

星点设计-效应面法优化莪术油中吉马酮的提取工艺

吴杰¹, 冯钰¹, 陈伟强², 杨梦蝶², 古金华¹, 叶连宝^{1*}¹广东药科大学药科学院; ²广东药科大学基础学院, 广州 510006

摘要: 利用星点设计-效应面法优化莪术油中吉马酮的提取工艺, 并对其含量测定。首先采用水蒸气蒸馏法提取莪术油, 选取吉马酮含量为因变量, 在单因素试验基础上, 选取浸泡时间、提取时间、液料比为自变量, 采用星点设计考察自变量对提取工艺的影响, 通过对不同因素各水平的多元线性回归及二项式拟合, 运用效应面法优选提取工艺并进行预测分析; 运用 HPLC 法以 Kromasil C₁₈ 柱 (250 × 4.6 mm, 5 μm); 甲醇-水 (80:20) 为流动相; 1.0 mL/min 为流速, 在 220 nm 处测定吉马酮的含量。所建立的含量测定方法线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率试验结果良好, 最佳提取工艺条件为浸泡时间 2.36 h, 提取时间 8.19 h, 加水量 9.98 倍; 依最佳条件提取的吉马酮平均得率 8.13%, 与理论预测值的偏差较小。星点设计-效应面法优选的提取工艺简便合理、预测性良好, 为吉马酮的资源开发提供参考。

关键词: 莪术油; 吉马酮; 星点设计-效应面法; 提取工艺; 含量测定

中图分类号: R28

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.03.024

Optimization of Extraction Process of Germacrone from Zedoary Turmeric Oil by Central Composite Design and Response Surface Methodology

WU Jie¹, FENG Yu¹, CHEN Wei-qiang², YANG Meng-die², GU Jin-hua¹, YE Lian-bao^{1*}¹School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University; ²School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Zedoary turmeric oil from crude extract of *Rhizoma Curcuma* has been used as an anti-cancer agent in Traditional Chinese Medicine. Germacrone is a natural compound isolated from zedoary turmeric oil. In this study, we optimized the extraction process of germacrone from zedoary turmeric oil by central composite design and response surface methodology. The process was carried out with the content of germacrone as dependent variable, soaking time, extraction time and the amount of water as independent variables which was based on single factor tests, and each level of independent variables was made by multiple linear regression and binomial fitting. Response surface methodology was used to optimized extraction process conditions and carry on predictive analysis. The HPLC method was used to test the determination of germacrone. The results showed that average content of germacrone was 8.13% with a small deviation compared with the predicted value when optimized extraction conditions were applied with soaking time of 2.36 h, extraction time of 8.19 h and 9.98 times water. This optimized extraction process was simple and reasonable with a good predictability and can provide reference for extraction of germacrone.

Key words: zedoary turmeric oil; germacrone; response surface methodology; extraction technology; content determination

莪术 (*Curcuma zedoaria*) 是姜科植物蓬莪术、广西莪术和温郁金的干燥根茎, 主要产于广西、云南、贵州和浙江等多个省区, 具有行气破血、消积止痛之功效, 莪术挥发油化学成分复杂, 多为倍半萜类化合物, 目前已经确定的结构有 20 多种^[1]。不同的品种

和不同的化学成分, 其药理活性也存在差异, 研究发现, 莪术挥发油大多数均具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用^[1-3]。莪术油主要用于妇科炎症, 肺炎, 治疗儿科疾病, 病毒性心肌炎, 恶性肿瘤, 如卵巢癌、肝癌和肺癌等^[4-11]。此外, 它还是一种低毒安全的药品^[12], 邓时贵等人^[13]报道称其微球的急性毒性并不来自于莪术油本身。

吉马酮 (结构如图 1) 是莪术油中的主要成分之一^[14,15], 其有较强抗肿瘤、抗菌、抗病毒等活

收稿日期: 2016-05-27

接受日期: 2016-10-12

基金项目: 广东省自然科学基金 (2015A030313586); 广东省科技计划 (2015-110)

