

Box-Behnken 设计-效应面法 优化白花蛇舌草总黄酮的提取工艺

李芳^{1,2}, 杨培民^{2*}, 曹广尚^{2*}, 逯双¹

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 优选白花蛇舌草黄酮类成分的提取工艺, 为该药材的资源开发提供参考。方法: 以乙醇体积分数、乙醇用量及提取时间为自变量, 芦丁、异槲皮苷、槲皮苷提取量的总评“归一值”为因变量, 通过 Design-Expert 8.0 软件对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合, 利用效应面法优选提取工艺并进行预测分析。采用 HPLC-DAD 测定芦丁、异槲皮苷、槲皮苷含量, 色谱条件为流动相乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B)梯度洗脱, 检测波长 254 nm。结果: 最佳提取工艺为加 14 倍量 73% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1.5 h; 芦丁、异槲皮苷、槲皮苷平均提取量分别为 2.529, 0.435, 0.215 mg·g⁻¹, 总评“归一值”实测值 0.922 7 与预测值偏差 -1.24%。结论: 优化的提取工艺稳定可行, 预测准确度高, 为白花蛇舌草总黄酮的制剂开发提供参考。

[关键词] 白花蛇舌草; 总黄酮; 芦丁; 异槲皮苷; 槲皮苷

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0021-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080021

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150225.1610.007.html>

[网络出版时间] 2015-02-25 16:10

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Oldenlandia diffusa* by Box-Behnken Design-response Surface Methodology LI Fang^{1,2}, YANG Pei-min^{2*}, CAO Guang-shang^{2*}, LU Shuang¹ (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China; 2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a reference for resource development of *Oldenlandia diffusa* by optimize extraction process of total flavonoids from this medicinal herb. **Method:** Extraction time, ethanol concentration and amount were selected as independent variables, overall desirability of contents of rutin, isoquercitrin and quercitrin as dependent variable, Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize extraction technology. HPLC-DAD was adopted to determine contents of rutin, isoquercitrin and quercitrin with mobile phase of acetonitrile (A) -0.05% phosphoric acid solution (B) for gradient elution and detection wavelength of 254 nm. **Result:** Optimal extraction process was as following: extracted 2 times with 14-fold the amount of 73% ethanol for 1.5 h per time. Average extracting amounts of rutin, isoquercitrin and quercitrin were 2.529, 0.435, 0.215 mg·g⁻¹, respectively. Deviation between the measured and predicted value of overall desirability was -1.24%. **Conclusion:** This extraction process is stable and feasible with high prediction accuracy, which can provide a reference for preparations development of total flavonoids from *O. diffusa*.

[Key words] *Oldenlandia diffusa*; total flavonoids; rutin; isoquercitrin; quercitrin

白花蛇舌草功效清热解毒、消痈、抗癌、消肿止痛等^[1], 具有抗肿瘤、抗菌消炎、增加免疫功能等药

[收稿日期] 20140807(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274052); 山东省自然科学基金项目(ZR2011HL043); 山东省优秀中青年科学家科研基金项目(BS2013YY052)

[第一作者] 李芳, 在读硕士, 从事中药制剂学研究, Tel:18340036339, E-mail:fangli997@126.com

[通讯作者] * 杨培民, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂研究, Tel:0531-68617607, E-mail:jnypm7777@126.com;

* 曹广尚, 从事中药新剂型研究, Tel:0531-68617919, E-mail:cgs198041@163.com

理作用,临床常用于治疗恶性肿瘤、阑尾炎、肝炎、泌尿系统感染、支气管炎等疾病,主要化学成分包括黄酮类、蒽醌类、萜类等。芦丁、异槲皮苷、槲皮苷为白花蛇舌草总黄酮的主要活性成分,临床主要用于抗肿瘤、抗炎、调节免疫、抗氧化等^[2-9]。目前,针对白花蛇舌草黄酮类成分的提取工艺已有报道^[10-11],但多存在试验精度不高、指标选取单一等问题。多指标成分表征中药品质已成为药物质量控制的主要手段^[12]。本实验以芦丁、异槲皮苷、槲皮苷提取量为综合评价指标,采用星点设计-效应面法优化白花蛇舌草黄酮类成分的提取工艺,为该药材的质量控制与资源利用提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), AB135-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。白花蛇舌草购自山东中医药大学附属医院,经山东中医药大学李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* 的干燥全草;芦丁、槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100080-200707,111538-200504),异槲皮苷对照(南京安博睿拉生物科技有限公司,批号 100080-200306),甲醇、乙腈和磷酸为色谱纯,水为娃哈哈高纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

