

星点设计-效应面法优选南五味子的提取工艺

肖莉¹, 张韵慧^{2*}

(1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江 湖州 313000; 2. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 目的: 采用星点设计-效应面法优化南五味子的提取工艺。方法: 以溶剂浓度, 溶剂倍数及提取时间为自变量, 五味子甲素提取率为因变量对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合, 用效应面法选择最佳提取工艺, 进行预测分析, 并将预测值与实验值进行比较。结果: 二项式拟合复相关系数较高, r 为 0.956 5, 最佳提取工艺为 62% 的乙醇溶液回流提取 2 次, 体积倍数为 11.20 倍, 提取时间为 3.00 h。提取率预测值与实验值偏差为 0.22%。结论: 试验值与预测值吻合度高, 星点设计-效应面法优化南五味子的提取工艺不仅方法简便, 且预测性良好。

[关键词] 南五味子; 五味子甲素; 星点设计-效应面法; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0022-04

Optimal Extraction of Effective Constituents from *Schisandra sphenanthera* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

XIAO Li¹, ZHANG Yun-hui^{2*}

(1. Huzhou Normal University, Huzhou 313000, China;

2. College of Pharmaceuticals & Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[Abstract] Objective: To investigate the optimal extraction process of effective constituents from *Schisandra sphenanthera* by central composite design/response surface methodology. **Method:** Independent variables were ethanol concentration, reflux time and the volume ratio of material to solvent, dependent variable was extraction rate of schisandrin A. Linear and nonlinear mathematic models were used to estimate the relationship between independent and dependent variables. Response surface methodology was used to optimize the process of extraction. Prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. **Result:** It was showed that the regression coefficient of second-order quadratic model was as high as 0.956 5. The optimum conditions of extraction process were 62% ethanol, 2.5 hours for reflux, 11.20 fold solvent and 2 times for extraction. Bias between observed and predicted values was 1.22%. **Conclusion:** The observed values and predicted one are close to each other, which proved the optimum model is reasonable and predictive.

[Key words] *Schisandra sphenanthera*; schisandrin A; Central composite design/response surface methodology; extraction process

南五味子系木兰科植物华中五味子 *Schisandra*

sphenanthera Rehd. Et wils. 的干燥成熟果实。化学研究表明, 其主要成分为五味子甲素、五味子酯甲等联苯环辛烯型木脂素类成分, 具有降低血清谷丙转氨酶的作用, 临床上用于治疗急、慢性肝炎^[1]。

目前国内多采取正交设计或均匀设计法优化中药的提取工艺, 这 2 种方法多采用线性数学模型, 虽有简便、试验次数较少等优点, 但精度不太高^[2]。星点设计 (central composite design) 是在析因设计

[收稿日期] 20100313(001)

[第一作者] 肖莉, 博士研究生, 讲师, 中药新剂型的研制与分析, Tel: 15868257436, E-mail: Tdxiao427@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 张韵慧, 教授, 博士生导师, Tel: 022-27401186, E-mail: Yunhuiz1186@yahoo.com.cn

(factorial design) 的基础上,加上星点(star point)及中心点(central point)而形成的试验设计方法,由于该法采用非线性数学模型拟合,复相关系数较高,在中心点进行重复性试验以提高试验精度,预测值更接近真实值;且简便,试验次数较少^[3-5]。本试验以五味子甲素提取率为指标,引入星点试验设计方法,结合效应面法优选南五味子的提取工艺,旨在优化南五味子提取工艺的同时,为探讨该试验设计法进一步应用于优化中药提取工艺的可行性提供依据^[6]。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪,SPD-6AV 紫外检测器,LC-6A 输液泵,ANASTAR 色谱工作站;DK-98-1 型电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);AL-204 型电子分析天平(Mettler-Toledo 公司)。

五味子甲素(中国药品生物制品检定所,批号 0764200107);南五味子(天津达仁堂中药饮片厂);甲醇、乙醇(分析纯,天津大学科威公司);蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 五味子甲素含量测定方法的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取五味子甲素对照品 7.10 mg,甲醇定容于 10 mL 量瓶中,摇匀,备用。

