

星点设计-效应面法优化龙须藤提取工艺

赵永恒, 周毅生*, 王嵩, 林丽微
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 优选龙须藤的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、液料比、提取时间为自变量, 浸膏得率、3', 4', 5', 5, 7-五甲氧基黄酮(黄酮1)和3', 4'-亚甲二氧基-5', 5, 6, 7-四甲氧基黄酮(黄酮2)含量的总评“归一值”为因变量, 通过 Design-Expert 7.0.0 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 测定黄酮1 和 黄酮2 含量, 色谱条件为流动相乙腈(A)-水(B)洗脱梯度(0~20 min, 30%~40% A; 20~36 min, 40%~48% A), 检测波长 324 nm。结果: 二项式拟合的复合相关系数较高, 总评“归一值”达 0.995 6; 最佳提取工艺为加 14 倍量 45% 乙醇提取 2 次, 每次 116 min; 黄酮1 和 黄酮2 的质量分数依次为 0.046%, 0.027%, 浸膏得率 21.21%。结论: 利用星点设计-效应面法优化的龙须藤提取工艺稳定简便, 具有良好的预测性。

[关键词] 龙须藤; 提取工艺; 星点设计-效应面法; 浸膏得率; 3', 4', 5', 5, 7-五甲氧基黄酮; 3', 4'-亚甲二氧基-5', 5, 6, 7-四甲氧基黄酮

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0036-04

[doi] 10.11653/syfy2014060036

Optimization of Extraction Technology for *Bauhinia championi* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHAO Yong-heng, ZHOU Yi-sheng*, WANG Song, LIN Li-wei
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of *Bauhinia championi*. **Method:** Taking ethanol concentration, ratio of material to liquid and reflux time as independent variables, overall desirability of dry extract yield, contents of 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxyflavone (flavonoids 1) and 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxyflavone (flavonoids 2) as dependent variable, data of overall desirabilities were fitted to a second-order polynomial equation and regressed by multiple linear, response surface methodology was used to optimize extraction technology and predictive analyze. HPLC was adopted to determine contents of flavonoids 1 and flavonoids 2 with mobile phase of acetonitrile (A) -water (B) gradient elution (0-20 min, 30%-40% A; 20-36 min, 40%-48% A) and detection wavelength of 324 nm. **Result:** Complex correlation coefficient of binomial fitting was higher with overall desirability of 0.995 6; Optimal extraction technology was as following: extracted 2 times with 14-fold the amount of 45% ethanol, 116 min per time; The mass fractions of flavonoids 1 and flavonoids 2 were 0.046% and 0.027%, dry extract yield was 21.21%. **Conclusion:** Central composite design-response surface methodology was convenient and highly predictive for optimizing extraction technology of *B. championi*.

[Key words] *Bauhinia championi*; extraction technology; central composite design-response surface methodology; dry extract yield; 3', 4', 5', 5, 7-pentamethoxyflavone; 3', 4'-methylenedioxy-5', 5, 6, 7-tetramethoxyflavone

[收稿日期] 20130713(004)

[基金项目] 赵永恒, 硕士, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:13751764885, E-mail:yonghengzhao@126.com

[通讯作者] * 周毅生, 教授, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:020-39352168, E-mail:yishzhou@aliyun.com

龙须藤别名九龙藤^[1]、蝴蝶藤等,性平,味苦辛,无毒,具有祛风除湿、活血止痛、健脾理气的功效,临床用于治疗风湿性关节炎、腰腿疼、跌打损伤、胃痛、小儿疳积等症^[2],主要含有黄酮类、原花青素类、糖类、挥发油及没食子酸等成分^[3-6]。现代药理研究表明黄酮类化合物具有较强的镇痛抗炎^[7-9]、抗血小板凝集^[10]等活性。前期研究证实3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮和3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮具有较好的抗炎镇痛作用,故本实验选择二者提取率和浸膏得率为综合评价指标,采用星点设计-效应面法优化龙须藤的提取工艺,为龙须藤的合理利用与制剂开发提供参考。

1 材料

2695-2996型高效液相色谱仪(美国Waters公司),AY120型电子天平(日本岛津),LG-04型中药粉碎机(瑞安市百信药器械厂),GZX-9240型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

