

失效模式分析结合 Box-Behnken 优化大孔吸附树脂分离纯化益心泰总皂苷工艺

陆慧玲, 邹苏兰, 郭志华, 李 雅

(湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] **目的:**采用失效模式分析(failure mode and effects analysis, FMEA)结合 Box-Behnken 响应面优化大孔吸附树脂分离纯化益心泰总皂苷工艺参数以提升工艺效率和稳健性。**方法:**用 D-101 型大孔吸附树脂(macroporous resin, MAR)对益心泰复方的总皂苷进行纯化,通过 FMEA 筛选纯化工艺的关键工艺参数,采用 Box-Behnken 响应面法,以总皂苷质量分数和总皂苷回收率为关键工艺评价指标,对益心泰总皂苷进行纯化工艺优选,得出益心泰总皂苷最佳分离纯化工艺。**结果:**通过 FMEA 设计确定了上样液质量浓度、吸附流速、洗脱剂体积分数及洗脱剂体积 4 个影响因素作为总皂苷分离提纯的关键因素;Box-Behnken 实验方差分析结果显示所建立模型的 P 值均 <0.05 ,表明所建立的模型有较好的预测能力。最终筛选出用 D-101 型大孔吸附树脂分离纯化益心泰总皂苷的工艺参数为:上样液质量浓度 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 90.0%、吸附流速 $1.7 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、洗脱剂体积 1.6 BV。**结论:**失效模式分析结合 Box-Behnken 优化大孔吸附树脂分离纯化益心泰总皂苷工艺稳定可靠,回收所得的皂苷类成分回收率和纯度均较高,为分离纯化益心泰中总皂苷提供了实验数据和思路,具有一定的参考价值和应用前景。

[关键词] 失效模式分析;Box-Behnken;大孔吸附树脂;益心泰;总皂苷;工艺参数

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)01-0057-08

Separation and purification of Yixintai total saponins by macroporous adsorption resin using failure mode and effects analysis combined with Box-Behnken

LU Hui-ling, ZOU Su-lan, GUO Zhi-hua, LI Ya

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the parameters in separation and purification processes of Yixintai total saponins, by using failure mode and effects analysis (FMEA) combined with Box-Behnken response surface design. **Methods:** The total saponins of Yixintai Compound were purified with macroporous resin (MAR), and the key process parameters of the purification process were screened by FMEA. Taking the recovery rate and mass fraction of saponins as evaluation indicators, the Box-Behnken design was used to optimize the MAR purification process of Yixintai total saponins. The optimal parameters were finally obtained in separation and purification processes of Yixintai total saponins. **Results:** FMEA determined four influencing factors, including the mass concentration of the sample solution, eluent volume fraction, the adsorption flow rate and the volume of the eluent as the key factors for the separation and purification of total saponins. The P values of the models established by Box-Behnken design were all below 0.05, indicating that the models had good predictive abilities. The obtained best parameters were as follows: the mass concentration of the sample solution is $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the ethanol volume fraction is 90.0%, the adsorption flow rate is $1.7 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$, and the eluent volume is 1.6 BV. **Conclusion:** The separation and purification

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82174343);湖南省自然科学基金资助项目(2021JJ30495);湖南省研究生教育创新工程和专业能力提升工程项目(CX20200760);湖南中医药大学中药学一流学科项目(校行科学[2018]3号)

[作者简介] 陆慧玲,女,硕士研究生,主要从事中药新药研究与开发工作。E-mail:1094144694@qq.com。

[通讯作者] 李雅,女,博士,硕士生导师,教授,主要从事中药新药研究与开发工作。E-mail:liyali12@163.com。

method obtained by failure mode analysis combined with Box-Behnken optimization was stable and reliable, with high recovery rate and purity of saponins. This method is suitable for purifying Yixintai total saponins.

[Key words] failure mode and effects analysis; Box-Behnken; macroporous resin; Yixintai; total saponins; parameters

益心泰复方是湖南中医药大学附属第一医院郭志华教授的临床科研方,由黄芪、丹参、红花等7味中药组成,具有益气活血、利水消肿之功效。方中以黄芪为君药,补气升阳、生津养血,丹参和红花为臣药,加强君药活血祛瘀之功效^[1-2]。益心泰复方已在临床运用数十年,可有效改善心肌梗死及慢性心衰^[3-4]。益心泰复方中皂苷类成分主要由黄芪贡献,以黄芪甲苷为主,对多种心肌细胞损伤模型具有显著的保护作用,具有改善心肌供血、能量代谢和抗心肌细胞凋亡等强心作用^[5-6],为益心泰复方中改善心衰的主要有效成分之一。对益心泰复方中的总皂苷成分进行分离纯化研究,得到高效的分离纯化工艺以及高纯度的总皂苷成分,可以在研究益心泰中总皂苷成分的药理作用、起效机制以及总皂苷成分在益心泰复方中改善心衰的贡献程度等方面起到巨大作用,为益心泰复方后期开发利用提供支持。

