

Box-Behnken 响应面法优选参芪复方颗粒的水提工艺

单丽芳¹, 曹 蕾¹, 杨红梅¹, 袁 彩¹, 宋 英², 谈 静², 高 天^{2*}

¹成都中医药大学, 成都 610075; ²成都中医药大学附属医院, 成都 610072

摘要:根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 在单因素试验基础上, 采用 3 因素 3 水平的响应曲面分析法, 考察了料液比、提取时间及提取次数对参芪复方颗粒水提效果的影响。结果表明, 在料液比(m/V) 1: 10, 提取 3 次, 每次 60 min 的条件下, 综合评分可达 98.90, 为最佳提取工艺。该优选水提工艺稳定, 合理可行, 可用于参芪复方中各药材有效成分的提取。

关键词:参芪复方颗粒; 响应面法; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 黄芪甲苷

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.018

Optimization of Water Extraction Process of Saponins from Shenqi Fufang Granular by Response Surface Methodology

SHAN Li-fang¹, CAO Lei¹, YANG Hong-mei¹, YUAN Cai¹, SONG Ying², TAN Jing², GAO Tian^{2*}

¹Pharmacy college, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; ²The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China

Abstract: Based on the results of single factor test, response surface methodology with 3 factors and 3 levels was applied according to Box-Behnken experimental design principle. The experimental programs were designed to investigate the effects of solid-liquid ratio, extraction duration and times of extraction on water extraction of Shenqi Fufang granular (SFG). The results showed that the optimal extraction process was solid/liquid ratio (m/V) 1: 10, extracted three times with 60 min each time. Under the optimal conditions, the composite score achieved up to 98.90. This optimized process was stable, reasonable and feasible. It can be used as an effective method for the extraction of other medicinal materials from SFG.

Key words: Shenqi Fufang granule; response surface methodology; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; astragaloside

参芪复方颗粒由人参、黄芪、生地、天花粉、丹参、制大黄等 7 味药组成, 具有益气养阴、清热生津、活血化瘀的作用^[1]。主要用以调节血糖、改善症状、防治糖尿病大血管病变等^[2]。目前, 尚没有关于参芪复方颗粒提取工艺的研究报道, 且用其中某一成分作为评价指标较为单一, 很难全面地评价该制剂的提取工艺。为了建立更加全面的参芪复方颗粒的提取工艺, 提高其临床疗效, 以方中君药人参、黄芪的主要药效成分(人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷)的含量及干膏收率的综合评分为评价指标对提取工艺中加水量、提取时间、提取次数 3 个因素进行考察。考虑到各因素之间的交

互作用, 采用了响应面分析法结合 Box-Behnken 设计方法将各个因素与响应值之间的函数关系用多项式进行拟合, 通过对回归方程及响应面分析求得最佳工艺条件^[3,4]。试验中采用单因素实验和响应面分析法对参芪复方颗粒的水提工艺进行优化, 利用 HPLC-ELSD 同时测定 4 种皂苷类成分的含量, 结果稳定可靠, 为规模化生产提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

人参皂苷 Rg₁ (批号: 110703-201128)、人参皂苷 Re (批号: 110754-201324)、人参皂苷 Rb₁ (批号: 110704-201424)、黄芪甲苷 (批号: 110781-201314) 均购于中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯; 其他试剂为分析纯。药材均购自四川省新荷花中药饮片有限公司, 经医院质检部鉴定符合 2010 版中国药

典及四川省中药饮片炮制规范的要求。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(四元梯度泵、自动进样器、Agilent 色谱工作站)、ELSD2000ES 蒸发光散射检测器(美国格雷斯奥泰公司)、BP-211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司);RE-501 旋转蒸发器(上海耀特仪器设备有限公司)。

2 实验方法

2.1 参芪复方颗粒的水提流程

按处方比例扩大 2 倍称取人参、黄芪、生地、天花粉等药材,平行称量 17 份,依一定的料液比加水煎煮(补加饮片吸水率)一定的次数,滤过,合并滤液,将滤液浓缩并定容至 1000 mL,得水提液样品,备用。

