

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.07.007

星点设计响应面法优选牛樟叶水提物提取工艺*

张 蓓¹, 余潇琴², 万永艳¹, 覃开羽¹, 张洪平¹, 梁学政^{1△}

(1. 广西壮族自治区柳州市中医医院, 广西 柳州 545026; 2. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江 杭州 310000)

摘要:目的 优化牛樟叶水提物的提取工艺。方法 以打粉粒径、浸渍时间、水浴温度、料液比为考察因素,以提取液中多糖含量为评价指标,在单因素试验基础上采用 Box-Behnken 星点设计响应面法优化牛樟叶多糖的提取工艺。结果 牛樟叶多糖最佳提取工艺为药材过 60 目筛,料液比为 1:40 (m/V),水浴温度为 90 ℃,浸渍时间为 75.61 min。结论 优化后的提取工艺方法简单,重复性和可预测性均较好。

关键词:星点设计响应面法;牛樟叶水提物;提取工艺优选

中图分类号:R932;R917;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)07-0027-04

Optimization of Extraction Process of Aqueous Extracts of *Cinnamomum Kanehirae* Leaves by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHANG Bei¹, YU Xiaoling², WAN Yongyan¹, QIN Kaiyu¹, ZHANG Hongping¹, LIANG Xuezheng¹

(1. Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545026; 2. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese

Medical University, Hangzhou, Zhejiang, China 310000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of aqueous extracts of *Cinnamomum kanehirae* leaves. **Methods** With powder particle size, soaking time, water bath temperature and solid-liquid ratio as the investigation factors and polysaccharide content as the evaluation index, the extraction process of polysaccharides from *Cinnamomum kanehirae* leaves was optimized by Box-Behnken central composite design-response surface methodology based on single-factor experiment. **Results** The best extraction process of *Cinnamomum kanehirae* leaves was as follows: the herb was screened through 60 mesh, the ratio of material to liquid was 1:40 (m/V), the water bath temperature was 90 ℃, and the soaking time was 75.61 min. **Conclusion** The optimized extraction process is simple with good repeatability and predictability.

Key words: central composite design-response surface methodology; aqueous extract of *Cinnamomum kanehirae* leaves; optimization of extraction process

牛樟树为樟科植物,原产地为台湾,生长在海拔 450~2 000 m 的山林间,因生长在百年以上的树干腐朽之心材内壁的真菌——牛樟芝而得名,被誉为森林中的红宝石^[1]。牛樟芝可抗肿瘤、抗衰老、保护肝脏、增强免疫力等,但生长周期过长,品种珍稀,不利于产业化发展^[2-6]。前期试验结果表明,牛樟叶水提物含有大量多糖类成分,开展水提物最优提取条件研究有一定的研究价值^[7-10]。本研究中以多糖为指标性成分,采用星点响应面法优选提取方法,以最大程度提取出多糖类成分,为后期进一步优化提取方法及多糖的纯化试验奠定基础。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

CAP 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司,精度为 0.1 mg);HWS-24 型电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);UV1780-5 型紫外分光光度计(岛津企业管理(中国)有限公司);L600 型台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);KQ5200B 型

超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 240 W,频率为 40 kHz)

1.2 试药

牛樟叶由广西柳州市天姿园艺有限公司提供,经柳州市中医医院吴冰副主任药师鉴定为樟科植物牛樟的叶子;苯酚(批号为 10015318),硫酸(批号为 10008316),乙醇(批号为 10009164),均购自国药集团化学试剂有限公司;无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110833-201707,规格为 100 mg,纯度为 ≥99%)。

2 方法与结果

2.1 多糖含量测定(硫酸-苯酚法)

溶液制备:取牛樟叶 5 g,打粉,过 60 目筛,加 250 mL 蒸馏水,80 ℃ 水浴提取 60 min,即得供试品溶液。取无水葡萄糖对照品 0.024 8 g,精密称定,加水定容至 250 mL 容量瓶中,即得对照品溶液。