失效模式与效应分析法(failure mode and effect analysis, FMEA)是常见的一种风险评估技术^[7],通过严重程度(S)、发生概率(O)和检测难易程度(D)评定和赋值,对风险进行量化,三者的得分值相乘得到风险评估系数(risk priority number, RPN),对工作流程进行前瞻性评估,通过识别风险、挖掘问题原因、制定措施、优化流程,避免或减少问题的发生^[8-9]。FMEA目前广泛应用于医疗工作中高风险程序的前瞻性分析^[10]。

本实验通过FMEA筛选出影响纯化工艺的关键因素,采用Box-Behnken响应面法,以皂苷类成分的回收率和质量分数为评价指标,用大孔吸附树脂对益心泰复方进行分离纯化工艺优选,以期得出高效、稳健的总皂苷分离纯化工艺参数。

材料与amp;方法

1 仪器

Agilent 1200 series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);WGL-230B 电热鼓风干燥箱(泰斯特仪器有限公司);UV755B 紫外-可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);AE224C 电子天平(舜宇

恒平科学仪器有限公司)。

2 试药与试剂

益心泰所用饮片黄芪(批号:19082607)、红花(批号:19092004)、泽泻(批号:19080202)、丹参(批号:19050806)、茯苓(批号:19091009)、葶苈子(批号:18112505)、猪苓(批号:19071209)均购自湖南振兴中药有限公司;黄芪甲苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:100080-202011,规格:20 mg);香兰素(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200803,规格:100 g);冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司,批号:20210906,规格:500 mL)。

3 方法

3.1 总皂苷含量测定

3.1.1 对照品溶液的制备 精密称取5.00 mg 黄芪甲苷对照品置于10 mL 容量瓶中,甲醇定容,摇匀,制成 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芪甲苷对照品溶液。

3.1.2 供试品的制备 量取1 mL 洗脱液放入10 mL 容量瓶中,甲醇定容,取0.3 mL 放在具塞试管中,挥干,加入5% 香草醛-冰醋酸溶液0.20 mL、高氯酸0.80 mL,置于水浴60 ℃加热15 min后,取出冰浴5 min,加入5 mL 冰醋酸,摇匀即得。

3.1.3 检测波长的测定 精密吸取对照品溶液0.5 mL、洗脱浓缩液0.5 mL、离心后复方提取液0.5 mL,分别置于10 mL EP管中,分别加入5% 香草醛-冰醋酸溶液0.20 mL、高氯酸0.80 mL,密塞,60 ℃水浴加热15 min,取出后冰浴5 min,加入5 mL 冰醋酸,摇匀即得。以相应的试剂为空白对照,于300 ~ 800 nm 波长处扫描,结果表明最大吸收在556 nm 处。

3.1.4 标准曲线的建立^[11] 精密吸取对照品溶液0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mL,置于10 mL EP管中,水浴挥干后分别加入5% 香草醛-冰醋酸溶液0.20 mL、高氯酸0.80 mL,60 ℃水浴加热15 min,冰浴5 min,最后加入5 mL 冰醋酸,摇匀即得。以相应的试剂为空白对照,在556 nm 处测定其吸光度。以黄芪甲苷对照品液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,相应的吸收度(Abs)为纵坐标,回归方程为 $Y = 8.2079X - 0.0009$, $R^2 = 0.9991$,表明黄芪甲苷在 $0.0450 \sim 0.0900 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与吸光度线性关系良好。

3.1.5 精密度实验 精密吸取 $0.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的黄芪甲苷对照品溶液 0.5 mL 共 6 份,分别水浴挥干,按“3.1.4”项下方法测吸光度,计算 RSD 为 0.84% ,说明仪器精密度良好。

3.1.6 重复性实验 平行取 6 份供试品溶液 0.5 mL ,水浴挥干,按“3.1.4”项下方法测吸光度,计算其 RSD 为 2.72% ,表明该方法重复性良好。

3.1.7 稳定性实验 取 0.5 mL 供试品溶液于置于 10 mL 的 EP 管中,水浴挥干,按“3.1.4”项下方法测吸光度,于显色后 $0, 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 \text{ h}$ 测定其吸光度,计算其 RSD $< 3.00\%$,表明供试品在 24 h 内稳定。

3.1.8 加样回收率实验 取含量已知的 1 mL 供试品溶液 9 份,分别精密加入相应含量为 $80\%, 100\%, 120\%$ 的对照品溶液,按“3.1.4”项下方法显色。结果显示黄芪甲苷加样回收率分别为 $98.64\%, 98.89\%, 97.45\%$ 。RSD 分别为 $3.01\%, 3.03\%, 3.13\%$,表明方法准确性良好。

3.2 大孔吸附树脂预处理与再生^[12]

树脂的预处理: 95% 乙醇浸泡 D-101 型大孔吸附树脂 24 h ,充分溶胀后湿法装柱,使用 95% 乙醇冲洗,直至洗出溶液与水混合 ($1:2$),混合液清澈不混浊,最后使用蒸馏水冲洗至无乙醇味,即得。