2.2 指标成分的定量测定

2.2.1 色谱条件

Phenomenex-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为水(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:0 ~ 3 min, 81% A; 3 ~ 20 min, 81% ~ 78% A; 20 ~ 28 min, 78% ~ 77% A; 28 ~ 33 min, 77% ~ 75% A; 33 ~ 40 min, 75% ~ 65.5% A; 40 ~ 52 min, 65.5% ~ 70% A; 52 ~ 62 min, 70% A; 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 25 °C, 进样体积 10 μL, ELSD 参数:气体流量 2.6 L/min, 漂移管温度 102 °C。

2.2.2 混合对照品溶液的制备

取人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷各 3 mg,精密称定,于 10 mL 的量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含有人参皂苷 R_{g1} 0.2976 mg,人参皂苷 Re 0.3138 mg,人参皂苷 R_{b1} 0.2895 mg,黄芪甲苷 0.2879 mg 的混合对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备^[5,6]

精密量取水提液 25 mL,加水定容至 50 mL,转移至分液漏斗中,用水饱和正丁醇振荡提取 5 次,每次 60 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤 3 次,每次 60 mL,弃去氨液,将正丁醇液于旋转蒸发器上蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 标准曲线的绘制

精密量取混合对照品储备液 0.5、1、3、5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得,人参皂苷 R_{g1} 浓度依次为:0.0149、0.0298、0.0893、

0.1488 mg/mL;人参皂苷 Re 浓度依次为:0.0157、0.0314、0.0942、0.1569 mg/mL;人参皂苷 R_{b1} 浓度依次为:0.0145、0.0286、0.0869、0.1448 mg/mL;黄芪甲苷浓度依次为:0.0144、0.0288、0.0864、0.1439 mg/mL。将不同浓度的混合对照品及母液按“2.2.1”项下色谱条件由低到高分别进样,测定峰面积。以进样量(C)的对数值为横坐标,峰面积(A)的对数值为纵坐标,进行线性回归,得回归方程。人参皂苷 R_{g1} 的回归方程为: $\log A = 1.2 \log C + 3.1895$ ($r = 0.9990$)、人参皂苷 Re 的回归方程为: $\log A = 1.0703C + 3.272$ ($r = 0.9990$)、人参皂苷 R_{b1} 的回归方程为: $\log A = 1.0706 \log C + 3.5732$ ($r = 0.9999$)、黄芪甲苷的回归方程为: $\log A = 1.1139 \log C + 3.4987$ ($r = 0.9997$)。结果表明:人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷分别在 0.1488 ~ 2.9757 μg, 0.1569 ~ 3.1382 μg, 0.1448 ~ 2.8954 μg, 0.1439 ~ 2.8788 μg 范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度实验

按“2.2.1”项下色谱条件,取同一混合对照品连续进样测定 6 次,记录色谱图,测定峰面积值。结果人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷的 RSD 分别为 1.72%、1.91%、0.97%、0.61%,表明精密度良好。

2.2.6 重复性实验

取同一供试品溶液,按“供试品溶液制备”项下方法平行制备 6 份,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,测定峰面积,计算含量的相对标准偏差。人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷含量的 RSD 分别为 2.72%、2.55%、1.44%、2.22%。

2.2.7 加样回收实验

精密量取同一供试品溶液 10 mL,共 3 份,别精密加入混合对照品溶液适量,照供试品溶液制备方法制备,分别测定并计算回收率。人参皂苷 R_{g1} 的平均回收率分别为 99.27%,RSD 为 1.48%;人参皂苷 Re 的平均回收率为 99.33%,RSD 为 1.15%;人参皂苷 R_{b1} 的平均回收率为 99.32%,RSD 为 1.00%;黄芪甲苷的平均回收率为 99.27%,RSD 为 2.43%。

2.2.8 干膏收得率测定

精密吸取各实验设计制备的水提液 25 mL,分别置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 干燥至恒重,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定重量,计算干膏收得率。

