannyu², DONG Xuefeng², ZHANG Jiayu², MA Quhuan^{2,3}, LIU Dongyan^{2,3}
(1.Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Gansu Provincial Engineering Research Center for Monitoring Exogenous Pollutants of Planting Chinese Medicinal Materials, Lanzhou 730050, China; 2.Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 3.Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the ultrasonic extraction technology of oligostilbene and monoterpene glycosides from the seed coat of *Paeonia rockii*(S. G. Haw. et. Laeuner)T. Hanget. T. J. Li. **METHODS** Take paeoniflorin and resveratrol measured by HPLC as indicators, using comprehensive scoring method, on the basis of 6 single factor experiments of extraction power, liquid-to-material ratio, extraction temperature, extraction time, ethanol concentration and extraction times, select significant factors by the Plackett-Burman test, and then optimize the ultrasonic extraction process of oligostilbene and monoterpene glycosides from the seed coat of *Paeonia rockii*(S. G. Haw. et. Laeuner)T. Hanget. T. J. Li by the Box-Behnken response surface method. **RESULTS** The optimized ultrasonic extraction process was as follows: ethanol concentration 75%, liquid-to- material ratio 30 mL·g⁻¹, ultrasonic power 210 W, temperature 50.0 °C, extraction 50 min, extraction 2 times. Under this optimal process, the contents of paeoniflorin and resveratrol were 5 472.43 and 1 633.11 μg·g⁻¹, and the measured values were basically in agreement with the predicted values. **CONCLUSION** The optimized ultrasonic extraction process of oligostilbene and monoterpene glycosides from the seed coats of *Paeonia rockii*(S. G. Haw. et. Laeuner)T. Hanget. T. J. Li is reasonable, it can provide reference for its follow-up application research which can provide a reference for its subsequent application research.

KEYWORDS: the coat of *Paeonia rockii*(S. G. Haw. et. Laeuner)T. Hanget. T. J. Li; ultrasonic extraction process; paeoniflorin; resveratrol; Plackett-Burman test; Box-Behnken response surface method

紫斑牡丹 *Paeonia rockii*(S. G. Haw. et. Laeuner) T. Hanget. T. J. Li 与凤丹牡丹(*Paeonia ostii* T. Hong et J. X. Zhang)统称为油用牡丹^[1], 其籽油的不饱和

脂肪酸高达 90%左右, 富含亚油酸和亚麻酸^[2-5], 于 2011 年列入新资源食品。在牡丹籽油的生产过程中, 产生了大量的籽壳和饼粕废弃物^[6]。文献报

基金项目: 甘肃省药品监督管理局 2022 年度科研计划项目(2022GSMPA0070); 甘肃省省级中医药科研课题(GZK-2017-44)

作者简介: 李洁, 女, 副主任中药师 E-mail: 751946605@qq.com *通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师 E-mail: 1394368511@qq.com

道^[7-10], 牡丹籽壳含有的主要化学成分是低聚芪类、单萜苷类和黄酮类等化合物, 其中低聚芪类和单萜苷类化合物具有多种药理活性^[11-12], 是一种潜在的药用部位。为了开发利用牡丹籽壳, 本实验以白藜芦醇和芍药苷分别代表低聚芪类和单萜苷类化合物, 以 HPLC 测得的芍药苷和白藜芦醇的得率为评价指标, 在提取功率、液料比、提取温度、提取时间、乙醇浓度和提取次数 6 个单因素试验的基础上, 通过 Plackett-Burman 设计结合 Box-Behnken 响应面法优化紫斑牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的超声提取工艺, 以期为其后续的应用研究提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪[配置 DAD 检测器, 岛津企业管理(中国)有限公司]; SBL-10DT 型恒温超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); ME204/02 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; RV10 型旋转蒸发仪(德国 IKA 公司); IQ700 型超纯水机(默克密理博公司); QE-100 型高速粉碎机(浙江屹立工贸有限公司); 药典检验 4 号筛(浙江上虞市华丰五金仪器有限公司)。