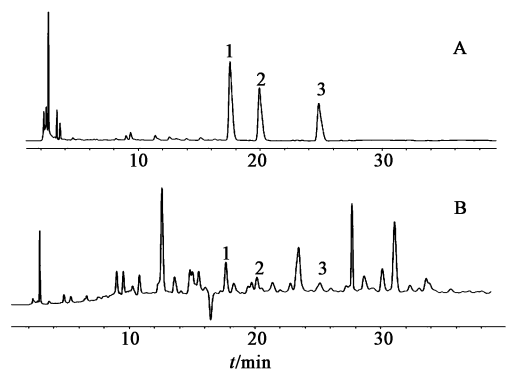
2.1 芦丁、异槲皮苷、槲皮苷的含量测定^[13]

2.1.1 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 10% ~ 15% A; 5 ~ 40 min, 15% ~ 25% A; 40 ~ 60 min, 25% ~ 40% A; 60 ~ 70 min, 40% ~ 10% A),检测波长 254 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取芦丁、异槲皮苷、槲皮苷对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇超声使溶解并定容至刻度,分别得 0.708, 0.603, 0.213 g·L⁻¹ 的对照品贮备液。精密吸取各贮备液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 在预试验基础上,精密称取白花蛇舌草粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,加入 70% 乙醇 50 mL,回流 2 次,每次 2 h,合并提取液,加 70% 乙醇定容至 100 mL,摇匀,滤过,即得。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密量取混合对照品溶液,加 70% 甲醇稀释成系列混合对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁; 2. 异槲皮苷; 3. 槲皮苷

图 1 白花蛇舌草 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Oldenlandia diffusa*

面积为纵坐标,得芦丁、异槲皮苷及槲皮苷回归方程分别为 $Y = 8.97X + 0.662$ ($r = 0.9995$), $Y = 10.60X + 0.336$ ($r = 0.9996$), $Y = 38.03X - 1.980$ ($r = 1.0000$),线性范围分别为 7.08 ~ 70.8, 6.03 ~ 60.3, 2.13 ~ 21.3 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 精密量取混合对照品溶液 3 mL,置 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇定容至刻度,摇匀,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果芦丁、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.8%, 0.9%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL,于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 按 2.1.1 项下条件测定,结果芦丁、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.5%, 2.3%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 精密称定同一样品 6 份,每份 1 g,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算芦丁、异槲皮苷、槲皮苷峰面积的 RSD 分别为 2.3%, 1.6%, 1.4%,表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取同批白花蛇舌草粉末 6 份,每份 0.5 g,精密加入混合对照品溶液适量(芦丁、异槲皮苷、槲皮苷质量分别为 1.215, 0.183, 0.115 mg),按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算芦丁、异槲皮苷、槲皮苷平均回收率分别为 98.78%, 95.38%, 101.01%, RSD 分别为 2.1%, 1.5%, 2.2%,表明该方法准确度较高。

2.2 提取工艺优选 白花蛇舌草黄酮类成分易溶于乙醇,故采用乙醇回流法提取,因提取次数为非连续变量,回归处理较困难,从节约成本和工业生产实

际考虑,提取数定为 2 次。在预试验基础上,选取乙醇体积分数、乙醇用量和提取时间为自变量,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理对各因素进行 3 个水平设计。以芦丁、异槲皮苷、槲皮苷提取量为综合评价指标,数据处理采用“归一化法”处理。计算公式为 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$, Y_i 为实测值, Y_{\min}

和 Y_{\max} 为某一指标在不同试验值中的最小值和最大值。计算总评“归一值”(overall desirability, OD) = $(d_1 \times d_2 \cdots \times d_n)^{1/n}$, n 为指标数。准确称取白花蛇舌草 17 份,每份 50 g,根据 Box-Behnken 试验设计方案回流提取,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算芦丁、异槲皮苷、槲皮苷含量,试验安排及结果见表 1。

表 1 白花蛇舌草总黄酮提取工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 1 Box-Behnken test analysis of extraction process for total flavonoids from *Oldenlandia diffusa*

