

星点设计-效应面法优选暴马丁香树皮中紫丁香苷的提取工艺

蔡恩博¹, 张崇禧², 朱启光¹, 吴谦¹, 徐蕊¹, 李鹏宇¹, 郑友兰^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 山东大学威海分校海洋学院, 威海 264209)

摘要 目的: 优选暴马丁香树皮中紫丁香苷的提取工艺。方法: 采用星点设计-效应面法, 以乙醇浓度、提取时间、溶媒比为主要影响因素, 紫丁香苷提取率为评价指标, 通过对各因素的多元线性回归及二项式拟合, 采用效应面法和岭脊分析优选最佳提取工艺, 并进行预测分析。结果: 确定紫丁香苷最佳提取工艺为 46% 乙醇 20 倍量超声提取 85 min。结论: 星点设计-效应面法优选暴马丁香树皮中紫丁香苷的提取工艺, 实际值与预测值吻合度高, 预测性良好, 方法简便易行, 为更好地开发利用暴马丁香树皮中紫丁香苷提供参考依据。

关键词: 暴马丁香(白丁香); 紫丁香苷; 星点设计; 效应面法; 工艺设计; 制药工艺学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)09-1808-04

Optimization of extraction process based on central composite design and response surface methodology for syringin in the peels of *Syringa reticulata*

CAI En-bo¹, ZHANG Chong-xi², ZHU Qi-guang¹, WU Qian¹,
XU Rui¹, LI Peng-yu¹, ZHENG You-lan^{1*}

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China)

Abstract Objective: To optimize the extraction process for syringin in peels of *Syringa reticulata* by central composite design and response surface methodology. **Method:** Central composite design and response surface methodology was used to optimize the extracting process. The main influential factors of extraction efficiency are ethanol concentration, reflux time and solvent ratio. The conditions of the extraction were evaluated by the total content of syringin. Multiple linear regression and binomial fitting models were performed with the main influential factors. A two-order polynomial equation was fitted to the data and resultant model was used to predict the response in the optimal region. **Result:** Analysis indicated the optimum conditions of syringin are 46% ethanol, 20 fold solvent, ultrasonic extraction 85 minutes. **Conclusion:** It shows that the optimum process for extracting the syringin in the peels of *Syringa reticulata* is simple, more convenient and with an higher precision. The procedure developed in this study provides a theoretical basis for better development and utilization syringe.

Key words: *Syringa reticulata*; syringin; central composite design; response surface methodology; process design; pharmaceutical technology

暴马丁香 [*Syringa reticulata* (Blume) Hara. var. *mandshurica* (Maxim.) Hara.] 又名暴马子、白丁香, 为木犀科丁香属植物, 是长白山常见的药用植物之一。味苦, 性微寒。主要分布在吉林、辽宁、华北、西北和华中等地。暴马丁香全身是宝, 树皮、树干及枝条均可药用。经现代药理实验证明暴马丁香具有清

肺祛痰、止咳、消炎、平喘、利尿等功效^[1]。目前, 关于暴马丁香树皮提取物的化学成分及其药理作用的研究鲜见报道。本文通过前期实验分离得到紫丁香苷单体, 且含量较大, 而且暴马丁香不同部位中紫丁香苷含量较高^[2], 可以考虑将其作为暴马丁香质量的评价指标。丁香苷含量测定已有报道^[2~5], 丁

* 通讯作者 Tel: (0431) 84533087-8005 / (0431) 5675313; E-mail: sqcg126621@126.com

香苷具有调节机体免疫^[6]、保肝^[7]、抗炎^[8]、降血压^[9]、提高耐受能力^[10]等药理活性,是暴马丁香皮的主要活性成分之一。

星点设计(central composite design, CCD)是国外近年来常用的实验设计方法,该方法具有可采用非线性数学模型拟合、简便、实验精度高等特点^[11]。其结果可采用集数学和统计方法学于一体的效应面法(response surface methodology, RSM)进行优化^[12]。本实验选用星点设计-效应面法(CCD-RSM)优选暴马丁香皮中紫丁香苷的醇提取工艺,为进一步合理开发暴马丁香树皮中紫丁香苷资源提供依据。

1 仪器与试剂

暴马丁香树皮于2009年4月采集于吉林农业大学校内,采集量100 g,采集后阴干,经吉林农业大学园艺学院胡全德教授鉴定为暴马丁香 [*Syringa reticulata* (Blume) Hara. var. *mandshurica* (Maxim.) Hara.] 的树皮。

ALLTECH 高效液相色谱仪; KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 电子计数天平(500 g/0.001 g, 金羊天平仪器厂); 百灵 LA114 型电子天平(110 g/0.0001 g, 常熟市百灵天平仪器有限公司); 101-2 型数显电热鼓风干燥箱(上海锦屏仪器仪表有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯, 双蒸水(经微孔滤膜滤过)。