1.2 试剂

芍药苷(批号: 110736-201842; 纯度: 97.4%)、白藜芦醇(批号: 111535-201703; 纯度: 99.4%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(德国默克公司, 色谱纯, 批号: SHBJ8804), 其他试剂为分析纯; 水为自制超纯水。本实验所用紫斑牡丹籽壳来源于甘肃中川牡丹产业有限公司, 原植物经该公司高级工程师赵潜龙鉴定为紫斑牡丹 *Paeonia rockii* (S. G. Haw. et. Laeuner) T. Hanget. T. J. Li。

2 方法与结果

2.1 芍药苷和白藜芦醇的得率测定方法

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品芍药苷 40.55 mg、白藜芦醇 18.79 mg, 分别置于 25, 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 得到单一对照品溶液; 分别精密吸取芍药苷、白藜芦醇对照品溶液 3, 1 mL, 置于同一 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 摇匀, 配制成浓度分别为 947.9, 373.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芍药苷和白藜芦醇混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取粉碎过四号筛的牡丹籽壳样品, 约 1.0 g, 精密称定, 置于锥形瓶

中, 精密加入 70%乙醇 20.0 mL, 超声处理 40 min (功率 210 W、温度 50 $^{\circ}\text{C}$), 过滤, 滤渣再按上述方法重复操作提取 1 次, 合并滤液, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 减压回收溶剂至干, 残渣用甲醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: CAPCELL PAK-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~20 min, 5% \rightarrow 10%A; 20~50 min, 10% \rightarrow 30%A; 50~50.1 min, 30% \rightarrow 50%A; 50.1~55 min, 50% \rightarrow 90%A; 55~58 min, 90%A; 58.1~60 min, 90% \rightarrow 5%A); 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 检测波长: 228 nm(芍药苷)、305 nm(白藜芦醇)。柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μL 。

2.1.4 系统适用性试验 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL , 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果表明, 芍药苷和白藜芦醇的色谱峰与其相邻色谱峰的分度均 >1.5 , 保留时间分别为 22.125, 42.501 min。理论板数以芍药苷和白藜芦醇计均 $>5\ 000$, 色谱图见图 1。

2.1.5 方法学考察 分别精密吸取“2.1.1”项下的

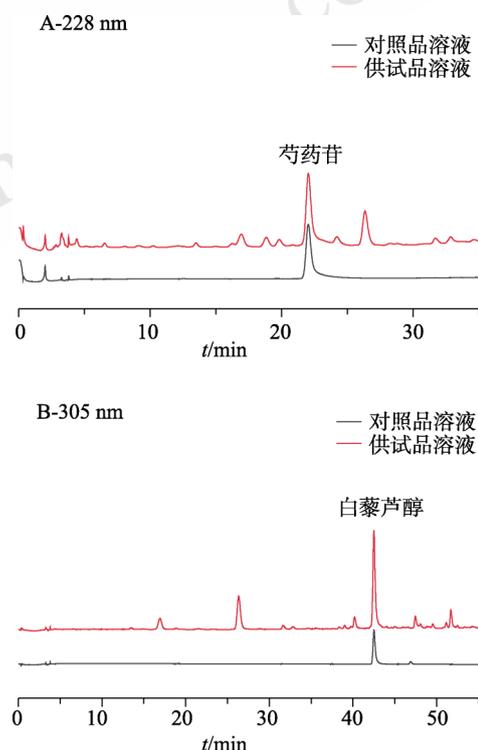


图 1 混合对照品和供试品溶液的高效液相色谱图
A-芍药苷; B-白藜芦醇。

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed control and sample solution
A-paeoniflorin; B-resveratrol.