* 通讯作者 Tel: 86-20-39352139; E-mail: yelb7909@163.com

性^[16-20]。然而,其提取率很低,限制了它的发展,本课题组多年来一直对吉马酮及其衍生物进行相关研究,也取得了一些成果,从成药的可能性上,目前市场上的吉马酮销售价格普遍比较昂贵,我们试图通过工艺的优化,分离技术的优化^[21],从而降低成本,为成药提供可能。近年来,研究人员发现,在工艺优化和处方筛选过程中,常用均匀设计(homogeneous design)和正交设计(orthogonal design),但是这两种方法实验精度不够,建立的数学模型预测性较差;而利用集数学和统计学方法于一体的效应面优化法(response surface methodology, RSM)进行优化,实验设计采用星点设计(central composite design, CCD),其应用已比较成熟,而且特点鲜明。本实验以吉马酮含量为评价指标,采用星点设计-响应面优化法优选提取工艺,并采用 HPLC 法测定其含量,为吉马酮的开发利用提供理论依据。

1 材料与仪器

BS-110 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),挥发油提取器(四川蜀牛仪器设备有限公司)

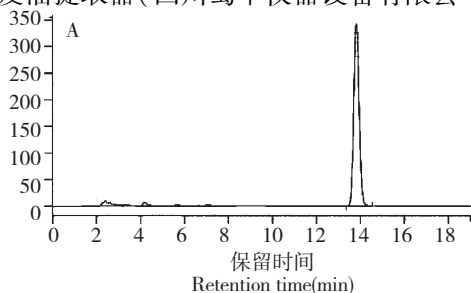


图1 吉马酮化学结构

Fig. 1 Chemical structures of germacrone

司), PTHW 型电子恒温电热套(巩义市予华仪器有限公司)、RV8V-C 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司)、日立高效液相色谱仪(日本日立公司)。吉马酮标准品(批号:PS14022101)(成都普斯生物有限公司),广西莪术购自广西,经广东药科大学李书渊教授鉴定为姜科姜黄属植物广西莪术(*Cureuma wangiensis* G. Lee et C. F. Liang)。水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈柱(250 × 4.6 mm, 5 μm);以甲醇-水(80:20)为流动相;检测波长为 220 nm;柱温 30 °C;流速为 1.0 mL/min,色谱详见图 2。

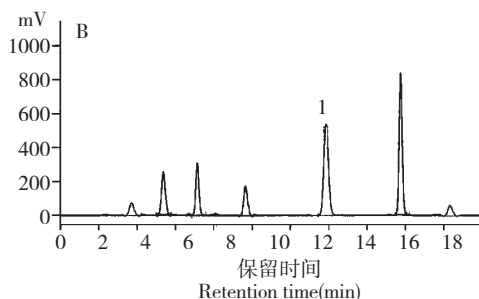


图2 标准品溶液(A)和供试品溶液(B)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of standard (A) and sample (B)

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称定吉马酮对照品,置 100 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得,HPLC 法检测吉马酮对照品保留时间 13.78 min。

2.2.2 供试品溶液的制备

取莪术药材 100 g,按《中国药典》^[1]一部附录 XD 挥发油测定法的甲法提取挥发油,将提取的挥发油定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的绘制

精密量取“2.2.1”项下溶液适量,配制成浓度

为 1 ~ 100 μg/mL 的系列溶液。并按 2.1 项下色谱条件各进样 20 μL,以浓度 X 为横坐标,峰面积积分值 Y 为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $Y = 3.105 \times 10^4 X - 1.821 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。结果表明,吉马酮在此浓度范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度试验

精密量取吉马酮对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,记录吉马酮峰面积,结果吉马酮峰面积的 RSD 为 0.54%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验

按照“2.2.2”项重复制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算吉马酮平均含量为 8.13%,RSD 为 1.26%。结果表明,该检测条

件重复性良好,满足样品检测的需要。

2.3.4 稳定性试验

取供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件每隔1d进样,测定含量,结果RSD为0.82%,表明供试品溶液在6d内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验

准确称定已知含量的样品6份,各准确加入吉马酮对照品溶液进行回收试验,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果平均回收率为98.8%,RSD为0.24%。

2.4 样品含量测定

取莪术药材,按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液。精密量取供试品溶液、对照品溶液各20 μ L,按“2.1”项下色谱条件进样测定,并按峰面积外标法计算含量。

2.5 挥发油的提取

取广西莪术,去皮后用粉碎机粉碎,烘干,过筛,精密称取100g作为1份,浸泡一定时间后加适量水提取一段时间,将药材和提取液全部转移至烧瓶中,安装水蒸气蒸馏提取挥发油装置,浸泡,提取,收集挥发油,备用。

