

金银萍,王 博,刘兴医,等.Box - Behnken 响应曲面法优化五味子木脂素的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):210-212.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.057

Box - Behnken 响应曲面法优化五味子木脂素的提取工艺

金银萍,王 博,刘兴医,逢世峰,薛禹臣,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:以五味子果实为原料,研究五味子木脂素的最佳提取工艺条件。以木脂素提取率为响应值,在单因素试验的基础上,通过 Box - Behnken 试验设计,考察乙醇体积分数、提取温度、提取时间对五味子木脂素提取率的影响。结果表明,冷凝回流法提取五味子木脂素的最佳提取工艺为:乙醇体积分数 90%、提取温度 83 ℃、提取时间 232 min,五味子木脂素的提取率为 0.54%;采用 Box - Behnken 响应曲面法建立的数学模型预测性好、稳定可行,可作为五味子木脂素提取的生产工艺。

关键词:五味子;木脂素;单因素试验;冷凝回流;响应曲面分析;冷凝回流法;提取工艺

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)22-0210-03

五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.]为木兰科五味子属多年生落叶藤本植物,为著名的滋补和安神镇静中药,已有 2 000 多年的临床应用历史。五味子的主要成分为木脂素、三萜、挥发油、多糖等^[1],其中主要的药效成分为木脂素,具有保肝、抑制中枢神经、抗衰老、抗肿瘤等多种药理活性^[2]。近年来,有关五味子木脂素提取工艺的文献有很多,以正交试验方法较为常见,但筛选得到的结果差异性大、重复性差^[3-4]。

响应曲面法(response surface method,简称 RSM)是一种通过对响应曲面及等高线进行分析并寻求最优工艺参数的方法,采用多元二次回归方程拟合响应值与因素之间函数关系的一种优化统计方法^[5-6]。该方法在木脂素提取工艺方面的研究报道较少,而且主要针对的是超声波辅助提取,且是在没有单因素的考察基础上进行的,缺乏整体系统性及科学性^[7-10]。本研究首次采用冷凝回流的提取方法,以五味子中含量高的 4 种木脂素含量为考察指标,在单因素试验的基础上,采用 Box - Behnken 试验设计筛选五味子木脂素的提取工艺,为五味子木脂素类成分的工业化提取提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司);HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司);SF-TDL-4A 离心机(上海菲加尔分析仪器有限公司)。

五味子果实采自吉林左家特产研究所资源圃,经中国农

业科学院特产研究所艾军研究员鉴定为木兰科五味子属植物的果实。五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素(中国食品药品检定研究所,批号分别为 110857、110764、110765);五味子醇乙(上海源叶生物科技有限公司,批号为 YY90208)。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 五味子中木脂素含量的测定

1.2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.7 μm);流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱程序为 0~1.0 min,48%~50%A;1.0~3.0 min,50%~70%A;3.0~4.5 min,70%~95%A;4.5~6.5 min,95%A;6.5~7.0 min,95%~48%A;7.0~9.0 min,48%A;柱温 35 ℃,样品温度 15 ℃,检测波长 254 nm,流速 0.35 mL/min,进样量 1 μL。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 五味子果实低温干燥,粉碎过 80~100 目筛,精确称取 5.000 g 原料粉末,按照表 1 试验设计的条件进行乙醇回流提取,过滤,合并滤液,4 500 r/min 离心 10 min,取上清液,用乙醇溶液定容至 100 mL 容量瓶内,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,高效液相检测分析。

1.2.1.3 对照品溶液的制备 精确称取五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素对照品适量,置于 10 mL 容量瓶内,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得到质量浓度分别为 113.6、62.0、36.8、62.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

1.2.1.4 线性关系考察 将混合对照品溶液用甲醇溶液稀释成系列浓度梯度,依次进入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标绘制标准曲线,计算各木脂素的回归方程,具体结果见表 2。

1.2.1.5 精密度 取供试品溶液按“1.2.1.1”节色谱条件连续测定 6 次,记录峰面积。结果显示,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.49%、0.39%、0.63%、0.48%(n=6),表明仪器精密度良好。

