

Plackett-Burman 设计结合响应面法 优化天麻效应成分的提取工艺

艾志福, 伍振峰*, 张帅杰*, 韩飞, 万晶
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 优选天麻效应成分的提取工艺。**方法:** 采用回流提取法, 以天麻素提取率为指标, 采用 Plackett-Burman 设计筛选天麻效应成分的显著性影响因素, 通过 Box-Behnken 设计对影响提取工艺的显著性因素进行优化, 试验数据进行多元线性回归和二项式拟合, 应用效应面法对最佳工艺进行预测分析。运用 HPLC 测定天麻素含量, 流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液 (3:97), 检测波长 220 nm。**结果:** 加液量、提取时间和提取次数对效应成分的提取效率影响较大; 二项式方程拟合度较好, 预测结果较为准确, 最佳工艺条件为加液量 10 倍, 提取时间 120 min, 提取数 3 次; 天麻素提取率 1.392%, 与预测值 1.397% 偏差较小。**结论:** 采用 Plackett-Burman 设计结合响应面法优选天麻效应成分的提取工艺稳定可行, 预测性较好, 为天麻的资源开发提供参考。

[关键词] Plackett-Burman 设计; Box-Behnken 设计-响应面法; 天麻; 天麻素; 显著性分析

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0034-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014140034

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1141.004.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:41

Optimization of Extraction Process for Active Ingredients from Gastrodiae Rhizoma by Plackett-Burman Design and Response Surface Analysis

AI Zhi-fu, WU Zhen-feng*, ZHANG Shuai-jie*, HAN Fei, WAN Jing
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of active ingredients from Gastrodiae Rhizoma in Dachuanxiong formula. **Method:** Active ingredients from Gastrodiae Rhizoma was extracted by reflux, with yield of gastrodine as index, some factors affecting index were firstly evaluated by Plackett-Burman design, then extraction conditions were optimized by Box-Behnken design, experimental date were imitated by multiple regression and second-order polynomial equation, response surface analysis was adopted to predict optimum process. HPLC was employed to determine the content of gastrodine with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (3:97) and detection wavelength at 220 nm. **Result:** Solvent volume, extracting times and time had significant effects on yield of active ingredients; binomial equation fitted well with good predictability, optimal extraction process was as follows: extracted thrice with solid-lipid ratio of 1:10, 120 min for each time; yield of gastrodine was 1.392%, whose deviation was small by comparing with the predicted value of 1.397%. **Conclusion:** Extraction process of active ingredients from Gastrodiae Rhizoma optimized by combination of Plackett-Burman design and response surface analysis was stable and feasible with good

[收稿日期] 20140113(005)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研项目(2012A021)

[第一作者] 艾志福, 博士, 从事中西医结合基础研究, Tel:0791-87118813, E-mail:azf0791@163.com

[通讯作者] * 伍振峰, 博士, 讲师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:0791-87118658, E-mail:zfwu527@163.com;

* 张帅杰, 高级工程师, 从事中药新药及制药新技术研究, Tel:0791-87118658, E-mail:2627033045@qq.com

predictability, which could serve as a valuable reference for resource development of Gastrodiae Rhizoma.

[Key words] Plackett-Burman design; Box-Behnken design-response surface methodology; response surface analysis; Gastrodiae Rhizoma; gastrodine; significance analysis

大川芎方源自金·刘完素《宣明论方》卷二,由川芎 500 g 和天麻 120 g 组成,功效活血化瘀、平肝息风,主治瘀血阻络及肝阳化风所致的头痛、头胀、眩晕、颈项紧张不舒、上下肢或偏身麻木、舌部瘀斑^[1]。方中天麻具有平肝息风、止痉等功能,临床用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、小儿惊风、癫痫抽搐、破伤风等,其有效成分为天麻素,对神经细胞损伤具有保护作用^[2-5]。大川芎方的提取工艺多采用正交试验优选,致使试验次数较多且精度低。本实验采用 Plackett-Burman^[6] 设计结合响应面法优化大川芎方中天麻的提取工艺条件,为该复方的开发利用提供参考。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), BT224S 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], UV2550 型紫外分光光度计(日本岛津), 6202 型摇摆式高速中药粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司), DZF-6050 型真空干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