混合对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容, 配置成系列浓度的混合对照品溶液, 依照“2.1.3”项下的色谱条件进样 10 μL , 测定峰面积。以对照品溶液的浓度(C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 各成分对应的峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得芍药苷、白藜芦醇的回归方程分别是 $Y=16\ 176C-26\ 317(r=0.999\ 7)$ 和 $Y=49\ 439C-834\ 234(r=0.999\ 6)$ 。结果表明芍药苷、白藜芦醇浓度分别在 18.96~189.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、7.471~74.71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与其各自峰面积呈良好的线性关系。

精密吸取浓度分别为 75.83, 29.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芍药苷和白藜芦醇混合对照品溶液 10 μL , 依照“2.1.3”项下色谱条件进样测定峰面积, 测得芍药苷和白藜芦醇峰面积的 RSD 值分别为 1.17%, 0.57%($n=6$), 表明仪器精密度良好。

精密称取粉碎过四号筛的牡丹籽壳样品 1.0 g, 按“2.1.2”项下方法操作制备供试品溶液, 依照“2.1.3”项下的色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样 10 μL 测定, 测得芍药苷和白藜芦醇峰面积的 RSD 值分别为 0.81%和 1.70%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

精密称取粉碎过四号筛的牡丹籽壳样品 1.0 g, 6 份, 按“2.1.2”项下方法操作制备供试品溶液, 依“2.1.3”项下的色谱条件进样 10 μL 测定峰面积, 计算得到芍药苷和白藜芦醇的平均得率和 RSD 值分别为 5 353.41, 1 622.93 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1.46%, 0.53%($n=6$), 表明该方法的重复性良好。

称取已知得率的粉碎过四号筛的牡丹籽壳样品 9 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 按样品中芍药苷和白藜芦醇得率的 80%, 100%, 120%加入芍药苷、白藜芦醇对照品, 平行 3 份, 按“2.1.2”项下方法操作制备加样回收率试验用供试品溶液, 依照“2.1.3”项下色谱条件进样 10 μL 测定峰面积, 计算得到芍药苷和白藜芦醇的平均回收率和 RSD 值($n=9$)分别为 98.73%, 98.83%和 1.13%, 1.31%, 表明该方法回收率好。结果见表 1。

2.2 单因素试验考察超声提取工艺

对牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物超声提取工艺的 6 个影响因素(提取功率、液料比、提取温度、提取时间、乙醇浓度和提取次数)进行单因素试验, 采用综合评分法^[13-15], 给予芍药苷和白藜芦醇得率相同的权重系数, 即芍药苷、白

表 1 加样回收试验($n=9$)

Tab. 1 Results of recovery tests($n=9$)

成分	称样量/ g	样品量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
芍 药 苷	0.501 2	2.649 6	2.117 0	4.766 5	4.732 3	98.73	1.13
	0.500 9	2.648 0	2.117 0	4.764 9	4.720 5		
	0.501 7	2.652 2	2.117 0	4.769 2	4.769 2		
	0.500 8	2.647 4	2.638 3	5.285 8	5.210 2		
	0.500 5	2.645 9	2.638 3	5.284 2	5.250 3		
	0.501 0	2.648 5	2.638 3	5.286 8	5.301 2		
	0.500 3	2.644 8	3.159 7	5.804 5	5.765 2		
	0.501 5	2.651 1	3.159 7	5.810 8	5.736 0		
	0.502 8	2.658 0	3.159 7	5.817 7	5.800 5		
白 藜 芦 醇	0.501 2	0.856 1	0.672 4	1.528 5	1.516 3	98.83	1.31
	0.500 9	0.855 6	0.672 4	1.528 0	1.502 0		
	0.501 7	0.857 0	0.672 4	1.529 4	1.526 2		
	0.500 8	0.855 4	0.859 2	1.714 6	1.712 1		
	0.500 5	0.854 9	0.859 2	1.714 1	1.700 7		
	0.501 0	0.855 8	0.859 2	1.714 9	1.719 0		
	0.500 3	0.854 6	1.027 2	1.881 8	1.861 1		
	0.501 5	0.856 6	1.027 2	1.883 9	1.879 6		
	0.502 8	0.858 9	1.027 2	1.886 1	1.880 0		

藜芦醇得率占比均为 50%。综合评分(OD 值)=(得率_{芍药苷}/得率最高值_{芍药苷}×50%+得率_{白藜芦醇}/得率最高值_{白藜芦醇}×50%), 以综合评分为评价指标。