2.6 单因素试验考察

在进行星点设计之前,先通过单因素实验选出对莪术油中吉马酮提取得率具有显著影响的因素,并确定其实验水平。本文考察浸泡时间、提取时间、

液料比对莪术油中吉马酮提取得率的影响。

2.6.1 浸泡时间

精密称取广西莪术100g,共6份,各加入等量水,室温下分别浸泡0.5、1、1.5、2、2.5、3h,水蒸汽蒸馏,按2.4项下方法计算吉马酮含量分别为5.53%、6.76%、6.84%、6.92%、7.01%、7.12%,故将浸泡时间设为1~3h。

2.6.2 提取时间

精密称取广西莪术100g,共6份,各加入等量水,室温下浸泡,水蒸汽蒸馏提取2、4、6、8、10、12h,按2.4项下方法计算吉马酮含量分别为4.78%、6.86%、6.97%、7.24%、7.38%、7.35%,故将提取时间设为4~10h。

2.6.3 液料比

精密称取广西莪术100g,共6份,分别加入4、6、8、10、12、14倍量水,室温下浸泡,水蒸汽蒸馏,按2.4项下方法计算吉马酮含量分别为5.42%、6.89%、6.97%、7.03%、7.14%、7.12%,故将液料比设为6~12倍。

2.7 提取工艺的优选

2.7.1 星点设计

在单因素试验基础上,选择浸泡时间、提取时间和液料比为自变量,因粒度为非连续变量,确定药材粒度30目,以吉马酮含量为评价指标,各因素水平取值用0、 ± 1 、 $\pm \alpha$ 代码表示($\alpha = 1.682$),根据星点设计原理,因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

表1 莪术油中吉马酮的提取工艺星点设计因素水平

Table 1 Factors and levels of central composite design

水平 Level	X ₁ 液料比 Liquid/solid ratio	X ₂ 浸泡时间 Soaking time (h)	X ₃ 提取时间 Extraction time (h)
-1.682	6	1	4
-1	7.216	1.405	5.216
0	9	2	7
1	10.784	2.595	8.784
1.682	12	3	10

表2 莪术油中吉马酮的提取工艺星点试验安排

Table 2 Central composite design and the experimental results

序号 No.	X ₁ 液料比 Liquid/solid ratio	X ₂ 浸泡时间 Soaking time (h)	X ₃ 提取时间 Extraction time (h)	Y 吉马酮含量 Content of germacrone (%)
1	-1	-1	-1	6.8
2	1	-1	-1	7.2
3	-1	1	-1	6.96

序号 No.	X ₁ 液料比 Liquid/solid ratio	X ₂ 浸泡时间 Soaking time (h)	X ₃ 提取时间 Extraction time (h)	Y 吉马酮含量 Content of germacrone (%)
4	1	1	-1	7.32
5	-1	-1	1	7.6
6	1	-1	1	7.76
7	-1	1	1	7.68
8	1	1	1	8.08
9	-1.682	0	0	7.48
10	1.682	0	0	7.8
11	0	-1.682	0	7.44
12	0	1.682	0	7.92
13	0	0	-1.682	3.52
14	0	0	1.682	7.88
15	0	0	0	7.95
16	0	0	0	7.96
17	0	0	0	7.9
18	0	0	0	7.99
19	0	0	0	7.96
20	0	0	0	7.97

2.7.2 模型拟合

以吉马酮含量 Y 为因变量,使用 Design-Expert 8.0.6 对表 2 中试验数据进行多元线性回归和二项式拟合,得多元线性回归方程 $Y = 5.082 + 0.076X_1 + 0.182X_2 + 0.211X_3$ ($r = 0.791$),说明模型拟合度不高,预测性较差。二项式拟合模型为 $Y = -3.08 + 0.779X_1 + 1.10X_2 + 1.48X_3 + 0.0236X_1X_2 -$

$0.00786X_1X_3 + 0.0141X_2X_3 - 0.0386X_1^2 - 0.307X_2^2 - 0.0875X_3^2$ ($r = 0.994, P < 0.0001$),其方差分析见表 3,说明该模型得到的回归方程具有极显著影响,在所选取的各因素水平范围内,提取时间对吉马酮含量的影响最大。试验设计可靠,表明可用此模型对莪术油中吉马酮的提取工艺进行分析和预测。

表 3 吉马酮提取率回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression model of extracting germacrone from zedoary turmeric oil

