

星点设计-效应面法优化黄芩中4种黄酮类成分的提取工艺

李容, 王海蓉, 欧小群, 李小彬, 杨楸楠, 肖昌斌, 万丽*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的: 优选黄芩中4种黄酮类成分的提取工艺, 为黄芩薄层鉴别用对照提取物的研究提供参考。方法: 以乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间为自变量, 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素提取率的总评“归一值”为因变量, 通过星点设计-效应面法优选黄芩提取工艺并进行预测分析和工艺验证。采用 HPLC 测定指标成分含量, 流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)梯度洗脱(0~25 min, 27% A; 25~27 min, 27%~43% A; 27~40 min, 43%~56% A; 40~45 min, 56%~85% A), 检测波长 274 nm。结果: 最佳提取工艺为加 12 倍量 54% 乙醇回流提取 2 次, 每次 135 min。黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素平均提取率分别为 12.53%, 2.77%, 0.66%, 0.25%, 总评“归一值”预测值和实测值偏差 1.19%。结论: 优选的提取工艺稳定可行、预测性良好, 为黄芩资源的合理利用提供参考。

[关键词] 黄芩; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0035-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015090035

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1040.002.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 10:40

Optimization of Extraction Process of Four Flavonoids in Scutellariae Radix by Central Composite Design-response Surface Methodology LI Rong, WANG Hai-rong, OU Xiao-qun, LI Xiao-bin, YANG Qiu-nan, XIAO Chang-bin, WAN Li* (State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of four flavonoids in Scutellariae Radix and provide references for control extracts research of thin-layer chromatography of Scutellariae Radix. **Method:** Effects of ethanol concentration, solvent dosage and extracting time on overall desirability of yields of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin were investigated and forecasted by central composite design-response surface methodology. HPLC was adopted to determine contents of four flavonoids with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution and detection wavelength at 274 nm. **Result:** Optimal extraction process was as following: extracted twice with 12 times the amount of 54% ethanol for per time of 135 min. Yields of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin were 12.53%, 2.77%, 0.66%, 0.25%, respectively. Bias between the predicted and observed value of overall desirability was 1.19%. **Conclusion:** This optimized extraction technology is stable and feasible with good prediction.

[Key words] Scutellariae Radix; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin

黄芩始载于《神农本草经》^[1], 功效清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎^[2]。其有效成分为黄酮类, 具

有显著的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒及抗肿瘤等药理活性^[3-6]。黄酮类成分中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩

[收稿日期] 20140720(009)

[第一作者] 李容, 在读硕士, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 15828534682, E-mail: 15828534682@163.com

[通讯作者] * 万丽, 教授, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 15982418713, E-mail: wanli8801@163.com

素和汉黄芩素含量最高且为主要药效成分^[7]。目前黄芩提取工艺研究主要以黄芩苷含量为考察指标^[8-12],未充分考虑其他有效成分的提取效果,难以使黄芩临床疗效达最大化。星点设计-效应面法^[13]集数学和统计学方法于一体,与单因素试验、均匀设计和正交设计相比,具有设计全面、实验精度高、建立的数学模型预测性良好等优势。本实验以黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素提取率的总评“归一值”为评价指标,采用星点设计-效应面法优选黄芩的提取工艺,为该药材的开发提供参考。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(包括 G1311A 型四元泵, G1322A 型真空脱气机, G1316A 型柱温箱, G1315D 型 DAD 紫外检测器, 美国安捷伦公司), BS124S 型 1/1 万和 BP211D 型 1/10 万型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

黄芩药材购自成都荷花池药材市场,经成都中医药大学标本馆卢先明教授鉴定为黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的根;黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号 110715-200815),汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-13052312, MUST-13082206, MUST-13092303),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 25 min, 27% A; 25 ~ 27 min, 27% ~ 43% A; 27 ~ 40 min, 43% ~ 56% A; 40 ~ 45 min, 56% ~ 85% A),检测波长 274 nm,柱温 30 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 283.89, 59.98, 30.12, 9.98 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取黄芩粉末(过 3 号筛)约 0.15 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 30 mL,称定质量,加热回流 2 h,放冷,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 3 mL 稀释于 10 mL 量瓶中,即得。