1.2.1.6 稳定性试验 取同一供试样品溶液,分别放置 0、

收稿日期:2016-06-12

基金项目:吉林省重点科技攻关(编号:20140204062YY)。

作者简介:金银萍(1981—),女,辽宁凌海人,硕士,助理研究员,主要从事中药化学质量评价研究。E-mail:jinyinping06@163.com。

通信作者:王英平,博士,研究员,主要从事中药质量评价研究。

E-mail:yingpingw@126.com。

表 1 木脂素提取试验 Box - Behnken 设计及结果

试验号	A:乙醇体积 分数 (%)	B:提取 时间 (min)	C:提取 温度 (℃)	木脂素含 量 (%)
1	50	30	75	0.133 2
2	90	30	75	0.212 9
3	50	270	75	0.289 2
4	90	270	75	0.506 8
5	50	150	55	0.165 2
6	90	150	55	0.293 7
7	50	150	95	0.218 5
8	90	150	95	0.431 6
9	70	30	55	0.092 0
10	70	270	55	0.218 6
11	70	30	95	0.133 5
12	70	270	95	0.397 6
13	70	150	75	0.454 0
14	70	150	75	0.433 6
15	70	150	75	0.437 0
16	70	150	75	0.445 9
17	70	150	75	0.444 1

表 2 4 种木脂素的回归方程

木脂素	回归方程	r^2	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)
木五味子醇甲	$Y=1.27X \times 10^7 + 2\ 880$	0.999 4	1.136 ~ 113.600
五味子醇乙	$Y=9.81X \times 10^6 + 1\ 730$	0.999 1	0.620 ~ 62.000
五味子甲素	$Y=1.23X \times 10^7 + 1\ 430$	0.999 3	0.368 ~ 36.800
五味子乙素	$Y=9.43X \times 10^6 + 2\ 070$	0.999 4	0.620 ~ 62.000

2、4、8、12、24 h 后进样分析,记录峰面积,计算木脂素含量。结果显示,供试样品液中五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素含量的 RSD 分别为 0.89%、0.76%、1.02%、1.23% ($n=6$)。结果表明,供试样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

1.2.1.7 重复性试验 取同一供试样品溶液 6 份,按“1.2.1.1”色谱条件测定,测得五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 0.72%、0.49%、1.13%、0.97%,表明本方法的重复性良好。

1.2.1.8 加样回收率试验 称取混合对照品适量,加入已知含量的同一批五味子粉末 5.000 g 中,按照“1.2.1.1”色谱条件和“1.2.1.2”供试品制备方法进行检测分析。结果显示,五味子醇甲、五味子醇乙、五味子甲素、五味子乙素的平均加样回收率分别为 101.9%、98.6%、101.3%、97.9%, RSD 值

分别为 2.8%、3.1%、1.7%、2.5% ($n=6$)。

1.2.2 五味子木脂素提取单因素试验

1.2.2.1 乙醇体积分数 准确称取粉碎后的五味子粉末 5.000 g(5 份),按 1 g : 10 mL 的料液比加入不同体积分数的乙醇溶液,提取温度为 90 ℃,提取时间为 3 h,提取 2 次,考察乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 时对五味子木脂素提取率的影响。

1.2.2.2 提取时间 准确称取粉碎后的五味子粉末 5.000 g(5 份),按 1 g : 10 mL 的料液比加入 90% 乙醇溶液,提取温度为 90 ℃,提取 2 次,考察提取时间分别为 30、90、150、210、270 min 时对木脂素提取率的影响。

1.2.2.3 提取温度 准确称取粉碎后的五味子粉末 5.000 g(5 份),按 1 g : 10 mL 的料液比加入 90% 乙醇溶液,提取时间为 3 h,提取 2 次,考察提取温度分别为 55、65、75、85、95 ℃ 时对五味子木脂素提取率的影响。

1.2.3 Box - Behnken 响应曲面法优化试验的设计 在单因素试验基础上,精确称取 5.000 g 五味子粉末,以乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、提取温度(C)3 个因素为自变量,以五味子木脂素提取率为响应值,按 Design - Expert 8.0.5 中 Box - Behnken 试验设计原理,共设计 17 个试验点、12 个分析点、5 个 0 点以估计误差,进行相应曲面的分析试验。试验设计和结果分析见表 1。

2 结果与分析

2.1 五味子木脂素提取单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对五味子木脂素提取率的影响 由图 1 可知,随着乙醇体积分数的增加,木脂素的提取率逐渐增加,当乙醇体积分数超过 70% 时,五味子木脂素提取率增加的幅度逐渐降低。这主要是由于木脂素为脂溶性成分,根据相似相溶原理,随着乙醇体积分数的增加,溶解度增加。

2.1.2 提取时间对五味子木脂素提取率的影响 由图 2 可知,随着提取时间的延长,木脂素的提取率也在逐渐增加,时间超过 210 min 后,木脂素的提取率趋于平稳。这主要是因为随着提取时间的延长,部分木脂素成分发生降解。