紫丁香苷(本实验室自制): 白色针晶, mp 190~192 °C(甲醇), 三氯化铁-铁氰化钾显色反应呈阳性, 示存在酚羟基; Molish 反应阳性, 示存在糖基。主要质谱峰 m/z 395.2, 由于糖苷类化合物在正离子谱中主要以和 Na^+ 形成加和离子峰 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 的形式出现, 由此可以断定化合物的相对分子质量为 372, 与文献报道紫丁香苷的相对分子质量相吻合。 m/z 364 为 $[395 - \text{CH}_3\text{O}]$, m/z 232.2 为 $[395 - \text{glc}]$ 这与紫丁香苷(紫丁香 β -葡萄糖苷)的结构完全符合。使用不同的三种展开剂[氯仿-甲醇-水(65:35:10)、乙酸乙酯-甲醇-水(20:3.4:2.7)、乙醚-丁酮(2:1)]与对照品紫丁香苷共薄层, 二者的 R_f 值、颜色均一致。且与对照品混合熔点不下降。因此, 化合物鉴定为紫丁香苷(syringin), 用 HPLC 法检测, 其紫丁香苷的纯度为 98.9%。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定紫丁香苷的含量^[2]

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS₂ 色谱柱(4.6 mm×250 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-水(12:

88); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 265 nm; 柱温: 25 °C; 进样量 10 μL 。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的暴马丁香树皮粉末 0.500 g, 置于锥形瓶中, 精密加入乙醇 10 mL, 密封称重, 记录重量, 超声(250 W, 90 kHz)提取 90 min, 静置至室温, 补足重量, 提取液用 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 精确称取紫丁香苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解定容, 制成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的紫丁香苷对照品溶液。

2.1.4 线性关系考察 吸取上述对照品溶液, 分别进样 2, 4, 8, 12, 16 μL , 按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 以进样量(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 结果紫丁香苷进样量在 2~16 μg 范围内线性关系良好, 回归方程为:

$$Y = 1.047 \times 10^6 X + 1.656 \times 10^5 \quad r = 0.9993$$

2.1.5 稳定性试验 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5 h 进样测定, 结果紫丁香苷峰面积的 RSD 为 1.1%。

2.1.6 精密度试验 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 5 次, 结果紫丁香苷峰面积的 RSD 为 1.0%。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别测定, 结果紫丁香苷质量分数的平均值为 2.001%, RSD 为 1.1%。

2.1.8 回收率试验 取暴马丁香树皮粉末 0.25 g, 平行 5 份, 加入浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的紫丁香苷对照品溶液 5 mL, 按“2.1.2”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 计算紫丁香苷平均回收率为 99.57%, RSD 为 0.84%。

2.1.9 样品测定 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按“2.1.1”项下的色谱条件进样测定, 将其峰面积代入相应的回归方程, 并按“提取液中紫丁香苷质量/药材质量×100%”计算紫丁香苷的收率。

2.2 星点设计试验

2.2.1 因素、水平及指标的确定 醇提因素为提取次数、乙醇浓度、提取时间和溶媒比, 因提取次数为非连续变量, 不能进行回归处理, 结合预实验结果, 固定为提取 1 次, 其余因素、水平见表 1。

2.2.2 试验安排与指标测定 精密称取干燥至恒重的暴马丁香树皮粉末 19 份, 每份 0.500 g, 按表 2 进行提取, 提取液过滤, 溶液用孔径为 0.45 μm 的滤膜滤过, 按照“2.1”项的测定方法测定暴马丁香皮中紫丁香苷含量, 计算提取率, 结果见表 2。

表 1 星点设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of central composite design

水平 (levels)	因素(factors)		
	X_1 [乙醇浓度 (ethanol concentration) /%]	X_2 [提取时间 (extraction time/min)]	X_3 [溶媒比(solvent ratio) /倍(times)]
-1.682	30.00	10.00	12.00
-1	42.20	26.22	15.65
0	60.00	50.00	21.00
1	77.80	73.78	26.35
1.682	90.00	90.00	30.00

表 2 星点试验设计与结果

Tab 2 Arrangement and results of central composite design

No.	X_1	X_2	X_3	紫丁香苷含量 (content of syringin) /%
1	60.00	50.00	21.00	2.435672
2	60.00	50.00	21.00	2.346836
3	60.00	50.00	21.00	2.473229
4	60.00	50.00	21.00	2.410267
5	60.00	50.00	21.00	2.497439
6	77.84	73.78	26.35	1.915804
7	77.84	73.78	15.65	1.732776
8	77.84	26.22	26.35	1.946050
9	77.84	26.22	15.65	2.132462
10	42.16	73.78	26.35	2.390947
11	42.16	73.78	15.65	2.559513
12	42.16	26.22	26.35	2.558747
13	42.16	26.22	15.65	2.425882
14	30.00	50.00	21.00	2.261552
15	90.00	50.00	21.00	1.274522
16	60.00	10.00	21.00	2.318618
17	60.00	90.00	21.00	2.497561
18	60.00	50.00	12.00	2.332437
19	60.00	50.00	30.00	2.054177

