

Optimization of Extract Process of Paeonol by Response Surface Method Based on Box-Behnken Design

Tong Yang

Laifeng High School of Bishan, Chongqing
Email: 624737359@qq.com

Received: Mar. 1st, 2018; accepted: Mar. 14th, 2018; published: Mar. 21st, 2018

Abstract

Objective: To optimize the extract process of paeonol from the roots of *Paeonia suffruticosa* Andrews adopted by response surface method basing on Box-Behnken design. **Method:** According to the results of the single factor experiment, a three-factor and three-level Box-Behnken central composite design coupled with response surface analysis (RSM) was employed to evaluate the influence of ethanol concentration, extract temperature and time on extract yield of paeonol. **Result:** The best extract condition was that 77.5% ethanol (V/V) extracted the crude powder of the root of *Paeonia suffruticosa* Andrews at 50°C for 2 h, solid/liquid ratio 30:1 (mL/g), 92.3% extract yield was obtained. **Conclusion:** The extract process of paeonolis stable and available for further industrial application.

Keywords

Response Surface, Paeonol, Optimization, Extract Process

基于Box-Behnken设计 - 响应曲面法优化丹皮酚的提取工艺

杨 桐

重庆市璧山来凤中学校, 重庆
Email: 624737359@qq.com

收稿日期: 2018年3月1日; 录用日期: 2018年3月14日; 发布日期: 2018年3月21日

摘 要

目的: 基于Box-Behnken设计 - 响应曲面法优化丹皮酚的提取工艺。 **方法:** 根据单因素实验数据, 选择

乙醇浓度(体积分数)、提取温度和提取时间,进行三因素三水平的Box-Behnken中心组合试验设计,采用响应曲面法(RSM)分析三个因素对响应值的影响。结果:最佳提取工艺条件为乙醇浓度77.5%,提取温度50℃,提取时间2 h,料液比30:1 (mL/g)时,提取率为92.3%;结论:该丹皮酚提取工艺稳定可靠,能应用于工业化生产。

关键词

响应曲面法, 丹皮酚, 优化, 提取工艺

Copyright © 2018 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andrews)是毛茛科植物,其干燥根皮俗称牡丹皮,别名丹皮、粉丹皮、木芍药、条丹皮等,丹皮是一种传统中药,首载于《神农本草经》:主寒热,中风痙痲、痉、惊痫邪气,除症坚瘀血留舍肠胃,安五脏,疗痈疮。丹皮酚(Paeonol)又称牡丹酚、芍药醇,系牡丹皮挥发油的主要成分。现代药理学研究表明,丹皮酚具有消炎[1]、抗乙型肝炎[2]、抗心肌损伤[3]、抗氧化[4]、抗螨虫[5]和降血糖[6]等作用。随着对丹皮酚药理研究范围的不断拓展,其提取和分离的工艺研究也在不断深入。

目前丹皮酚的提取方法有CO₂超临界萃取法[7]、超声法[8]、微波法[9]、水蒸气蒸馏法[10]和乙醇渗漉法[11]等。对于CO₂超临界萃取法、超声法和微波法,工业生产中提取设备费用昂贵;水蒸气蒸馏法容易产生大量工业废水;乙醇渗漉法提取速率慢,提取时间长。因此,采用溶剂提取时,如果能优化工艺,回收溶剂,减少废液排放,在提取工艺简单化同时,使生产成本大大降低,将更加符合实际生产需求。响应曲面法(Response surface methodology, RSM)将有助于对提取工艺进行优化。它是一种集数学、统计学于一体的试验设计方法,通过描绘评价指标(或响应值)对试验变量的响应面,采用多元二次方程来拟合变量和响应值之间的函数关系,最终找到试验变量的最佳组合及最优响应值[12] [13]。与往常用的均匀设计和正交设计相比,弥补了实验精度不够,建立的数学模型预测性较差的缺点,在中药有效成分提取中发挥着越来越重要的作用。

本研究拟采用乙醇溶剂法提取丹皮酚,先设计单因素实验,再采用Box-Behnken响应曲面法考察乙醇浓度(体积分数)、提取温度和提取时间三个因素对提取率的影响,从而优化丹皮酚的提取工艺,为实际生产提供参考数据与依据。