2.1.2 样品溶液的制备 将南五味子药材研磨后过 40 目筛,取细粉约 0.1 g,精密称定后,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称重,超声提取 30 min,放冷,称重补足。将提取液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液备用。取南五味子浸膏约 0.2 g,精密称定,后续处理方法同药材样品溶液制备。

2.1.3 色谱条件 Spherisorb ODS C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相甲醇-水(75:25);流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 254 nm(室温);进样量 10 μL。

2.1.4 标准曲线制备 精密吸取对照品溶液,按不同比例稀释,得到 7.10, 17.75, 35.50, 71.00, 142.00, 284.00 mg·L⁻¹ 对照品溶液,分别进样 10 μL,按上述色谱条件测定,记录色谱图,计算峰面积。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得线性回归方程 $Y = 5\,015.5C + 8\,526.8$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,在 7.10 ~ 284.00 mg·L⁻¹ 峰面积对浓度有良好的线性关系。

2.1.5 精密度实验 取南五味子细粉约 0.1 g,精

密称定,按照 2.1.2 项样品溶液的制备,重复进样 5 次,测定峰面积,根据标准曲线方程计算 RSD 为 1.51%。

2.1.6 稳定性试验 取南五味子细粉约 0.1 g,精密称定,按照 2.1.2 项样品溶液的制备,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 10 μL,测定峰面积,根据标准曲线方程计算 RSD 为 1.74%,结果表明样品在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取南五味子细粉约 0.1 g,精密称定 5 份,按照 2.1.2 项样品溶液的制备,分别测定,每次进样 10 μL,测定峰面积,根据标准曲线方程计算 RSD 为 1.59%。

2.1.8 加样回收率试验 取已知含量的南五味子细粉 6 份(每份约含有五味子甲素 74.82 μg),精密称定,分别加入 80%, 100%, 120% 五味子甲素对照品,按照 2.1.2 项样品溶液的制备,进样 10 μL,测定峰面积,由标准曲线计算低、中、高加入量的平均回收率为 99.21%,RSD 为 1.3%,结果表明该方法有很好的回收率。

2.1.9 样品测定 分别精密吸取南五味子药材和按星点设计提取所得的浸膏适量,按照 2.1.2 项样品溶液的制备,进样 10 μL,根据标准曲线方程计算五味子甲素的含量,并由下列公式计算五味子甲素提取率。

$$\text{提取率} = \frac{\text{提取物五味子甲素含量}(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) \times \text{出膏率} / \text{称样量}(\text{g})}{\text{南五味子药材中五味子甲素含量} \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}}$$

2.2 星点设计法优化提取条件

2.2.1 试验设计与结果 根据文献报道及中药材的传统提取经验,确定回流提取的考察因素为提取次数、乙醇浓度、提取时间和溶剂倍量^[7]。由于提取次数为非连续变量,回归处理较困难,结合预试验结果和工业生产的实际,定为 2 次,其余因素的水平据预实验结果而定,以五味子甲素提取率为考察指标,采用星点设计优化提取条件,因素水平见表 1,试验安排和结果见表 2。

表 1 提取工艺星点设计因素水平

因素	水 平				
	- 1.732	- 1	0	+1	+1.732
X ₁ (乙醇体积分数) / %	50.00	58.45	70.00	81.55	90.00
X ₂ (提取时间) / min	60	85.36	120	154.64	180
X ₃ (溶剂量) / 倍	6	7.69	10	12.31	14

表 2 提取工艺星点试验设计与结果

No	X_1	X_2	X_3	五味子甲素 提取率 /%
1	-1	-1	-1	66.30
2	+1	-1	-1	53.53
3	-1	+1	-1	60.31
4	+1	+1	-1	48.51
5	-1	-1	+1	43.28
6	+1	-1	+1	57.63
7	-1	+1	+1	83.10
8	+1	+1	+1	74.14
9	-1.732	0	0	59.25
10	+1.732	0	0	50.88
11	0	-1.732	0	61.15
12	0	+1.732	0	77.42
13	0	0	-1.732	67.47
14	0	0	+1.732	79.45
15~20	0	0	0	60.26

