

# 响应面法优化巴戟天低聚糖提取工艺

杨欣<sup>1\*</sup>, 宋健平<sup>2</sup>, 关业枝<sup>2</sup>, 王琪<sup>2</sup>, 林励<sup>1#</sup>, 林伟栋<sup>1</sup>, 顾善喜<sup>1</sup>(1.广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2.广州中医药大学科技产业园, 广州 510445)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4847-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.31

**摘要** 目的:优化巴戟天低聚糖提取工艺。方法:以液料比、提取时间和提取温度为考察因素,以巴戟天低聚糖提取率为评价指标,在单因素试验的基础上,采用3因素3水平Box-behnken中心组合试验,建立低聚糖提取率的二次多项式回归方程,经响应面回归分析得到优化组合条件并进行验证。结果:最优提取工艺条件为液料比23:1(ml/g)、提取时间1.7 h、提取温度93℃、提取2次。该条件下3次验证试验低聚糖提取率实测均值为10.29%(RSD=0.20%,n=3),与预测值10.37%相比偏差为0.06%。结论:采用响应面法可实现巴戟天低聚糖提取工艺的优化。

**关键词** 巴戟天;低聚糖;提取工艺;响应面法;优化

## Optimization of the Extraction Technology for Oligosaccharides of *Morinda officinalis* by Response Surface Methodology

YANG Xin<sup>1</sup>, SONG Jian-ping<sup>2</sup>, GUAN Ye-zhi<sup>2</sup>, WANG Qi<sup>2</sup>, LIN Li<sup>1</sup>, LIN Wei-dong<sup>1</sup>, GU Shan-xi<sup>1</sup>(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. Science & Technology Industrial Park, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510445, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of oligosaccharides of *Morinda officinalis*. METHODS: The liquid/solid ratio, extraction time and temperature were chosen as factors, and the yield of oligosaccharides was estimated as index. On the basis of single-factor experiments, using a 3-factor, 3-level Box-behnken central composite experimental design, two-polynomial regression equation of extraction rate of oligosaccharide was established, and it was analyzed by response surface methodology to obtain the optimum extraction conditions, and the verification test was conducted. RESULTS: The optimum extraction conditions were as follows as material/liquid ratio of 23:1 (ml/g), extraction time of 1.7 h, and extraction temperature of 93℃, extracting for twice. Under these conditions, the estimated and observed average values of extraction rate of oligosaccharides were 10.37% and 10.29% (RSD=0.20%, n=3), respectively. The deviation value was 0.06%. CONCLUSIONS: The response surface methodology can be used to optimize the extraction process of oligosaccharides of *M. officinalis*.

**KEYWORDS** *Morinda officinalis* How; Oligosaccharides; Extraction technology; Response surface methodology; Optimization

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根<sup>[1]</sup>, 全年均可采挖, 采后洗净, 去除须根, 晒干。《本草纲目》记载, 巴戟天具有补肾壮阳、强筋健骨、祛风湿的功效。现代药理研究显示巴戟天中的低聚糖成分具有抗痴呆、抗抑郁、增强记忆作用的神经药理学活性<sup>[2-4]</sup>。目前, 巴戟天低聚糖的提取工艺多采用正交设计, 不能考察各因素之间、多个响应面与因素之间的交互作用关系; 而采用响应面法(RSM)<sup>[5]</sup>, 能以最经济、最少的试验次数和最短的时间对所选的考察因素及试验参数进行全面研究, 故该方法越来越多地应用于生物医药领域。显然, 通过响应面优化工艺参数, 对巴戟天低聚糖有效部位新药中试及产业化的研究具有重要意义。因此, 笔者采用响应面法对巴戟天低聚糖的提取条件进行了优化研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器与设备

8453E型紫外-可见分光光度计(美国Agilent公司); BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司); HH-S6型数显

