

# Plackett-Burman 试验设计联合星点设计效应面法优选 蜘蛛香中总缬草三酯提取工艺

郜红利<sup>1</sup>, 谭玉柱<sup>2\*</sup>

(1. 湖北民族学院, 湖北恩施 445000; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 采用 Plackett-Burman 试验联合星点设计效应面法优选蜘蛛香中总缬草三酯的提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 通过 Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素; 采用星点设计-效应面积法优选蜘蛛香中总缬草三酯提取工艺, 以乙醇体积分数、浸泡时间、超声时间为自变量, 总缬草三酯含量为因变量, 通过对自变量与因变量的完全二次响应曲面的回归拟合, 利用三维曲面图直观分析总缬草三酯的最佳提取工艺, 并进行预测分析。结果: 最佳提取工艺为乙醇体积分数 65%, 液料比 10:1, 浸泡时间 3 h, 室温超声 2 次, 每次 30 min。结论: 优选的提取工艺简便、精度更高、重复性好、预测性强。

**[关键词]** 蜘蛛香; 缬草三酯; Plackett-Burman; 星点设计 (CCD); 提取工艺

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0038-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013100038

## Optimization of Extraction Technology for Total Valepotriates from *Valeriana jatamansi* by Plackett-Burman Design Combined with Central Composite Design and Response Surface Methodology

GAO Hong-li<sup>1</sup>, TAN Yu-zhu<sup>2\*</sup>

(1. Hubei University For Nationalities, Enshi 445000, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total valepotriates from *Valeriana jatamansi* by Plackett-Burman combined with central composite design-response surface methodology. **Method:** Based on single factor test, Plackett-Burman test was adopted to screen main influencing factors; Extraction technology of total valepotriates was optimized by central composite design-response surface method, with the concentration of ethanol, soaking time, ultrasound time as independent variables, dependent variable was the content of total valepotriates, through complete quadratic response surface regression fitting of independent variables and the dependent variable, optimum technology was determined by intuitive analysis of 3D surface chart, and predictive analysis was used. **Result:** Optimum extraction technology was as following: the concentration of ethanol 65%, soaking time 3 hours, liquid-solid 10:1, ultrasonic extracted 2 times at room temperature, 30 minutes per time. **Conclusion:** This optimized process was simple, accurate, reproducible with good predictability.

**[Key words]** *Valeriana jatamansi*; total valepotriates; Plackett-Burman; central composite design; extraction process

蜘蛛香又名马蹄香、老虎七、印度缬草, 主要分布 在西南少数民族地区<sup>[1]</sup>, 多以根茎及根入药, 性

**[收稿日期]** 20121029(021)

**[基金项目]** 湖北省自然科学基金重点项目(2010CDA047)

**[第一作者]** 郜红利, 学士, 副教授, 从事民族药物的开发与研究, Tel:0718-8439504, E-mail:349523825@qq.com

**[通讯作者]** \* 谭玉柱, 硕士, 助教, 从事中药有效成分及质量标准化研究, Tel:028-61800033, E-mail:365762996@qq.com

温,味辛、微苦,具有消食健胃、理气止痛、祛风解毒的功效,用于治疗胃痛腹胀、消化不良、小儿疳积、胃肠炎、风湿疼痛、腰膝酸软<sup>[2]</sup>。同时还具有镇静催眠、抗肿瘤的药理作用<sup>[3]</sup>,疗效确切、不良反应小,具有很大的开发潜力<sup>[4]</sup>。

蜘蛛香环烯醚萜类化合物是一类具有广泛生物活性的天然化合物,其中缬草三酯类成分(缬草三酯和乙酰缬草三酯)是主要活性成分及质量控制指标,具有镇静、抗病毒、血管舒张等药理作用<sup>[5]</sup>。但缬草三酯类化合物不稳定,对温度、湿度、酸碱度、光照等因素较敏感,对提取条件要求较高,目前多采取超临界二氧化碳提取、渗滤提取、超声提取等方法。在已有报道中,蜘蛛香总黄酮和总缬草素的提取、纯化工艺优选多采用正交设计,存在试验精度不高的问题<sup>[6]</sup>。因此本实验在单因素试验基础上,采用 Plackett-Burman 试验设计联用星点设计效应面法优选蜘蛛香中总缬草三酯提取工艺<sup>[7]</sup>,为蜘蛛香资源的合理利用提供实验依据。