No.	X_1 乙醇体积 分数/%	X_2 乙醇用量 /倍	X_3 提取时间 /h	芦丁 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	异槲皮苷 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	槲皮苷 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	OD
1	60	13	2.0	0.659	0.092	0.046	0.124
2	80	13	2.0	0.714	0.186	0.077	0.275
3	60	15	2.0	0.689	0.138	0.061	0.203
4	80	15	2.0	1.269	0.276	0.121	0.512
5	60	14	1.5	0.178	0.057	0.027	0.000
6	80	14	1.5	1.452	0.316	0.134	0.594
7	60	14	2.5	1.365	0.298	0.125	0.527
8	80	14	2.5	1.937	0.358	0.135	0.629
9	70	13	1.5	2.606	0.396	0.163	0.788
10	70	15	1.5	2.359	0.408	0.172	0.845
11	70	13	2.5	2.528	0.425	0.206	0.973
12	70	15	2.5	2.544	0.438	0.211	0.995
13	70	14	2.0	2.537	0.421	0.212	0.983
14	70	14	2.0	2.486	0.430	0.198	0.938
15	70	14	2.0	2.471	0.429	0.202	0.952
16	70	14	2.0	2.434	0.424	0.212	0.969
17	70	14	2.0	2.399	0.413	0.182	0.899

表 1 中数据采用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面试验分析,以 OD 为响应值分别对各自变量进行多元线性回归和二项式方程拟合,得回归方程 $Y = 0.95 + 0.14X_1 + 0.049X_2 + 0.11X_3 + 0.039X_1X_2 - 0.12X_1X_3 - 8.75 \times 10^{-3}X_2X_3 - 0.57X_1^2 - 0.10X_2^2 + 0.056X_3^2$,方差分析见表 2。

由表 2 可知,二次项 X_1^2, X_2^2 达显著水平,交互项 X_1X_3 具有显著性,一次项 X_1, X_3 达显著水平。失拟项检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小。拟合检验极显著,说明该模型拟合程度很好,试验误差小。根据回归方程作不同因子的响应面分析图,见图 2。根据拟合的响应曲面形状,初步得到最佳提取工艺为乙醇体积分数 72.48%,溶剂用量 14.33 倍,提取时间 1.50 h,OD 最大预测值 0.934 3。结合实际生产情况,确定最佳工艺参数为加 14 倍量 73% 乙醇提取 2 次,每次 1.5 h。

2.3 验证试验 称取白花蛇舌草 25 g,共 3 份,按最佳工艺条件进行 3 次验证试验,结果芦丁、异槲皮苷、槲皮苷平均提取量 2.529,0.435,0.215 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.1%,2.3%,1.7%。OD 实测值 0.922 7,

表 2 响应面拟合回归方程的方差分析

Table 2 Variance analysis of response surface fitting regression equation

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.78	9	0.20	56.28	<0.000 1
X_1	0.17	1	0.17	47.52	0.000 2
X_2	0.020	1	0.02	5.55	0.050 7
X_3	0.10	1	0.10	28.61	0.001 1
X_1X_2	6.241×10^{-3}	1	6.24×10^{-3}	1.78	0.224 5
X_1X_3	0.061	1	0.06	17.22	0.004 3
X_2X_3	3.062×10^{-4}	1	3.06×10^{-4}	0.09	0.776 4
X_1^2	1.35	1	1.35	384.02	<0.000 1
X_2^2	0.045	1	0.05	12.82	0.009 0
X_3^2	0.013	1	0.01	3.69	0.096 1
残差	0.025	7	3.52×10^{-3}		
失拟项	0.020	3	6.81×10^{-1}	6.51	0.051 0
纯误差	4.183×10^{-3}	4	1.05×10^{-1}		
总差	1.81	16			

与预测值的偏差 -1.24%,说明二项式拟合效果好,建立的数学模型可靠,具有良好的预测性。

3 讨论

本文采用 HPLC-DAD 测定各指标成分含量,利

便合理、稳定,预测结果具有较高的准确性。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010;附录 23.

[2] Liang Z, Jiang Z, Ho H, et al. Comparative analysis of *Oldenlandia diffusa* and its substitutes by high performance liquid chromatographic finger print and mass spectrometric analysis[J]. *Planta Med*, 2007, 73(14): 1502-1507.

[3] Wang N, Li D Y, Niu H Y, et al. 2-Hydroxy-3-methylantraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd induces apoptosis in human leukemic U937 cells through modulation of MAPK pathways[J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(6): 752-758.