\* 博士研究生。研究方向: 中药资源开发与新药研究。E-mail: chemist\_yx@163.com

# 通信作者: 研究员, 博士生导师。研究方向: 中药资源开发与新药研究。电话: 020-39358270。E-mail: ll76611@yahoo.com.cn

恒温水浴锅(常州普天仪器公司)。

### 1.2 药品、试剂与树脂

巴戟天样品于2014年7月采自广东德庆市高梁镇中药材生产质量管理规范(GAP)的巴戟天种植基地, 经广州中医药大学中药学院林励研究员鉴定为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的肉质根; 葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110833-200904, 纯度:  $\geq 99.5\%$ ); 乙醇、浓硫酸、苯酚等均为分析纯(广州化学试剂厂); D-900离子交换大孔树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司, 批号: 20141107)。

## 2 方法与结果

### 2.1 巴戟天低聚糖的提取工艺

分别精密称取同一批巴戟天药材粉末各100 g(过3号筛), 用15倍量的40%乙醇<sup>[6]</sup>浸泡24 h后, 于90℃水浴回流提取1 h, 滤过, 取滤渣再次提取1 h; 合并滤液, 浓缩至稠浸膏后, 减压干燥。

### 2.2 低聚糖含量测定

采用2010年版《中国药典》(一部)苯酚-硫酸法<sup>[1]</sup>。

2.2.1 含量测定方法学考察 以葡萄糖为对照品绘制标准曲线。称取葡萄糖对照品溶液适量, 精密称定, 加水制备成0.25 mg/ml的葡萄糖对照品溶液。分别精密量取对照品溶液1、2、

3、4、6、8、10 ml置于25 ml量瓶中,加水至刻度,摇匀。然后取上述溶液各1 ml,置于具塞试管中,分别加入4%苯酚溶液0.5 ml,混匀,缓慢滴加浓硫酸3 ml,摇匀,在沸水中水浴20 min,取出放冷。于490 nm波长处测定吸光度,以葡萄糖的质量浓度( $c$ , mg/ml)为横坐标、吸光度值( $A$ )为纵坐标进行回归,得方程为 $A=0.0128c+0.0086$ ( $r=0.9998$ ),结果表明葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.01~0.1 mg/ml;按规定进行精密度和准确度试验,结果吸光度的RSD=0.28%( $n=6$ ),平均加样回收率为99.76%(RSD=0.46%, $n=6$ )。

2.2.2 换算因子计算<sup>[7]</sup> 称取巴戟天药材100 g,用15倍量的40%乙醇浸泡24 h后,于90℃回流提取1 h,滤过,取滤渣再次提取1 h,合并滤液。取上述滤液过活性炭柱除杂质,再用树脂进行纯化,循环上柱2次以上,用纯化水冲洗至洗脱液糖显色反应为阴性。合并无色水洗脱液,减压浓缩至稠膏后,冷冻干燥成固体,再加入5倍量纯化水水浴回流溶解后,趁热过滤,待滤液冷却至常温后,加入乙醇至体积分数为90%,搅拌均匀,常温静置4 d,过滤。收集沉淀,减压干燥得巴戟天低聚糖固体约4.0 g。

精密称取5.0 mg巴戟天低聚糖,纯水溶解并定容至50 ml中,得巴戟天低聚糖供试品溶液。精密量取1.0 ml,照“2.2.1”项下方法测定吸光度,代入回归方程计算供试液中葡萄糖含量。计算换算因子 $f=M_1/M_2$ ( $M_1$ 为供试液中低聚糖实际加入量5.0 mg, $M_2$ 为测定值)。

### 2.3 巴戟天低聚糖提取率测定

巴戟天中低聚糖含量测定:吸取巴戟天低聚糖待测液1 ml,测定吸光度( $A$ ),代入回归方程计算待测液中低聚糖质量浓度( $c$ )。计算样品中巴戟天低聚糖含量: $c \times f \times V/W \times 100\%$ ( $W$ 为称取低聚糖的质量(mg), $V$ 为低聚糖待测液总体积)。低聚糖提取率=巴戟天中低聚糖含量 $\times W_{\text{巴戟天提取物}}/W_{\text{巴戟天药材}} \times 100\%$ 。