2.3 水提工艺单因素试验

设定其它条件不变的情况下,分别考察提取时

间、料液比、提取次数对皂苷含量、干膏收率综合评分的影响(表1)。

表1 水提工艺单因素变化条件

Table 1 Conditions of single factor experiments for water extraction

因素 Factor	单因素变化条件 Single-factor experimental condition						其它条件 Fixed boundary condition	
时间 Time (min)	20	40	60	80	100	120	料液比 1:10	提取 1 次
料液比 Solid-Liquid ratio (g/mL)	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:16	提取 1 次	40 min
提取次数 Times of extraction	1 2 3 4 5						料液比 1:10	提取 40 min

2.4 提取工艺优化

2.4.1 响应面实验设计^[7-9]

根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,综合单因素影响试验,选取提取次数(A)、提取时间(B)、加水量(C)作为考察对象,以人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷含量及干膏收

率的综合评分为响应值,采用 Design-Expert 统计分析软件的响应面分析法安排试验,研究其对皂苷提取率的影响,以获取最适工艺参数。采用 3 因素 3 水平的响应面分析法进行试验设计,并以 -1、0、1 表示自变量的高低水平。各因素水平编码见表 2。

表2 响应面分析因素水平及编码

Table 2 Factors and levels for response surface methodology

因素 Factors	编码水平 Levels		
	-1	0	1
(A) 提取次数 Times of extraction	1	2	3
(B) 提取时间 Extraction duration (min)	40	60	80
(C) 加水量 Solid/liquid ratio (g/mL)	1:6	1:8	1:10

2.4.2 响应面实验中参芪复方颗粒药材的提取和测定指标方法

根据响应面所安排试验,按“2.1”项下方法进行提取,按“2.2”和“2.3”项下方法测定 17 组水提液中皂苷类成分含量及干膏收得率。

综合评分(Z):将综合评分设定为满分 100 分,根据复方中君臣佐使的关系划分人参皂苷、黄芪甲苷的含量及干膏收率权重系数分别为 40、40、20^[9,10]。并在此基础上进行总加权评分,以综合评分(Z)对试验结果进行分析:以 Y 表示试验中指标成分的测定值,以各指标的最大值(Y_{max})作为参照对同一指标的各数据进行标准化处理,E 表示试验中该指标成分测定值的标准化数据(E = Y/Y_{max})。综合评分(Z) = E_{人参皂苷} × 40 + E_{黄芪甲苷} × 40 + E_{干膏收率} × 20, E_{人参皂苷} = C_{人参皂苷R_{g1}含量} (mg/g) + C_{人参皂苷Re含量} (mg/g) + C_{人参皂苷R_{b1}含量} (mg/g)。

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果

3.1.1 煎煮时间对干膏收率、皂苷含量综合评分的影响

按“2.3”项下方法以综合评分分别考察煎煮 20、40、60、80、100、120 min 对皂苷类成分及干膏收率的影响。结果如图 1(A),表明:随着煎煮时间的延长,综合评分结果不断升高,20~40 min 时增加较为明显,以后趋于平缓,为缩短工时且保证提取效果,提取时间宜控制在 40~80 min 内,选煎煮 60 min 为中心点。

3.1.2 煎煮次数对干膏收率、皂苷含量的影响考察

按“2.3”项下方法以综合评分分别考察煎煮 1、2、3、4、5 次对皂苷类成分含量及干膏收率的影响。结果如图 1(B),表明:煎煮 1、2、3 次综合评分呈上升趋势且变化较为明显,煎煮 3 次以后无明显变化,为节约成本且保证提取效果,宜将提取次数控制在 3 次以内,故选煎煮 2 次为中心点。

3.1.3 料液比对干膏收率、皂苷含量综合评分的影响

按“2.3”项下方法以综合评分分别考察料液比

为 1:4、1:6、1:8、1:10、1:12、1:16 对皂苷类成分及干膏收率的影响。综合评分结果表明:随着水量的增加,综合评分结果不断升高,1:4~1:6 时增加较

