

## Box-Behnken 效应面法优化菊花提取工艺

张建萍\*

(郑州市骨科医院, 郑州 450052)

**[摘要]** 目的: 优选菊花的提取工艺条件。方法: 选择提取时间、乙醇体积分数、加醇量为自变量, 木犀草素、芹菜素、绿原酸得率的总评“归一值”为因变量, 采用 Box-Behnken 效应面法优选菊花的醇提工艺并对该工艺进行预测分析。结果: 最佳提取工艺为加 12 倍量 80% 乙醇提取 110 min; 木犀草素、芹菜素、绿原酸平均得率分别为 1.64%、0.94%、3.95%, 实测 OD = 0.979 6 (RSD 1.83%), 与预测值(0.981 6)的偏差 0.204%。结论: 优选的提取工艺稳定可行且可预测性强。

**[关键词]** 菊花; 木犀草素; 芹菜素; 绿原酸; Box-Behnken 效应面设计法

**[中图分类号]** R284.2; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0036-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080036

## Optimization of Extraction Process of Chrysanthemi Flos by Box-Behnken Response Surface Methodology

ZHANG Jian-ping\*

(Zhengzhou Orthopaedics Hospital, Zhengzhou 450052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of Chrysanthemi Flos. **Method:** Based on single factor test, taking extracting time, ethanol concentration and amount as independent variables, overall desirability (OD) of yield of luteolin, apigenin and chlorogenic acid as dependent variable, Box-Behnken response surface methodology was applied to optimize extraction conditions. **Result:** Optional extraction process was as follows: extracted 110 min with 12 times the amount of 80% ethanol; Average yields of luteolin, apigenin and chlorogenic acid were 1.64%, 0.94% and 3.95%, respectively, deviation between the measured value (0.979 6) and the predicted value (0.981 6) of OD was 0.204%. **Conclusion:** This optimized extraction technology was simple and reliable with high predictability.

**[Key words]** Chrysanthemi Flos; luteolin; apigenin; chlorogenic acid; Box-Behnken response surface methodology

**[收稿日期]** 20131013(002)

**[基金项目]** 济南军区后勤科研计划项目(CJN10L067)

**[通讯作者]** \* 张建萍, 副主任中医师, 从事临床中药学和制剂研究, Tel: 15037180772, E-mail: zjp0507@126.com

- [2] 张红, 孙明江, 王凌. 枳实的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(11): 1787.
- [3] 朱玲, 杨峰, 唐德才. 枳实的药理研究进展[J]. 中医药学报, 2004, 32(2): 64.
- [4] 景怡, 景荣琴, 任远, 等. AB-8 大孔吸附树脂分离纯化玉米须中总黄酮的研究[J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 75.
- [5] 程文明, 张明, 李俊, 等. 大孔树脂纯化野菊花总黄酮的工艺研究[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1508.
- [6] 谢燕贤. 大孔树脂分离纯化苦参总黄酮提取工艺研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(6): 528.
- [7] 黄爱华, 陈海丰, 曾元儿. 不同规格枳实中柚皮苷的含量考察[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(2): 130.

[责任编辑 仝燕]

菊花功效疏风、清热、明目、解毒,现代药理学研究表明其具有治疗冠心病、降血压、抗病毒等生理活性<sup>[1]</sup>,主要化学成分包括黄酮类、挥发油、绿原酸等,其中黄酮类化合物木犀草素具有血管舒张作用,并能减轻氧化应激引起的血管内皮损伤;芹菜素对多种肿瘤细胞具有抑制生长、诱导凋亡的作用且毒副作用较小,在体外具有抗过敏及抗氧化保护辐射损伤等作用<sup>[2]</sup>,这2种成分均为口服菊花提取物的主要效应成分。绿原酸已被证实具有抗菌和抗炎作用,2010年版《中国药典》中将其作为菊花质量评价的指标性成分。考虑到菊花苷类成分在体内易代谢为苷元<sup>[3]</sup>,故在含量测定时选择木犀草素和芹菜素为指标成分,以芹菜素、绿原酸及木犀草素得率的总评“归一值”为考察指标,采用 Box-Behnken 效应面法优选菊花的醇提工艺。

## 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BS201 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。菊花药材购自安徽亳州药材市场,经河南中医药大学第一附属医院李学林主任中药师鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序;绿原酸、木犀草素、芹菜素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 10753-200413,111720-200603,110739-200309),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

