

正交试验联合星点设计-效应面法 优化杨树芽总黄酮的提取工艺

刘长龙¹, 李海涛^{1,2*}

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江苏银杏研究院, 江苏 邳州 221300)

[摘要] **目的:** 优选杨树芽总黄酮的提取工艺。**方法:** 以总黄酮含量为指标, 在单因素试验基础上, 采用正交试验联合星点设计-效应面法考察乙醇体积分数、提取时间和料液比对杨树芽总黄酮提取工艺的影响。**结果:** 正交试验确定最佳提取工艺为加13倍量90%乙醇超声提取2次, 每次24 min; 总黄酮质量分数达28.82%。星点设计-效应面法确定最佳提取工艺为加14倍量80%乙醇超声提取2次, 每次24 min; 总黄酮质量分数达31.14%。**结论:** 星点设计-效应面法较正交设计法更为准确, 2种方法结合应用可使中药提取工艺优化具有良好预测性。

[关键词] 正交设计; 星点设计-效应面法; 杨树芽总黄酮; 提取工艺; 紫外分光光度法

[中图分类号] R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0026-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100026

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000077.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:46

Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from Poplar Buds Based on Central Composite Design-Response Surface Methodology and Orthogonal Design

LIU Chang-long¹, LI Hai-tao^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Jiangsu Academy of Ginkgo, Pizhou 221300, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from poplar buds. **Method:** With the content of total flavonoids from poplar buds as index, based on single factor tests, orthogonal test was adopted to optimize extraction technology by taking ethanol concentration, extraction time and solid-liquid ratio as factors. **Result:** Optimum process determined by orthogonal test was as following: extracted twice with 13 times the amount of 90% ethanol for 30 min per time; The content of total flavonoids was 28.82%. The best process optimized by central composite design-response surface methodology was as following: extracted twice with 14 times the amount of 80% ethanol for 24 min per time; The content of total flavonoids was 31.14%. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology was better than orthogonal method in accuracy, combined two methods for optimizing application of extraction process for traditional Chinese medicine had good predictability.

[Key words] orthogonal design; central composite design-response surface methodology; total flavonoids from poplar buds; extraction technology; UV spectrophotometry

[收稿日期] 20140104(007)

[基金项目] 江苏省“六大人才高峰”项目(Y Y-111)

[第一作者] 刘长龙, 在读硕士, 从事心血管药理研究, Tel:15950582185, E-mail:948695045@qq.com

[通讯作者] *李海涛, 教授, 博士生导师, 从事心血管药理研究, E-mail:lihaitao0003@sina.com

杨树的树皮、树叶、树芽及花均可作为药物使用,《本草纲目》中记载白毛杨树叶煎汤可止痢,民间煎煮杨树嫩芽可消肿止痛。前期研究发现杨树芽中黄酮类和萜稀类化合物含量较高^[1-3],但目前尚无杨树芽总黄酮提取工艺优化的相关研究。本实验以总黄酮含量为指标,采用正交设计法联合星点设计-效应面法优选杨树芽总黄酮的提取工艺,为杨树资源的充分利用提供参考。

1 材料

UV-2401PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),R-124 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司)。杨树芽购于河南省金华蜡业有限公司,产地河南长葛地区,经我院潘杨教授鉴定为杨柳科杨属植物 *Palicaceae populus* L. 的新生芽;芦丁对照品(批号 0080-9705,中国食品药品检定研究院),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制^[3] 精密吸取芦丁对照品溶液 0, 2, 4, 8, 10 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 各加入 80% 乙醇溶液至 12.5 mL, 摇匀, 加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.7 mL, 摇匀后静置 5 min, 加入 10% 硝酸铝溶液 0.7 mL, 摇匀后静置 6 min, 加入 5% 氢氧化钠溶液 6.0 mL, 摇匀后加 80% 乙醇定容至刻度, 放置 15 min, 以不含芦丁的试液作空白, 于 500 nm 处测定吸光度(A), 以质量浓度(C)为横坐标, A 为纵坐标, 得回归方程 $A = 2.065 3C + 0.015 2 (R^2 = 0.998 6)$, 线性范围 0 ~ 0.32 g·L⁻¹。