### 2.4 单因素试验

2.4.1 液料比对巴戟天低聚糖提取率的影响 称取10 g巴戟天药材粉末,共5份,按液料体积质量比10:1、15:1、20:1、25:1、30:1(多组液料比)加入蒸馏水,浸泡24 h,于90℃水浴浸提2 h,测定巴戟天低聚糖的含量并计算提取率。结果,液料比从10:1增加到25:1时,低聚糖提取率显著增加;液料比为25:1以上时,提取率增加不大且呈下降趋势,详见图1A。因此选择液料比为20:1。

2.4.2 提取时间对巴戟天低聚糖提取率的影响 称取10 g巴戟天药材粉末,共5份,液料比为20:1,在90℃水浴中分别浸提0.5、1、1.5、2、2.5 h,测定巴戟天低聚糖的含量并计算提取率。结果,随着提取时间的延长,提取率在1.5 h前增加较为明显,2 h后的变化趋于平缓,详见图1B。为减少能耗、节省时间,选择提取时间为1.5 h。

2.4.3 提取温度对巴戟天低聚糖提取率的影响 称取10 g巴戟天药材粉末,共5份,液料比为20:1,分别置于60、70、80、90、100℃恒温水浴锅中浸提2 h,测定巴戟天低聚糖的含量并计算提取率。结果,随着温度的升高,提取率不断增加,90℃时达到最大;而在100℃时提取效果没有明显增加,详见图1C。因此选择90℃为提取温度。

2.4.4 提取次数对巴戟天低聚糖提取率的影响 称取10 g巴戟天药材粉末,共5份,液料比为20:1,置于90℃恒温水浴锅中浸提2 h,滤过,取滤渣再重复提取2次,测定巴戟天低聚糖的含量并计算提取率。结果,巴戟天药材经过2次回流提取后

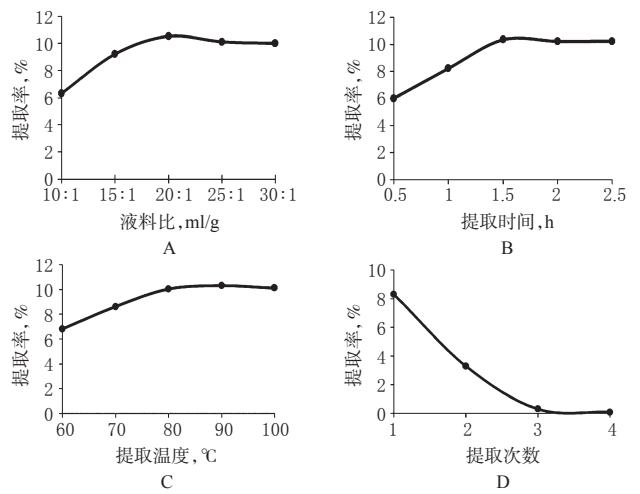


图1 各因素对低聚糖提取率的影响

Fig 1 Effect of each factor on the extraction rate of oligosaccharides

提取较完全,详见图1D。因此选择提取次数为2次。

### 2.5 响应面试验

综合单因素试验结果,根据Box-behnken的中心组合试验设计原理<sup>[8]</sup>,采用响应面法在3因子3水平上以低聚糖提取率 $Y$ 为指标对巴戟天低聚糖的提取条件进行优化。因素与水平见表1,Box-behnken中心组合试验设计与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
A(液料比), ml/g	15:1	20:1	25:1
B(提取时间), h	1	1.5	2
C(提取温度), °C	80	90	100

表2 Box-behnken中心组合试验设计与结果

Tab 2 Design and results of Box-behnken central composite

试验号	A	B	C	Y, %
1	0	0	0	10.12
2	0	0	0	10.12
3	0	0	0	10.12
4	0	0	0	10.12
5	0	-1	1	9.32
6	-1	0	1	9.03
7	0	1	1	10.10
8	1	0	1	10.24
9	0	1	-1	9.68
10	1	1	0	10.19
11	1	-1	0	9.28
12	-1	0	-1	9.08
13	-1	-1	0	9.02
14	-1	1	0	9.35
15	1	0	-1	9.57
16	0	0	0	10.12
17	0	-1	-1	9.02