树脂的再生: 用无水乙醇将使用过的大孔吸附树脂洗脱至无色,再用 5% HCl 溶液浸泡 $3 \sim 4 \text{ h}$,大量水洗至中性后,用 5% NaOH 溶液浸泡 $3 \sim 4 \text{ h}$,最后用纯水洗至中性,即得。

3.3 上样液的制备和质量浓度考察

上样液制备: 取益心泰复方,加入 6 倍量 70% 乙醇加热回流 60 min , 200 目筛网过滤,收集滤液,药渣加 4 倍量 70% 乙醇继续加热回流 30 min , 200 目筛网过滤,收集滤液。合并 2 次滤液,浓缩至原体

积的 $1/10, 3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,使用纯水稀释至皂苷质量浓度分别为 $0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

上样液质量浓度考察: 根据浓缩液总皂苷质量浓度,配制不同浓度的上样液。取等体积的上样液,以 $1.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的体积流速上 D-101 型大孔吸附树脂柱,然后用 3 BV 的纯水,以 $2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的体积流速冲洗,把糖类等水溶性物质洗脱下来,弃去水洗液,再用 $3 \text{ BV} 60\%$ 乙醇以 $2.0 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 体积流速洗脱,收集洗脱液,分别测定皂苷质量分数和皂苷回收率,进行单因素考察。

3.4 FMEA 设计

总皂苷的分离纯化工艺鱼骨图见图 1,用 FMEA 对各纯化工艺参数的影响进行定量风险评估,通过 S, O 和 D 对工艺参数的风险进行量化,评分原则见表 1。结合实际生产经验以及前期研究基础对各工艺参数的 S, O 及 D 赋值,将三者的得分值相乘得到 RPN,即 $\text{RPN} = \text{S} \times \text{O} \times \text{D}$ 。通过分析比较各因素的 RPN,选出本实验的考察因素。

表 1 工艺参数评分原则

属性	评分等级	评分标准
S	4	高:参数小的波动就能对工艺产生严重的影响
	3	中:只有参数在较大范围内波动时才能对工艺产生严重影响
	2	低:参数的波动对工艺的影响始终较小
	1	参数的波动对工艺几乎没有影响
O	3	偏离设定值或产生较大波动的可能性较大
	2	偏离设定值或产生较大波动的可能性较小
	1	始终很稳定,不易偏离设定值或产生波动
D	3	发生异常时,很难被检测到
	2	发生异常时,偶尔被检测到
	1	只要发生异常,就能被检测到

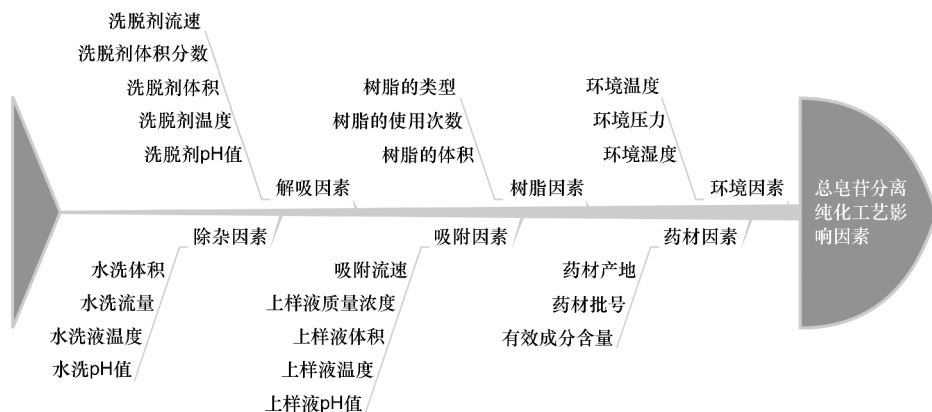


图 1 益心泰总皂苷分离纯化鱼骨图

3.5 Box-Behnken 设计

3.5.1 Box-Behnken 响应面因素与水平 根据 FMEA 对益心泰总皂苷成分纯化工艺的影响因素评估结果,筛选出较为显著的影响因素,并在 3 个水平上进行优化研究,以益心泰总皂苷质量分数和总皂苷回收率为响应指标,建立数学模型优化处方。

3.5.2 模型拟合和方差分析 采用 Design-Expert 10.0 软件对各因素进行二次多元回归拟合,得到总皂苷质量分数(Y_1)和总皂苷回收率(Y_2)二项多次回归模型方程。

3.5.3 Box-Behnken 设计对益心泰复方中总皂苷提取工艺优化效果验证 通过 Design-Expert 10.0 软件对上述数学模型进行综合优化分析,得到最优条件并进行验证。

结 果

1 上样液的质量浓度考察结果

综合上样液质量浓度对皂苷质量分数和回收率的影响结果,发现上样液质量浓度对皂苷质量分数影响不大,而皂苷回收率在 $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 间波动较大,当上样液质量浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,皂

苷回收率最高,而在 $0.8 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 间波动幅度趋于稳定,表明上样液质量浓度在 $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 间皂苷回收率存在最大值,初步确定上样液质量浓度范围为 $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,进行下一步实验。结果见表 2。