默认提取工艺: 精密称取粉碎过四号筛的牡丹籽壳样品 1.0 g, 6 份, 置于锥形瓶中, 分别加入 70%乙醇 30.0 mL, 于功率 210 W、水温 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 50 min, 滤过, 滤渣再同法操作提取 1 次, 合并 2 次的滤液, 后续操作同“2.1.2”项。

2.2.1 提取功率对芍药苷和白藜芦醇得率的影响
提取功率分别为 150, 180, 210, 240, 270, 300 W 对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 当提取功率为 210 W 时, 芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分达到最大值, 故选择提取功率为 180, 210, 240 W。

2.2.2 液料比对芍药苷和白藜芦醇得率的影响
液料比分别为 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1, 50 : 1 和 60 : 1($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 当液料比为 30 : 1($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)时, 芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分基本达到了最大值, 故选择液料比为 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)。

2.2.3 提取时间对芍药苷和白藜芦醇得率的影响
提取时间分别为 30, 40, 50, 60, 70, 80 min 对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 当提取时间为 50 min 时, 芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分基本达到峰值, 故选择提取时间为 40,

50, 60 min。

2.2.4 提取温度对芍药苷和白藜芦醇得率的影响

提取温度分别为 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C 对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 当提取温度为 50 °C 时, 芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分达最大值, 故选择提取温度为 40, 50, 60 °C。

2.2.5 乙醇浓度对芍药苷和白藜芦醇得率的影响

乙醇浓度分别为 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 当乙醇浓度为 70% 时, 芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分达最大值, 故选择乙醇浓度为 60%, 70%, 80%。

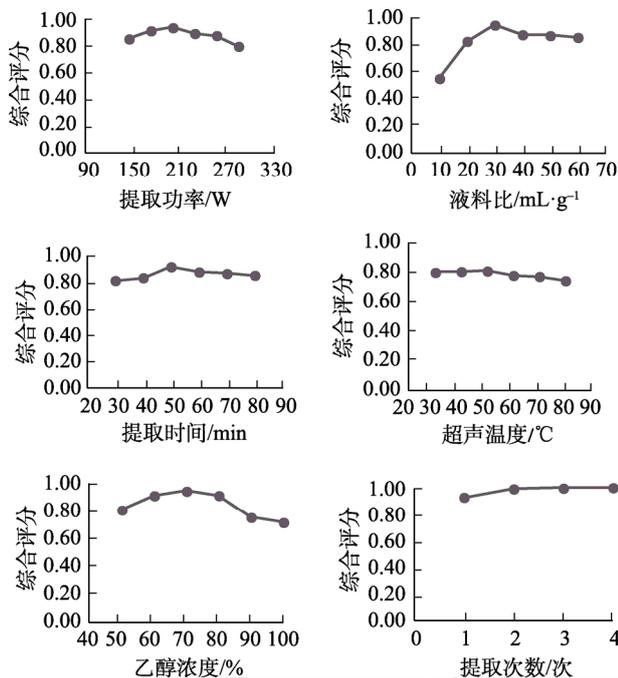


图 2 单因素试验的结果

Fig. 2 Results of the single factor test charts

2.2.6 提取次数对芍药苷和白藜芦醇得率的影响

提取次数分别为 1, 2, 3, 4 次对提取工艺综合评分的影响结果见图 2。结果显示, 芍药苷和白藜芦醇得率在提取 2 次时达到了 4 次总提取量的 95% 以上, 故选择提取次数为 1, 2, 3 次。

2.3 Plackett-Burman 试验筛选显著性因素

为了克服单因素太多造成的试验组数较多的问题, 在单因素试验的基础上, 采用 Plackett-Burman 试验通过比较各因素 2 水平之间的差异与整体性的差异以确定主要影响因素, 以降低试验次数和成本。

2.3.1 Plackett-Burman 试验设计及结果 选取提

取功率、液料比、提取温度、提取时间、乙醇浓度和提取次数 6 个影响因素, 依据单因素试验结果, 确定低水平与高水平(-1, +1)的值, 运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 6 因素 2 水平的试验设计, 共 12 次试验, 每个试验重复 3 次。因素水平及编码见表 2。试验结果见表 3, 响应值以牡丹籽壳提取液中芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分计。