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	Prob > F
Model	3.68	9	0.41	69.15	<0.0001
X1	0.25	1	0.25	42.78	<0.0001
X2	0.16	1	0.16	27.41	0.0004
X3	1.92	1	1.92	325.72	<0.0001
X1X2	5.00E-03	-1	5.00E-03	0.85	0.3793
X1X3	5.00E-03	-1	5.00E-03	0.85	0.3793
X2X3	1.80E-03	1	1.80E-03	0.3	0.5931
X12	0.22	1	0.22	36.81	0.0001
X22	0.17	0	0.17	28.82	0.0003
X32	1.12	0	1.12	189.04	<0.0001
残差 Error	0.059	10	5.91E-03		

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	Prob > F
失拟性 Lack of fit	0.055	5	0.011	11.99	0.0082
纯误差 Pure error	4.55E-03	5	9.10E-04		
总差 Total	3.74	19			

2.7.3 工艺参数优化和预测

根据回归方程作相应曲面图,见图3,根据拟合的响应曲面形状,分析各自变量对提取工艺的影响,基于已建立的数学模型,该模型有稳定点,且稳定点

为最大值。利用 Point Prediction 进行预测分析,得挥发油中吉马酮最佳提取工艺为加 9.98 倍量水,浸泡 2.36 h,提取时间 8.19 h。在此优化条件下,吉马酮预测值 8.15%。

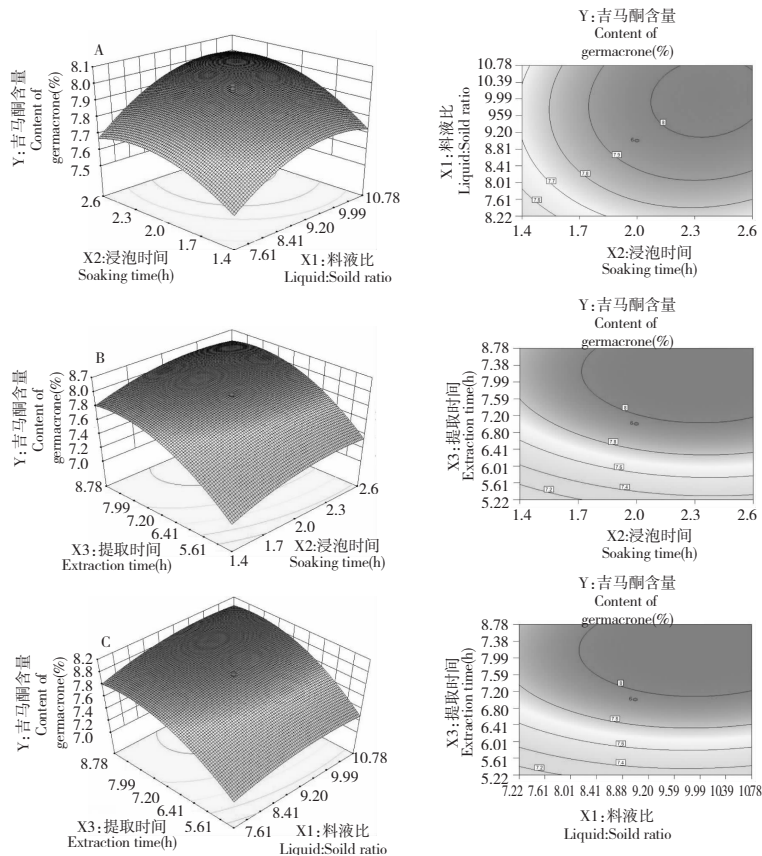


图3 浸泡时间和液料比(A)、浸泡时间和提取时间(B)、液料比和提取时间(C)对挥发油中吉马酮提取工艺影响的响应面及

Fig. 3 Response surface plots and contour plots showing the interactive effects of soaking time and liquid/solid ratio (A), soaking time and extraction time (B), liquid/solid ratio and extraction time (C) on the content of germacrone from zedoary turmeric oil

2.7.4 预测值的验证试验

称取莪术 100 g,共 3 份,按优选的工艺提取挥发油中的吉马酮,按 2.4 项下方法测定挥发油中吉马酮平均含量 8.13%。预测值与实际值间偏差较小,说明二次多项式数学模型所得到的优化条件符合设计目标,试验设计和数学模型具有较好的可靠性和重复性。

3 讨论与结论

预试验对广西莪术的粉碎度进行单因素试验考察,结果显示过 30 目筛药粉的吉马酮含量最高。理论上说,药材粒径变小,表面积增大,有利于溶剂的渗入;同时在实验中,粉碎度过大,会致使药材表面溶液的黏度增加,反而会使挥发油中吉马酮的提取