2. 材料

2.1. 材料

丹皮购自重庆市垫江县澄溪镇丹皮种植区,将丹皮烘干和粉碎待用。

2.2. 仪器

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津仪器公司); UV-3150 型紫外可见分光光度计(日本Jasco公司); AL-104 电子分析天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公司); 德国 Heidolph MR Hei-Tec 磁力搅拌器(香港德祥科技有限公司); RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); FFC-45D 型粉碎机(临沂大华机械

厂); DHG-9075A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。

2.3. 药品及试剂

丹皮酚(西南大学药学院药用资源化学研究所自制, HPLC 纯度 > 99.0%); 甲醇(色谱纯, 成都市宜邦科析仪器有限公司); 磷酸, 95%乙醇(皆分析纯, 成都市科龙化工试剂厂); 纯水器(重庆前沿水处理设备有限公司)。

3. 方法

3.1. 丹皮酚含量的测定

3.1.1. HPLC 条件[14]

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 流动相甲醇-0.1%磷酸水溶液(45:55, V/V); 流速 $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 紫外检测波长 274 nm; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。

3.1.2. 丹皮酚的提取率

按照 2015 版《中国药典》, 牡丹皮药材含量测定项下操作, 平行测 3 次。丹皮酚提取率(%) = 丹皮酚提取量(g)/药材中丹皮酚总量(g) \times 100%。

3.2. 原料预处理

将丹皮在 50°C 恒温鼓风干燥箱内烘干, 粉碎过 60 目筛后备用。丹皮颗粒大, 丹皮酚的提取溶出度小; 颗粒小, 原料过滤分离慢, 颗粒直径控制在 1 mm 左右。

3.3. 丹皮酚的提取与测定

称取丹皮样品 50 g, 置于配回流装置的圆底烧瓶中, 加入不同浓度(体积分数)的乙醇溶液 250 ml, 在不同温度下磁力搅拌(1500 rpm)一定的时间, 过滤后滤液定容, 根据药典中的高效液相色谱法, 以纯化的丹皮酚标准品作标准曲线, 测定丹皮酚的提取率。实验先采用单因素实验考察料液比、乙醇浓度、提取温度和时间对丹皮酚提取率的影响。四组单因素实验具体方案如下: ① 料液比 10:1、20:1、30:1 和 40:1 (mL/g) (固定条件: 乙醇浓度 80%、提取温度 50°C 、提取时间 2 h); ② 乙醇浓度 20%、40%、60%、80% 和 95% (固定条件: 料液比 20:1 (mL/g)、提取温度 50°C 、提取时间 2 h); ③ 提取温度 15°C 、 30°C 、 50°C 、 70°C 和 90°C (固定条件: 料液比 20:1 (mL/g)、乙醇浓度 80%、提取时间 2 h); ④ 提取时间 0.5 h、1 h、2 h、3 h 和 4 h (固定条件: 料液比 20:1 (mL/g)、乙醇浓度 80%、提取温度 50°C)。每组实验重复 3 次。

3.4. 数据分析方法

根据单因素实验结果, 选取乙醇浓度、提取温度和时间对丹皮酚提取率影响较大的因素, 通过响应曲面法, 利用 Box-Behnken 软件对提取条件进行回归设计和优化, 每一变量的低、中、高水平分别为-1, 0, 1 进行编码, 实验因素和水平见编码见表 1。

4. 结果与分析

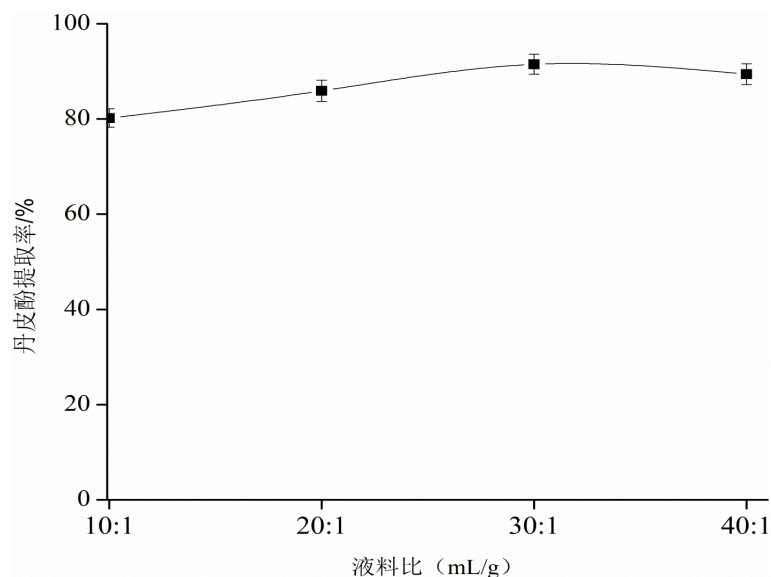
4.1. 单因素实验

4.1.1. 料液比对丹皮酚提取率的影响

由图 1 可知, 牡丹中丹皮酚的提取率随着料液比的增加先增大后趋稳定, 当料液比大于 30:1 时, 提取率略有降低。这可能与固液两相的扩散和吸附平衡有关, 起初以扩散为主, 溶质浓度增大, 提取率增