天麻药材购于四川新荷花药材有限公司,经江西中医药大学杨明教授鉴定系兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,符合《中国药典》2010 年版一部天麻项下标准;天麻素对照品(批号 110807-200205,中国食品药品检定研究院),甲醇、乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法及结果

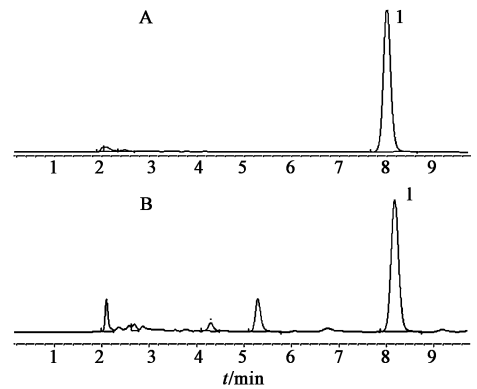
2.1 样品溶液的制备 称取天麻药材 20 g,置圆底烧瓶中,按设定的工艺条件提取,滤过,合并提取液,定容,即得。

2.2 天麻素的含量测定

2.2.1 色谱条件 依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97),检测波长 220 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取于 80 °C 减压干燥 1 h 的天麻素对照品 10 mg,加流动相制成 50 mg·L⁻¹ 的对照品贮备液,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取部分提取液,滤过,精密量取续滤液 1 mL,浓缩至近干,残渣加流动相溶解,转移至 25 mL 量瓶中,定容,摇匀,经 0.22 μm



A. 对照品; B. 供试品; 1. 天麻素

图 1 大川芎方中天麻提取物 HPLC

微孔滤膜滤过,即得。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取天麻素对照品贮备液 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中,加流动相定容,摇匀,得系列对照品溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得回归方程 $Y = 26.96X - 6.81$ ($r = 0.9995$),线性范围 0.02 ~ 1 μg。

2.3 Plackett-Burman 试验 在预试验基础上,选择提取时间、液固比、提取次数、药材粒度及浸泡时间为考察因素,每个因素设置 2 个水平,试验数 16 次。按 Plackett-Burman 设计表进行设计,每个试验号重复 3 次,以天麻素提取率为评价指标,因素水平、试验安排及结果见表 1。采用 Design-Expert 7.0 软件处理试验数据,比较各因素的 F 值和可信度,选择可信度 > 85% 的因素作为显著影响因素,显著性及方差分析见表 2,3。结果显示因素 A, B, C 对天麻素提取率的影响具有显著性差异,其他因素则无显著性影响,故采用 Box-Behnken 效应面法进行下一步试验。

2.4 Box-Behnken 效应面法 选择提取次数、提取时间及液固比为自变量,天麻素提取率为因变量,通过 Box-Behnken 效应面法优化天麻提取工艺,采用 Design expert 7.0 软件对试验数据进行拟合分析,每个因素的低、中、高试验水平分别以 -1, 0, 1 进行编码,共 17 次试验,每个试验重复 3 次,因素水平及试验安排见表 4。

经统计分析,得因变量与自变量间的回归方程 $Y = 1.23 + 0.014A + 0.071B + 0.160C + 0.0003AB -$

表 1 大川芎方中天麻提取工艺
Plackett-Burman 试验因素水平及安排

No.	A 提取时间 /min	B 液固比 /mL·g ⁻¹	C 提取数 /次	D 药材粒度 /目	E 浸泡时间 /min	天麻素提取率 /%
1	60	6	3	10	30	1.060
2	120	10	1	40	30	1.118
3	60	6	1	40	30	0.875
4	60	10	3	40	30	1.048
5	120	10	3	10	30	1.258
6	60	6	1	10	90	0.922
7	120	10	1	10	90	1.091
8	60	10	1	40	90	0.994
9	60	10	3	40	30	1.025
10	120	6	3	10	90	1.247
11	120	6	3	40	30	1.126
12	60	6	3	40	90	1.151
13	120	6	1	10	30	1.071
14	120	6	1	40	90	1.076
15	120	10	3	40	90	1.193
16	60	10	1	10	30	1.007