率降低,故选择粉碎度为 30 目。

广西莪术具有抗癌活性,其复方制剂可用于治疗多种疾病,挥发油是其主要成分,主要含有倍半萜类成分,吉马酮作为其中的活性成分,有很好的研究价值,目前关于吉马酮的研究较少且价格昂贵,所以优选出一条合适的提取工艺显得尤为重要。提取工艺优化多采用正交设计,而星点设计-效应面法采用非线性数学模型拟合,预测值与真实值更接近且试验次数少,所以本文选择星点设计效应面优化法优选莪术油中吉马酮的提取工艺,为吉马酮的进一步开发利用提供参考;同时,本文依据吉马酮为考察对象,采用高效液相色谱法对其含量进行测定,得到的含量结果高于同类文献报道结果。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I.
- Wilson B, Abraham G, Manju VS, et al. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99: 147-151.
- Uechi S, Ishimine Y, Hong F. Antibacterial activity of essential oil derived from *Curcuma zedoaria* against food borne pathogenic bacteria and their thermal stability. *Rdngbm*, 2000, 47: 129-136.
- Wang YF (王毅峰), Liu SQ (刘素清), Zhao JH (赵金红). Observe the compound *Zedoary turmeric oil* suppositories treatment of pregnant women with *Vulvovaginal candidiasis*. *Hebei Med J (河北医药)*, 2006, 28: 839-840.
- Ding YL (丁玉玲), Xu AX (徐爱秀). Antitumor research of *zedoary turmeric oil* and effective group. *J Chin Med Mat (中草药)*, 2005, 28: 152-156.
- He JS (何解生). *Zedoary Turmeric Oil* Injection in pediatric clinical application. *Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志)*, 2006, 15: 501.
- Ding XL (丁晓玲), Hu LC (胡玲灿). To observe the curative effect of *Zedoary Turmeric Oil* Injection on children with viral myocarditis. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2002, 13: 670-671.
- Li X, Wang G, Zhao J, et al. Antiproliferative effect of β -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 894-904.
- Wu WY, Xu Q, Shi LC, et al. Inhibitory effects of *Curcuma aromatica* oil on proliferation of hepatoma in mice. *World J Gastroenterol*, 2000, 6: 216-219.
- Xiao Y, Yang FQ, Li SP, et al. Essential oil of *Curcuma wenyujin* induces apoptosis in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 4309-4318.
- Zhao J, Li QQ, Zou B, et al. *In vitro* combination characterization of the new anticancer plant drug β -elemene with taxanes against human lung carcinoma. *Int J Oncol*, 2007, 31: 241-252.
- Li GD (李国栋), Xu F (许付), Shen AJ (沈爱军). Research progress of *zedoary oil*. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2002, 37: 806-809.
- Deng SG (邓时贵), Mo LL (莫莉莉), Ou YQ (区勇全), et al. *Zedoary oil* gelatin microspheres preparation acute toxicity experiment. *Herald Med (医药导报)*, 2002, 21: 200-202.
- Yang FQ, Wang YT, Li SP. Simultaneous determination of 11 characteristic components in three species of *Curcuma* rhizomes using pressurized liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2006, 1134: 226-231.
- Chen XJ (成晓静), Liu HG (刘华钢), Lai MX (赖茂祥). Review of chemical constituents and pharmacological actions of *Rhizoma Curcumae*. *J Guangxi Univ Chin Med (广西中医学院学报)*, 2007, 10 (1): 79-82.
- Xia Q, Wang X, Xu DJ. Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential oil. *Thromb Res*, 2012, 130: 409-414.
- Park SD, Jung JH, Lee HW. *Zedoariae* rhizoma and curcumin inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic myofibroblasts. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 555-569.
- Li CZ (李成章), Shi JH (时继慧). Research the anti-inflammatory effects of *zedoary turmeric oil*. *Chin J Chin Mater Med*, 1985, 10(3): 38-40.
- Suphrom N, Pumthong G, Khorana N. Anti-androgenic effect of sesquiterpenes isolated from the rhizomes of *Curcuma aeruginosa* Roxb. *Fitoterapia*, 2012, 83: 864-871.
- Xu JJ (许俊杰), Chen YR (陈育尧), Meng QD (孟庆棣). Effect of *zedoary* on rat hemorrheology and thrombosis. *Chin Med Mater*, 1992, 15(5): 33-35.
- Wu J (吴杰), Gu JH (古金华), Fen Y (冯钰), et al. Separation, purification and structural elucidation of Germacrone from *Zedoary oil*. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2015, 27: 1884-1886.