

星点设计-响应面法优化厚朴提取工艺

刘颖新*, 刘利利, 喻祖文, 李飞艳

(湖南中医药大学高等专科学校, 湖南 株洲 412012)

[摘要] 目的:通过星点设计-响应面法优化厚朴的提取工艺。方法:以乙醇体积分数、提取时间、溶媒比为自变量,以浸膏得率、厚朴酚及和厚朴酚含量的总评“归一值”为因变量,通过对自变量各水平进行多元线性回归及二项式拟合,采用响应面法优选提取工艺,并进行预测分析。结果:最佳提取工艺为佳 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 95 min。结论:星点设计-响应面法优选的厚朴提取工艺简便、合理可行,具有较高的精确度,可推广于大生产应用。

[关键词] 厚朴; 星点设计; 响应面法; 厚朴酚; 和厚朴酚; 浸膏

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0027-04

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070027

Optimization of Extraction Technology for *Magnolia officinalis* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

LIU Ying-xin*, LIU Li-li, YU Zu-wen, LI Fei-yan

(Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Magnolia officinalis* by central composite design/response surface methodology. **Method:** Taking ethanol concentration, extraction time and the amount of solvent

[收稿日期] 20121019(011)

[基金项目] 湖南省教育厅科研项目(12C1190)

[通讯作者] * 刘颖新, 讲师, 硕士, 从事中药物质基础研究, Tel:15886357041, E-mail:liuyx412@163.com

提取溶剂为 90% 乙醇, 渗漉速率 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在前期研究工作中, 本课题组采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对薯蓣的渗漉提取工艺进行优化, 结果确定为以 80% 乙醇为溶媒, 收集 8 倍量渗漉液, 流速 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

本试验曾对大孔吸附树脂纯化鞣质的耐用性进行考察, 结果表明经 6 次动态吸附洗脱过程后, 树脂色泽明显加深, 吸附率下降, 需进行酸碱处理后才能重复使用。曾与薯蓣水提取浸膏比较, 按本方法制备的浸膏收率 14.00% (按原药材折算), 仅为水提取浸膏收率的 1/2, 鞣质平均含量比水提取浸膏高 1 倍多。

[参考文献]

[1] 王新花. 固冲汤加减联合西药治疗围绝经期功能失调性子宫出血 56 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):241.

- [2] 刘晓鹏, 张永萍, 闫春霞. 小剂量氟哌利多和安定在人工流产后出血量的观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):279.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典·下册[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:3722.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 22 卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999:228.
- [5] 刘日才. 大剂量红孩儿治疗出血症[J]. 浙江中医杂志, 1997, 42(5):228.
- [6] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 全军中西医结合工作会议资料选编-止血药红孩儿临床应用与药理研究(附 585 例报告)[M]. 北京: 中国人民解放军战士出版社, 1974:341.
- [7] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 第 4 册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:219.
- [8] 黄瑞松, 苏青, 黄永灵, 等. 均匀设计法优选薯蓣的提取工艺条件[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(3):199.

[责任编辑 仝燕]

as independent variables, overall desirability of dry extract yield and the content of magnolol and honokiol as dependent variable, each level of independent variables was fitted by multiple linear regression and binomial formula fitting, extraction process was optimized by response surface method, and prediction was carried out through comparing the observed and predicted value. **Result:** Optimum extraction technology was as following: extracted 3 times with 10-fold the amount of 60% ethanol for 95 minutes each time. **Conclusion:** This optimized extraction technology of *M. officinalis* was reasonable, stable and feasible with high accuracy, it could be extended to large-scale production applications.

[**Key words**] *Magnolia officinalis*; central composite design; response surface methodology; magnolol; honokiol; extract

厚朴具有燥湿消痰、下气除满等功效^[1], 主要化学成分为厚朴酚、和厚朴酚、挥发油类、生物碱类等^[2], 具有抑菌、抗肿瘤、抗炎、促进胃肠蠕动等药理作用。目前, 国内对厚朴提取工艺的研究多采用正交试验设计或均匀设计法, 因此均存在精度不高的缺点。本实验以厚朴酚、和厚朴酚含量及浸膏得率为考察指标, 采用星点设计-响应面法结合总评归一值法优化厚朴提取工艺, 旨在为厚朴进一步的合理研究与利用奠定基础, 同时为本课题组的后续研究提供实验依据。

1 材料

LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津仪器有限公司), METTLER AE240 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏)。

厚朴药材购自湖南双鹤医药有限公司, 经湖南中医药大学高等专科学校生药教研室彭学著副教授鉴定为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils 的干燥干皮、根皮及枝皮。厚朴酚、和厚朴酚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110729-200412, 110730-201112), 甲醇为色谱纯, 水为重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 厚朴酚及和厚朴酚的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-aq 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-水(70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 294 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取厚朴酚及和厚朴酚对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得厚朴酚、和厚朴酚质量浓度分别为 0.391, 0.280 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 厚朴浸膏粉的制备 精密称取厚朴饮片适