Table 1. Protocol of Box-Behnken central composite design**表 1.** Box-Behnken 中心组合实验设计方案

水平	因素		
	乙醇浓度(%)	提取温度(°C)	提取时间(h)
	A	B	C
-1	60	30	1
0	80	50	2
1	95	70	3

**Figure 1.** Effect of solid/liquid ratio on paeonol extract yield**图 1.** 料液比对丹皮酚提取率的影响

加；然后随着溶剂增多，固相吸附能力增加，溶质在溶剂中的分配减少，提取率出现降低。

4.1.2. 乙醇浓度对丹皮酚提取率的影响

从图 2 得到，随着乙醇浓度的增加，丹皮酚的提取率先增加后降低。乙醇浓度增加，丹皮酚的溶解度增加，当达到 80% 时，丹皮酚提取率达到最高 90%；当继续增加乙醇浓度时，其他脂溶性成分溶解度也开始增加，有可能影响了丹皮酚的提取效果。

4.1.3. 提取温度对丹皮酚提取率的影响

从图 3 观察发现，随着提取温度的增加，丹皮酚的提取率增加，但当温度 70°C~90°C，乙醇的挥发速度加快，溶剂有损失。在低于 50°C 时，提取率增加明显；当温度高于 50°C 时，提取率的增加明显减缓。

4.1.4. 提取时间对丹皮酚提取率的影响

从图 4 观察可知，提取 2 h 时提取率最高，随着提取时间的延长，提取效果趋于稳定。这可能与溶质在溶剂中的饱和度有关，当溶质逐渐达到最大溶解时，丹皮酚提取率变化减小。

4.2. 丹皮酚提取响应曲面法实验

4.2.1. 丹皮酚提取率拟合回归模型的建立

按照实验设计(表 2)，采用 design-expert 软件进行多元回归拟合：以丹皮酚的提取率(Y)为响应值，

各因子与响应值之间的回归方程为： $Y = -1.11 + 0.04A + 0.01B + 0.07C + 5.89 \times 10^{-5}AB + 1.09 \times 10^{-3}AC + 4.3 \times 10^{-4}BC - 2.61 \times 10^{-4}A^2 - 1.25 \times 10^{-4}B^2 - 3.91 \times 10^{-2}C^2$ ($R^2 = 0.9905$)。

Table 2. Design and results of the three-variable/three-level response surface method
表 2. 响应面法实验设计与结果

Run	Factor 1 A: 浓度%	Factor 2 B: 温度 $^{\circ}\text{C}$	Factor 3 C: 时间 h	Response 提取率%
1	80	70	1	0.8488
2	80	50	2	0.9200
3	60	30	2	0.7060
4	95	30	2	0.7819
5	60	50	3	0.7243
6	80	50	2	0.9230
7	80	50	2	0.9190
8	95	50	3	0.9042
9	60	70	2	0.7345
10	80	30	1	0.7688
11	95	70	2	0.8954
12	80	70	3	0.9010
13	80	50	2	0.9100
14	95	50	1	0.8140
15	60	50	1	0.7133
16	80	30	3	0.7866
17	80	50	2	0.9050