表 2 Plackett-Burman 试验设计因素水平及编码

Tab. 2 Experiment design factor levels and coding of Plackett-Burman

因素	编码	低水平(-1)	高水平(+1)
提取功率/W	X1	180	240
液料比/mL·g ⁻¹	X2	20	40
提取时间/min	X3	40	60
超声温度/°C	X4	40	60
乙醇浓度/%	X5	60	80
提取次数/次	X6	1	3

表 3 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Tab. 3 Experimental design and response values of Plackett-Burman

编号	X1	X2	X3	X4	X5	X6	平均得率/μg·g ⁻¹		OD 值
							芍药苷	白藜芦醇	
1	180	40	40	60	80	1	5 192.93	1 463.77	0.87
2	240	20	60	60	80	1	4 610.15	1 319.12	0.78
3	180	40	60	40	80	3	5 539.45	1 452.11	0.90
4	180	40	60	60	60	1	4 683.79	1 391.23	0.81
5	240	40	60	40	60	1	4 824.40	1 380.10	0.82
6	180	20	40	60	60	3	5 346.17	1 434.23	0.88
7	240	20	60	60	60	3	5 190.21	1 404.62	0.85
8	240	20	40	40	80	1	4 533.63	1 284.09	0.76
9	180	20	60	40	80	3	5 074.82	1 386.33	0.84
10	180	20	40	40	60	1	4 133.57	1 193.51	0.70
11	240	40	40	60	80	3	5 492.25	1 521.63	0.91
12	240	40	40	40	60	3	5 096.44	1 456.17	0.86

2.3.2 Plackett-Burman 试验结果分析 运用

Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行回归分析和显著性检验, 结果见表 4。

由表 4 可以看出, 该模型显著。各因素对牡丹籽壳提取液中芍药苷和白藜芦醇得率影响的显著性顺序依次为 X6(提取次数)>X2(液料比)>X4(超声温度)>X5(乙醇浓度)>X1(提取功率)>X3(提取时间)。其中提取次数对提取液中得率的影响达到了非常显著的水平($P<0.01$), 液料比对得率的影响达到了显著水平($P<0.05$), 其他因素影响不显著, 根据 F 值的大小, 其他因素影响的大小为 X4(超声温度)>X5(乙醇浓度)>X1(提取功率)>X3(提取时间)。

表4 Plackett-Burman 试验设计各因素效应评价

Tab. 4 Effect evaluation of each factor under Plackett-Burman test design

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
Model	0.037	6	6.228×10^{-3}	7.41	0.022 0	$P < 0.05$
X1	3.333×10^{-5}	1	3.333×10^{-5}	0.040	0.850 0	
X2	0.011	1	0.011	12.86	0.015 8	$P < 0.05$
X3	3.333×10^{-5}	1	3.333×10^{-5}	0.040	0.850 0	
X4	4.033×10^{-3}	1	4.033×10^{-3}	4.80	0.080 0	
X5	1.633×10^{-3}	1	1.633×10^{-3}	1.94	0.222 0	
X6	0.021	1	0.021	24.80	0.004 2	$P < 0.01$
残差	4.200×10^{-3}	5	8.400×10^{-4}			
总差	0.042	11				

校正系数 $R^2=0.899 0$, $R^2_{Adj}=0.777 7$

2.4 Box-Behnken 响应面法优化超声提取工艺

2.4.1 Box-Behnken 响应面法试验及结果 根据单因素试验和 Plackett-Burman 试验结果, 将提取时间、提取功率和提取次数 3 个因素固定为 50 min、210 W 和 2 次, 选取对提取液中芍药苷和白藜芦醇得率影响显著的因素: 液料比(A)、超声温度(B)和乙醇浓度(C)为响应面模型的自变量进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计, 共 17 次试验, 每个试验重复 3 次。以芍药苷和白藜芦醇得率的综合评分为响应值进行响应面分析。因素的水平见表 5, 结果见表 6。

