

Box-Behnken 响应面法优化和肝理脾颗粒中肉桂与香附总挥发油的提取工艺^Δ

赵 锋*, 李江英#, 张炜华(西安市中医医院, 西安 710001)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3545-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.30

摘要 目的: 优选和肝理脾颗粒中肉桂与香附总挥发油的提取工艺。方法: 以总挥发油提取率为指标, 采用 Box-Behnken 响应面法, 考察加水倍量、药材浸泡时间和蒸馏提取时间对挥发油提取量的影响, 优化和肝理脾颗粒中肉桂、香附总挥发油的提取工艺并进行验证试验。结果: 建立的 3 个因素变量的二次多项回归模型的相关系数为 0.970 5; 最优提取工艺为加 5 倍量药材的水浸泡 2.5 h, 提取 6.0 h; 验证试验总挥发油的提取率为 1.65%, 与预测值 1.67% 比较, 偏离率小于 2%。结论: 建立的模型可靠、预测性良好; 优化后的工艺可用于和肝理脾颗粒中肉桂与香附总挥发油的提取。

关键词 和肝理脾颗粒; 肉桂; 香附; 总挥发油; Box-Behnken 响应面法; 优化; 提取

Optimization of Extraction Technology of Total Volatile Oil from *Cinnamomum cassia* Presl. and *Cyperus rotundus* L. in Hegan Lipi Granules by Box-Behnken Response Surface Method

ZHAO Feng, LI Jiang-ying, ZHANG Wei-hua (Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of total volatile oil from *Cinnamomum cassia* Presl. and *Cyperus rotundus* L. in Hegan lipi granules. METHODS: With the extraction rate of total volatile oil as the index, Box-Behnken response surface method was applied to investigate the effects of water amount, soaking time for medicinal materials and extraction time by distillation on the amount of the extracted volatile oil and optimize the extraction technology of total volatile oil from *C. cassia* Presl. and *C. rotundus* L. in Hegan lipi granules, and verification tests were conducted. RESULTS: The relevant coefficient of the established quadratic polynomial regression model of 3 variable factors was 0.970 5. The optimal extraction technology was as follows as 5 times as much as the amount of medicinal materials of water, soaking time of 2.5 h, extraction time of 6.0 h. Verification tests showed the extraction rate of total volatile oil was 1.65%, with a deviation rate lower than 2% compared to the predicted value of 1.67%. CONCLUSIONS: The established model is reliable with good predictability. The optimal technology can be used for the extraction of total volatile oil from *C. cassia* Presl. and *C. rotundus* L. in Hegan lipi granules.

KEYWORDS Hegan lipi granules; *Cinnamomum cassia* Presl.; *Cyperus rotundus* L.; Total volatile oil; Box-Behnken response surface method; Optimization; Extraction

和肝理脾颗粒是西安市中医医院自配制剂的改进剂型, 原剂型为蜜丸。该处方由白芍、赤芍、冰片、肉桂、薄荷冰、连翘、香附、甘草等组成, 具有醒脾健胃、疏肝通络的作用, 主要用于肝气郁结、脾胃不和、肝腹胀满、食少纳呆、两肋不舒或肝区疼痛等症, 相当于现代医学的慢性肝炎, 临床应用已经近 50 年, 疗效显著^[1]。该方中肉桂、香附均含有挥发油, 是镇痛、抗炎等药效作用的物质基础之一^[2-3]。本试验以挥发油提取率为指标, 采用响应面法优化肉桂与香附挥发油的提取工艺, 为和肝理脾颗粒的剂型改进提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

MH-500 调温型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司);

Δ 基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目(No.2013k12-07-06)

* 主任药师。研究方向: 医院管理、药学。电话: 029-89626601。

E-mail: zff369@126.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 医院药事管理、制剂研发。电

话: 029-89626635。E-mail: lijiangy@126.com

JA2003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司); 挥发油提取器(西安市科易丰仪器公司)。

1.2 药材

肉桂为樟科常绿乔木肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥树皮; 香附为莎草科多年生草本植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的根茎; 均由西安盛兴中药饮片厂提供, 批号分别为 140601 和 140522, 经本院制剂室鉴定符合 2010 年版《中国药典》要求。

2 方法与结果

2.1 挥发油提取方法^[4]