明显,1:10 以后逐渐趋于平缓,考虑到成本及提取效果,料液比在 1:6~1:10 为宜,故选料液比为 1:8 为中心点。

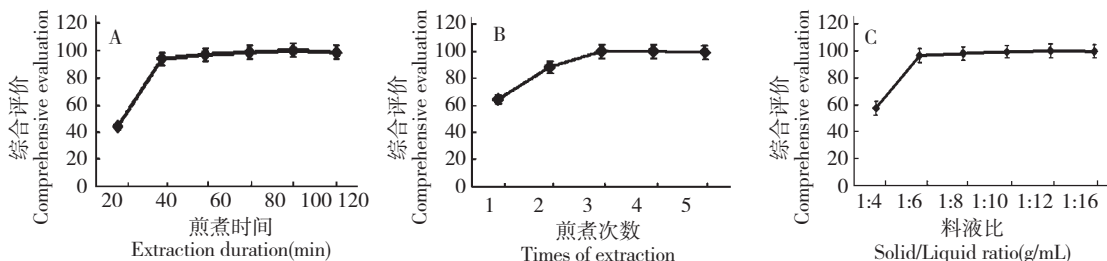


图 1 煎煮时间(A)、煎煮次数(B)、料液比(C)对皂苷类成分含量及干膏收率综合评分结果的影响

Fig. 1 Effects of extraction duration (A), times of extraction (B), solid/liquid ratio (C) on the comprehensive evaluation results

3.2 响应面实验结果及分析

间 3 因素作 3 水平的响应面正交设计实验,所得结果见表 3。

3.2.1 响应面实验结果

对影响提取率较大的液料比、提取次数、提取时

表 3 响应面法试验设计方案及结果

Table 3 Design and results of response surface analysis

实验号 No.	A 提取次数 Times	B 提取时间 Extraction duration (min)	C 料液比 solid/liquid ratio (g/mL)	指标成分含量 Indexes content (mg/g)				干膏收率 Extract yield (%)	综合评分 Comprehensive Evaluation
				人参皂苷 R _{g1}	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	黄芪甲苷 Astragaloside		
1	-1	0	1	1.1686	1.6164	1.6287	0.5412	35.99	74.26
2	0	0	0	1.5946	2.2057	2.2225	0.7385	45.17	99.59
3	-1	-1	0	1.0706	1.4808	1.4921	0.4958	20.15	62.41
4	0	1	-1	1.5327	2.1199	2.1361	0.7098	45.05	96.44
5	1	0	1	1.5756	2.1794	2.1959	0.7307	45.62	98.90
6	-1	0	-1	1.0928	1.5116	1.5231	0.5061	33.52	69.38
7	0	0	0	1.5974	2.2096	2.2264	0.7398	44.01	99.22
8	0	1	1	1.5669	2.1674	2.1839	0.7257	45.59	98.40
9	1	0	-1	1.5672	2.1677	2.1842	0.7258	45.66	98.44
10	0	0	0	1.5907	2.2003	2.2170	0.7367	44.87	99.28
11	0	0	0	1.5939	2.2048	2.2216	0.7382	45.08	99.52
12	1	-1	0	1.5726	2.1752	2.1918	0.7283	44.18	98.06
13	-1	1	0	1.2863	1.7792	1.7927	0.5957	36.58	80.39
14	0	0	0	1.5981	2.2105	2.2273	0.7401	42.37	98.54
15	0	-1	-1	1.4007	1.9375	1.9522	0.6487	43.78	89.28
16	0	-1	1	1.4020	1.9393	1.9540	0.6493	43.96	89.42
17	1	1	0	1.5767	2.1809	2.1975	0.7302	45.69	98.93

3.2.2 模型的建立及其显著性检验

通过 Design-Expert 统计分析软件将表 3 所得的试验数据进行统计分析,得到综合评分对提取次数

料液比和提取时间的二次多项回归模型为:

$$Z = 99.23 + 13.49A + 4.37B + 0.93C - 4.28AB - 1.11AC + 0.46BC - 11.21A^2 - 3.07B^2 - 2.77C^2 \quad (R^2 =$$

0.9987)

由拟合回归方程的相关系数可知模型拟合程度良好,可以用此模型对参芪复方颗粒药材提取工艺进行分析和预测。

为了检验回归模型的有效性,确定各因素对综合评分结果的影响程度,对回归模型进行方差分析,结果见表4。由表4可知,所建立的二次多项式模型具有高度的显著性($P < 0.001$),模型的失拟项的 P 值为0.0947,大于0.05,说明模型选择合适,该模