2.2 提取工艺设计 称取杨树芽, 洗净烘干, 于 -80 °C 冷冻 12 h, 粉碎过 40 目筛, 加一定体积分数乙醇超声提取, 过滤得澄清透明液体, 减压回收, 真空干燥, 得杨树芽提取物, 计算粗品中总黄酮含量。

2.3 正交试验 在预试验基础上, 确定提取数 2 次, 以总黄酮质量分数为评价指标, 选择乙醇体积分数、提取时间、料液比为考察因素, 采用 L₉(3⁴) 正交表进行试验设计, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 杨树芽总黄酮超声提取工艺正交试验因素水平

水平	A 乙醇体积分数/%	B 料液比	C 提取时间/min
1	60	1:10	10
2	75	1:13	20
3	90	1:16	30

由直观分析可知, 各因素对杨树芽总黄酮提取工艺的影响顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A

表 2 杨树芽总黄酮超声提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总黄酮质量分数/%
1	1	1	1	1	23.27
2	1	2	2	2	25.12
3	1	3	3	3	24.80
4	2	1	2	3	24.80
5	2	2	3	1	28.00
6	2	3	1	2	25.21
7	3	1	3	2	28.73
8	3	2	1	3	28.24
9	3	3	2	1	28.80
K ₁	24.40	25.60	25.57		
K ₂	26.00	27.12	26.24		
K ₃	28.59	26.27	27.18		
R	4.19	1.52	1.60		

表 3 总黄酮质量分数方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	26.856	2	13.428	32.308	<0.05
B	3.482	2	1.741	4.189	>0.05
C	3.893	2	1.946	4.683	>0.05
D(误差)	0.831	2	0.416	1.000	

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

具有对提取工艺具有显著性影响, 其他因素则无显著性影响, 确定最佳提取条件为 $A_3B_2C_3$, 即乙醇体积分数 90%, 料液比 1:13, 提取时间 30 min, 提取数 2 次。按该工艺进行 3 次验证试验, 结果总黄酮平均质量分数 28.82%, RSD 1.4%, 表明优选的提取工艺稳定可行。

2.4 星点试验^[4-7] 在正交试验基础上, 选择乙醇体积分数、提取时间及料液比为自变量, 固定提取数 2 次, 根据星点设计原理, 因素水平见表 4, 试验安排及结果见表 5。

表 4 杨树芽总黄酮超声提取工艺星点试验因素水平

编码水平	X ₁ 乙醇体积分数/%	X ₂ 提取时间/min	X ₃ 料液比
-1.732	60	10	1:10
-1	66.3	14.2	1:11.3
0	75	20	1:13
1	83.7	25.8	1:14.7
1.732	90	30	1:16

以杨树芽总黄酮质量分数为因变量, 使用 Statistica 6.0 软件对各自变量进行多元线性回归和二项式拟合, 得多元线性回归 $Y = 0.040 + 0.748X_1 + 0.322X_2 + 0.087X_3 (r = 0.819 3)$, 说明模型拟合度和预测性较差, 故重新采用二项式拟合, 得二项式模型 $Y = 1.570 - 0.027X_1 - 0.007X_2 -$

表 5 杨树芽总黄酮超声提取工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	总黄酮质量分数/%
1	-1	-1	-1	24.18
2	1	-1	-1	27.25
3	-1	1	-1	25.02
4	1	1	-1	28.84
5	-1	-1	1	23.27
6	1	-1	1	27.38
7	-1	1	1	25.08
8	1	1	1	31.24
9	-1.732	0	0	24.15
10	1.732	0	0	30.24
11	0	-1.732	0	22.05
12	0	1.732	0	24.26
13	0	0	-1.732	24.06
14	0	0	1.732	24.95
15~20	0	0	0	24.46

$0.054X_3 + 0.000161X_1^2 - 0.000042X_2^2 + 0.000984X_3^2 + 0.000069X_1X_2 + 0.000286X_1X_3 - 0.000411X_2X_3$ ($r=0.9489$), 表明二次回归方程拟合度较好。