根据预试验结果, 肉桂和香附所含挥发油密度接近, 可共同蒸馏提取。将干燥后的肉桂和香附药材粗粉, 按和肝理脾颗粒处方比例取样, 置于挥发油提取装置中, 加入规定倍量的蒸馏水, 浸泡一定时间, 按 2010 年版《中国药典》(一部)附录 XD 挥发油测定法进行提取与测定^[5]。并按下式计算挥发油提取率: 挥发油提取率 = [提取得到挥发油量 (ml) / 药材总质量 (g)] × 100%。

2.2 单因素试验

按“2.1”项下方法,取肉桂粗粉66g、香附粗粉96g,置于挥发油提取装置中,对提取时间(h)、加水倍量(倍)和浸泡时间(h)3个影响因素进行单因素考察。(1)取样品6份,分别加入5倍量水,室温下浸泡2h,水蒸汽蒸馏2、3、4、5、6、7h,计算每份样品挥发油提取率。(2)取样品6份,分别加入3、4、5、6、7、8倍量水室温浸泡2h,水蒸汽蒸馏5h,计算每份样品挥发油提取率。(3)取样品6份,分别加入5倍量水,室温下浸泡0.5、1、1.5、2、2.5、3h,水蒸汽蒸馏5h,计算每份样品挥发油提取率,结果见图1。

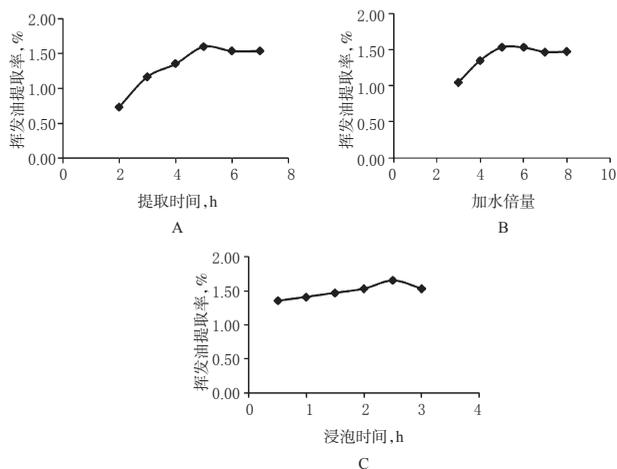


图1 各因素对总挥发油提取率的影响

A.提取时间;B.加水倍量;C.浸泡时间

Fig 1 Effects of various factors on the extraction rate of total volatile oil

A. extraction time; B. water amount; C. soaking time

图1结果表明,固定加水倍量为5倍、浸泡时间为2h时,随着提取时间的延长,挥发油的提取率显著增加;在提取时间为5h时提取率达到峰值;高于5h,提取率略有下降。固定提取时间为5h、浸泡时间为2h时,随着加水倍量的增加,挥发油的提取率增加;在加水倍量为5倍时达到平衡;当超过5倍量时,提取率变化不大。固定提取时间为5h、加水倍量为5倍时,随着浸泡时间的延长,挥发油提取率有一定程度增加;在浸泡时间为2.5h时,提取效率较好。后续工艺优化试验则以此为基础确定考察的因素及水平。

2.3 响应面法优化提取工艺

2.3.1 试验安排与结果 根据单因素试验结果,采用Design Expert 8.0.1软件,运用Box-Behnken设计模型,选取提取时间、加水倍量、浸泡时间3个因素为变量,以肉桂、香附总挥发油提取率为响应值,设计3因素3水平17个试验点的响应面分析试验,包括12个析因试验、5个中心试验^[6-9]。Box-Behnken试验设计因素与水平见表1,Box-Behnken试验方案与结果见表2。

表1 试验设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of the test

水平	因素		
	A(提取时间),h	B(加水倍量),倍	C(浸泡时间),h
-1	4	4	1
0	5	5	2
1	6	6	3

表2 试验方案与结果

Tab 2 Test plan and its results

试验号	A	B	C	提取率,%
1	5	6	1	1.60
2	4	6	2	1.35
3	5	5	2	1.66
4	4	4	2	1.17
5	5	4	1	1.35
6	4	5	3	1.35
7	6	4	2	1.47
8	6	5	3	1.53
9	6	6	2	1.44
10	5	5	2	1.66
11	5	5	2	1.60
12	5	5	2	1.66
13	6	5	1	1.41
14	5	6	3	1.53
15	4	5	1	1.29
16	5	5	2	1.60
17	5	4	3	1.54