2.2.2 模型拟合 以五味子甲素提取率为因变量, 对各因素进行多元线性回归和二项式拟合。多元线性回归方程:

$$Y = 62.199 - 2.406X_1 + 5.250X_2 + 3.589X_3, R = 0.5744, F(3, 16) = 2.63 (P > 0.05).$$

表 3 二项式拟合系数结果

	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	b_7	b_8	b_9
估计值	60.260	-2.406	5.250	3.589	-2.701	2.039	3.431	-2.793	3.745	8.417
标准误	1.662	1.088	1.088	1.088	1.026	1.026	1.026	1.440	1.440	1.440
t	36.250	-2.210	4.824	3.298	-2.632	1.988	3.344	-1.940	2.601	5.847
P	0.000	0.052	0.001	0.008	0.075	0.015	0.007	0.081	0.026	0.000

根据上述星点设计的优化结果, 分别称取 30 g 南五味子药材 5 份, 加入 11.20 倍量的 62% 乙醇溶液回流提取 2 次, 每次提取时间为 3.00 h, 考察五味子甲素提取率, 结果见表 4 与表 5。

表 4 验证试验 %

No	提取率	提取率平均值	RSD
1	70.84		
2	71.59		
3	68.52	70.39	1.667
4	70.11		
5	70.93		

表 5 预测值与试验值偏差 %

因变量	五味子甲素提取率
预测值	69.53
试验值	70.39
偏差	1.22

二项式拟合方程:

$$Y = 60.260 - 2.406X_1 + 5.250X_2 + 3.589X_3 - 2.701X_1^2 + 2.039X_2^2 + 3.431X_3^2 - 2.793X_1X_2 + 3.745X_1X_3 + 8.417X_2X_3, R = 0.9565 (P < 0.01),$$

拟合结果见表 3。

从拟合方程的相关系数可见, 多元线性回归方程的相关系数较低, 表示自变量与因变量之间线性相关性较差, 可见多元线性回归拟合度不佳, 预测性较差, 因此该数学模型不合适。而多元二项式拟合方程相关系数较高, 拟合效果较好。其中, $X_1, X_2, X_3, X_1^2, X_2^2$ 及 X_3^2 项为 3 因素对指标的单独作用, 而 X_1X_3 和 X_2X_3 项为因素的交互作用, 方程从整体上反映了各因素及其相互作用对指标值的影响。

2.2.3 工艺优化和预测 因变量曲面图是三维图, 只能表达 2 个自变量的函数, 因此固定 3 个自变量之一为中值, 以拟合的目标函数为数学模型, 采用 Minitab 软件绘制效应面图(图 1~3)。考虑到工艺生产中实际成本以及实际实验误差等问题, 本研究选取南五味子提取的最优工艺为: $X_1: -0.75, X_2: 0.61, X_3: 0.52$, 即最优工艺为提取溶剂为 62% 的乙醇溶液回流提取 2 次, 体积倍数为 11.20 倍, 提取时间为 3.00 h。