## 1 材料

UV1100 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),UPT-I-10T 型优谱 UPT 系列超纯水器(成都超纯科技有限公司),BS124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

蜘蛛香采自湖北恩施州利川福宝山,经湖北民族学院朱敏英教授鉴定为败酱科植物蜘蛛香 *Valeriana jatamansi* Jones 的干燥根茎和根。缬草三酯对照品(成都植标化纯生物技术有限公司,批号 110756-200110,纯度 >98%),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品的制备** 称取蜘蛛香粉末 5 g,置具塞锥形瓶中,加无水乙醇 50 mL 浸泡 1 h,超声提取 3 次,每次 30 min,用无水乙醇定容至 50 mL,摇匀,即得。

**2.2 对照品溶液的制备** 取缬草三酯对照品适量,用无水甲醇溶解配制成  $0.1096 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品贮备液。

**2.3 检测波长的确定** 精密量取缬草三酯对照品溶液和供试品溶液,于 200~400 nm 扫描,结果显示二者在 256 nm 有最大吸收,因此选择 256 nm 作为检测波长。

**2.4 标准曲线的绘制** 精密量取缬草三酯对照品贮备液 0.5,1,1.5,2,2.5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用无水甲醇定容至刻度,摇匀,以吸光度为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得标准曲线  $Y =$

$31.427X + 0.0372 (r = 0.9992)$ ,线性范围  $2.19 \sim 27.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

## 2.5 单因素试验考察

**2.5.1 乙醇体积分数** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 30 min,料液比 1:10,考察体积分数分别为 55%,65%,75%,85%,95% 的乙醇溶液对总缬草三酯含量影响,结果表明乙醇体积分数 65%~85% 时,总缬草三酯含量较高。

**2.5.2 料液比** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 30 min,乙醇体积分数 95%,分别考察料液比为 1:10,1:15,1:20,1:25,1:30 对总缬草三酯含量影响,结果表明料液比为 1:10~1:20 时,总缬草三酯含量较高。

**2.5.3 超声时间** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 1 次,料液比 1:10,乙醇体积分数 95%,考察超声时间分别为 20,30,40,50,60 min 对总缬草三酯含量影响,结果表明超声时间为 30~50 min 时,总缬草三酯含量变化较大。

**2.5.4 浸泡时间** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 30 min,料液比 1:10,考察用无水乙醇浸泡不同时间(0,3,6,12,24 h)对总缬草三酯含量影响,结果表明浸泡时间为 3~12 h 时,总缬草三酯含量变化较大。

**2.5.5 超声温度** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 30 min,料液比 1:10,乙醇体积分数 95%,考察不同提取温度(25,30,35,40,45 ℃)对总缬草三酯含量的影响,结果表明超声温度为 25~35 ℃ 时,总缬草三酯含量变化较大。

**2.5.6 超声次数** 精密称取蜘蛛香粉末 5 份,每份 10 g,不浸泡,于 30 ℃ 超声提取 30 min,料液比 1:10,乙醇体积分数 95%,考察不同提取次数(1,2,3,4,5 次)对总缬草三酯含量的影响,结果表明超声次数为 1~3 次时,总缬草三酯含量变化较大。

**2.6 主要影响因素筛选** 选用 Plackett-Burman 试验设计。选取 6 个试验因素(A 乙醇体积分数,B 料液比,C 超声时间,D 浸泡时间,E 超声温度,F 超声次数)和 5 个空白因素(G,H,I,J,K),根据预试验结果确定每个因素设高、低 2 个水平,每个试验号重复 3 次。用 Design expert 8.0 软件设计试验并进行数据处理,因素水平见表 1,运用 Design expert 8.0 软件对各因素进行显著性分析,结果 P 值分别为

0.029, 0.092, 0.060, 0.045, 0.096, 0.095, 0.030, 0.067, 0.060, 0.075, 0.036 ( $P < 0.05$  为主要影响因素)。表明各因素对总缬草三酯含量的影响顺序乙醇体积分数 > 浸泡时间 > 超声时间 > 料液比 > 超声温度 > 超声次数, 结合经济成本考虑, 确定料液比选择 1:10, 室温超声 2 次。