2.1.4 线性关系考察 取 2.1.2 项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 18, 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的回归方程分别为

$Y = 3\ 767.3X - 279.55 (r = 0.999\ 6)$, $Y = 4\ 301.7X - 62.939 (r = 0.999\ 8)$, $Y = 6\ 157.0X - 31.908 (r = 0.999\ 6)$, $Y = 6\ 937.1X - 19.071 (r = 0.999\ 7)$,线性范围依次为 0.57 ~ 5.68, 0.12 ~ 1.20, 0.06 ~ 0.60, 0.02 ~ 0.20 μg。

2.1.5 精密度试验 取 2.1.2 项下混合对照品溶液 10 μL,按 2.1.1 项下色谱条件重复进样 6 次,计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 0.4%, 0.7%, 1.2%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同批黄芩粉末 6 份,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,计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素平均质量分数分别为 127.01, 28.39, 8.41, 2.70 mg · g⁻¹,RSD 分别为 0.4%, 1.0%, 1.8%, 1.8%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 10, 24 h 按 2.1.1 项下条件测定,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量的 RSD 分别为 1.6%, 2.0%, 1.9%, 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 加样回收试验 精密称取黄芩粉末约 0.075 g,共 6 份,各加入对照品黄芩苷 9.009 mg,汉黄芩苷 2.022 mg,黄芩素 0.651 mg 和汉黄芩素 0.220 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,计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的平均回收率分别为 96.59%, 97.41%, 98.70%, 97.03%, RSD 分别为 0.9%, 1.9%, 2.4%, 1.9%,表明该方法回收率良好。

2.2 单因素试验 精密称取黄芩粉末(过 2 号筛)20 g(n = 2),比较水煎煮法和乙醇回流法 2 种提取方式的差异性,结果显示以乙醇回流法效果较好。考察乙醇体积分数(20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%)、溶媒用量(6, 8, 10, 12, 14 倍)、提取时间(30, 60, 90, 120, 150, 180 min)及提取数(1, 2, 3 次)对黄芩中 4 种黄酮类成分提取率的影响,确定选择乙醇体积分数 30% ~ 70%,溶媒用量 6 ~ 14 倍,提取时间 60 ~ 180 min。由于提取次数为非连续变量,二项式回归处理较为困难,同时考虑提取效果和工业生产成本,设定提取数为 2 次。

2.3 星点试验 根据星点设计原理,选择乙醇体积分数、溶媒用量及提取时间为考察因素,称取黄芩粉末 20 g,以黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素提取率的总评“归一值”(overall desirability, OD)为指标,试验安排及结果见表 1。

表 1 黄芩提取工艺星点试验分析

Table 1 Central composite design of extraction process of Scutellariae Radix

No.	X_1 乙醇体积 分数/%	X_2 溶媒 用量/倍	X_3 提取 时间/min	黄芩苷 /%	汉黄芩苷 /%	黄芩素 /%	汉黄芩素 /%	OD
1	38.45	7.69	85	11.35	2.55	0.40	0.17	0
2	61.55	7.69	85	11.49	2.59	0.57	0.22	0.37
3	38.45	12.31	85	11.69	2.61	0.52	0.19	0.34
4	61.55	12.31	85	12.31	2.73	0.58	0.23	0.66
5	38.45	7.69	155	11.16	2.48	0.51	0.18	0
6	61.55	7.69	155	11.36	2.48	0.58	0.21	0
7	38.45	12.31	155	12.17	2.73	0.54	0.22	0.58
8	61.55	12.31	155	12.50	2.75	0.62	0.23	0.74
9	30.00	10.00	120	11.46	2.61	0.52	0.16	0
10	70.00	10.00	120	11.75	2.64	0.63	0.23	0.53
11	50.00	6.00	120	11.41	2.83	0.46	0.25	0.40
12	50.00	14.00	120	12.42	2.72	0.62	0.21	0.65
13	50.00	10.00	60	12.17	2.70	0.50	0.21	0.49
14	50.00	10.00	180	12.40	2.72	0.53	0.21	0.56
15	50.00	10.00	120	12.09	2.75	0.83	0.25	0.85
16	50.00	10.00	120	11.72	2.75	0.80	0.25	0.73
17	50.00	10.00	120	11.71	2.70	0.84	0.24	0.69
18	50.00	10.00	120	11.51	2.71	0.85	0.24	0.62
19	50.00	10.00	120	11.63	2.68	0.84	0.25	0.67
20	50.00	10.00	120	11.60	2.76	0.80	0.25	0.70