表 2 大川芎方中天麻提取工艺各因素显著性分析

方差来源	天麻素提取率	
	系数	P
常量	1.08	
A	0.069	<0.000 1
B	0.013	0.020 4
C	0.060	<0.000 1
D	-6.325 × 10 ⁻³	0.175 7
E	8.438 × 10 ⁻³	0.086 5
AD	-0.013	0.019 6
BC	-0.020	0.002 6
BE	-0.025	0.001 0
DE	-0.022	0.001 6

表 3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.16	9	0.018	67.01	<0.000 1
残差	1.630 × 10 ⁻³	6	2.716 × 10 ⁻⁴	-	-
总和	0.17	15	-	-	-

0.013AC - 0.017BC + 0.03A² - 0.027B² - 0.056C² (r = 0.930), 说明回归模型的拟合情况良好, 能准确的预测实际情况。方差分析见表 5, 显著性分析见表 6, 表明经 F 检验显示总模型方程显著, 提取时间和提取数对天麻素提取率影响显著。绘制效应面和等高线见图 2~4。采用 Design-Expert 7.0 软件对各因素水平进行优化预测, 确定最佳提取工艺为加液量 10 倍, 提取时间 120 min, 提取数 3 次, 天麻素提取率预测值 1.397%。为验证该模型的稳定性, 按优选的工艺条件进行 5 次重复试验, 结果天麻素平均提取率 1.392%, RSD < 2%, 与预测值的偏差较小。

表 4 大川芎方中天麻提取工艺 Box-Behnken 效应面试验因素水平及安排

No.	A 加液量 /倍	B 提取时间 /min	C 提取数 /次	天麻素提取率 /%
1	10	90	1	1.072
2	8	90	2	1.234
3	8	90	2	1.231
4	8	60	3	1.255
5	6	120	2	1.290
6	8	120	1	1.079
7	10	60	2	1.174
8	8	90	2	1.232
9	6	60	2	1.155
10	10	90	3	1.369
11	8	90	2	1.235
12	8	60	1	0.903
13	6	90	3	1.365
14	10	120	2	1.322
15	8	90	2	1.231
16	8	120	3	1.363
17	6	90	1	1.018

注: 第 2, 3, 8, 11, 15 次试验为 5 次重复的中心点试验, 用于考察模型的误差。

表 5 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	0.27	9	0.030	7 052.8	<0.000 1
残差	2.949 × 10 ⁻³	7	1.469 × 10 ⁻³		
失拟项	1.599 × 10 ⁻⁵	3	5.328 × 10 ⁻⁶	1.58	0.326 7
误差	1.350 × 10 ⁻⁵	4	3.375 × 10 ⁻⁶		
总和	0.27	16			

表 6 大川芎方中天麻提取工艺各自变量显著性分析

方差来源	天麻素提取率	
	系数	P
常数	1.23	
A	0.014	<0.000 1
B	0.071	<0.000 1
C	0.16	<0.000 1
AB	3.325 × 10 ⁻³	0.014 2
AC	-0.013	<0.000 1
BC	-0.017	<0.000 1
A ²	0.030	<0.000 1
B ²	-0.027	<0.000 1
C ²	-0.056	<0.000 1

3 讨论

中药提取工艺优化通常采用单因素试验或正交试验优化, 因素水平较多时, 可能试验次数较多。Plackett-Burman 设计是一种有效的二水平试验设计法, 可在试验次数较少的情况下分析各因素对响应值的影响, 实现从较多因素中快速找到显著性影响