表 1 蜘蛛香中总缬草三酯的提取工艺 Plackett-Burman 试验因素水平

水平	A /%	B	C /min	D /h	E /°C	F	G	H	I	J	K
-1	65	10	30	3	25	1	-	-	-	-	-
1	85	20	50	12	35	3	-	-	-	-	-

注:“-”表示空白试验。

2.7 星点试验设计优选 在 Plackett-Burman 试验基础上, 选定乙醇体积分数、浸泡时间、超声时间为考察因素, 总缬草三酯含量 ( $Y$ ) 为评价指标, 优选最佳工艺条件, 因素水平见表 2, 试验设计与结果见表 3, 回归方差分析见表 4。

表 2 蜘蛛香中总缬草三酯的提取工艺星点试验因素水平

水平	$X_1$ 乙醇体积分数/%	$X_2$ 浸泡时间/h	$X_3$ 超声时间/min
-1.732	65	3	30
-1	69	5	34
0	75	8	40
1	81	10	46
1.732	85	12	50

通过 Design-expert 7.1 软件对试验数据进行二次多元回归拟合, 得回归方程  $Y = 3.87 - 0.15X_1 - 0.34X_2 + 0.071X_3 - 0.076X_1X_2 + 0.24X_1X_3 + 0.47X_2X_3 - 0.15X_1^2 + 0.075X_2^2 + 0.045X_3^2$ ; 方差分析显示因素  $X_1, X_2, X_1X_3, X_2X_3$  及  $X_1^2$  影响显著, 其他因素影响均不显著, 为增加模型预测精度, 将不显著因素从模型中去除, 对回归方程重新拟合, 得优化后二次回归模型  $Y = 3.87 - 0.15X_1 - 0.34X_2 + 0.24X_1X_3 + 0.47X_2X_3 - 0.16X_1^2$ ; 该模型极显著 ( $P < 0.001$ ), 失拟项相对误差不显著 ( $P > 0.1$ ), 模型的校正确定系数  $R_{Adj}^2 = 0.8612$ , 表明模型能解释总缬草三酯响应值的变化, 且与实际情况拟合很好, 可用于预测。响应面分析见图 1~2, 结果发现浸泡时间和超声时间交互作用对缬草三酯影响显著, 而乙醇体积分数和超声时间交互作用影响较小。

运用 Design expert 7.1 软件响应面分析, 确定最佳提取工艺为乙醇体积分数 65%, 浸泡时间 3 h,

表 3 蜘蛛香中总缬草三酯的提取工艺星点试验安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y/\%$
1	1.000	1.000	1.000	4.15
2	1.000	-1.000	-1.000	4.22
3	0.000	-1.732	0.000	4.59
4	0.000	0.000	0.000	3.87
5	0.000	0.000	0.000	3.86
6	0.000	0.000	0.000	3.49
7	0.000	0.000	1.732	3.88
8	0.000	0.000	0.000	3.84
9	-1.000	1.000	1.000	4.04
10	0.000	0.000	0.000	3.86
11	1.732	0.000	0.000	3.18
12	-1.000	-1.000	-1.000	4.77
13	1.000	-1.000	1.000	3.70
14	0.000	1.732	0.000	3.22
15	-1.732	0.000	0.000	3.29
16	-1.000	1.000	-1.000	3.63
17	-1.000	-1.000	1.000	3.78
18	1.000	1.000	-1.000	2.28
19	0.000	0.000	0.000	3.75
20	0.000	0.000	-1.732	3.75

表 4 回归方程的方差分析

方差来源	$f$	$SS$	$MS$	$F$	$P$
模型	9	4.82	0.54	10.38	0.0005
$X_1$	1	0.30	0.30	5.88	0.0358
$X_2$	1	1.61	1.61	31.13	0.0002
$X_3$	1	0.07	0.07	1.37	0.2688
$X_1X_2$	1	0.05	0.05	0.90	0.3648
$X_1X_3$	1	0.47	0.47	9.02	0.0133
$X_2X_3$	1	1.80	1.80	34.79	0.0002
$X_1^2$	1	0.35	0.35	6.76	0.0265
$X_2^2$	1	0.09	0.09	1.70	0.2221
$X_3^2$	1	0.03	0.03	0.61	0.4547
失拟项	5	0.41	0.08	3.71	0.0881
纯误差	5	0.11	0.02		
总离差	19	5.34			