2.3.2 模型方程的建立与方差分析 应用Design Expert 8.0.1软件对表2数据进行多元回归拟合分析,得肉桂、香附总挥发油提取率(Y)对提取时间(A)、加水倍量(B)、浸泡时间(C)3个变量的二次多项回归模型为: $Y=1.64+0.09A+0.053B+0.038C-0.045AB+0.015AC-0.065BC-0.19A^2-0.081B^2-0.05C^2$ 。方差分析及显著性检验结果见表3。

表3 方差分析及显著性检验结果

Tab 3 Results of variance analysis and significance test

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	0.33	9	0.037	37.95	<0.000 1	极显著
A	0.060	1	0.060	61.31	0.000 1	极显著
B	0.019	1	0.019	19.59	0.003 1	极显著
C	0.011		0.011	11.59	0.011 4	显著
AB	0.011	1	0.011	11.36	0.011 9	显著
AC	9.000×10^{-4}	1	9.000×10^{-4}	0.93	0.367 7	
BC	0.017	1	0.017	17.41	0.004 2	极显著
A ²	0.16	1	0.16	163.67	<0.000 1	极显著
B ²	0.030	1	0.030	30.79	0.000 9	极显著
C ²	9.202×10^{-3}	1	9.202×10^{-3}	9.48	0.017 8	显著
残差	6.759×10^{-3}	7	9.707×10^{-4}			
失拟项	2.475×10^{-3}	3	8.250×10^{-4}	0.76	0.570 5	
误差	4.320×10^{-3}	4	1.080×10^{-3}			
总离差	0.34	16				

结果显示,本试验模型极显著($P<0.01$),失拟项不显著($P=0.570 5>0.05$),表明该模型真实可靠。由P值可知,各因素对提取率的影响程度顺序为:A>B>C。一次项中A、B极显著,C为显著;二次项中A²、B²极显著,C²显著;交互因素BC极显著,AB显著。 $R^2=0.979 1$, $R_{adj}^2=0.952 3$,表明该模型可以解释95.23%响应值的变化;相关系数 $r=0.33/0.34=0.970 5$,即响应值的变化有97.05%来源于所选变量,表明该模型拟合程度较好,可以用于分析和预测肉桂、香附总挥发油提取率。

2.3.3 响应面分析 提取工艺各因素对挥发油提取率影响的二维等高线和三维响应面图见图2、图3、图4。

由图2等高线和响应面图可知,在理论最优浸泡时间下,提取时间与加水倍量所对应曲面较陡,表明提取时间与加水

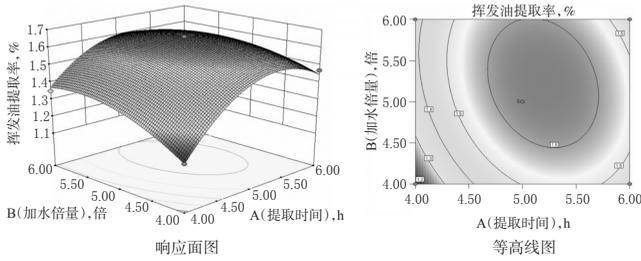


图2 提取时间与加水倍量对挥发油提取率影响的响应面和等高线图

Fig 2 Response surface and contour plots for the effects of extraction time and water amount on the extraction rate of volatile oil

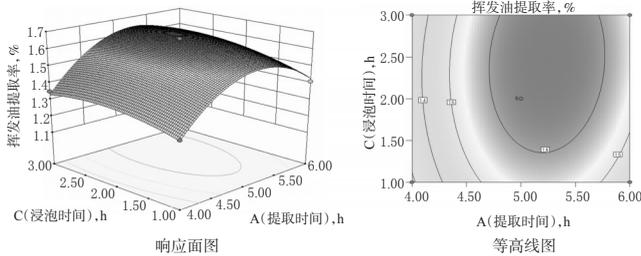


图3 提取时间与浸泡时间对挥发油提取率影响的响应面和等高线图

Fig 3 Response surface and contour plots for the effects of extraction time and soaking time on the extraction rate of volatile oil

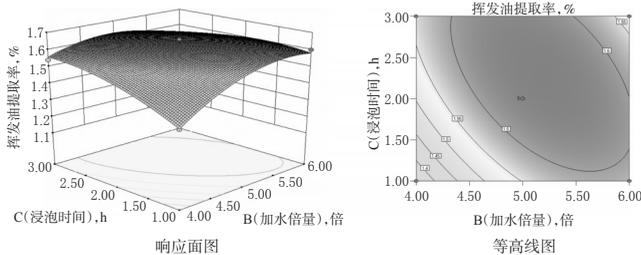


图4 加水倍量与浸泡时间对挥发油提取率影响的响应面和等高线图

Fig 4 Response surface and contour plots for the effects of water amount and soaking time on the extraction rate of volatile oil