[4] Ganbold M, Barker J, Ma R, et al. Cytotoxicity and bioavailability studies on a decoction of *Oldenlandia diffusa* and its fractions separated by HPLC[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 396-403.

[5] Kim D H, Lee H J, Oh Y J, et al. Iridoid glycosides isolated from *Oldenlandia diffusa* inhibit LDL-oxidation[J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(10): 1156-1160.

[6] 于春艳,李薇,刘玉和,等. 白花蛇舌草提取物体外抗肿瘤作用及机制研究[J]. *北华大学学报:自然科学版*, 2004, 5(6): 412-416.

[7] 曹广尚,杨培民,周鹏. 高效液相色谱法测定白花蛇舌草中异高山黄芩素的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(8): 650-652.

[8] 杨培民,代龙,魏永利. 大孔吸附树脂分离纯化白花蛇舌草总黄酮的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(6): 417-420.

[9] 杨培民. 白花蛇舌草抗肿瘤有效部位黄酮和多糖的纯化及其脂质体复合物的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2011.

[10] 张彩霞,蔡定建,方文英. 白花蛇舌草中黄酮提取工艺的优化及其结构鉴[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(1): 131-133, 136.

[11] 姚田华,蒋剑平,林圣云,等. 基于响应面分析法优化白花蛇舌草黄酮提取工艺[J]. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(4): 425-429.

[12] 刘荣霞,叶敏,果德安. 中药质量控制研究的思路与方法[J]. *中国天然药物*, 2006, 4(5): 332-337.

[13] 李芳,杨培民,曹广尚,等. 白花蛇舌草及其制剂有效成分定量测定方法的研究进展[J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1803-1808.

[责任编辑 刘德文]

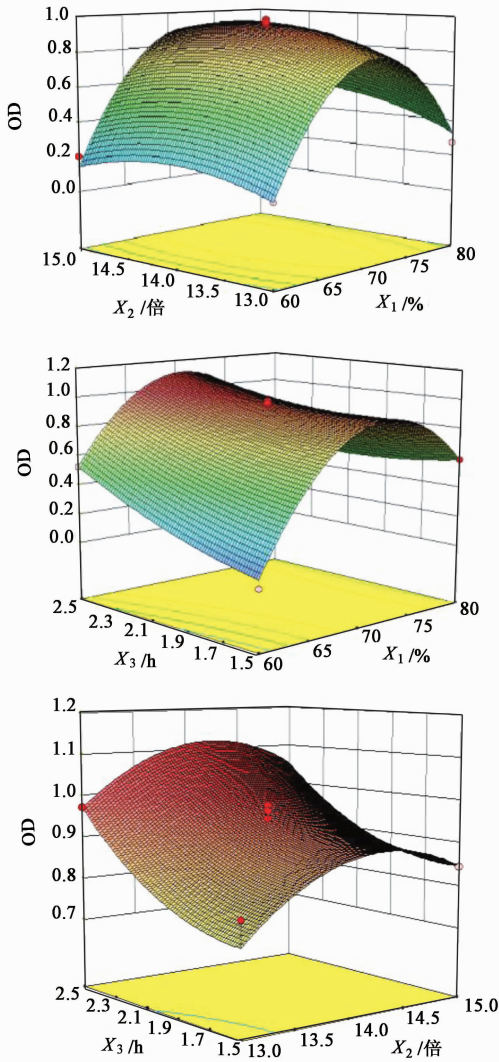


图 2 乙醇体积分数、乙醇用量及提取时间相互作用对白花蛇舌草总黄酮提取工艺的响应面

Fig. 2 Response surface of interaction among extraction time, ethanol concentration and amount on extraction process of total flavonoids from *Oldenlandia diffusa*

用 DAD 检测器进行全波长扫描(200 ~ 400 nm),结果表明波长为 254 nm 时,3 个待测成分均有较大紫外吸收,且分离效果良好,综合考虑,选择检测波长 254 nm。流动相曾分别考察了甲醇、乙腈、水和 0.05%、0.1% 磷酸,结果发现用乙腈和 0.05% 磷酸洗脱时,各色谱峰分离度及峰形均较好。同时考察了流速和柱温对峰形的影响,确定流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃。目前国内学者对白花蛇舌草提取工艺考察较少,且多采用正交试验,本文采用星点设计-效应面法优化白花蛇舌草中 3 种黄酮类成分的提取工艺,兼顾了多个影响因素和评价指标,优选的工艺简