2.1.3 提取温度对五味子木脂素提取率的影响 由图 3 可知,随着提取温度的升高,五味子木脂素的提取率逐渐增加,当提取温度超过 85 ℃ 时,木脂素的提取率趋于平稳。这主要是因为随着提取温度的提高,部分木脂素成分发生降解。

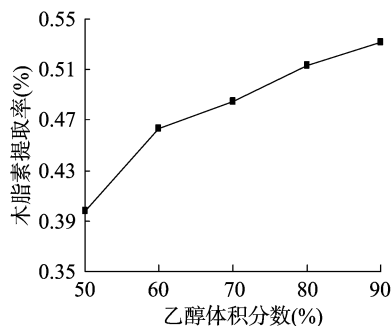


图 1 乙醇体积分数对木脂素提取率的影响

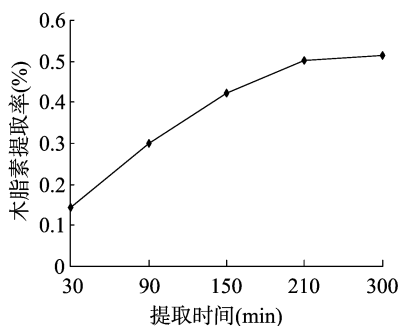


图 2 提取时间对木脂素得率的影响

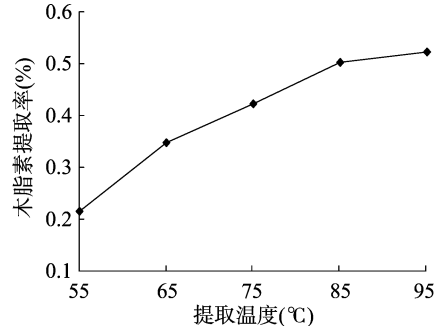


图 3 提取温度对木脂素得率的影响

2.2 Box - Behnken 响应曲面法优化试验的设计

2.2.1 木脂素提取试验方案及方差分析 利用 Design -

Expert 8.0.5 软件对表 1 中的数据进行多元拟合,得到木脂素提取率(Y)对乙醇体积分数(A)、提取时间(B)、提取温度

(C)的二次多项模型方程 $Y = 0.440 + 0.080A + 0.110B + 0.051C + 0.034AB + 0.021AC + 0.034BC - 0.045A^2 - 0.011B^2 - 0.120C^2$ 。对该模型进行方差分析,具体结果见表 3。从表 3 可以看出,模型的 $F = 227.31$ 、 $P < 0.0001$,表明模型对提取工艺影响极显著。 $R^2 = 0.9966$,变异系数(CV) = 3.92%, $R^2_{adj} = 0.9922$,表明模拟程度良好,试验误差较小,模型相关度良好。模拟一次项 A、B、C 对五味子木脂素提取率均有显著影响,交互项中 AB、AC、BC 对五味子木脂素提取率均有显著影响,二次项中 A^2 、 B^2 、 C^2 对五味子木脂素提取率也有显著影响。根据回归方程中的各项系数及表 3 回归方程中的方差结果可知,在所选因素范围内,各个因素对五味子木脂素提取率的影响顺序为提取时间 > 乙醇体积分数 > 提取温度。

根据拟合的二项式方程,采用 Design-Expert 8.0.5 软件分别绘制三维效应图,考察各自变量对五味子木脂素提取工艺的影响,具体见图 4。由图 4 可知,响应曲面的坡度均较陡峭,呈现钟罩状,表明所考察的 3 个因素(乙醇体积分数、提取时间、提起温度)两两交互作用对五味子木脂素提取率

表 3 Box-Behnken 试验回归模型的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.310 000	9	0.034 000	227.31	<0.000 1
A	0.051 000	1	0.051 000	341.54	<0.000 1
B	0.088 000	1	0.088 000	591.22	<0.000 1
C	0.021 000	1	0.021 000	141.82	<0.000 1
AB	0.004 754	1	0.004 754	31.82	0.000 8
AC	0.001 789	1	0.001 789	11.98	0.010 5
BC	0.004 727	1	0.004 727	31.64	0.000 8
A^2	0.008 521	1	0.008 521	57.03	0.000 1
B^2	0.053 000	1	0.053 000	353.34	<0.000 1
C^2	0.061 000	1	0.061 000	406.42	<0.000 1
残差	0.001 046	7	0.000 149		
失拟项	0.000 791	3	0.000 264	4.13	0.102 0
纯误差	0.000 255	4	0.000 064		
总和	0.310 000	16			