超声 30 min。

2.8 验证试验 称取药材 50 g, 按优选工艺参数进行 3 次验证试验, 结果实测值与预测值 (6.37%) 偏差率均 < 2%, 说明该工艺重复性好, 具有一定可行性。

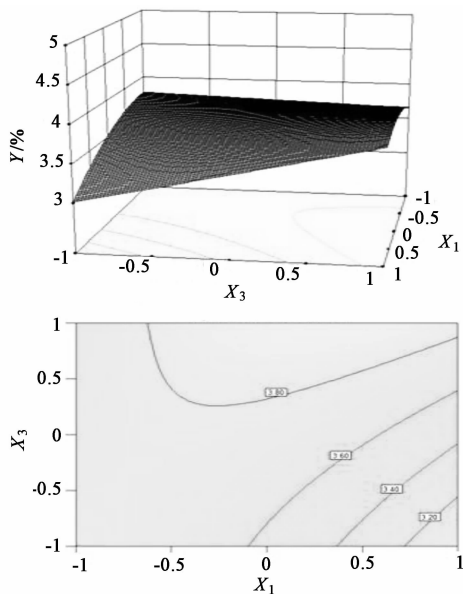


图1 乙醇体积分数和超声时间交互作用对总缬草三酯含量影响的三维曲面

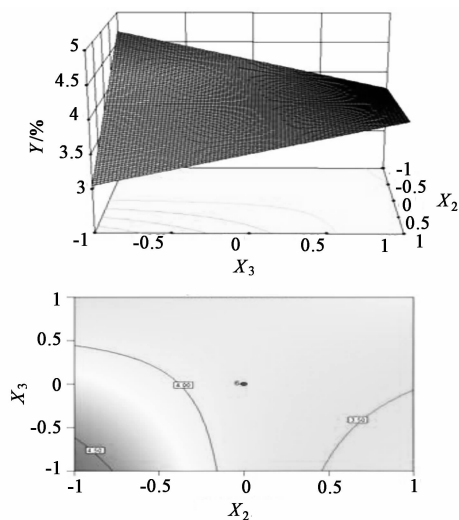


图2 浸泡时间和超声时间交互作用对总缬草三酯含量影响的三维曲面

### 3 讨论

目前,尚未见运用 Plackett-Burman 试验设计联合星点设计效应面法优化蜘蛛香缬草三酯类成分提取工艺的国内研究报道。基于非线性模型设计的效应面法不同于一般线性模型设计方法,试验精度高,

还可提高试验预测性。Plackett-Burman 试验筛选发现,料液比和超声次数为影响不显著因素,结合工业生产成本考虑,选取料液比为 1:10,超声数 2 次;由于缬草三酯对热不稳定,选取室温浸泡、室温超声为宜,因此在超声过程中一定要控制好超声温度。

蜘蛛香中缬草三酯类成分单体成分的含量测定多采用 HPLC 和电位滴定法,缬草三酯在 256 nm 处有最大吸收,本实验采用紫外分光光度法测定蜘蛛香中总缬草三酯含量的方法简便易行、结果稳定可靠且分析成本低。缬草三酯类成分不稳定,易降解,在极性较小溶剂中较稳定<sup>[8]</sup>。预试验分别考察无水乙醇,65%乙醇,95%乙醇提取蜘蛛香中缬草三酯的含量变化,结果发现在 0~3 h 内含水溶剂提取效率较好,但放置一段时间后其含量明显较无水溶剂减小。因此,为兼顾提取效果和保持缬草三酯的稳定性,本实验采用无水乙醇浸泡,用不同体积分数乙醇在 0~3 h 内超声提取,同时在操作过程中注意避光。

### [参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:北京科学出版社,2000;28.
- [2] 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;345.
- [3] 陈畅,李韶菁,唐仕欢,等. 蜘蛛香药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2174.
- [4] 李少华,闫智勇. 蜘蛛香环烯醚萜类成分的研究进展[J]. 中国新药杂志,2012,21(6):632.
- [5] 王延丽,石晋丽,郭建友,等. 缬草素抗焦虑活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):126.
- [6] 肖婷,闫智勇,左长英,等. 蜘蛛香总黄酮大孔树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):36.
- [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.
- [8] 陈玉娟,石晋丽,闫兴丽,等. 蜘蛛香中缬草素在不同溶媒中的稳定性研究[J]. 北京中医药大学学报,2009,32(5):349.

[责任编辑 仝燕]