表5 Box-Behnken 试验设计因素水平

Tab. 5 Factors and levels of Box-Behnken test

因素	水平		
	-1	0	1
液料比(A)/mL·g ⁻¹	20	30	40
超声温度(B)/°C	40	50	60
乙醇浓度(C)/%	60	70	80

2.4.2 响应面模型的建立及分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件, 对表 6 得到的试验数据进行回归分析, 得到 OD 值(Y)对液料比(A)、超声温度(B)和乙醇浓度(C)的三元二次回归模型, $Y=5.00+0.062A+0.052B+0.10C+5.000 \times 10^{-5}AB-1.500 \times 10^{-4}AC+1.250 \times 10^{-4}BC-8.725 \times 10^{-4}A^2-5.975 \times 10^{-4}B^2-6.975 \times 10^{-4}C^2$, 方差分析结果见表 7。该模型的 $P < 0.000 1$, 说明该模型方程达到了极显著的水平; 失拟项 $P=0.736 3$, 说明拟合误差不显著, 各因素对响应值的影响大小为 $C > A > B$ 。

2.4.3 响应面分析 通常等高线的形状能反映交互作用的大小, 若呈椭圆形, 说明两因素的交互作用显著, 若呈圆形则正好相反。响应面曲线的

表6 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab. 6 Design and results of Box-Behnken experiment

编号	A/mL·g ⁻¹	B/°C	C/%	平均得率/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		OD 值
				芍药苷	白藜芦醇	
1	20	40	70	4 724.73	1 208.11	0.76
2	30	40	60	4 713.75	1 234.13	0.76
3	40	50	80	5 058.31	1 316.79	0.82
4	30	60	80	5 519.93	1 441.37	0.89
5	40	40	70	4 850.56	1 264.42	0.79
6	40	50	60	4 748.62	1 247.16	0.77
7	30	50	70	5 582.68	1 537.84	0.93
8	30	50	70	5 585.75	1 539.91	0.93
9	30	50	70	5 604.31	1 571.62	0.94
10	40	60	70	5 201.55	1 366.15	0.84
11	20	60	70	4 865.47	1 290.89	0.79
12	30	40	80	5 038.72	1 335.67	0.82
13	30	50	70	5 718.21	1 589.72	0.95
14	30	50	70	5 720.50	1 593.51	0.96
15	30	60	60	4 815.23	1 251.28	0.78
16	20	50	80	5 026.91	1 350.65	0.83
17	20	50	60	4 402.14	1 180.84	0.72

表7 回归模型方差分析结果

Tab. 7 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	0.096	9	0.011	82.41	<0.000 1
A	0.014	1	0.014	108.88	<0.000 1
B	6.945×10^{-3}	1	6.945×10^{-3}	53.72	0.000 2
C	0.018	1	0.018	140.26	<0.000 1
AB	1.000×10^{-4}	1	1.000×10^{-4}	0.77	0.408 3
AC	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	6.96	0.033 5
BC	6.250×10^{-4}	1	6.250×10^{-4}	4.83	0.063 9
A ²	0.032	1	0.032	247.92	<0.000 1
B ²	0.015	1	0.015	116.27	<0.000 1
C ²	0.020	1	0.020	158.44	<0.000 1
残差	9.050×10^{-4}	7	1.293×10^{-4}		
失拟项	2.250×10^{-4}	3	7.500×10^{-5}	0.44	0.736 3
纯误差	6.800×10^{-4}	4	1.700×10^{-4}		
总差	0.097	16			

校正系数 $R^2=0.990 7$, $R^2_{Adj}=0.978 6$

陡峭程度也说明两因素交互作用显著。A 和 C、B 和 C 之间有一定的交互作用, 见图 3。

2.5 验证试验

从回归方程求得牡丹籽壳低聚芪类和单萜苷类提取的最佳工艺条件: 液料比为 $30.65 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 、超声温度为 $52.12 \text{ }^\circ\text{C}$ 、乙醇浓度为 73.08% , 综合评分为 0.95 , 考虑到实际操作的简便性和可操作性, 选取液料比 $30 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 超声温度为 $50.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 乙醇浓度为 75% , 修改后工艺的综合评分为 0.96 , 在该条件下进行 3 次平行验证试验。测得芍药苷和白藜芦醇的得率分别为 $5 472.43$, $1 633.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 综合评分为 0.94 , 与计算值的相对偏差为 -1.58% 。