表 2 上样液质量浓度考察结果

上样液质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	皂苷质量分数/%	皂苷回收率/%
0.2	23.4	30.8
0.5	26.1	77.9
0.8	24.0	65.7
1	26.0	69.4
1.5	27.4	57.7
2	26.7	61.2
2.5	28.8	61.8

2 FMEA 设计结果

由表 3 结果可知计算风险优先数最大数值为 36,因此在对影响因素和实验条件综合考虑的基础上,选择分数大于最大风险优先数的一半的 4 个影响因素作为本实验的考察因素,即上样液质量浓度($\text{RPN} = 36$)、洗脱剂体积($\text{RPN} = 36$)、吸附流速($\text{RPN} = 24$)、洗脱剂体积分数($\text{RPN} = 24$)。

表 3 益心泰分离纯化工艺影响因素的 FMEA 评估结果

影响因素	来源	S	O	D	RPN	评分依据
环境因素	环境温度	3	1	1	3	统一实验环境:温度 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$,相对湿度 30% ~ 35%
	环境压力	1	1	1	1	
	环境湿度	2	1	1	2	
药材因素	药材产地	3	1	1	3	本实验过程均采用同一批药材提取
	药材批号	3	1	1	3	
	有效成分含量	3	1	1	3	
树脂因素	树脂的类型	4	1	1	4	所有实验均使用同一树脂,风险较低
	树脂使用次数	3	2	2	12	
	树脂体积	3	1	2	6	
吸附因素	上样液质量浓度	4	3	3	36	吸附因素影响总皂苷的分离纯化效果
	上样液体积	3	3	2	18	
	上样液温度	3	2	1	6	
	上样液 PH 值	4	2	1	8	
	吸附流速	4	3	2	24	
解吸因素	洗脱剂体积分数	4	3	2	24	解吸因素直接影响总皂苷分离纯化的效果
	洗脱剂体积	4	3	3	36	
	洗脱剂温度	3	2	1	6	
	洗脱剂 PH 值	4	2	1	8	
	洗脱剂流速	3	3	2	18	
除杂因素	水洗体积	3	2	2	12	除杂因素均比较好控制,对总皂苷的分离纯化效果影响较小
	水洗流速	3	2	2	12	
	水洗液温度	3	2	1	6	
	水洗液 PH 值	3	2	2	12	

3 Box-Behnken 结果

3.1 Box-Behnken 响应面因素与水平

根据 FMEA 对益心泰总皂苷成分纯化工艺的影响因素评估结果,筛选出 4 个影响因素作为较为显著的影响因素,包括上样液质量浓度(A)、吸附流速(B)、洗脱剂体积分数(C)及洗脱剂体积(D),在 3 个水平上进行了优化研究,以益心泰总皂苷质量分数和总皂苷回收率为响应指标,建立数学模型优化处方。因素水平设计见表 4,设计结

果见表 5。

表 4 Box-Behnken 响应面因素水平设计

编码	因素	水平		
		-1	0	1
A	上样液质量浓度/mg·mL ⁻¹	0.2	0.5	0.8
B	吸附流速/BV·h ⁻¹	1	1.5	2
C	乙醇体积分数/%	30	60	90
D	洗脱液体积/BV	1	3	5

表 5 Box-Behnken 响应面设计结果

序号	A	B	C	D	Y ₁ 总皂苷 质量分数/%	Y ₂ 总皂苷 回收率/%	序号	A	B	C	D	Y ₁ 总皂苷 质量分数/%	Y ₂ 总皂苷 回收率/%
2	0.5	1.5(0)	60(0)	3	37.369 8	71.526 4	17	0.5	1.5	60	3	38.039 4	61.865 7
3	0.8(1)	1	60	3	29.236 2	65.012 8	18	0.5	1.5	60	3	38.506 8	85.522 3
4	0.5	2(1)	60	1(-1)	42.880 7	62.130 0	19	0.2	1	60	3	33.137 6	73.049 0
5	0.2(-1)	1.5	30	3	28.782 4	81.236 5	20	0.2	1.5	60	5	18.765 8	85.459 7
6	0.2	2	60	3	22.673 8	76.866 0	21	0.5	1	60	1	29.972 7	74.398 3
7	0.5	1	60	5(1)	32.981 3	58.704 9	22	0.8	1.5	90	3	57.238 8	77.232 4
8	0.5	1.5	60	3	35.890 7	49.002 5	23	0.2	1.5	60	1	39.975 8	65.541 8
9	0.5	1.5	90(1)	1	56.512 5	76.138 3	24	0.5	1.5	90	5	35.737 9	82.678 8
10	0.8	2	60	3	44.705 5	52.016 2	25	0.5	2	60	5	37.382 9	66.573 7
11	0.2	1.5	90	3	35.694 5	67.249 6	26	0.5	1.5	60	3	30.527 3	69.485 6
12	0.5	2	30	3	23.504 7	30.346 6	27	0.5	2	90	3	52.944 6	58.593 9
13	0.5	1.5	30	1	28.684 0	52.379 5	28	0.5	1	90	3	41.263 6	67.114 7
14	0.8	1.5	30	3	30.108 2	37.691 3	29	0.5	1.5	30	5	24.872 8	44.109 8
15	0.8	1.5	60	1	36.303 4	83.709 4							