龙须藤药材购于广东清平药材市场,经广东药学院生药教研室李书渊教授鉴定为豆科羊蹄甲属植物龙须藤 *Bauhinia championi* (Benth.) Benth. 的干燥藤茎;3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮和3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮对照品(自制,面积归一化法计算纯度均为98.0%),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 2种黄酮类成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)洗脱梯度(0 ~ 20 min, 30% ~ 40% A; 20 ~ 36 min, 40% ~ 48% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 324 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮(黄酮1)11.16 mg和3',4'-亚甲二氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮(黄酮2)9.84 mg,分别加甲醇定容至10 mL量瓶中。精密量取前者3 mL和后者1.5 mL置于100 mL量瓶中,加甲醇定容,制成33.48,14.76 mg · L⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 龙须藤浸膏的制备 称取龙须藤药材适量,置圆底烧瓶中,加入一定体积分数乙醇回流提取一定时间,过滤,减压回收乙醇,于105 °C干燥至恒重,即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取龙须藤浸膏0.5 g置于50 mL量瓶中,加适量甲醇超声溶解并定

容至刻度,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.5 线性关系的考察 精密量取混合对照品溶液2,5,10,15,20,25 μL,分别按2.1.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得黄酮1和黄酮2的回归方程依次为 $Y = 3\ 184.5X - 99\ 744$ ($R^2 = 0.999\ 9$), $Y = 3\ 521.2X - 23\ 071$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围分别为66.96 ~ 837,29.52 ~ 369 ng。

2.1.6 精密度试验 取混合对照品溶液10 μL,按2.1.1项下色谱条件重复进样6次,结果黄酮1和黄酮2峰面积的RSD分别为0.95%,2.28%,表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液,分别于制备后0,4,8,12,16,24 h按2.1.1项下色谱条件测定,结果黄酮1和黄酮2峰面积的RSD分别为1.70%,2.40%,表明供试品溶液于24 h内基本稳定。

2.1.8 重复性试验 取同一样品,按2.1.4项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,结果黄酮1和黄酮2峰面积的RSD分别为2.06%,1.93%,表明该方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 分别精密称取同一批龙须藤浸膏0.20,0.25,0.30 g,各3份,精确加入与药材中质量相同的黄酮1和黄酮2对照品,按2.1.4项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件测定,结果平均加样回收率分别为100.18% (RSD 2.06%),99.62% (RSD 1.91%)。

2.2 提取工艺优选

2.2.1 星点试验设计 提取次数为非连续变量,单因素试验发现黄酮1和黄酮2提取2次的提取率分别占总提取率的95.38%,95.50%,从节约成本及生产实际考虑,确定提取数为2次。选择乙醇体积分数、液料比、提取时间为自变量,以黄酮1和黄酮2质量分数、浸膏得率为综合评价指标,数据处理采用“归一化法”,利用Hassan法^[11]分别对各考察指标进行数学转换求“归一值” d_{\min} 和 d_{\max} ,计算公式为 $d_{\min} = (Y_{\max} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$, $d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$,计算各指标的 d 值后,对各指标“归一值”进行处理,得“总评归一值(OD)”,计算公式为 $OD = (d_1 \cdot d_2 \cdots d_n)^{1/n}$, n 为指标数。根据星点设计原理安排试验,因素水平见表1,试验安排及结果见表2。

2.2.2 模型拟合及方差分析 以OD为因变量,使

用 Design-Expert 7.0.0 软件对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,拟合得多元线性回归方程 $Y = 1.034 - 0.01993X_1 + 0.03955X_2 + 0.001970X_3$ ($r = 0.6964, P = 0.0122$), 相关系数过小且 P 值不显著, 不能通过检验, 模型拟合度不高, 预测性较差; 二项式拟合模型为 $Y = -0.330 + 2.640X_1 + 0.055X_2 + 0.004515X_3 + 0.021X_1X_2 + 0.032X_1X_3 + 0.001317X_2X_3 - 7.243X_1^2 - 0.007780X_2^2 - 0.000156X_3^2$ ($r = 0.9859, P < 0.0001$), 方程显著, 具有较高的可信度, 可用此模型对龙须藤的提取工

艺进行分析和预测, 除交互项 X_1X_2 不显著外, 其余各项均具有显著性, 说明各自变量对响应值的影响不是简单的线性关系。

表 1 龙须藤提取工艺星点试验因素水平

水平	X_1 乙醇体积分数/%	X_2 液料比/倍	X_3 提取时间/min
-1.682	40	6	60
-1	48.11	8.43	84.32
0	60	12	120
1	71.89	15.57	155.68
1.682	80	18	180