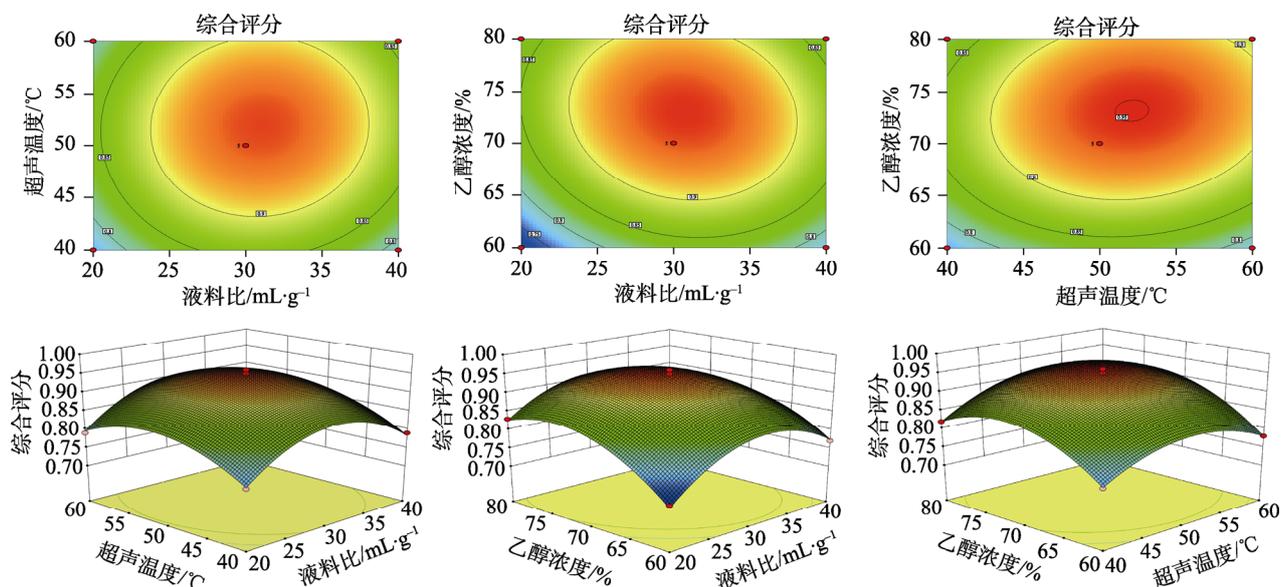


图3 各因素(料液比、超声温度、乙醇浓度)交互作用对综合评分影响的等高线和响应面图

Fig. 3 Contour lines and response surface diagrams of the interaction of various factors(solid-liquid ratio, ultrasonic temperature and ethanol concentration) on the comprehensive scoring

3 讨论

苷类化合物在天然植物中广泛存在,是一类极性较大的化合物,可溶于水、乙醇等极性较大的溶剂中。天然的芪类化合物具有酚羟基,呈弱酸性,一般能溶于强碱溶液和各种极性较大的溶剂中。超声提取法是利用超声波产生高速、强烈的空化效应和搅拌作用,以破坏植物药材的细胞,促使溶剂渗透到细胞中,所以本研究选用超声提取法,用乙醇溶液同时提取籽壳中的低聚芪类和单萜苷类成分,具有提取时间短、提取率高的特点。