型的决定系 $R^2 = 0.9987$,表明该模型与实际试验拟合较好,自变量与响应值之间线性关系显著,可以用于参芪复方颗粒提取工艺试验的理论预测。回归方程的各项方差分析结果还表明模型的一次项提取次数,提取时间和料液比都是极显著的($P < 0.01$),按照综合评分结果从大到小排序为:提取次数 > 提取时间 > 料液比;交叉项中的影响都是高度显著的($P < 0.05$)。

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

方差来源 Variance source	平方和 Square sum	自由度 Df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	2333.613	9	259.29	614.718	< 0.0001	**
A	1455.032	1	1455	3449.55	< 0.0001	**
B	153.0375	1	153.04	362.817	< 0.0001	**
C	6.9192	1	6.9192	16.4038	0.0049	**
AB	73.18803	1	73.188	173.512	< 0.0001	**
AC	4.8841	1	4.8841	11.5791	0.0114	*
BC	0.8281	1	0.8281	1.96324	0.2039	
A ²	529.23	1	529.23	1254.68	< 0.0001	**
B ²	39.71611	1	39.716	94.1578	< 0.0001	**
C ²	32.39448	1	32.394	76.7999	< 0.0001	**
残差 Residual	2.952625	7	0.4218			
失拟项 Lack of Fit	2.260225	3	0.7534	4.35245	0.0947	not significant
净误差 Pure Error	0.6924	4	0.1731			
总离差 Cor Total	2336.565	16				

注: ** 为差异极显著($P < 0.01$); * 为差异显著($P < 0.05$)。

Note: ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$); * indicated significant difference ($P < 0.05$).

3.2.3 提取工艺的响应面分析

各影响因素和响应值构成三维空间的曲面图和二维平面上的等高线图能够较为直观地反映出各因素的相互作用以及对综合评分结果的影响。将因变

量与另外两因素拟合为三维曲面图,固定3个因素之一为中值,将中心点值代入二次回归模型方程得到新方程,根据新模型方程得到响应面三维图和等高线图。结果见图2、图3。

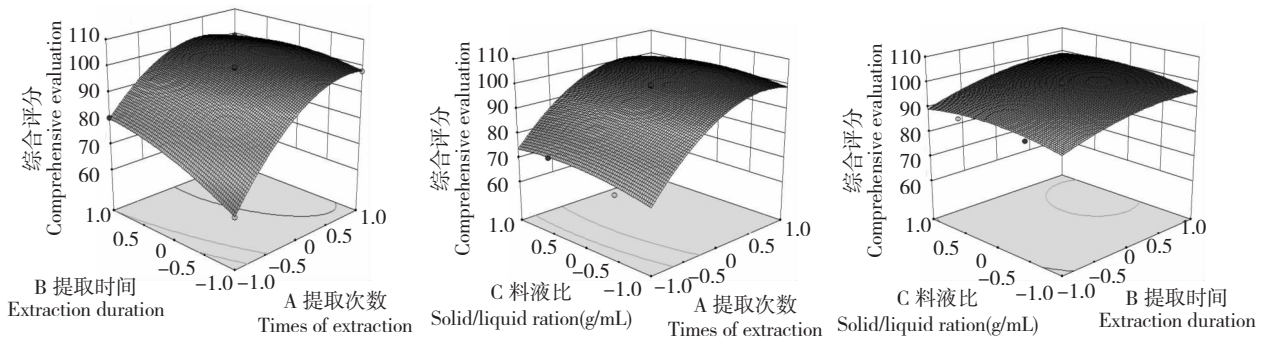


图2 3因素交互作用对综合评分影响的3D响应面图(A-B、A-C、B-C)

Fig. 2 Response surface plots showing the cross interaction among three factors (A-B, A-C, B-C)

图2(a-c)分别是综合评分与提取次数(A)和提取时间(B)、综合评分与提取次数(A)和料液比(C)、综合评分与提取时间(B)和料液比(C)的响应面图。由图可知,提取次数(A)和提取时间(B)对