表 2 龙须藤提取工艺星点试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	黄酮 1/%	黄酮 2/%	浸膏得率/%	OD
1	-1	-1	-1	0.047	0.023	20.283	0.813
2	1	-1	-1	0.031	0.019	17.753	0.073
3	-1	1	-1	0.047	0.023	20.033	0.777
4	1	1	-1	0.036	0.018	18.835	0.000
5	-1	-1	1	0.038	0.019	20.188	0.275
6	1	-1	1	0.031	0.019	18.135	0.000
7	-1	1	1	0.043	0.025	20.510	0.837
8	1	1	1	0.041	0.023	20.098	0.670
9	-1.682	0	0	0.046	0.023	21.323	0.900
10	1.682	0	0	0.039	0.021	17.648	0.140
11	0	-1.682	0	0.038	0.021	18.145	0.291
12	0	1.682	0	0.045	0.023	20.353	0.769
13	0	0	-1.682	0.035	0.021	17.603	0.000
14	0	0	1.682	0.038	0.021	20.413	0.499
15~20	0	0	0	0.046	0.022	20.948	0.822

注: 15~20 号为重复试验, 该行数据均为平均值。

2.2.3 工艺参数优化和预测 根据回归方程作相应曲面图(图 1~3), 根据拟合的响应曲面形状, 分析各自变量对龙须藤中黄酮 1 和黄酮 2 含量的影

响, 基于已建立的数学模型, 得最佳提取条件为加 14 倍量 45% 乙醇提取 2 次, 每次 116 min。

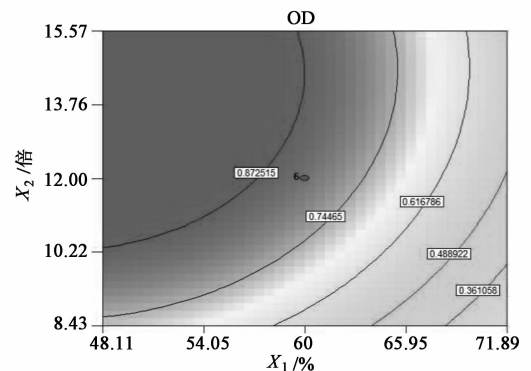
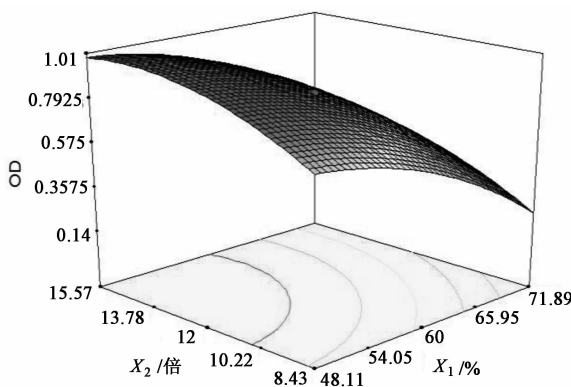


图 1 乙醇体积分数、液料比及其相互作用对龙须藤提取工艺影响的响应面和等高线

2.2.4 验证试验 称取龙须藤药材约 20 g, 共 3 份, 按最佳工艺条件进行 3 次验证试验, 结果黄酮 1 和黄酮 2 的质量分数依次为 0.046%, 0.027%, 浸

膏得率 21.21%, OD 实测值 0.9696, 与预测值 (0.9956) 的偏差率仅 3.02%^[12], 说明建立的数学模型可靠, 具有良好的预测性。