2.2.3 模型拟合

采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行多元线性回归和二项式方程拟合,对于二项式方程,根据统计软件对各项系数进行的 t 检验结果,删除 $p > 0.3$ 的项,已达到简化模型的目的。

多元线性回归方程为:

$$Y = 3.363681 - 0.015877X_1 - 0.000502X_2 - 0.006940X_3 \quad (r=0.753 \quad p=0.005)$$

二项式方程为:

$$Y = -0.011757 + 0.069368X_1 + 0.002732X_2 + 0.078982X_3 - 0.000117X_1X_2 + 0.000042X_1X_3 + 0.000067X_2X_3 - 0.000669X_1^2 + 0.000024X_2^2 - 0.002186X_3^2 \quad (r=0.957 \quad p=0.001)$$

从拟合方程的复相关系数 r 和 p 值可见,对于紫丁香苷这个指标来说采用二项式方程拟合效果较好,3 个因素对紫丁香苷的提取率均有影响。

2.3 效应面优化和预测

根据拟合的二项式方程,用 Origin 8.0 软件分别绘制各指标与影响较显著的 2 个自变量的三维效应面,结果见图 1~3,从中筛选出较佳的工艺水平,从图中可以直观的看出紫丁香苷提取率较高的提取工艺范围为 X_1 : 45% ~ 55%; X_2 : 80 ~ 90 min; X_3 : 18 ~ 22 倍。

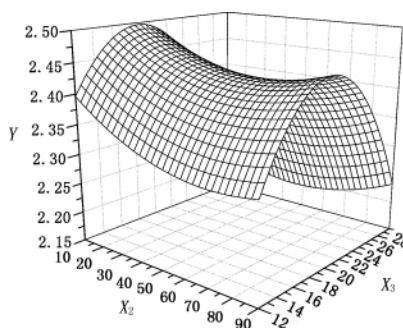


图 1 提取时间(X_2)和溶媒比(X_3)对暴马丁香树皮中紫丁香苷百分含量(Y)的三维效应面图

Fig 1 3D Response surface plot showing the effect of extraction time (X_2) and solvent ratio (X_3) on the response of the percentage content of syringin in *Syringa reticulata* peel (Y)

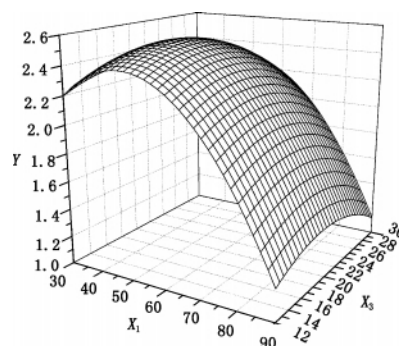


图 2 乙醇浓度(X_1)和溶媒比(X_3)对暴马丁香树皮中紫丁香苷百分含量(Y)的三维效应面图

Fig 2 3D Response surface plot showing the effect of ethanol concentration (X_1) and solvent ratio (X_3) on the response of the percentage content of syringin in *Syringa reticulata* peel (Y)

最优条件的验证:采用 SAS 9.1 软件进行岭峭分析并经综合评价,确定最佳提取工艺为 46% 的乙醇 20 倍量超声提取 85 min。根据确定的最优提取工艺,分别取 3 份样品,进行验证实验,并将测定的平均结果与拟合方程的预测值进行比较,并计算其相对偏差,相对偏差[相对偏差=(预测值-实测值)/预测值×100%]为 1.06%,说明本实验得到的拟合方程可以较好的描述因素与指标的关系。

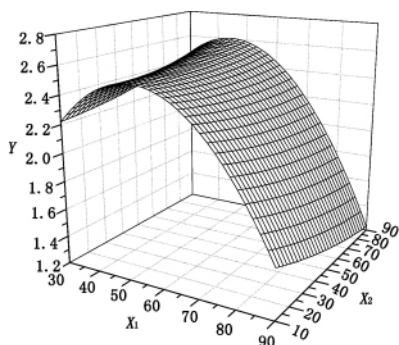


图3 乙醇浓度(X_1)和提取时间(X_2)对暴马丁香树皮中紫丁香苷百分含量(Y)的三维效应面图

Fig 1 3D Response surface plot showing the effect of ethanol concentration(X_1) and extraction time(X_2) on the response of the percentage content of syringin in *Syringa reticulata* peel(Y)