注:数据采用 Hassan 法归一化,归一值 $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$, $OD = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times d_4)^{1/4}$ 。

2.4 模型拟合及方差分析 利用 Design Expert 8.0.5.0 统计软件,OD(Y) 对各因素进行多元线性回归和二项式方程拟合,得多元线性回归方程 $Y = -0.82 + 0.011X_1 + 0.074X_2 + 1.47 \times 10^{-4} X_3$ ($P = 0.0253, r = 0.6576$),二项式方程 $Y = -5.67 + 0.15X_1 + 0.22X_2 + 0.014X_3 + 5.16 \times 10^{-4} X_1X_2 - 1.66 \times 10^{-4} X_1X_3 + 1.08 \times 10^{-3} X_2X_3 - 1.26 \times 10^{-3} X_1^2 - 0.015X_2^2 - 6.76 \times 10^{-5} X_3^2$ ($P = 0.0018, r = 0.9353$),说明采用二项式方程拟合较好,可信度较大,对结果的模拟优化效果较好。方差分析见表 2。剔除不显著项,简化二项式回归方程为 $Y = -5.67 + 0.15X_1 + 0.22X_2 - 1.26 \times 10^{-3} X_1^2 - 0.015X_2^2 - 6.76 \times 10^{-5} X_3^2$ 。选择的模型非常显著 ($P < 0.01$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),说明未知因素对试验的干扰很小,二项式拟合模型为成功模型。一次项 X_1 和 X_2 对 OD 影响显著。

2.5 工艺优化与预测 固定 3 个自变量之一为中值,以拟合的目标函数为数学模型,应用 Design Expert 8.0.5.0 统计软件绘制因变量三维图,见图 1。结合图像及二项式回归模型预测分析,选择乙醇体积分数 53.83%,溶媒用量 12.31 倍,提取时间

表 2 总评“归一值”方差分析

Table 2 Variance analysis of overall desirability

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	1.27	9	0.14	7.76	0.0018
X_1	0.22	1	0.22	12.25	0.0057
X_2	0.41	1	0.41	22.25	0.0008
X_3	3.63×10^{-4}	1	3.63×10^{-4}	0.020	0.8906
X_1X_2	1.51×10^{-3}	1	1.51×10^{-3}	0.083	0.7792
X_1X_3	0.035	1	0.035	1.93	0.1953
X_2X_3	0.060	1	0.060	3.27	0.1009
X_1^2	0.44	1	0.44	24.32	0.0006
X_2^2	0.10	1	0.10	5.68	0.0383
X_3^2	0.10	1	0.10	5.68	0.0383
残差	0.18	10	0.018		
失拟项	0.15	5	0.030	5.04	0.0503
纯误差	0.030	5	6.04×10^{-3}		
总差	1.46	19			

134.84 min,OD 最大值 0.84。结合实际操作可行性,确定黄芩最优提取工艺为乙醇体积分数 54%,溶媒用量 12 倍,提取数 2 次,提取时间 135 min。称

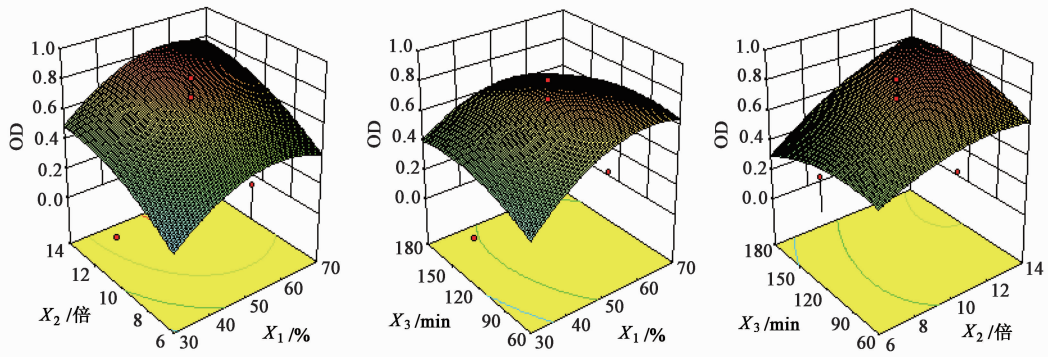


图1 乙醇体积分数、溶媒用量及提取时间相互作用对黄芩提取工艺影响的响应面

Fig. 1 Interaction among ethanol concentration, solvent dosage and extracting time on response surface of extraction process of Scutellariae Radix