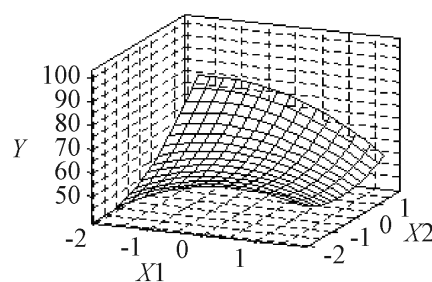


图 1 乙醇浓度和提取时间对五味子甲素提取率影响的三维图

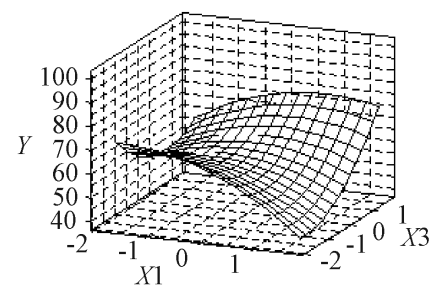


图 2 乙醇浓度和溶剂量对五味子甲素提取率影响的三维图

3 讨论

参考文献中关于五味子甲素的流动相为甲醇-

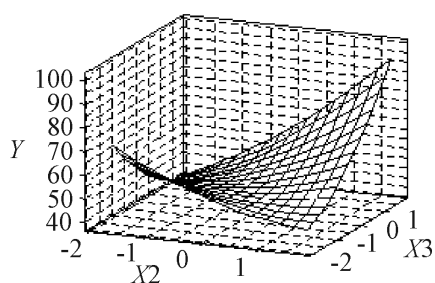


图 3 提取时间和溶剂量对五味子甲素提取率影响的三维图

水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等^[8-9], 综合考虑保留时间、色谱峰分离度、峰形及成本等因素, 本研究中选用甲醇-水(75:25)作为流动相, 不仅能得到峰形较好、分离度较高的色谱峰, 并且保留时间也很适宜。

本研究在预实验的基础上, 通过单因素考察影响五味子甲素提取率的因素, 选取影响最大的 3 个因素, 即溶剂浓度、提取时间和溶剂用量, 去掉单因素中对五味子甲素提取率影响较小的水平, 缩小考察范围, 提高实验精度, 进而采用星点设计-效应面优化设计进行提取工艺的优化和筛选, 以五味子甲素提取率作为优化指标, 应用 Minitab 实验设计软件绘制各因素对指标的三维效应面图, 直观的描绘出各个因素的影响。通过对各因素进行拟合, 得出二项式拟合方程, 相关系数 R 为 0.956 5, 说明该拟合模型为成功的模型, 具有较好的预测作用。

国内关于南五味子有效成分提取采用的多为传统的正交实验设计或均匀设计, 本研究中为了更好的达到优化对比的效果, 笔者使用 $L_9(3^4)$ 正交表进行了南五味子乙醇提取工艺的研究, 优化得到的最佳提取工艺为: 提取溶剂为 70% 的乙醇溶液, 体积倍数为 10 倍, 提取时间为 2 h, 提取 3 次, 五味子甲素提取率为 65.01%。通过对 2 种优化方法的比较, 结果显示星点设计虽然实验次数相对较多, 但由

于其考察因素的水平范围更大, 最优工艺的选择不仅局限于所设置的水平, 同时采用非线性模型, 拟合预测能力优异可靠。未来该优化方法在中药材提取优化的研究中将发挥日益重要的作用。

[参考文献]

- [1] 杨福泰, 李向东, 黄巧云. 五酯胶囊治疗各种病因所致血清转氨酶升高 120 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(8): 1044.
- [2] 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.
- [3] Branchu S, Forbes R T, York P, et al. A central composite design to investigate the thermal stabilization of lysozyme[J]. *Pharm Res* 1999, 16(5): 702.
- [4] 任凤莲, 谷芳芳, 吴梅林, 等. 利用响应面分析法优化山楂中总黄酮提取工艺[J]. 天然产物开发与研究, 2006, 18: 126.
- [5] 徐蓉, 陈钧, 徐骅. 响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 26.
- [6] 马腾文, 白志川, 代军平. 高效液相色谱法测定五酯分散片中五味子甲素的含量[J]. 西南民族大学学报, 2006, 32(3): 572.
- [7] 宋小妹, 曹林林, 董彬彬. 南五味子有效成分的提取工艺研究[J]. 现代中医药, 2003, 5: 74.
- [8] 陈光龙. HPLC 法测定复方五味子胶囊中五味子甲素的含量[J]. 中草药, 2004, 35(5): 529.
- [9] 刘玉红, 易进海, 黄志芳, 等. 五仁醇分散片的制备工艺研究及体外溶出度试验[J]. 中成药, 2009, 31(6): 860.

[责任编辑 仝燕]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿, 请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员, 登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后, 如录用, 请按通知要求交纳论文发表费。(见本刊稿约 7 投稿及缴费)