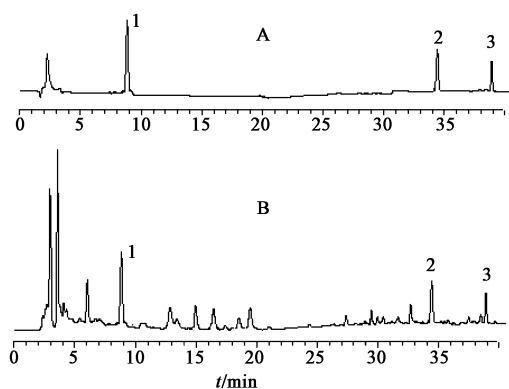
**2.1 色谱条件** Shim-Pack VP-ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水(B)梯度洗脱(0~10 min, 30% A; 10~50 min, 30%~75% A),进样量 10 μL,检测波长 332 nm,柱温 30 ℃。理论塔板数均 > 3 000,见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 依次精密称定木犀草素、芹菜素、绿原酸对照品 7.84, 4.92, 15.69 mg,置于同一 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取菊花粉末(过 1 号筛)1.0 g,置于 50 mL 量瓶中,加适量甲醇超声提取 15 min,放冷至室温,加甲醇定容,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性范围考察** 分别精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 2, 10, 12, 14 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得



A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 木犀草素; 3. 芹菜素

图 1 菊花提取液 HPLC

木犀草素、芹菜素及绿原酸回归方程依次为  $Y = 1.28 \times 10^5 X - 329$  ( $r = 0.999\ 8$ ),  $Y = 7.16 \times 10^4 X + 12.59$  ( $r = 0.999\ 9$ ),  $Y = 6.89 \times 10^5 X - 593.4$  ( $r = 0.999\ 6$ ), 线性范围依次为 0.627 2~4.390 4, 0.393 6~2.755 2, 1.095 2~7.666 4 μg。

**2.4.2 精密度试验** 取 2.2 项下混合对照品溶液,连续进样 6 次,每次 5 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,结果木犀草素、芹菜素、绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.09%, 0.59%, 1.17%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 精密吸取 2.3 项下供试品溶液 5 μL,分别于 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 按 2.1 项下色谱条件测定,计算木犀草素、芹菜素、绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.68%, 1.10%, 2.59%,说明供试品溶液在 36 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 取同批菊花药材,按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算木犀草素、芹菜素、绿原酸质量分数分别为 1.84%, 1.26%, 2.27%,说明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 取菊花药材 0.2 g,共 6 份,分别置于 50 mL 量瓶中,分别精密加入混合对照品溶液 5 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,计算各成分回收率,结果见表 1。

### 2.5 提取工艺优选

**2.5.1 Box-Behnken 试验安排<sup>[4-5]</sup>** 将提取数作为固定变量(2 次),结合试验设计特点,选择加醇量(8~15 倍)、提取时间(30~150 min)、乙醇体积分数(55%~95%)为自变量,木犀草素、芹菜素、绿原酸得率为考察指标,将各指标“归一值”求算几何平均值,采用 Hasson 法计算总评“归一值”(OD),试验安排及结果见表 2。

表 1 菊花提取物中 3 种成分的加样回收率试验

成分	No.	样品中	加入量	测得量	回收率	平均值	RSD
		质量					
		/mg	/mg	/mg	/%	/%	/%
木犀草素	1	3.68	1.568	5.21	97.58	96.41	1.59
	2	3.72		5.23	96.30		
	3	3.64		5.19	98.85		
	4	3.58		5.08	95.66		
	5	3.62		5.11	95.03		
	6	3.6		5.09	95.03		
芹菜素	1	2.52	0.984	3.47	96.54	95.87	0.55
	2	2.45		3.39	95.53		
	3	2.49		3.43	95.53		
	4	2.53		3.47	95.53		
	5	2.52		3.47	96.54		
	6	2.47		3.41	95.53		
绿原酸	1	4.54	2.738	7.15	95.33	95.81	0.57
	2	4.6		7.21	95.33		
	3	4.59		7.22	96.06		
	4	4.55		7.17	95.69		
	5	4.62		7.27	96.79		
	6	4.61		7.23	95.69		

$$d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min}); d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min}); OD = (d_1 d_2 d_3 \cdots d_n)^{1/n}$$