量, 置于圆底烧瓶中, 加乙醇回流提取一定时间, 过滤, 减压回收溶剂, 50 °C 干燥至恒重, 即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取厚朴浸膏粉 0.4 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液一定量, 按倍数关系用甲醇稀释成 6 种不同质量浓度的溶液, 摇匀, 取 10 μL 进样测定。以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程为 $Y_{\text{厚朴酚}} = 728\ 864X + 634\ 509$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围 0.019 55 ~ 0.391 g·L⁻¹; $Y_{\text{和厚朴酚}} = 786\ 968X + 224\ 342$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围 0.014 ~ 0.280 g·L⁻¹。

2.1.6 精密度试验 取混合对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 结果厚朴酚、和厚朴酚峰面积 RSD 分别为 0.93%, 0.57%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 结果厚朴酚、和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 说明供试品溶液于 24 h 基本稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一样品, 按 2.1.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 结果厚朴酚、和厚朴酚含量的 RSD 分别为 1.3%, 0.4%, 表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取 9 份已知含量的厚朴浸膏粉, 每份约 0.1 g。分别准确加入厚朴酚、和厚朴酚混合对照品溶液适量, 制备高、中、低 3 种质量浓度样品, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定。结果厚朴酚、和厚朴酚平均回收率分别为 98.26% (RSD 0.9%), 100.3% (RSD 1.0%), 说明该方法回收率良好。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 试验设计 在预试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、溶媒比和提取次数为考察因素,其中提取次数为非连续变量,回归处理较困难,结合工业生产实际及相关文献,暂定为3次。根据星点设计原理,每因素设五水平,用代码值 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 表示,因素水平见表1。以厚朴中主要有效成分厚朴酚、和厚朴酚含量及浸膏得率为评价指标,试验安排及结果见表2。为将所有指标综合为一个能反映总体效应结果的值,数据处理采用“归一化法”,采用 Hassan 法^[3] 分别对各指标进行数学转换求“归一值”,计算公式如下。

$$d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}) \quad (1)$$

计算出各指标 d_i 值后,对各指标“归一值”进行处理,得总评“归一值”(OD),计算公式为式(2)^[4]。

$$OD = (d_1 \times d_2 \cdots d_n)^{1/n} \quad (2)$$

表1 厚朴提取工艺星点设计因素水平

	X_1 乙醇体积分数 /%	X_2 提取时间 /min	X_3 溶媒比 /倍
-1.682	40.00	30.00	6.00
-1	51.15	54.33	7.62
0	67.50	90.00	10.00
1	83.85	125.67	12.38
1.682	95.00	150.00	14.00

表2 厚朴提取工艺星点设计试验安排

No	X_1	X_2	X_3	厚朴酚/%	和厚朴酚/%	浸膏得率/%	OD
1	-1	-1	-1	1.240	0.668	18.969	0.660
2	1	-1	-1	0.869	0.493	17.812	0.260
3	-1	1	-1	0.883	0.502	20.843	0.538
4	1	1	-1	0.714	0.408	19.946	0.296
5	-1	-1	1	0.904	0.533	18.149	0.349
6	1	-1	1	0.648	0.377	18.359	0.146
7	-1	1	1	0.834	0.471	20.030	0.438
8	1	1	1	0.597	0.294	20.384	0.000
9	-1.682	0	0	1.155	0.552	21.844	0.786
10	1.682	0	0	0.895	0.499	18.725	0.360
11	0	-1.682	0	0.863	0.484	22.889	0.595
12	0	1.682	0	1.101	0.605	22.626	0.853
13	0	0	-1.682	0.698	0.400	19.165	0.244
14	0	0	1.682	0.775	0.390	17.384	0.000
15~20	0	0	0	1.216	0.663	21.596	0.899

注:No. 15~20 为重复试验,其值为平均值。

2.2.2 模型拟合及方差分析 以总评 OD 值为因变量,使用 Design-Expert 7.1.6 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,拟合模型如下:

多元线性回归方程 $Y = 1.475 - 8.952 \times 10^{-3} X_1 + 5.984 \times 10^{-4} X_2 - 0.038 X_3$; 二项式拟合方程 $Y = -6.407 + 0.063 X_1 + 0.013 X_2 - 1.012 X_3 - 1.641 \times 10^{-5} X_1 X_2 + 7.714 \times 10^{-6} X_1 X_3 + 4.419 \times 10^{-5} X_2 X_3 - 5.193 \times 10^{-4} X_1^2 - 6.714 \times 10^{-5} X_2^2 - 0.053 X_3^2$ 。

从多元线性回归方程可知 $r = 0.4533$, 相关系数过小, P 值不显著,不能通过检验,模型拟合度不高,预测性较差。对二项式拟合方程进行方差分析,

结果见表3。

表3 厚朴醇提工艺拟合回归方程的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.90	9	0.21	22.07	<0.0001
X_1	0.29	1	0.29	30.62	0.0002
X_2	6.224×10^{-3}	1	6.224×10^{-3}	0.65	0.4384
X_3	0.11	1	0.11	11.60	0.0067
$X_1 X_2$	7.334×10^{-4}	1	7.334×10^{-4}	0.077	0.7874
$X_1 X_3$	7.200×10^{-7}	1	7.200×10^{-7}	7.535×10^{-5}	0.9932
$X_2 X_3$	1.125×10^{-4}	1	1.125×10^{-4}	0.012	0.9157
X_1^2	0.28	1	0.28	29.08	0.0003
X_2^2	0.11	1	0.11	11.01	0.0078
X_3^2	1.28	1	1.28	134.27	<0.0001
残差	0.096	10	9.555×10^{-3}		
总差	1.99	19			