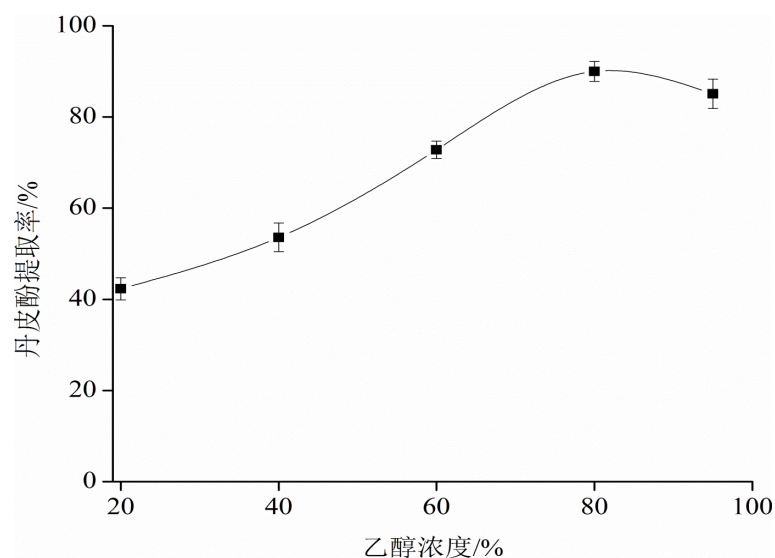


Figure 2. Effect of ethanol concentration on paeonol extract yield
图 2. 乙醇浓度对丹皮酚提取率的影响

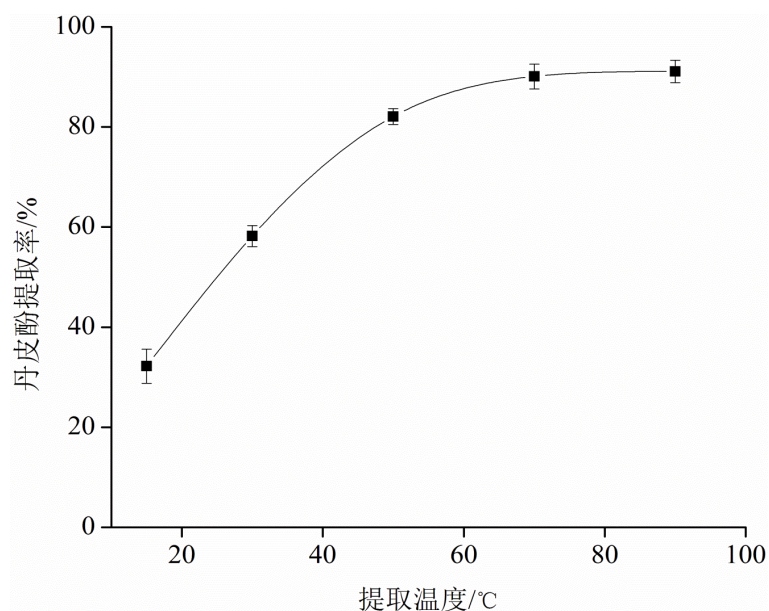


Figure 3. Effect of extract temperature on paeonol extract yield
图 3. 提取温度对丹皮酚提取率的影响

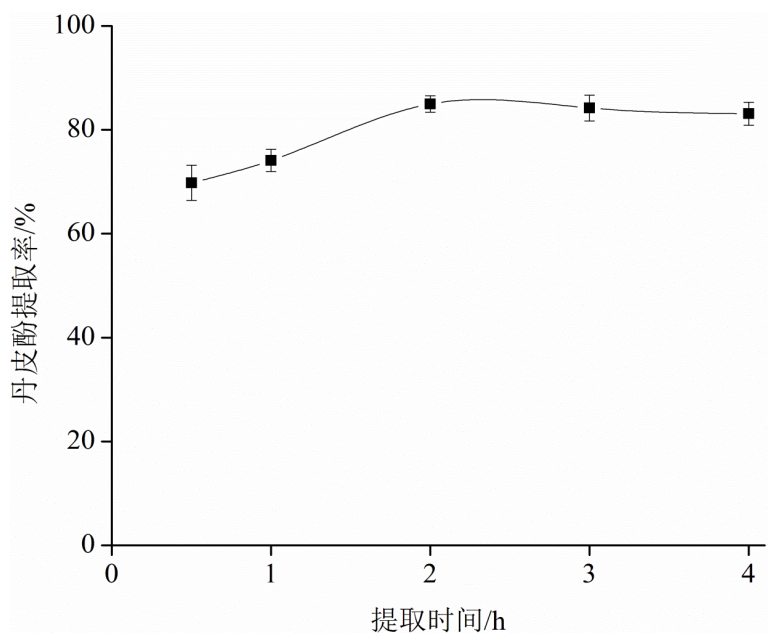


Figure 4. Effect of extract time on paeonol extract yield
图 4. 提取时间对丹皮酚提取率的影响

4.2.2. 回归方程显著性分析

从表 3 可以看出, 乙醇浓度、提取温度和时间对丹皮酚的提取率分别具有极显著($P < 0.01$)。回归模型方程的决定系数 $R^2 = 0.9905$, 变异系数 1.46, 失拟项不具有显著差异($P > 0.05$), 说明实验拟合度高, 误差小, 实验具有可靠性, 能用于乙醇提取丹皮酚工艺的分析优化。