本研究建立了 HPLC 同时测定籽壳中芍药苷和白藜芦醇的方法,参考中国药典 2020 年版一部白芍含量测定项下^[16],以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相,由于籽壳提取液中有部分的脂溶性成分,等度洗脱的话,杂质对体系的影响较大,故进行梯度洗脱,该体系基线平稳,目标成分保留时间适宜,分离效果好,杂质成分对体系的干扰小。由于牡丹籽壳中的主要成分是低聚芪类和单萜苷类,两者同等重要,所以在综合评分的比例上给予了相同的权重系数,优化出了一种同时提取芪类和单萜苷类化合物的超声方法。在修约最佳提取工艺时,将提取温度修约为 50 ℃,是因为芍药苷具有热不稳定性^[17]。最后的验证结果与预测值的综合评分接近,表明该模型设计合理,操作可行,稳定可靠,对牡丹籽壳中低聚芪类和单萜苷类化合物的提取工艺具有实际指导意义。

目前,紫斑牡丹的栽培逐年增加,产生的籽壳等废弃物也会越来越多,对于紫斑牡丹籽壳中化学成分和提取工艺的研究以实验室研究为主,下一步有待侧重产业化方面纯化工艺的研究。另外,对其所含中药活性成分的药理学研究有待进一步深入,为其临床应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] LS/T 3242—2014(牡丹籽油)[S]. 2014-11-17.
- [2] MAO C X, LI G H, LI P X, et al. Analysis of triglycerides composition structure and physicochemical properties of peony seed oil[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2014, 30(4): 142-146.
- [3] QI J C, ZHOU H M, MA J Q, et al. Analysis of the chemical constituents in peony seed oil by GC-MS[J]. J Cereals Oils(粮食与油脂), 2005, 18(11): 22-23.
- [4] LIU J H, CHENG C G, WANG X, et al. Analysis of fatty acids in *Paeonia suffruticosa* Andr. seeds[J]. Chem Anal Meterage(化学分析计量), 2006, 15(6): 30-31.
- [5] WANG C T, ZHANG P, DONG Y M. The technique of the extraction of oil from peony seed with supercritical CO₂ extraction method and the analysis of the composition[J]. J Chin Cereals Oils Assoc(中国粮油学报), 2009, 24(8): 96-99, 107.
- [6] DENG R X, YANG X, QU C X, et al. Chemical compositions in different parts of the seeds of three *Paeonia* species[J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40(8): 141-148.
- [7] HE C N. Study on the pharmacophylogenetic significance of the *Paeonia* in China[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2010.
- [8] 吴静义. 牡丹籽化学成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学,

- 2014.
- [9] MENG Q H. Study on separation, antioxidant and anti-fatigue capacity of flavonoids from peony testa[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2013.
- [10] NIU Y Q. Study on extraction and purification of oligostilbenes and monoterpene glycoside compounds from the byproducts of peony for oil[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2015.
- [11] LIU J, LIU B, SHE G M, et al. Advances in research of chemical constituents and pharmacological activities of monoterpene glucosides[J]. *Drugs Clin(现代药物与临床)*, 2010, 25(2): 81-93.
- [12] ZHAO Y M, GUO Y, SHANG J N. Distribution and biological activity of stilbenoid compounds[J]. *Sci Technol Chem Ind(化工科技)*, 2015, 23(1): 77-80.
- [13] YIZITI PALIHATI, MA J W, LIU Y, et al. Optimization of water extraction process of Jianpi Qushi Concentrated Pills by Box-Behnken response surface methodology[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志)*, 2019, 26(5): 92-97.
- [14] ZHOU F J, HUANG M, PENG X J, et al. Optimization of the extraction technology of oligosaccharides from the flowers of *Osmanthus fragrans* by Uniform design[J]. *West China J Pharm Sci(华西药学杂志)*, 2017, 32(1): 63-66.
- [15] 刘东平, 张文朋, 李端. 多指标试验结果的数据处理[J]. *包头医学院学报*, 2015, 31(10): 127-128.
- [16] 中国药典. 一部[S]. 2020: 108-109.
- [17] TANG A L, ZHENG Y, SONG Y, et al. Thermal stability of paeoniflorin in water extract and concentrated solution of Shujing Fangtong capsules[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2015, 21(7): 24-26.
- 收稿日期: 2021-11-08
(本文责编: 蔡珊珊)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com