2.5.2 模型拟合 采用 Design-Expert7.0 数据处理系统对试验数据进行分析,结果发现采用多元线性回归时各指标拟合方程置信度  $P > 0.05$ ,无统计学意义;而采用二次多项式拟合时各指标数据拟合程度较好,拟合方程数据参数分析见表 3,4,拟合方程为  $Y_1 = -5.72 + 0.50X_1 + 0.02X_2 + 0.09X_3 - 0.0004X_1X_2 + 0.02X_1X_3 + 0.00006X_2X_3 - 0.02X_1^2 - 0.00007X_2^2 - 0.0007X_3^2$ ;  $Y_2 = -3.21 + 0.15X_1 + 0.001X_2 + 0.08X_3 - 0.00006X_1X_2 + 0.0001X_1X_3 + 0.00006X_2X_3 - 0.005X_1^2 - 0.00002X_2^2 - 0.0005X_3^2$ ;  $Y_3 = -11.73 + 0.15X_1 + 1.70X_2 + 0.02X_3 - 0.002X_1X_2 - 0.001X_1X_3 + 0.0002X_2X_3 - 0.07X_1^2 - 0.0002X_2^2 - 0.0007X_3^2$ 。

由表 3 可知,各因变量回归方程拟合系数均较高,说明各方程对试验数据的拟合程度较高,对模型的预测性较好,其中  $Y_1$  和  $Y_3$  拟合程度要高于  $Y_2$ ,这与模型方程显著性统计结果相一致。由表 4 可知,各自变量对不同指标反映出不同的显著强度,即 3 个自变量对木犀草素得率具有显著关联,绿原酸与自变量  $X_1, X_2$  具有显著性关联,而芹菜素与自变量  $X_2, X_3$  存在显著性关联;各自变量交互作用的试验

表 2 菊花提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	$X_1$ 加醇量/倍	$X_2$ 提取时间/min	$X_3$ 乙醇体积 分数/%	木犀草素得率 ( $Y_1$ )/%	芹菜素得率 ( $Y_2$ )/%	绿原酸得率 ( $Y_3$ )/%	OD
1	8	30	75	0.65	0.69	0.64	0
2	15	30	75	1.09	0.72	0.79	0.320
3	8	150	75	1.21	0.84	0.98	0.501
4	15	150	75	1.33	0.82	1.78	0.785
5	8	90	55	0.88	0.38	1.10	0
6	15	90	55	0.93	0.65	1.44	0.442
7	8	90	95	0.92	0.62	1.36	0.404
8	15	90	95	1.41	0.86	1.53	0.773
9	11.5	30	55	0.98	0.56	1.39	0.399
10	11.5	150	55	1.15	0.61	1.33	0.482
11	11.5	30	95	0.84	0.51	1.15	0.261
12	11.5	150	95	1.31	0.83	1.53	0.720
13	11.5	90	75	1.65	0.92	1.92	0.994
14	11.5	90	75	1.59	0.9	1.95	0.967
15	11.5	90	75	1.61	0.91	1.94	0.979
16	11.5	90	75	1.63	0.89	1.93	0.970
17	11.5	90	75	1.58	0.86	1.91	0.930

数据显示只有  $X_1$  和  $X_3$  的交互作用对木犀草素得率具有显著性影响,其他因变量对各自变量的交互作用均无显著性关联;各自变量表现的显著性程度存

在较大差别,各自变量的二次项均对木犀草素得率具有显著性影响, $X_3^2$  对芹菜素得率和  $X_1^2, X_2^2$  对绿原酸得率的影响均具有统计学意义。

表 3 菊花提取工艺中各指标回归方程可信度分析

评价指标	变异系数/%	拟合系数	校正拟合系数	预测拟合系数	信噪比
木犀草素得率	6.02	0.977 3	0.948 2	0.665 7	16.674
芹菜素得率	10.84	0.892 9	0.755 2	-0.640 7	6.832
绿原酸得率	10.88	0.938 6	0.859 5	0.021 1	9.188