综合评分影响显著,表现为响应面陡峭;而料液比(C)的变化对综合评分的影响相对较小,响应面较平滑。

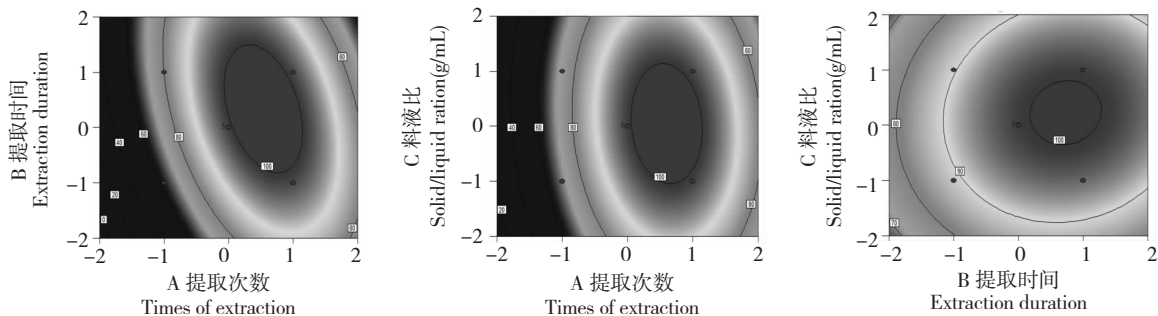


图3 各因素交互作用对综合评分影响的等高线图

Fig. 3 Contour plots of mutual effects of extraction conditions on the comprehensive evaluation results

图3中的(a-c)分别显示了不同交叉因素对参芪复方颗粒提取工艺各指标性成分综合评分结果的交互影响趋势图。等高线图能够直观地反映出两变量交互作用的显著程度:圆形表示两因素交互作用不明显,而曲率半径较大的椭圆则表示两因素交互作用显著,且曲率半径越大,交互作用越显著。在等高线图上,最大的椭圆即最外围的椭圆代表在该圆上取值时,综合评分结果最低,反之最小的椭圆则表示在其上面取值时,综合评分结果值最高,它们之间

的等高线代表综合评分逐渐变化^[9]。

经过以上对回归模型响应面的三维立体图分析,以综合评分结果最大值为目标,由响应面预测模型得出的最优提取条件为:加入10倍量水,提取3次,每次60 min。

3.2.4 响应面优化验证实验

取10倍处方量的药材,共5份,按上述优化方法进行验证实验,检验实验结果的可靠性,结果见表5。

表5 提取工艺验证结果

Table 5 Results of verification experiments of extraction process

实验号 No.	指标成分含量 Indexes content (mg/g)				干膏收率 Extraction yield (%)	综合评分 Comprehensive Evaluation
	人参皂苷 R _{g1} Ginsenoside R _{g1}	人参皂苷 Re Ginsenoside Re	人参皂苷 R _{b1} Ginsenoside R _{b1}	黄芪甲苷 Astragaloside		
1	1.5716	2.1739	2.1904	0.7276	46.77	99.55
2	1.5006	2.0756	2.0914	0.6949	47.67	96.31
3	1.5545	2.1501	2.1665	0.7199	47.94	99.17
4	1.5012	2.0764	2.0922	0.6852	47.77	95.83
5	1.5647	2.1643	2.1807	0.7246	47.84	99.65

验证结果与理论实验值的相对误差为1.9%,说明验证值与回归方程预测值吻合较好,建立的数学模型可靠,具有良好的预测性,优化后的提取工艺对实际工业生产具有一定的指导意义。

4 结果与讨论

查阅相关文献,人参皂苷的含量大都采用

HPLC法^[12-14]测定,本实验利用HPLC-ELSD法对参芪复方颗粒中指标性成分人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、人参皂苷R_{b1}、黄芪甲苷含量同时进行测定,且精密度高、重复性好。

皂苷类成分一般有较强的极性,易溶于水、甲醇、乙醇等^[12]极性溶剂,在节约成本且保证提取效果的基础上,研究中主要以水作为溶剂进行提取工

艺的考察。

本方中人参、黄芪均为君药,其主要有效成分为皂苷类。浸出物是中药复方的药效物质基础^[9],为提取工艺的重要指标,研究中以方中君药4个指标性成分(人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、黄芪甲苷)含量及干膏收率的综合评分为指标进行评价。按君臣佐使关系对所选取指标成分进行权重系数分配,人参皂苷、黄芪甲苷、干膏收率的权重系数分别为40、40、20,这样使得用综合评分去评价提取工艺更加合理,且能全面反映提取物有效成分的信息,更符合中医用药的整体观。