注:共有17个试验,其中12个为析因试验,5个为中心试验,以估计误差

Note: a total of 17 tests, 12 of them for the factorial experiment, 5 of them for the central test, in order to estimate error

采用 Design-Expert 8.0.6 软件处理数据,采用二次型进行变异分析(ANOVA),其方差分析结果见表3。

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	0.98	1	0.980	67.63	0.000 1**
B	0.641	1	0.640	44.30	0.000 3**
C	0.09	1	0.090	6.18	0.041 9*
AB	0.08	1	0.084	5.80	0.046 8*
AC	0.13	1	0.130	8.94	0.020 2*
BC	0.03	1	0.027	1.87	0.213 8
A <sup>2</sup>	0.42	1	0.420	29.28	0.001 0**
B <sup>2</sup>	0.33	1	0.330	22.58	0.002 1**
C <sup>2</sup>	0.29	1	0.290	19.74	0.003 0**
残差	0.10	7	0.014		
失拟项	0.056	2	0.028	3.13	0.131 1
误差	0.045	5	0.009		
总离差	3.78	16			
模型	3.68	9	0.410	28.22	<0.000 1**

注:\* $P < 0.05$ ,显著;\*\* $P < 0.01$ ,极显著

Notes:\* $P < 0.05$ , significant effect;\*\* $P < 0.01$ , very significant effect

fect

对响应值与各个因素进行回归拟合,该模型对应的回归方程: $Y = 10.12 + 0.35A + 0.34B + 0.13C + 0.15AB + 0.18AC + 0.11BC - 0.35A^2 - 0.31B^2 - 0.29C^2$ 。由二次回归方程的方差显示模型 $P < 0.01$ ,表明试验模型极显著,该试验方法可靠。方程失拟项不显著,表明该回归模型与实测值拟合性较好。回归系数 $R^2 = 0.973 2 > 0.9$ ,也表明该模型的相关度较好。回归方程中的各项方差结果表明,A、B、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>均达到极显著水平( $P < 0.01$ ),C、AB、AC也达到了显著水平。各因子间液料比和提取时间、提取温度交互作用影响较显著。同时,由F值可以推断,在所选择的试验范围内,3个因素对巴戟天低聚糖提取率影响的排序为液料比(A)>提取时间(B)>提取温度(C)。

通过响应面图,可直观地反映各因素的交互作用对响应值的影响,从而确定最优工艺参数范围。根据拟合模型绘制巴戟天低聚糖提取率三维响应面和等高线图,其中I、III、V为响应面图,II、IV、VI为等高线图,见图2。

图2表明,在液料比20:1~25:1的范围内可以得到较大的Y值,与方差分析结果吻合;在提取温度适中情况下,液料比在较大范围内均可得到较高的提取率;当提取温度低、提取时间较短时,提取率低;但提取温度过高、提取时间过长可能导致低聚糖得率下降,这可能是由于时间长、温度高使糖分解所致。综合各方面因素考虑,用SAS软件优化程序分析得出低聚糖提取率最优工艺参数为:液料比23.11:1(ml/g)、提取时间1.69 h、提取温度92.67℃。在此工艺范围内,巴戟天低聚糖提取率理论预测值为10.37%。考虑实际操作和生产的便利,设定液料比为23:1(ml/g)、提取时间为1.7 h、提取温度为93℃为最终试验条件。

### 2.6 验证试验

根据确认的优化的工艺参数范围,平行进行3批试验验证巴戟天低聚糖提取工艺。结果,3批巴戟天低聚糖提取率分别为10.27%、10.31%、10.28%,实测均值为10.29%(RSD=0.20%),与预测值相比偏差为0.06%。实测值与预测值比较接近,说明二次多项式数学模型所得优化区域与设计目标基