3.2 模型拟合与方差分析

Box-Behnken 响应面设计结果见表 5,采用 Design-Expert 10.0 软件对各因素进行二次多元回归拟合,得到总皂苷质量分数(Y₁)和总皂苷回收率(Y₂)二项多次回归模型方程。

$Y_1 = 36.07 + 3.67A + 2.25B + 9.41C - 4.92D + 6.48AB + 5.05AC + 2.60AD + 4.67BC - 2.13BD - 4.24CD - 2.74A^2 - 0.3585B^2 + 2.72C^2 - 1.81D^2$ 。
 $R^2 = 0.8828$, $R_{adj}^2 = 0.7656$, 即该方程可以解释 76.56% 实验数据变异的情况;回归模型 $P < 0.05$, 具有显著性差异;失拟项水平差异不具显著性($P > 0.05$)。表明该模型拟合度较好,因素 A, C, D, AB, AC 有显著影响,可以用数学模型进行分析。方差分析结果见表 6,响应面分析图见图 2。

表 6 总皂苷质量分数响应面方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	2 193.15	14	7.53	0.000 3
A	161.81	1	7.78	0.014 5
B	60.74	1	2.92	0.109 6
C	1 062.87	1	51.1	<0.000 1
D	290.93	1	13.99	0.002 2
AB	168.13	1	8.08	0.013
AC	102.2	1	4.91	0.043 7
AD	27.09	1	1.3	0.273
BC	87.24	1	4.19	0.059 8
BD	18.09	1	0.869 6	0.366 9
CD	71.94	1	3.46	0.084 1
A ²	48.75	1	2.34	0.148 1
B ²	0.833 9	1	0.040 1	0.844 2
C ²	48.13	1	2.31	0.150 5
D ²	21.26	1	1.02	0.329 2
残差	291.22	14		
失拟项	248.96	10	2.36	0.212 1
净误差	42.26	4		
总离差	2 484.37	28		

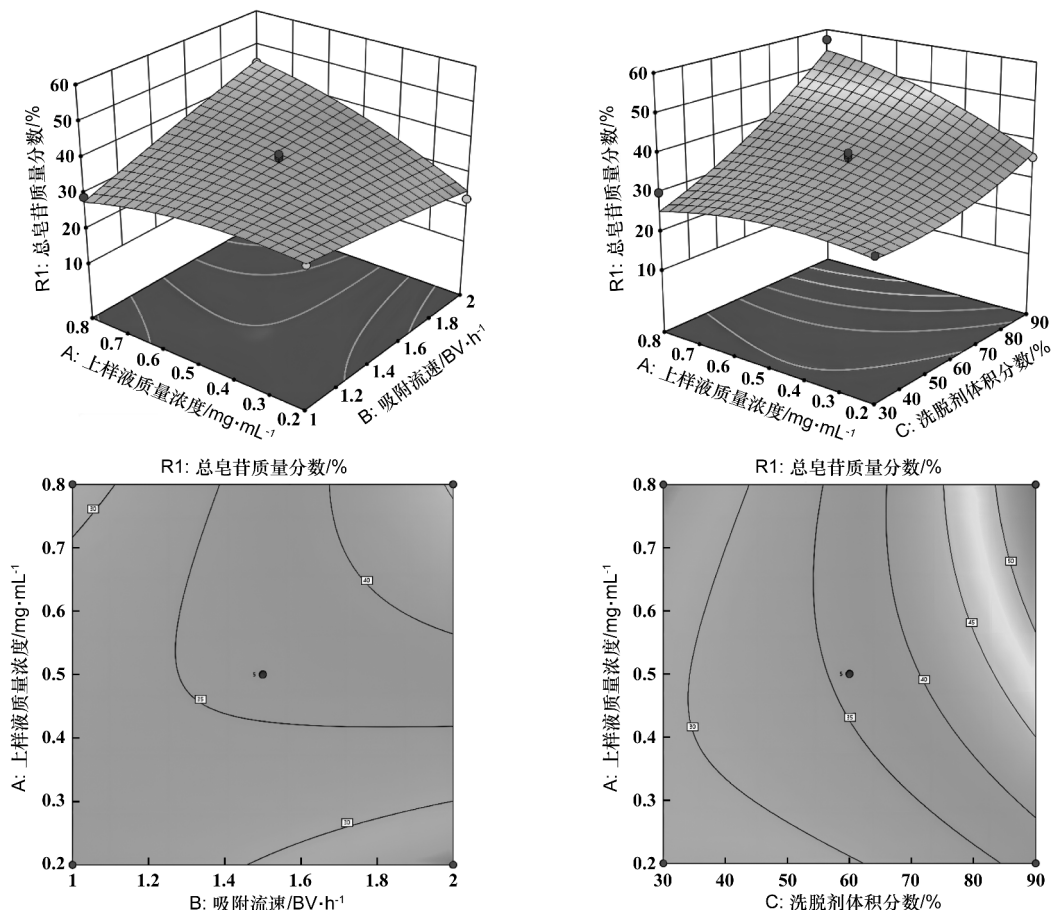
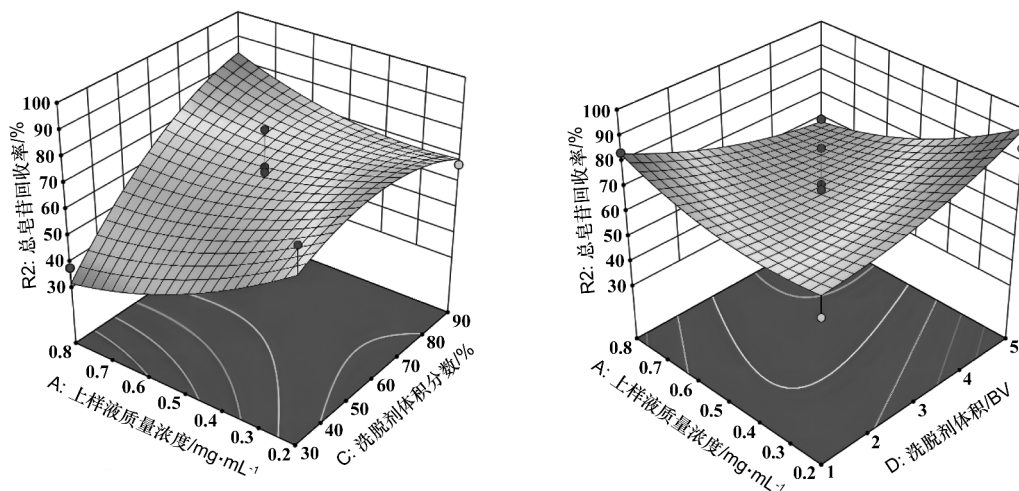