3 讨论

星点设计-效应面优化法是适宜进行非线性拟合的优化法,通常在最佳条件附近,指标与影响因素之间的关系为非线性,此时不宜用线性方程进行拟合,应选用二次多项式或更高次的多项式进行拟合,可以提高优化效果。根据星点设计所建立的数学模型描绘效应面,从其较优区域可以直接读取较佳工艺条件。本文采用星点设计法综合考虑乙醇浓度、提取时间、溶媒比三因素间的交互作用,并通过效应面法分析得出最佳的提取条件为46%乙醇20倍量超声提取85 min。

本文考察了甲醇-水、甲醇-2%醋酸、乙腈-水、乙腈-1%醋酸、甲醇-0.1%醋酸等不同流动相系统和Apollo-C₁₈(4.6 mm×250 mm 5 μm)、Hypersil ODS₂(4.6 mm×250 mm 5 μm)、CenturySIL-C₁₈(4.6 mm×150 mm 5 μm)3种色谱柱,优选出乙腈-水(12:88)溶剂系统和Hypersil ODS₂色谱柱用于暴马丁香树皮中紫丁香苷的分离,结果显示分离度较好且与杂质分离完全,且基线平稳峰形无拖尾现象,故此色谱条件适于紫丁香苷的测定。

通过星点设计-效应面法优选出的工艺可最大化地提取出暴马丁香树皮中的紫丁香苷,具有很好的开发前景,这为更好地开发利用暴马丁香提供了重要依据。

由于紫丁香苷具有较好的药理活性,因此,建议将暴马丁香树皮作为入药部位,以紫丁香苷含量作为指标加入中国药典,这样能更好地评价暴马丁香的质量。

参考文献

- XU Guo-xing(徐国兴). Phytochemical Studies of *Syringa Amurensis* Twigs Native in Changbai Mountains(长白山暴马丁香枝化学成分的研究): [Thesis(学位论文)]. Jilin(吉林): Jilin University(吉林大学) 2005
- ZHANG Chong-xi(张崇禧), LI Ying-li(李瑛丽), CAI En-bo(蔡恩博), et al. Analysis of syringin from *Syringa reticulata* (Blume) Hara. var. *mandshurica* (Maxim.) Hara. in different parts by HPLC(HPLC分析暴马丁香不同部位的紫丁香苷含量). *Resource Dev Market*(资源开发与市场) 2010 26(10): 871
- LI Pan-deng(李攀登), ZHANG Chong-xi(张崇禧), LI Jin-ling(李金玲), et al. Optimum extracting process for leaves of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. Et Maxim.) Harms by central composite design and response surface method(星点设计-效应面法优化刺五加叶提取工艺药物分析杂志). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010 30(6): 1064
- ZHANG Chong-xi(张崇禧), ZHANG Qian(张倩), CAI En-bo(蔡恩博), et al. Comparison research on the content of syringin and sofraxidin in different collecting time of *Acanthopanax senticosus* and *Acanthopanax sessiliflorus* leaves by HPLC(HPLC比较刺五加茎与短梗五加茎中紫丁香苷及异嗪皮啶的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2010 32(2): 254
- ZHANG Chong-xi(张崇禧), ZHANG Ying-ying(张莹莹), TIAN Rui(田蕊), et al. Determination of syringin in *Acanthopanax senticosus* of different sources by HPLC(HPLC测定不同产地刺五加中紫丁香苷的含量). *Chin Tradit Pat Med*(中成药) 2008 30(11): 1648
- NIE Shu-qin(聂淑琴). Protective effect of syringin on galactosamine sends hepatotoxicity(紫丁香苷对半乳糖胺致肝毒性的防护作用). *Foreign Med Tradit Chin Med*(国外医学中医中药分册) 2000 22(6): 346
- Kapil A, Sharma S. Immunopotentiating compounds from *Tinospora cordifolia*. *J Ethnopharmacol* 1997 58(2): 89
- Diaz Lanza AM, Abad Martinez MJ, Fernandez Matellano L, et al. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity. *Planta Med* 2001 67(3): 219
- Mansoor A, Khalid A. Hypotensive action of syringin from *Syringia vulgaris*. *Phytother Res* 1995 9(6): 452
- LING Hai-yan(凌海燕), LU Xue-zhao(鲁学照), ZHAO Yong-li(赵咏丽), et al. The survey on the research of *Salvia miltiorrhiza* water-soluble components(丹参水溶性成分的研究概况). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 1999 11(1): 75
- Wu W, Cui GH. Central composite design-response surface methodology and its application in pharmaceutical science. *Foreign Med Sci (Sect Pharm)* 2000 27(5): 291
- Chang JS, Huang YB, Hou SS, et al. Formulation optimization of meloxicam sodium gel using response surface methodology. *Int J Pharm* 2007 338(1): 48

(本文于2010年10月24日收到)