由方差分析可知,模型组具有高度的显著性 ($r=0.9758$),说明方程拟合度和可信度均良好,可用此模型对厚朴的提取工艺进行分析和预测。因素 X_1, X_3 中一次项和二次项均具有显著性差异,说明各具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。因此,选择二项式拟合模型为成功模型,实测值和预测值基本吻合,具有较好的预测作用。

2.2.3 工艺条件优化与预测 根据回归方程,作响应曲面图(图 1~3),根据所拟合的响应曲面形状,分析乙醇体积分数、提取时间、溶媒比对厚朴中厚朴酚及和厚朴酚含量的影响。基于已建立的数学模型,得到最佳提取条件为加 10 倍量 60% 乙醇提取 3 次,每次 95 min。

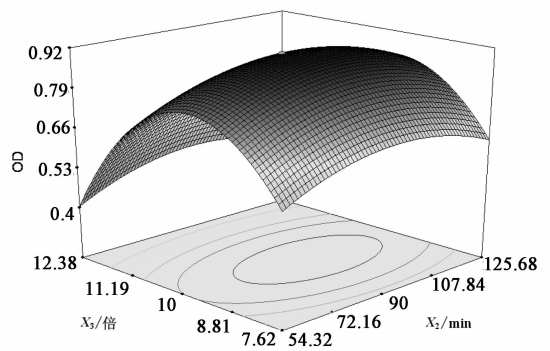


图 3 溶媒比、提取时间及其相互作用对提取工艺影响的响应面

3 讨论

目前,国内学者应用星点设计-响应面法优化药材提取工艺较多^[5-6],但对厚朴的提取工艺优化多采用正交设计或均匀设计的方法,普遍存在精确度不高、预测性不好等缺点。星点设计-响应面法适宜进行非线性拟合的优化法,选用二次多项式进行拟合得到最佳的模型拟合度。实验中二项式模型的拟合相关系数高,模型可信度好,预测值更接近真实值。本实验结合星点试验设计深入地对厚朴提取工艺参数进行系统考察,同时引入总评“归一值”对多指标进行处理,使试验模型具有更好的预测性,为厚朴进一步合理的开发、利用奠定基础。

[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,2010:235.
- [2] 杨云,张晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:540.
- [3] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志, 2000,35(8):532.
- [4] Hassan E E, Parish R C, Gallo J M. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anti-cancer agent, oxantrazole[J]. Pharm Res, 1992, 9(3):390.
- [5] 陈健,廖国平,张忠义. 星点设计-效应面法优化超高压提取红景天中红景天苷[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(1):19.
- [6] 李航,李小芳,李娜,等. 星点设计-效应面法优化黄连提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):52.

[责任编辑 仝燕]

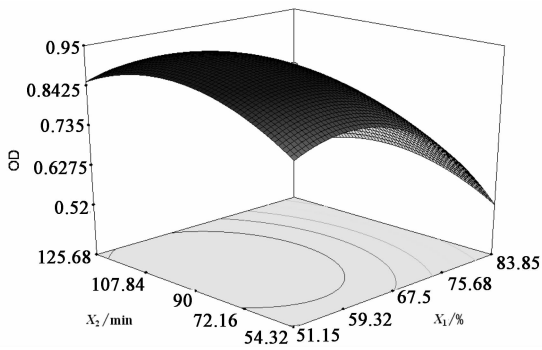


图 1 提取时间、体积分数及其相互作用对提取工艺影响的响应面

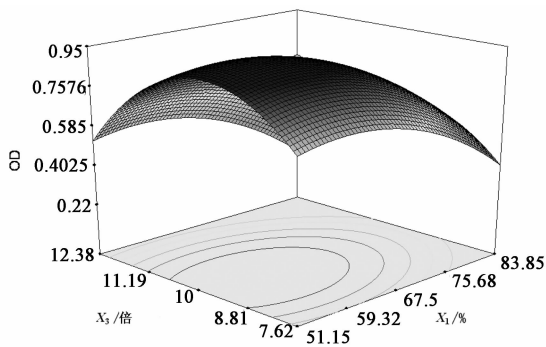


图 2 溶媒比、体积分数及其相互作用对提取工艺影响的响应面

2.2.4 验证试验 按最佳工艺条件进行 3 次验证试验,结果厚朴酚质量分数 1.28%,和厚朴酚质量分数 0.706%,浸膏得率 21.69%,总评归一值 0.9214,预测值 0.9501,偏差率 -3.01%,说明本试验建立的数学模型可靠,具有良好的预测性。