表 4 菊花提取工艺中各评价指标方差分析

方差来源	木犀草素			芹菜素			绿原酸		
	SS	MS	P	SS	MS	P	SS	MS	P
模型	1.628 6	0.181 0	<0.01	0.374 9	0.041 7	0.011	10.633 0	1.181 4	0.002
$X_1$	0.151 3	0.151 3	0.001	0.033 8	0.033 8	0.056	1.087 8	1.087 8	0.013
$X_2$	0.259 2	0.259 2	0.000	0.048 1	0.048 1	0.029	1.361 3	1.361 3	0.008
$X_3$	0.036 5	0.036 5	0.036	0.048 1	0.048 1	0.029	0.046 5	0.046 5	0.516
$X_1X_2$	0.025 6	0.025 6	0.066	0.000 6	0.000 6	0.764	0.416 0	0.416 0	0.080
$X_1X_3$	0.048 4	0.048 4	0.020	0.000 2	0.000 2	0.857	0.028 9	0.028 9	0.607
$X_2X_3$	0.022 5	0.022 5	0.081	0.018 2	0.018 2	0.136	0.198 0	0.198 0	0.201
$X_1^2$	0.350 5	0.350 5	<0.01	0.017 4	0.017 4	0.144	3.209 0	3.209 0	0.001
$X_2^2$	0.270 6	0.270 6	0.000	0.017 4	0.017 4	0.144	3.338 9	3.338 9	0.001
$X_3^2$	0.350 5	0.350 5	<0.01	0.175 7	0.175 7	0.001	0.313 8	0.313 8	0.119
残差	0.037 8	0.005 4		0.045 0	0.006 4		0.696 1	0.099 4	
失拟项	0.034 5	0.011 5	0.014	0.042 9	0.014 3	0.004	0.692 8	0.230 9	<0.01
纯误差	0.003 3	0.000 8		0.002 1	0.000 5		0.003 3	0.000 8	
总离差	1.666 4			0.419 9			11.329 1		

**2.5.3 工艺参数的优化** 将上述二次多项式模型和试验参数分别绘制成三角能级图及等高线(各因素水平及指标成分进行标准化转换),优选 3 个自变量的最佳取值范围,结果见图 2~7。初步得到最佳提取工艺为加 12.5 倍量 79.79% 乙醇提取 113.32 min,此时预测木犀草素、芹菜素、绿原酸得率分别为 1.66%, 0.94%, 3.97%, OD=0.981 6;结合实际生产情况,确定最佳工艺参数为加 12 倍量 80% 乙醇提取 110 min。根据最佳参数进行 3 次验证试验,结果木犀草素得率分别为 1.64%, 1.66%, 1.63%, 芹菜素得率依次为 0.94%, 0.96%, 0.92%, 绿原酸得率分别为 3.98%, 3.95%, 3.93%, 实测 OD=0.979 6(RSD 1.83%),与预测值的偏差 0.204%,说明优选的提取工艺稳定可行且预测性良好。

**3 讨论**

绿原酸为 3-咖啡酰奎宁酸,含有羧基和酯键,

极性偏大,稳定性较差,在含水溶剂中容易受温度、酸碱度、光照影响而发生异构化和酯键断裂,生产新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、奎宁酸,故测定绿原酸含量时应操作仔细。