显色:精密量取多糖溶液 1.0 mL,置 10 mL 具塞比

*基金项目:柳州市柳北区应用技术与开发计划项目[LB201801];柳州市阳和工业新区应用技术研究开发与科技创新项目[2019007]。

第一作者:张蓓,女,硕士,副主任药师,研究方向为中药品质评价及活性成分,(电子信箱)zhangbei8402@126.com。

△通信作者:梁学政,男,硕士,主任药师,研究方向为医院药学及中药品质评价,(电子信箱)liangxuezheng@163.com。

色管中,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,混匀,精密加入浓硫酸 3.0 mL,充分混匀,90 ℃ 水浴 30 min。另以蒸馏水为空白对照同上操作,于 490 nm 波长处测定吸光度。

线性关系考察:取对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置 10 mL 具塞比色管中,加水至 1.0 mL,得系列质量浓度为 0.01984, 0.03968, 0.05952, 0.07936, 0.0992 mg/mL 的葡萄糖对照品溶液,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速精密加入硫酸 3 mL,摇匀,90 ℃ 水浴保温 30 min,取出,迅速冷却至室温,同法制备空白溶液。照 2015 年版《中国药典(四部)》紫外-可见分光光度法(通则 0401),在 490 nm 波长处测定吸光度,以吸光度(Y)为纵坐标、葡萄糖质量浓度(X , mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,葡萄糖标准溶液的线性回归方程为 $Y = 5.9627X + 0.0337$, $R = 0.9996$ ($n = 5$)。结果表明,葡萄糖标准溶液质量浓度在 0.01984 ~ 0.0992 mg/mL 范围内与吸光度值线性关系良好。

精密密度试验:精密量取对照品溶液(质量浓度为 0.255 mg/mL)1.0 mL,连续进样测定 5 次。结果平均吸光度值为 0.3134, RSD 为 1.17% ($n = 5$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:精密量取供试品溶液 1.0 mL,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时测定吸光度,并计算 RSD 值。结果平均吸光度值为 0.3214, RSD 为 1.67% ($n = 7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:平行制备同一批(批号为 20190322)牛樟叶多糖提取液 6 份,依法显色后测定吸光度,并计算 RSD 值。结果样品中葡萄糖标准溶液吸光度的 RSD 为 0.59% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品 0.5 g,精密称定,共 6 份,加入 20 mg 葡萄糖对照品,按最优提取工艺提取样品,并将上述多糖置 25 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,配置多糖溶液,显色后测定吸光度,并计算回收率和 RSD 值。结果见表 1。

表 1 多糖加样回收试验 ($n = 6$)

Tab. 1 Recovery test of polysaccharide ($n = 6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
67.5824	67.3284	134.9254	100.02	99.72	0.71
67.2487	67.3284	134.5287	99.93		
67.5471	67.3284	134.9874	100.17		
67.5219	67.3284	134.3217	99.21		
67.3219	67.3284	134.9564	100.45		
67.8894	67.3284	134.2478	98.56		

2.2 单因素试验

打粉粒径:取牛樟叶 1.0 g,精密称定,共 3 份,打粉,分别过 20, 24, 40, 60 目筛,浸渍 1 h,水浴温度为 80 ℃,

料液比为 1:50 (m/V),考察牛樟叶可提取多糖含量。结果牛樟叶可提取多糖含量分别为 9.51, 10.29, 11.67, 15.40 mg/g。可见,打粉粒径越小,多糖含量越高。

浸渍时间^[11]:取牛樟叶 1.0 g,精密称定,共 3 份,打粉,过 60 目筛,水浴温度为 80 ℃,料液比为 1:50 (m/V),分别浸渍 30, 60, 90 min,考察牛樟叶可提取多糖含量。结果牛樟叶可提取多糖含量分别为 7.63, 10.29, 11.15 mg/g。可见,浸渍时间越长,多糖含量越高。

水浴温度:取牛樟叶 1.0 g,精密称定,共 3 份,打粉,过 60 目筛,浸渍 1 h,料液比为 1:50 (m/V),分别置 70, 80, 90 ℃ 恒温水浴锅中,考察牛樟叶可提取多糖含量。结果牛樟叶可提取多糖含量分别为 9.27, 10.29, 13.10 mg/g。可见,随着水浴温度的升高,多糖含量升高。