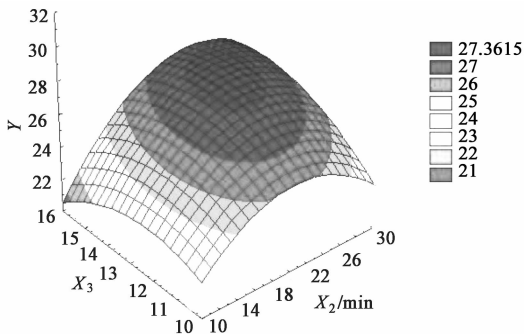


图 1 提取时间和料液比
对杨树芽总黄酮质量分数影响的三维曲线

通过因变量与另两因素拟合制作三维曲面图, 绘制因变量曲面图, 见图 1~3。结果选取较佳工艺范围为 X_1 80%~90%, X_2 20~26 min, X_3 1:13~1:15, 综合实际情况, 故确定杨树芽总黄酮最佳提取工艺为加 14 倍量 80% 乙醇超声浸提 2 次, 每次 24 min。按优选的提取工艺进行 3 次验证试验, 结果总黄酮平均质量分数 31.14%, RSD 1.13%, 表明优选的工艺条件稳定可行。

3 讨论

杨树芽作为当代非传统中药资源, 含有丰富的黄酮类物质、酚类物质及一些稀有物质, 具有多样生物活性作用。前期研究发现, 杨树芽提取物对抗氧化、抗炎抗肿瘤等具有良好的治疗作用, 但有关其提取工艺的研究尚未见报道, 本文通过正交试验联合星点设计-效应面法优化其提取工艺, 可为后期工业

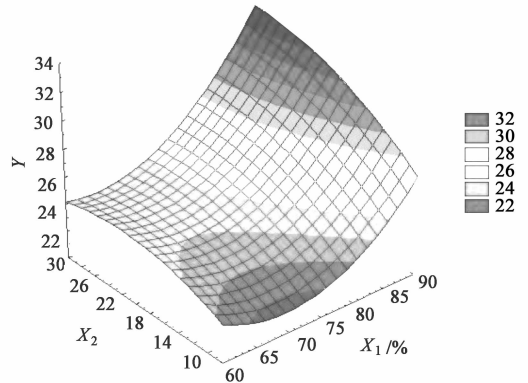


图 2 乙醇体积分数和提取时间
对杨树芽总黄酮质量分数影响的三维曲线

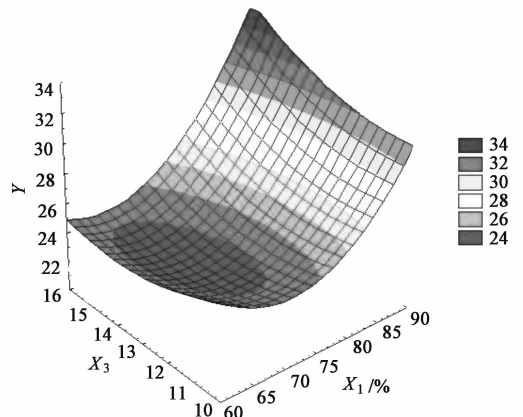


图 3 乙醇体积分数和料液比
对杨树芽总黄酮质量分数影响的三维曲线

大规模生产提供参考。

[参考文献]

- [1] 郑光耀, 周维纯, 何玲, 等. 杨树芽提取物体外抗肿瘤活性的研究[J]. 林产化学与工业, 2009, 29(6): 38.
- [2] 李骄, 郑光耀, 李海涛. 杨树芽提取物对实验性胃溃疡的防治作用[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(3): 36.
- [3] 刘长龙, 雷慧, 赵其秀, 等. 杨树芽提取物清除 DPPH 自由基的作用[J]. 安徽医药, 2013, 17(7): 1091.
- [4] 张吉祥, 欧来良. 正交试验法优化超声提取枣核总黄酮[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 18.
- [5] 张吉祥. 正交实验法优选绿茶绿色素的超声波提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 36(1): 192.
- [6] 刘华钢, 叶月华, 冯看. 星点设计-效应面法优选两面针活性成分的提取工艺[J]. 广西医科大学学报, 2011, 28(4): 493.
- [7] 陈卫卫, 何炜玲, 李海涛, 等. 星点设计-响应面法优选参芪保健饮料的制备工艺[J]. 食品科学, 2013, 38(2): 95.

[责任编辑 刘德文]