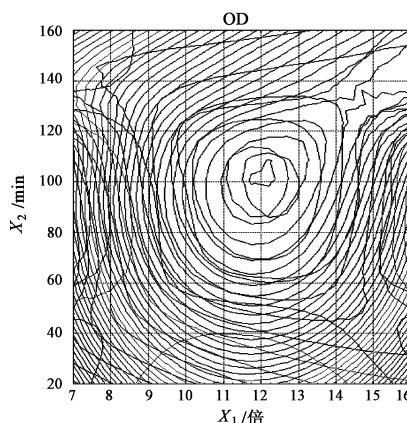


图 2 加醇量和提取时间对菊花提取工艺影响的等高线

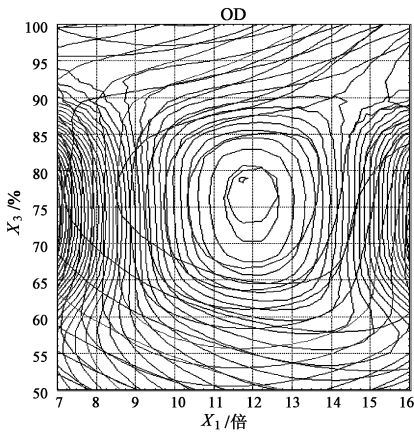


图 3 加醇量和乙醇体积分数对菊花提取工艺影响的等高线

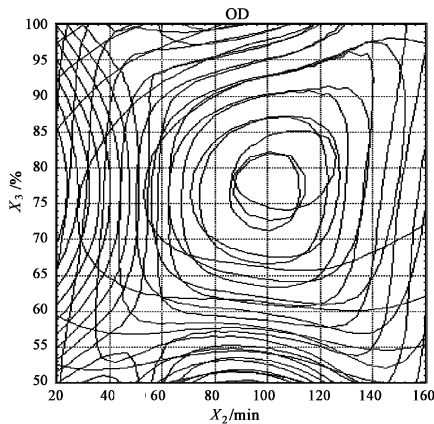


图 4 乙醇体积分数和提取时间对菊花提取工艺影响的等高线

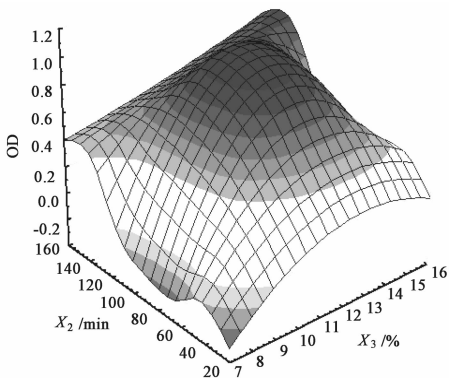


图 5 加醇量和提取时间对菊花提取工艺影响的效应面

曾采用甲醇-磷酸盐缓冲液、乙腈-磷酸缓冲盐、甲醇-水等流动相系统,经比较采用甲醇-磷酸梯度洗脱系统时色谱参数较好,3 个指标性成分能够实现完整分离,出峰时间理想,各色谱峰分离度较好,同时降低了流动相系统对液相管路及色谱柱的损害,极大地延长了色谱柱的使用寿命。木犀草素、芹

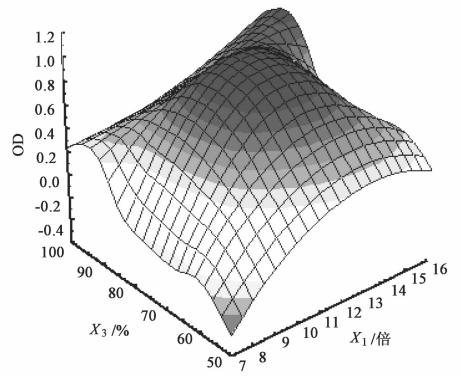


图 6 加醇量和乙醇体积分数对菊花提取工艺影响的效应面

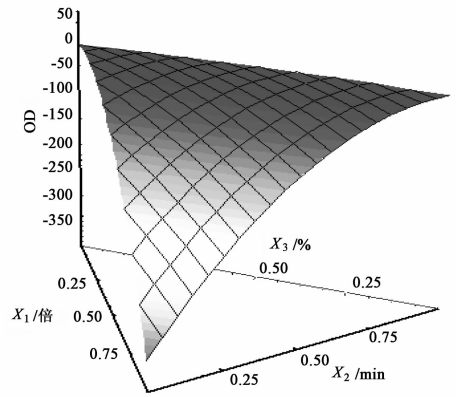


图 7 乙醇体积分数、提取时间及加醇量对菊花提取工艺影响的效应面

菜素、绿原酸的最大吸收波长分别为 324, 349, 332 nm,因为芹菜素含量相对较低,故选择 332 nm 为检测波长,此时各色谱峰分离度良好,出峰较多,基线稳定,适合色谱定量分析。

[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,2010:292.

[2] 吴金爽,吴德玲,俞年军,等. RP-HPLC 法同时测定毫菊总黄酮中 3 种黄酮类成分[J]. 中成药,2013,35(4):774.

[3] 李丽萍,蒋慧娣. 肠道菌群对菊花提取物的代谢作用[J]. 中草药,2006,37(7):1001.

[4] 孙英英,崔永霞,刘伟. HPLC 对不同品种菊花中绿原酸含量的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):83.

[5] 郭巧生,汪涛,程俐陶,等. 不同栽培类型药用菊花黄酮类成分比较研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(7):756.

[责任编辑 仝燕]