料液比:取牛樟叶 1.0 g,精密称定,打粉,过 60 目筛,浸渍 90 min,水浴温度为 90 ℃,分别加 40 倍、50 倍、60 倍水,即料液比为 1:40 (m/V)、1:50 (m/V)、1:60 (m/V),考察牛樟叶可提取多糖含量。结果牛樟叶可提取多糖含量分别为 13.62, 10.29, 8.94 mg/g。可见,随着料液比比例的增大,多糖含量降低。

2.3 提取工艺优化

提取工艺条件:根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验结果,选取浸渍时间(因素 A)、料液比(因素 B)、水浴温度(因素 C)为响应面模型的自变量,采用 Design-Expert v8.0.6 软件,设置响应值目标[浸渍时间为 30 ~ 90 min,料液比为 1:40 (m/V)、1:50 (m/V)、1:60 (m/V)],水浴温度最大为 100 ℃,确定最佳提取工艺。变量因素和水平见表 2。根据响应面试验,得到的试验组合与结果见表 3,方差分析结果见表 4。结果显示,通过 Design-Expert v8.0.6 软件拟合得到的模型,其水平小于 0.05,表明该模型有高度显著性;失拟项检验结果表明,失拟误差不显著 ($P = 0.5843$),表明未知因素对试验结果影响很小,预测回归模型与试验结果拟合很好;预测模型的 $R^2 = 0.9961$,表明多糖含量的试验值与预测值间的一致性较好;该模型的变异系数 (CV) = 4.13% < 5%,校正系数 (R^2_{Adj}) = 0.9911,表明预测模型能反映 99.11% 响应值的变化,故通过回归方程能预测并分析试验的真实数据。由表 4 可见,各单因素对牛樟叶多糖含量(Y)影响从大到小依次为 $B > C > A$,料液比与提取温度间的交

表 2 变量因素和水平

Tab. 2 Variable factors and their levels

水平	因素 A(min)	因素 B(m/V)	因素 C(℃)
1	30	1:40	70
2	60	1:50	80
3	90	1:60	90

表 3 Box – Behnken 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of Box – Behnken experiment

编号	因素 A	因素 B	因素 C	$m(g)$	含量(mg/g)
1	2	1	3	1.004 1	26.69
2	1	1	2	1.004 2	13.54
3	2	3	1	1.000 4	8.70
4	3	3	2	1.002 7	9.27
5	2	1	1	1.000 7	13.59
6	2	3	3	1.000 6	13.49
7	3	1	2	1.000 3	17.19
8	3	2	3	1.009 5	17.09
9	1	2	3	1.003 0	12.46
10	2	2	2	1.008 2	11.16
11	2	2	2	1.002 3	9.73
12	2	2	2	1.004 0	10.26
13	2	2	2	1.003 4	10.31
14	2	2	2	1.000 9	10.17
15	1	3	2	1.006 1	4.47
16	1	2	1	1.004 1	5.23
17	3	2	1	1.004 2	7.97