图 2 AB,AC 交互作用对总皂苷质量分数影响的响应面分析图

$Y_2 = 67.48 - 6.18A - 1.83B + 12.75C - 1.43D - 4.20AB + 13.38AC - 11.01AD - 2.16BC + 5.03BD + 3.70CD + 5.67A^2 - 8.03B^2 - 9.28C^2 + 4.02D^2$ 。 $R^2 = 0.8145$, $R^2_{adj} = 0.6291$, 即该方程可以解释 62.91% 实验数据变异的情况; 回归模型 $P < 0.05$, 具有显著

性差异; 失拟项水平差异不显著 ($P > 0.05$)。说明模型拟合度较好, 因素 A, C, AC, AD 有显著影响, 可以用数学模型来分析。方差分析结果见表 7, 响应面分析图见图 3。



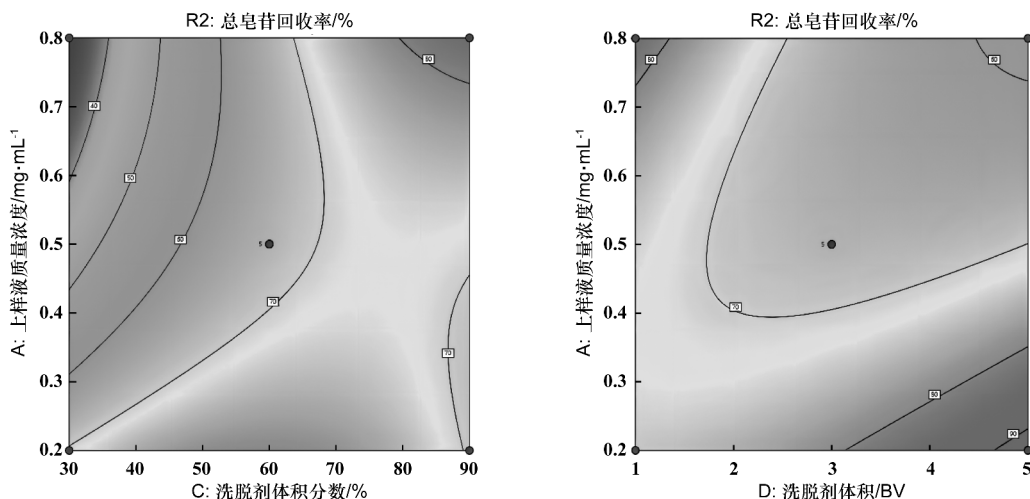


图3 AC,AD交互作用对总皂苷回收率影响的响应面分析图

表7 总皂苷回收率响应面方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	5 457.67	14	4.39	0.004 5
A	458.34	1	5.16	0.039 4
B	40.21	1	0.453	0.511 9
C	1 951.53	1	21.98	0.000 3
D	24.63	1	0.277 5	0.606 6
AB	70.67	1	0.796 2	0.387 3
AC	716.31	1	8.07	0.013 1
AD	485.09	1	5.46	0.034 8
BC	18.72	1	0.210 9	0.653 1
BD	101.38	1	1.14	0.303 3
CD	54.84	1	0.617 7	0.445
A ²	208.71	1	2.35	0.147 5
B ²	418.31	1	4.71	0.047 6
C ²	559.19	1	6.3	0.025
D ²	104.68	1	1.18	0.295 8
残差	1 242.75	14		
失拟项	523.89	10	0.291 5	0.948 2
净误差	718.86	4		
总离差	6 700.41	28		