目前,国内学者对人参、黄芪药材及复杂复方提取工艺考察大多采用正交试验,本文采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化了参芪复方颗粒中4种皂苷类成分的提取工艺,Box-Behnken 响应面法通过非线性模型拟合得出最优提取条件更接近客观实际^[15],避免了传统的正交设计和均匀设计法的不足,兼顾了多个影响因素和评价指标,且在实验设计精度上优于正交试验设计,优选的工艺简便合理、稳定,预测结果具有较高的准确性,为其应用于中药提取工艺优化的可行性提供了依据。

参考文献

- 1 Yang QY(杨启悦),Zhang S(张帅),Xie CG(谢春光), et al. Mechanism of Shenqi Compound Recipe on preventing and treating macroangiopathy of diabetes mellitus. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2014,45:1179-1183.
- 2 Hu YH(呼永河),Hou J(侯君),Zheng DZ(郑德志), et al. protection and mechanism of Shenqi Compound for diabetic angiopathy model rats. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志),2014,34:1078-1085.
- 3 Wang YF(王永菲),Wang CG(王成国). The Application of response surface methodology. *J Cent Univ,Nat Sci*(中央民族大学学报,自科版),2005,14:236-240.
- 4 Yang WX(杨文雄),Gao YX(高彦祥). response surface methodology & its application in food industry. *Chin Food Add* (中国食品添加剂),2005,2:68-71
- 5 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010, Vol I . 857-859.
- 6 Lin L(林林),Liu GZ(刘广楨),Liu HC(刘洪超), et al.

- Determination of seven saponins in Xinnaoshu Oral Liquid by HPLC-ELSD. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),2014,36:90-94.
- 7 Xing YL(邢雅丽),Bi LW(毕良武),Zhao ZD(赵振东), et al. Optimization of ultrasonic extraction of ursolic acid from *Paulownia elongata* leaves by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2015,27:301-305.
- 8 Yu XH(余响华),Jiang QF(蒋琼凤),Shao JH(邵金华). Optimization of extraction of camptothecin from *Camptotheca acuminata* fruits by response surface methodology. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2014,26:1858-1863.
- 9 Chen LW(陈林伟),Qin KM(秦昆明),Wang Q(王琴), et al. Optimization of percolation extraction technology for Qixue Shuangbu Tinctura by Box-Behnken response surface methodology. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2015,46:1151-1155.
- 10 Shi HL(石海利),Jiang SJ(蒋舜媛),Xu KJ(徐凯节), et al. Study on extraction technology of Bioactive Components from *Notopterygium incisum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2012,24:687-690.
- 11 Zhang B(张铂),Wang B(王兵),Cao SH(曹书华), et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction technique of Tannins from *Rhubarb* by Box-Behnken response surface methodology. *J Emerg Tradit Chin Med* (中国中医急症), 2015,24:579-582.
- 12 Cao JL(曹俊岭),Li ZL(李祖伦),Fu Q(付强), et al. The determination of contents of 8 Gin senosides in extraction of *Panax ginseng* by HPLC. *J Chin Med Mater* (中药材), 2006,29:1038-1039.
- 13 Guo C(郭冲),Gao YG(郜玉钢),Zang P(臧埔). Simultaneous determination of sixteen ginsenosides in *Panax ginseng* and its preparation by HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2014,45:2009-2013.
- 14 Lin L(林林),Liu GZ(刘广楨),Liu HC(刘洪超), et al. Determination of seven saponins in Xinnaoshu Oral Liquid by HPLC-ELSD. *Chin Tradit Pat Med* (中成药),2014,36:90-94.
- 15 Li F(李芳),Yang PM(杨培民),Cao GS(曹广尚), et al. Optimization of extraction process of total flavonoids from *Oldenlandia diffusa* by Box-Behnken design response surface methodology. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志),2015,21:21-24.