倍量对肉桂、香附总挥发油提取率的影响较为显著,且两个因素之间交互作用显著。由图3可见,在理论最优加水倍量下,浸泡时间的响应曲面坡度较缓,表明该因素对总挥发油提取率的影响较小;而提取时间响应曲面较陡,表明该因素对总挥发油提取率的影响较大,但两个因素之间交互作用并不显著。由图4可见,在理论最优提取时间条件下,加水倍量响应曲面较陡,表明该因素对肉桂、香附总挥发油提取率的影响较大;而浸泡时间相对于提取率的响应曲面较为平缓,几乎呈一次线性关系,表明该因素对总挥发油提取率的影响较小;以上两个因素等高线图呈椭圆形且密度较大,表明此两因素的交互作用极为显著($P=0.0042$)。

2.3.4 工艺条件验证 对回归方程求导,并令其等于0,得肉

桂、香附总挥发油的最优提取条件为:提取时间5.85 h、加水倍量4.75倍、浸泡时间2.72 h。为便于实际操作,调整方案为:提取时间6.0 h、加水倍量5倍、浸泡时间2.5 h。采用此优化条件进行试验3次,挥发油平均提取率为1.65%,与模型预测值(1.67%)间的偏离率[(预测值-实测值)/预测值 $\times 100\%$]为1.20% (小于2%),表明本试验建立的模型可靠、预测性良好。

3 讨论

在采用水蒸气蒸馏法提取挥发油过程中,提取时间、加水倍量和浸泡时间的影响并非呈现简单的线性关系。如加水倍量过高,挥发油在水中的溶解量增加,提取率反而下降^[9]。本试验采用响应面法优化和肝脾颗粒中肉桂、香附总挥发油提取工艺,通过多元二次方程拟合提取时间、加水倍量和浸泡时间与响应值之间的函数关系,获得整个区域上的最优组合和响应值的最优值,最终经验证试验确定了最优工艺条件。各因素分析结果表明,影响肉桂、香附总挥发油提取因素的大小顺序为提取时间>加水倍量>浸泡时间,且加水倍量与浸泡时间之间存在极为明显的交互作用。此结果可为和肝脾颗粒的生产工业提供试验依据。

根据预试验结果,肉桂、香附所含挥发油密度接近,可按2010年版《中国药典》(一部)附录XD挥发油测定法(乙法)共同进行提取与测定。但由于药材肉桂中所含挥发油量较大,饱和后的二甲苯容纳能力有限,常常导致挥发油回流入烧瓶中并且在测定器管路中存在严重粘壁现象,从而影响提取率的测定。故本试验最终改用2010年版《中国药典》(一部)附录XD挥发油测定法(甲法)进行测定,并将挥发油提取器改用密度大于1.0型的,得到了较好的提取效果。

参考文献

- [1] 李晓燕,吕文哲,黄小林,等.黄保中辨治病毒性肝病经验[J].中医杂志,2011,52(16):1360.
- [2] 杨继章,刘红森,李艳玲.肉桂油的研究进展[J].中国药房,2011,22(27):2579.
- [3] 田友清,丁平.香附挥发油的研究进展及其开发前景[J].中国药业,2010,19(3):1.
- [4] 李兰芳,李存满,张勤增,等.复方消经痛胶囊中香附、肉桂挥发油的提取和包合物工艺研究[J].时珍国医国药,2007,18(6):1443.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XD.
- [6] 张冶,谢春阳.响应面法优化超声波辅助提取白苏叶挥发油物质[J].农产品加工,2013,30(6):30.
- [7] 张薇,魏翔,谢世清,等.响应面法优化草果挥发油提取工艺条件的筛选研究[J].西部林业科学,2013,42(3):28.
- [8] 刘江,樊钰虎,王泽秀,等.响应面法优化姜黄挥发油提取工艺及其化学成分研究[J].西南师范大学学报:自然科学版,2012,37(10):70.
- [9] 吕霞,李建利,李俊各,等.川芎、香附挥发油提取和包合物工艺研究[J].西北药学杂志,2011,26(1):51.

(收稿日期:2015-01-04 修回日期:2015-02-16)

(编辑:刘 萍)