3.3 Box-Behnken 设计对益心泰复方中总皂苷提取工艺优化效果验证

通过 Design-Expert 10.0 软件对上述数学模型进行综合优化分析,所得最优条件为上样液质量浓度 $0.799\ 617\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 $89.817\ 1\%$ 、吸附流速 $1.705\ 8\ \text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 、洗脱剂体积 $1.622\ 92\ \text{BV}$,考虑到实际应用情况,确定最优条件为上样液质量浓度 $0.80\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 90% 、吸附流速

$1.7\ \text{BV}\cdot\text{h}^{-1}$ 、洗脱剂体积 $1.6\ \text{BV}$,并进行工艺验证实验,预测所得总皂苷质量分数为 63.79% ,总皂苷回收率为 85.94% 。总皂苷质量分数实际测得值为 48.68% ,总皂苷回收率实际测得值为 77.85% 。实测结果与预测结果相差不大,说明 Box-Behnken 实验设计所得的工艺参数具有可行性和可靠性。

讨 论

目前,常用的皂苷类成分纯化技术主要有大孔吸附树脂纯化法^[13-15]、强极性大孔吸附树脂纯化法^[16]等,大孔吸附树脂是一种普遍应用于中药提取液分离纯化中的材料,具有可操作性强、选择性好、生产成本低、再生方便的优势^[17]。而 D-101 型大孔吸附树脂分离纯化在分离纯化皂苷类成分具有明显的优势^[18]。但采用大孔吸附树脂技术对皂苷类成分进行分离纯化会受到许多因素的影响,包括环境因素、上样因素、色谱柱因素等,筛选出对纯化过程起关键影响作用的因素并进行优化有利于提高纯化的效率和稳定性。

FMEA 是一种认清并预防问题发生的风险管理手段,通过评估其 S、O 和 D 计算 RPN 值,使潜在风险量化,确认潜在的失效模式及其效应,有效地对风险进行分级和处理,从而降低过程中风险事件的发生^[19-21]。Box-Behnken 可以将体系的拟合因素和评价指标的函数关系,建立连续变量曲面模型,对影响实验指标的因素水平及其交互作用进行评价,可快速有效地确定多因子系统的最优值^[22-27]。本实验采用 FMEA 结合 Box-Behnken 对大孔吸附树脂分离纯化

益心泰总皂苷进行了优化,FEMA 成功筛选出纯化工艺的关键工艺参数为上样液质量浓度、吸附流速、洗脱剂体积分数及洗脱剂体积。通过 Box-Behnken 响应面法对筛选出的关键工艺进行优化,得出最佳分离纯化工艺为:上样液质量浓度 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 90%、吸附流速 $1.7 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、洗脱剂体积 1.6 BV 。

总皂苷的分离纯化需把 D-101 型大孔吸附树脂经活化后采用湿法上样,用蒸馏水洗去糖类、水溶性杂质,再用一定体积分数的乙醇将皂苷类成分冲洗下来。而上样液的质量浓度与吸附率、解吸率相关,浓度太高或太低会影响吸附率和整体的纯化效率,实验对上样液的质量浓度进行考察时选取了 0.2, 0.5, 0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 这三个连贯波动幅度较大的参数而不是选择 $>0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度除了考虑到总皂苷洗脱率的最高点在 $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间以外,还考虑到采用较低浓度的上样液可以减少前期复方浓缩时间和程度以降低皂苷类成分的损失。此外,水洗体积过小则不足以将糖类和一些水溶性杂质除去,影响皂苷质量分数,过大又会将一部分皂苷洗脱,影响皂苷的回收率。综合考虑将水洗参数设置为 $2 \text{ BV}, 1.5 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。同理,为了使一定浓度的乙醇将皂苷充分地洗脱而又不会将杂质洗脱下来,综合考虑到节省原料和提高工作效率,将乙醇体积分数设计为 30%, 60%, 90%, 乙醇洗脱体积设计为 1, 3, 5 BV 、吸附流速 $1, 1.5, 2 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 。Box-Behnken 设计结果表明,D-101 型大孔吸附树脂在最优条件(上样液质量浓度 $0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、乙醇体积分数 90.0%、吸附流速 $1.7 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 、洗脱剂体积 1.6 BV)下能够得到较好的总皂苷质量分数以及总皂苷回收率。经实验验证表明该工艺具有简便、稳定可靠、易于操作等优点,为中药活性成分的纯化提供一定参考意义,也为下一步对研究益心泰产品复方进一步开发应用和研究提供了技术支持。

[参 考 文 献]