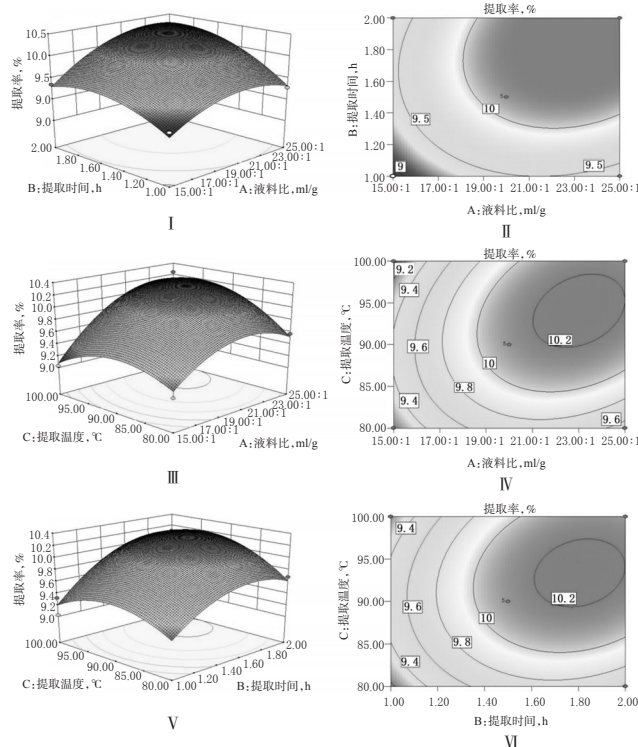


图2 各因素对低聚糖提取率的响应面图和等高线图

Fig 2 Response surface and contour plots of the effect of each factor on the extraction rate of oligosaccharides

本一致,可见采用响应面法可实现巴戟天低聚糖的提取工艺优化,对巴戟天低聚糖中试及产业化具有应用价值。

### 3 讨论

巴戟天中低聚糖的含量采用苯酚-硫酸法测定,其原理是根据多糖在浓硫酸作用下水解生成单糖,并迅速生成糖醛衍生物,再与苯酚缩合成橙黄色化合物而显色。本方法不能直接测定低聚糖的含量,一般需要通过葡萄糖标准曲线方程计算相当于葡萄糖的含量。如果不通过换算因子f计算,则测得的巴戟天低聚糖含量应以葡萄糖计。为了更加直观地体现巴戟天中低聚糖的含量,本文通过测得葡萄糖的量来计算换算因子f,再代入巴戟天低聚糖的回归方程求得含量。

通过Box-behnken中心组合设计建立了3个影响因素与响应值相互作用的数学模型,所测模型理论值与实测值基本一致。与正交试验方法相比,响应面法能较好地、连续地对各个水平进行试验分析,弥补一个水平点优选方式的不足。但响应面法优化的关键点在于因素水平的选取是否合理,故本文通过单因素考察分析,合理选择因素水平,可避免因各因素水平选取不当影响优化效果。

将响应面法应用于优化巴戟天低聚糖提取工艺的试验结果表明,液料比、提取时间及其平方、提取温度的平方均对低聚糖提取率影响显著,说明各影响因素对响应值的影响较为复杂,并不是简单的线性关系。

验证试验和响应面回归分析表明,本文优选的提取方法合理、可靠、高效,对于医药行业中试及产业化节能减排、提高效益具有实际指导意义。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年

# 康肤霜处方改良及稳定性考察

刘迪丰<sup>1\*</sup>, 阳玉竹<sup>2</sup>, 蔡林<sup>1#</sup> (1.解放军第181医院药剂科, 广西桂林 541002; 2.河北联合大学冀唐学院, 河北唐山 063300)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4850-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.32

**摘要** 目的:改进康肤霜乳膏处方,以提高其稳定性。方法:针对康肤霜中氧化锌的破乳及乳膏稳定性差的问题,以油相比例(硬脂酸-白凡士林-单硬脂酸甘油酯)和聚山梨酯80、三乙醇胺、聚氧乙烯(10)硬脂酸酯(SG-10)的用量为因素,以乳膏的光泽度、细腻度、稠度、涂布性、分层现象的综合评分(满分10分)为指标,用正交试验优化乳膏处方,验证并考察其配伍、耐热、耐寒、光照等稳定性。结果:最优处方为每100 g乳膏中含硬脂酸8 g、白凡士林8 g、单硬脂酸甘油酯6 g、聚山梨酯80 4 g、三乙醇胺3 g、SG-10 2 g和水适量;所制乳膏的综合评分>9.5分( $n=3$ )。与原处方成品比较,改良后新品外观无明显变化,未见破乳、分层现象,无颜色变化。结论:成功制得稳定性优于原处方的康肤霜乳膏。