取黄芩粉末 20 g,共 3 份,按最优工艺参数进行验证试验,结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素平均提取率分别为 12.53%,2.77%,0.66%,0.25%,RSD 依次为 0.4%,0.4%,0.9%,2.3%,计算 OD 0.83,与预测值的偏差 -1.19%,说明优选的提取工艺准确可靠。

3 讨论

乙醇回流法优于水煎煮法主要是因为黄芩苷及苷元在水中溶解度较在乙醇溶液中低,但水煎煮法使用仍普遍,因为成本较低且易操作。在单因素试验基础上,通过星点设计-效应面法优选黄芩中 4 种黄酮类成分的提取工艺,不仅考察了单一变量对提取效果的影响,还通过非线性数学模型拟合,预测分析试验,结果准确可靠。试验发现各因素与因变量在一定范围内呈正相关,超过一定范围则呈负相关;随着回流时间延长,黄芩苷含量有所降低,原因可能为加热时间过长,黄芩苷分解,这与文献报道一致^[14]。黄芩为临床常用大宗药材之一,但多数成方制剂中黄芩 TLC 只以黄芩苷作为对照,不符合中药多成分质量控制的发展趋势。利用星点设计-效应面法优选黄芩的提取工艺虽有报道^[15],但试验结果指标(黄芩苷提取率)单一,且 4 种成分理化性质差异,以 4 个成分的提取率分别作为考察指标,难以得到一致的结果,采用总评归一值进行优选效果良好。

[参考文献]

[1] 李子,郝近大. 黄芩本草考证[J]. 中药材,2008,31(10):1584-1585.
[2] 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,2010:282-283.

[3] 康辉,李强,王丽. 黄芩提取物、黄芩苷抗氧化和保肝作用研究[J]. 中医研究,2010,23(4):27-30.
[4] 杨凌,崔晓燕,张许. 黄芩提取物的抗炎免疫作用研究[J]. 中国药房,2007,18(24):1856-1858.
[5] 刘通,李文华,周旋,等. 黄芩提取物抑制金黄色葡萄球菌 α -溶血素溶血活性的研究[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(10):809-812.
[6] 李世武,陈瑶. 黄芩提取物及黄酮类化合物对肺癌作用机制的研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2014,7(12):172-174.
[7] 周锡钦,张庆英,梁鸿,等. 黄芩中主要黄酮类成分的含量分析[J]. 中国中药杂志,2009,34(22):20-25.
[8] 潘五九,肖雪,孟庆杰,等. 正交试验法优选安脑分散片黄芩提取工艺的研究[J]. 黑龙江中医药,2013,42(3):60-61.
[9] 宋承富,叶萍. 黄芩提取物工艺研究[J]. 中华中医药学刊,2011,29(3):641-644.
[10] 杨宏静. 黄芩乙醇回流提取工艺研究[J]. 实用中医药杂志,2013,29(6):492-493.
[11] 赵益霞. 优选黄芩提取工艺[J]. 黑龙江医药,2013,26(4):620-622.
[12] 于千,张杨. 正交设计法对黄芩提取工艺的研究[J]. 沈阳医学院学报,2011,13(3):171-172.
[13] 邱宏聪,刘布鸣. 星点设计-效应面法优选岗松总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):46-49.
[14] 史亚军,郭琳,杨明. 不同黄芩提取物制备工艺研究[J]. 陕西中医学院学报,2013,36(6):110-113.
[15] 蒋荣珍,欧阳小光,黄斌,等. 星点设计-效应面法优选黄芩提取工艺的研究[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(增刊):33-34.

[责任编辑 刘德文]