均有明显影响。以上对响应面图的分析结果与表 3 的方差分析结果一致。

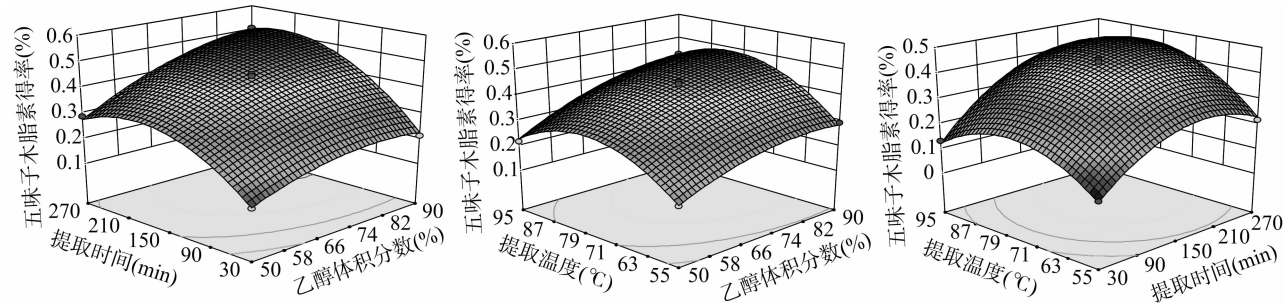


图 4 交互作用对五味子木脂素提取率的影响

2.3 五味子木脂素提取验证试验

通过 Design Expert 8.0.5 软件分析,得到最佳的提取条件为乙醇体积分数 90%,提取温度 83.02 °C,提取时间 232.22 min,五味子木脂素的最高得率为 0.539 6%。考虑到实际生产需要,将工艺参数调整为乙醇体积分数 90%,提取温度 83 °C,提取时间 232 min。按照修正后的条件进行提取,平均提取率为 0.536 1%,与预测值无明显差异。

3 结论与讨论

木脂素类化合物是五味子中主要的药效成分,从 20 世纪 40 年代起至今的 70 多年中,国内外学者对五味子的研究最为活跃。尤其是中国学者以五味子中的联苯环辛二烯类木脂素为先导化合物,创制了拥有自主知识产权的抗肝炎新药-联苯双酯、双环醇的研发工作最为出色,取得了显著的社会效益和经济效益。因此,对木脂素的提取工艺研究具有重要意义。

常压乙醇提取虽是属于比较传统的提取方法,但在实际生产过程中,却是很多企业 and 研究学者常用的提取方法,具有简单易行、成本低廉的优点。响应曲面优化法从三维空间出发,通过因素与响应值之间的函数表达,找出整个区域上因素的最佳组合方式及响应面的最优值。本研究以五味子中 4 种含量高的木脂素为测定指标,利用 Box-Behnken 响应曲面试验设计优化五味子木脂素的提取工艺参数。通过本研究筛选得到的工艺参数为五味子木脂素的工业化提取和临床应用提供了理论依据。

参考文献:

[1] 金银萍,焉石,刘俊霞,等.五味子科植物中羊毛脂烷型三萜类成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2014,45(1):137-143.

[2] 史琳,王志成,冯叙桥.五味子化学成分及药理作用的研究进展[J].药物评价研究,2011,34(3):208-212.

[3] 蒋益萍,张巧艳,张宏,等.正交试验优选五味子木脂素类成分的提取工艺[J].中成药,2013,35(11):2390-2394.

[4] 吴艳玲,朴惠善.北五味子活性成分提取工艺的研究[J].时珍国医国药,2007,18(5):1176-1177.

[5] 刘艳杰,项荣武.星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J].中国现代应用药学,2007,24(6):455-457.

[6] Pan Y, Cai B C, Wang K L, et al. Neferine enhances insulin sensitivity in insulin resistant rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 124(1):98-102.

[7] 董媛媛,邓翀,柴思佳.综合评分结合响应面法筛选北五味子木脂素提取工艺[J].中草药,2014,45(9):860-864.

[8] 王连芝,付克,顾媛媛,等.Box-Behnken 试验设计优化五味子木脂素提取工艺[J].长春中医药大学学报,2015,31(1):21-23.

[9] 张悦怡,刘勇慧,赵岩,等.响应面法优化超声辅助乙醇提取五味子木脂素工艺研究[J].食品安全质量检测学报,2014,5(6):1855-1861.

[10] 魏殿文,王振宇,王志强.响应面法优化超声波辅助提取五味子木脂素研究[J].国土与自然资源研究,2010(4):76-77.