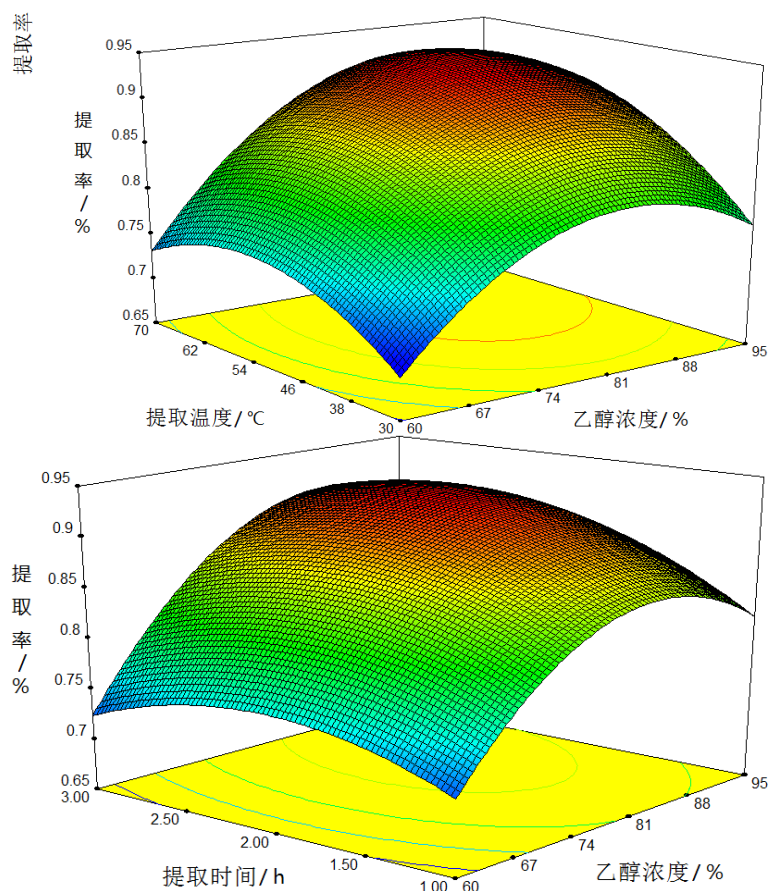
4.2.3. 响应曲面分析

响应面优化与预测: 依据二维等高线和三维响应面, 当设定 Y 最大时, 丹皮酚最佳提取工艺。此时

Table 3. Analysis of significant difference of the regression equation
表 3. 回归方程显著性分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.11	9	0.012	80.87	<0.0001**
A	0.033	1	0.033	221.45	<0.0001**
B	0.013	1	0.013	85.13	<0.0001**
C	0.00318	1	0.00318	21.53	0.0024**
AB	0.00172	1	0.00172	11.63	0.0113
AC	0.00147	1	0.00146	9.93	0.0161
BC	0.0003	1	0.0003	2	0.1999
A ²	0.026	1	0.026	172.68	<0.0001
B ²	0.011	1	0.011	71.36	<0.0001
C ²	0.00643	1	0.00643	43.51	0.0003
残差	0.00103	7	0.00015		
失拟项	0.00080	3	0.00027	4.68	0.0850
纯误差	0.00023	4	0.00006		
总和	0.11	16			
决定系数	0.9905		变异系数	1.46	