**关键词** 康肤霜;处方改良;稳定性;正交试验

## Formulation Improvement and Stability Study of Kangfu Cream

LIU Di-feng<sup>1</sup>, YANG Yu-zhu<sup>2</sup>, CAI Lin<sup>1</sup> (1.Dept. of Pharmacy, No. 181 Hospital of PLA, Guangxi Guilin 541002, China; 2.Jitang College of Hebei United University, Hebei Tangshan 063300, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the formulation of Kangfu cream, in order to increase the stability of it. METHODS: According to the problem that demulsion of zinc oxide and poor stability of Kangfu cream, orthogonal test was used to optimize the formulation of cream matrix with oil phase ratio (stearic acid-white vaseline-glycerol monostearate), with the amount of polysorbate 80, triethanolamine and SG-10 as factors, using comprehensive score of glossiness, delicacy, consistence, coating and stratification (10 points as full mark) as index. The stability of the cream was validated and investigated, such as compatibility, heat-resisting, cold-resistant, lighting. RESULTS: The formulation were as follows as 100 g cream containing stearic acid 8 g, white vaseline 8 g, glycerol monostearate 6 g, polysorbate 80 4 g, triethanolamine 3 g, SG-10 2 g and appropriate amount of water. The comprehensive scores of the cream were >9.5 points ( $n=3$ ). Compared with the cream prepared by previous formulation, the cream prepared by modified formulation had no significant change in appearance and color, and demulsion and layering hadn't been found. CONCLUSIONS: Kangfu cream with better stability than original formulation is successfully prepared.

**KEYWORDS** Kangfu cream; Formulation improvement; Stability; Orthogonal test

康肤霜,主要含维生素A、维生素E、冰片、氧化锌等,系某军区医院烧伤科近年自制的烧伤乳膏,曾获国家科技进步奖,对Ⅱ度以上的烧伤创面愈合、人体表皮细胞修复有显著疗效<sup>[1-4]</sup>。

康肤霜具有明显加速创面愈合、预防感染、减轻创面疼痛、更换敷料方便等特点,是治疗深Ⅱ度烧伤创面的良好外用药。康肤霜作为烧伤乳膏疗效明显,且制作工艺简单、成本低,能

版.北京:中国医药科技出版社,2010:75、78。  
[2] 陈地灵,张鹏,林励,等.巴戟天低聚糖对 $A\beta_{25-35}$ 致拟痴呆模型大鼠的保护作用[J].中国中药杂志,2013,38(9):1306。  
[3] 张鹏,陈地灵,林励,等.巴戟天水提液对自然衰老小鼠脑组织中单胺类神经递质含量的影响[J].医学研究杂志,2014,43(6):79。  
[4] 邹连勇,马远林,宓为峰,等.巴戟天寡糖对海马神经细胞再生及神经元生长的影响[J].中国新药杂志,2012,21

(22):2623。  
[5] Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization[J]. *Process Biochemistry*, 2000, 35(6):539。  
[6] 邓少东,肖凤霞,林励,等.亲水作用色谱-蒸发光散射检测器联用法同时测定巴戟天中5种低聚糖的含量[J].中国中药杂志,2012,37(22):446。  
[7] 杨武德,李聪.大黄生品及炮制品中总糖及多糖的含量测定[J].中国药房,2010,21(19):1759。  
[8] 费荣昌.实验设计与数据处理[M].4版.无锡:江南大学出版社,2001:59-63。

\* 主管药师。研究方向:制剂研发。电话:0773-2081484。E-mail:liufengqi818@163.com

# 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0773-2081641。E-mail:cailin181@163.com

(收稿日期:2015-03-09 修回日期:2015-05-08)  
(编辑:刘萍)