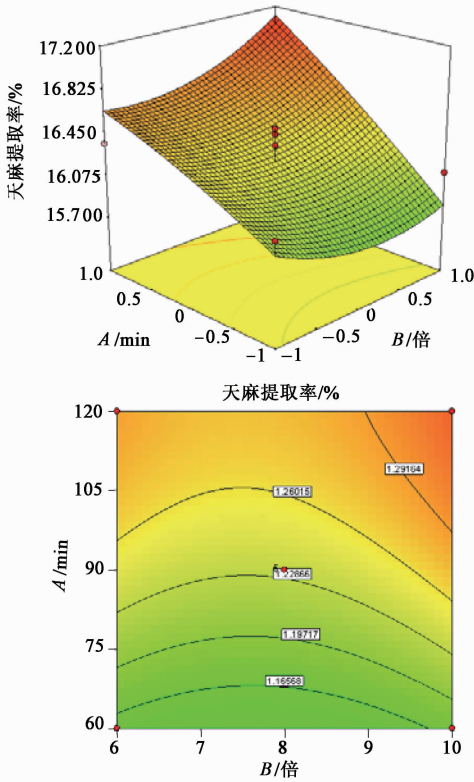


图2 提取时间和加液量对天麻提取工艺影响的响应面和等高线

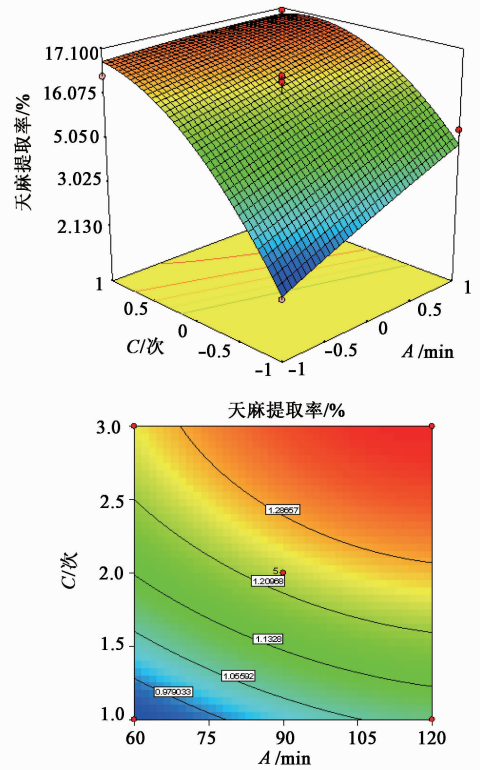


图4 提取时间和提取次数对天麻提取工艺影响的响应面和等高线

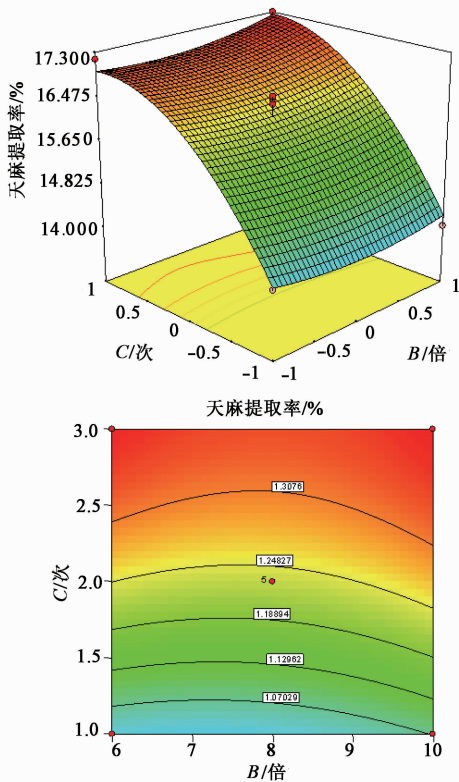


图3 提取次数和加液量对天麻提取工艺影响的响应面和等高线

因素。本文采用该方法优选天麻提取工艺,结果表明提取时间、加液量和提取数对天麻素提取率影响较大。Box-Behnken 设计-效应面法是基于非线性模式设计^[7],设计方法简单,试验次数少,而且充分考虑到各影响因素间的交互作用,同时在中心点进行重复试验,试验准确性较好。

[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,2010:459.

[2] 王彤宇. 天麻素注射液对急性脑梗死的神经保护作用[J]. 天津医药,2011,39(3):205.

[3] 杨杰,赵朝华,宗长宏,等. 短暂性 MCAO 大鼠注射天麻素具有神经保护作用[J]. 第四军医大学学报,2008,29(4):295.

[4] 胡京红,司银楚,洪庆涛,等. 天麻素对体外模拟脑缺血损伤大鼠脑血管内皮细胞的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2007,22(2):124.

[5] 陶云海. 天麻药理研究新进展[J]. 中国中药杂志,2008,33(1):108.

[6] 苏柘僮,刘英,徐佳丽,等. 应用 Box-Behnken 设计优化地榆皂苷的闪式提取工艺研究[J]. 中草药,2012,43(3):501.

[7] 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):292.

[责任编辑 刘德文]