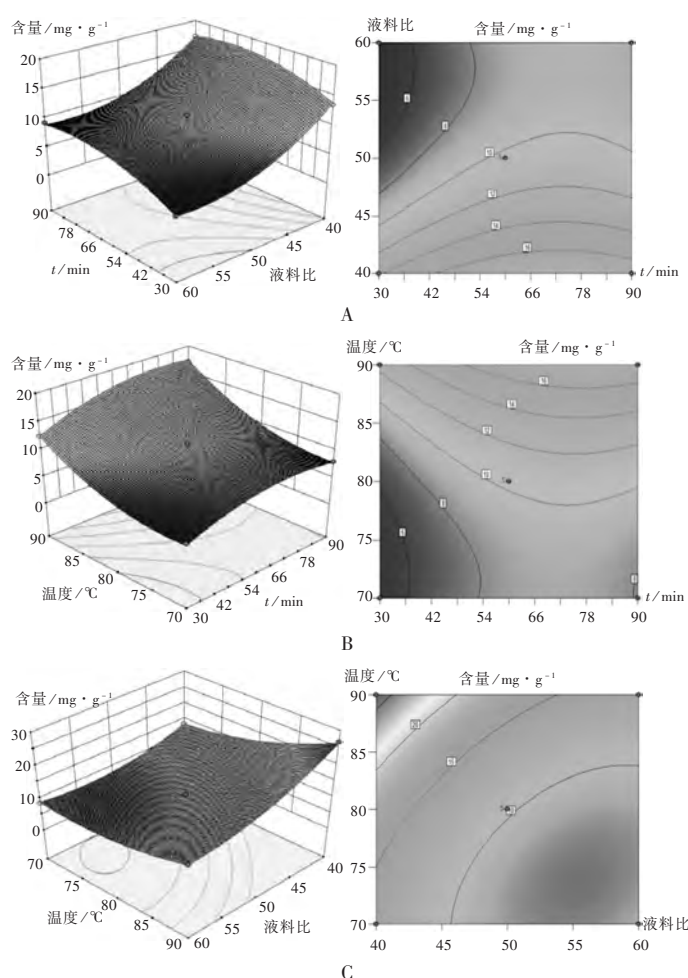
表 4 方差分析结果

Tab. 4 Results of ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	426.08	9	47.34	198.06	<0.000 1
A	31.28	1	31.28	130.88	<0.000 1
B	153.83	1	153.83	643.54	<0.000 1
C	146.55	1	146.55	613.09	<0.000 1
AB	0.33	1	0.33	1.38	0.278 0
AC	0.89	1	0.89	3.74	0.094 5
BC	17.26	1	17.26	72.22	<0.000 1
A^2	18.03	1	18.03	75.42	<0.000 1
B^2	34.46	1	34.46	144.16	<0.000 1
C^2	24.88	1	24.88	104.08	<0.000 1
残差	1.67	7	0.24		
失拟误差	0.59	3	0.20	0.73	0.584 3
纯误差	1.08	4	0.27		
总和	427.76	16			

互影响最显著。根据 Design – Expert v8.0.6 软件拟合得回归方程 $Y=10.33+1.98A-4.39B+4.28C+0.29AB+0.47AC-2.08BC-2.07A^2+2.86B^2+2.43C^2$ 。

响应面图分析:通过 Box – Behnken 试验得到的多元回归模型所作的响应面图及等高线见图 1。响应面的曲面越陡峭,表明该因素对响应值的影响越显著;等高线越密集则影响越显著,越稀疏则影响越小。可见,液料比所对应的曲面最陡峭,提取时间所对应的曲面最平滑,表明液料比对牛樟叶提取多糖含量的影响最显著,浸渍时间的影响最小。结果料液比为 1:40(即 40 倍蒸



A. 浸渍时间和液料比的交互作用 B. 浸渍时间和提取温度的交互作用 C. 液料比和提取温度的交互作用

图 1 各影响因素间的交互作用对多糖提取率的响应面图及等高线图

A. The interaction between soaking time and liquid – material ratio
B. The interaction between soaking time and extraction temperature
C. The interaction between liquid – material ratio and extraction temperature

Fig. 1 The response surface diagram and contour diagram of the interaction of various factors on the extraction rate of polysaccharide

馏水)、温度为 90 ℃、浸渍时间为 75.61 min 时,牛樟叶水提物中多糖提取率最高(26.924 7 mg/g)。

验证试验:取牛樟叶 5 g,精密称定,共 3 份,按最优提取工艺进行验证试验,操作方法同前。结果牛樟叶水提物中多糖含量为 26.88 mg/g,与理论预测值 26.92 mg/g 基本吻合。

3 讨论

植物多糖生物活性广泛,独特活性和来源的天然性在保障人体健康应用中具有很大潜力^[12-16]。但多糖结构复杂,种类繁多,其结构测定和分离纯化有一定难度;且在天然植物中含量低,不易分离,这给多糖的研究和应用带来了许多挑战。Box – Behnken 星点设计响应面法相较于正交试验设计法和均匀设计法,具有预测性