注: *表明显著性差异($P < 0.05$); **表明极显著性差异($P < 0.01$)。



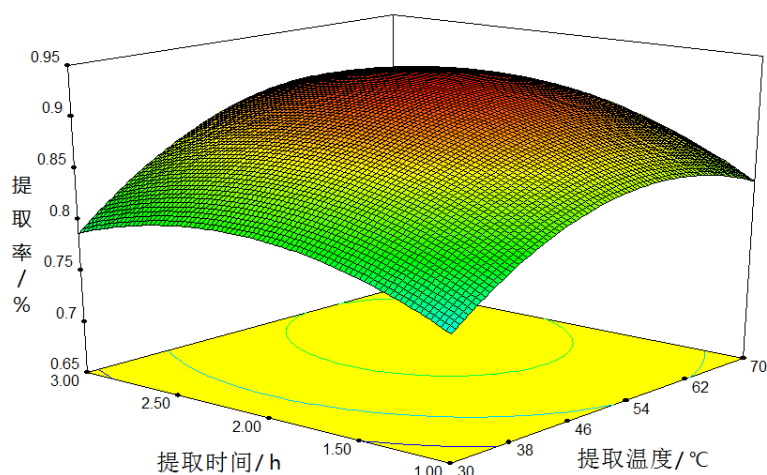


Figure 5. 3D-response surface curves of different two factors including ethanol concentration, extract temperature and extract time on paeonol extract yields
图 5. 乙醇浓度、提取温度、提取时间各两因素对丹皮酚提取率的三维响应面曲线

乙醇浓度 77.5%，提取温度 50℃，提取时间 2 h，提取率 92.3%。结果见图 5。

5. 结论

目前丹皮酚由于具有显著的抗炎活性，在国内医药市场上已得到广泛应用，但是提高和优化丹皮酚的提取纯化工艺，对丹皮酚原料市场具有重要意义。本实验通过单因素和响应曲面实验，研究了丹皮中丹皮酚的提取工艺并进行了优化，得出用 77.5%乙醇浓度、50℃提取温度、2 h 提取时间和料液比 30:1 (mL/g)时，丹皮酚的提取率达到 92.3%，该提取工艺稳定可靠，能应用于工业化生产。

参考文献

- [1] Chou, T.C. (2003) Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of Paeonol in Carrageenan-Evoked Thermal Hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, **139**, 1146-1152. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705360>
- [2] Huang, T.J., Chuang, H., Liang, Y.C., Lin, H.H., Horng, J.C., Kuo, Y.C., Chen, C.W., Tsai, F.Y., Yen, S.C., Chou, S.C. and Hsu, M.H. (2015) Design, Synthesis, and Bioevaluation of Paeonol Derivatives as Potential Anti-HBV Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **90**, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.050>
- [3] Nizamutdinova, I.T., Jin, Y.C., Kim, J.S., Yean, M.H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Lee, J.H., Seo, H.G., Kim, H.J. and Chang, K.C. (2008) Paeonol protects Rat Heart by Improving Regional Blood Perfusion during No-Reflow. *Planta Medica*, **74**, 8.
- [4] Chen, B., Ning, M. and Yang, G. (2012) Effect of Paeonol on Antioxidant and Immune Regulatory Activity in Hepatocellular Carcinoma Rats. *Molecules*, **17**, 4672-4683. <https://doi.org/10.3390/molecules17044672>
- [5] Lau, C.H., Chan, C.M., Chan, Y.W., Lau, K.M., Lau, T.W., Lam, F.C., Law, W.T., Che, C.T., Leung, P.C., Fung, K.P., Ho, Y.Y. and Lau, C.B.S. (2007) Pharmacological Investigations of the Anti-Diabetic Effect of Cortex Moutan and Its Active Component Paeonol. *Phytomedicine*, **14**, 778-784. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.01.007>
- [6] Kim, H.K., Tak, J.H. and Ahn, Y.J. (2004) Acaricidal activity of *Paeonia suffruticosa* Root Bark-Derived Compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7857-7861. <https://doi.org/10.1021/jf048708a>
- [7] 邵作敏. 牡丹皮中丹皮酚提取工艺优化及药理作用的研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [8] 朱琳琳, 李玉贤. 丹皮酚超声提取工艺研究[J]. 中医学报, 2011(6): 713-714.
- [9] 赵连飞, 陈凤丽, 孙曦晓, 等. 牡丹种壳中丹皮酚和芍药苷的微波提取及含量测定[J]. 植物研究, 2014, 34(4): 561-566.
- [10] 韦丽佳, 杨宗发. 从牡丹皮中提取丹皮酚工艺研究[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(8): 1153-1154.

-
- [11] 张云升, 成晓迅, 和健, 等. 牡丹皮中丹皮酚的提取工艺研究[J]. 河北省科学院学报, 2005, 22(3): 49-51.
- [12] 彭晓霞, 路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 296-299.
- [13] Khuri, A.I. and Mukhopadhyay, S. (2009) Response Surface Methodology. *Springer Texts in Statistics*, **1**, 1171-1179.
- [14] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjbm@hanspub.org