- [1] 张彤瑜, 孙涛, 刘承鑫, 等. 益心泰有效组分对心肌梗死后心力衰竭兔心功能及心肌超微结构的影响[J]. 中南药学, 2020, 18(3): 379-383.
- [2] 魏佳明. 益心泰有效组分调节心衰模型兔心室重构和心肌组织 CaN 活性的作用机理研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [3] 郭志华, 齐婧, 申思, 等. 益心泰对急性心肌梗死患者 ALD 水平的影响[J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(5): 10-11, 15.
- [4] 李庆. 益心泰治疗慢性心力衰竭 160 例临床观察[J]. 实用预防医学, 2010, 17(3): 557-558.
- [5] 唐斌, 张金国, 谭洪勇, 等. 黄芪甲苷对慢性心衰大鼠心肌

纤维化及能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 411-416.

- [6] 孔祥琳, 吕琴, 李运伦, 等. 黄芪甲苷对心脑血管疾病的现代药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2): 218-223.
- [7] LIU HC, ZHANG LJ, PING YJ, et al. Failure mode and effects analysis for proactive healthcare risk evaluation: a systematic literature review[J]. *J Eval Clin Pract*, 2020, 26(4): 1320-1337.
- [8] 陈桢, 李冰韶, 王永洁, 等. 设计空间法优化红花温浸提取工艺[J]. 中草药, 2018, 49(19): 4544-4551.
- [9] 丁琮洋, 邱博, 宋浩静, 等. 失效模式与影响分析中两种方法在临床试验药物管理中的应用[J]. 医药导报, 2022, 41(6): 916-919.
- [10] BABIKER A, AMER YS, OSMAN ME, et al. Failure Mode and Effect Analysis (FMEA) may enhance implementation of clinical practice guidelines: an experience from the Middle East[J]. *J Eval Clin Pract*, 2018, 24(1): 206-211.
- [11] 叶丽华, 叶倩灵, 章晓红, 等. 优化参麦注射液人参总皂苷含量测定方法[J]. 药学研究, 2017, 36(4): 203-205, 242.
- [12] 邹苏兰, 李雅, 李姿锐, 等. 大孔吸附树脂分离纯化益心泰总黄酮工艺的优化[J/OL]. [2022-03-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20211027.0916.002.html>.
- [13] 张琳, 赵凤平, 江敏瑜, 等. Box-Behnken 响应面法优选大孔树脂分离纯化三七总皂苷的工艺研究[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(3): 57-61, 127.
- [14] 崔翰明, 张秋燕, 林海, 等. 三七总皂苷的大孔吸附树脂纯化工艺和质量分析研究[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2177-2182.
- [15] 刘瑞, 裴黎行, 陈佳, 等. 生脉注射液中总糖、总皂苷和总木脂素的含量测定方法建立及应用[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(11): 1112-1118.
- [16] 郭丽冰, 王蕾. 常用大孔吸附树脂的主要参数和应用情况[J]. 中国现代中药, 2006, 8(4): 26-32.
- [17] 胡迎丽, 夏璐, 雷福厚. 大孔吸附树脂在天然产物的分离纯化中的应用进展[J]. 化工技术与开发, 2021, 50(11): 29-34.
- [18] 郭婷婷, 王兆华, 张大军. 大孔树脂分离纯化西洋参叶总皂苷的工艺研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(9): 1196-1200.
- [19] 范静, 乔永洁, 贾秀玲, 等. 失效模式和效应分析在 PIVAS 全肠外营养液调配全流程风险管理的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(17): 1881-1886.
- [20] 胡玉飘, 崔秀明, 张泽君, 等. 失效模式分析和星点设计-效应面法优化三七皂苷类成分纯化工艺[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3009-3016.
- [21] 邱婷婷, 张萌萌, 孔宪伟, 等. 运用医疗失效模式与效应分析方法预防分装药品错误的发生[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(13): 1137-1139.
- [22] 赵莹莹, 李强, 赵学玲, 等. Box-Behnken 响应面法优化姜黄素氧化锌纳米粒的制备工艺[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(19): 2349-2355.
- [23] ZHAO LJ, XIA BH, LIN LM, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic polysaccharide extraction from turpiniae folium based on response surface methodology[J]. *Digital Chin Medicine*, 2018, 1(3): 239-246.
- [24] 艾佳佳, 邓平, 胡鹏翼, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化胶皮处方及胶皮的性能研究[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(2): 192-198.
- [25] 李雅, 易丽娟, 柳兰, 等. Box-Behnken 响应面法结合反向传播神经网络优化益心泰复方浓缩液喷雾干燥工艺研究[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(18): 1715-1723.
- [26] 刘珊珊, 吴琼珠. Box-Behnken 设计-响应面法优化雷贝拉唑钠肠溶微丸片的处方[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(8): 1041-1048.
- [27] 唐玉, 张爱军, 李帅, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法结合 G1-熵权法优化七味蟾参胶囊制剂工艺及其质量标准研究[J]. 中国新药杂志, 2021, 30(10): 953-960.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-06-24