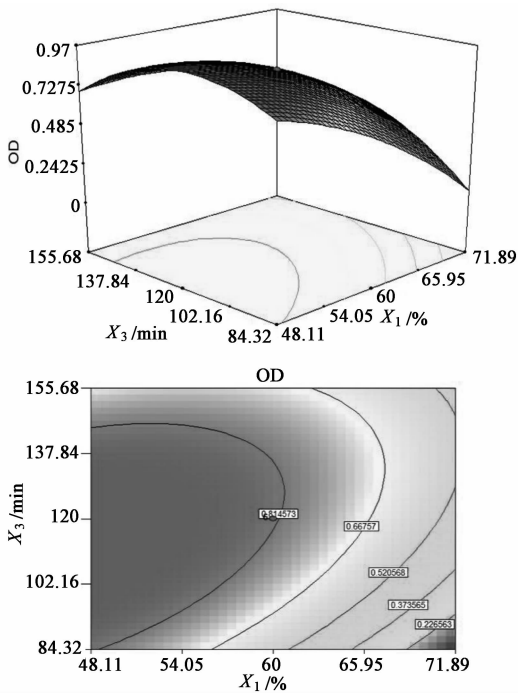


图2 乙醇体积分数、提取时间及其相互作用对龙须藤提取工艺影响的响应面和等高线

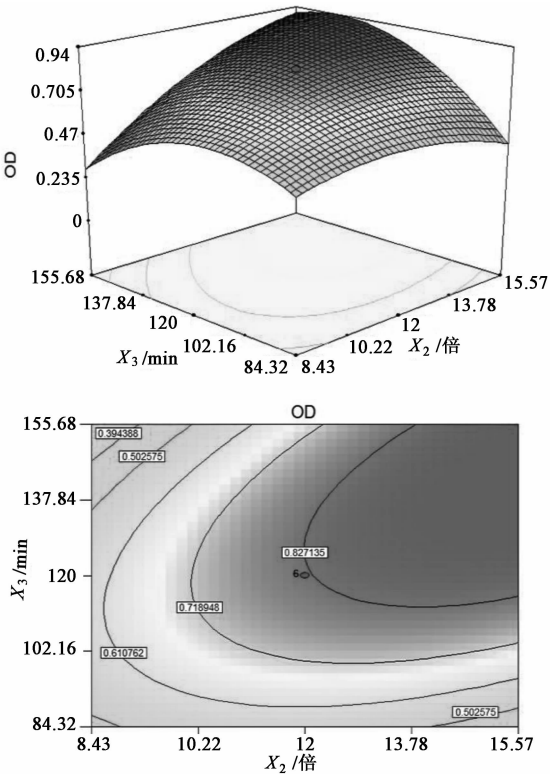


图3 液料比、提取时间及其相互作用对龙须藤提取工艺影响的响应面和等高线

3 讨论

龙须藤制剂为闽南验方,临床证实其具有较好的抗炎、镇痛作用^[13],目前关于其提取工艺的报道

较少。与正交试验和均匀设计相比,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。前期研究已从龙须藤中分离得到了3',4',5',5,7-五甲氧基黄酮和3',4'-亚二甲氧基-5',5,6,7-四甲氧基黄酮,通过药效学试验证实二者均具有较好的抗炎、镇痛作用,目前尚无二者含量测定的报道,本文采用HPLC测定二者含量,建立的方法简便、准确。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第4册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:361.
- [2] 福建省医药研究所. 福建药物志. 第1册[M]. 福州:福建人民出版社,1979:194.
- [3] 白海云,詹庆丰,夏增华,等. 九龙藤化学成分研究(II)[J]. 天然产物研究与开发,2004,16(4):312.
- [4] 徐伟,郑海音,洪振丰. RP-HPLC测定龙须藤中4种黄酮类成分的含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(9):763.
- [5] 叶蕪芝,郑春松,林薇,等. 气相色谱质谱联用技术分析梅花入骨丹挥发油的化学成分[J]. 福建中医学院学报,2009,19(5):20.
- [6] 白海云,詹庆丰,劳爱娜,等. 九龙藤化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志,2005,30(1):42.
- [7] 郑海音,洪振丰,朱洪民,等. 康美肤烧伤膏对烫伤创面IL-6、IL-8表达的影响及疗效观察[J]. 中国医药导报,2008,5(26):40.
- [8] 易荆丽,张嘉家,周毅生,等. 龙须藤提取物的镇痛抗炎作用[J]. 广东药学院学报,2012,28(6):647.
- [9] 高杰,林炜鑫,卢少欢,等. 九龙藤乙酸乙酯提取物清除自由基、镇痛抗炎作用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(36):22305.
- [10] 胡娟,叶蕪芝,冯亚,等. 3种闽产中药体外对大鼠血小板凝集的影响[J]. 福建中医学院学报,2007,17(3):23.
- [11] 吴伟,崔光华,陆彬. 实验设计中多指标的优化:星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药学杂志,2000,35(8):530.
- [12] 孟江,许舒娅,卢国勇,等. 星点设计-效应面法优化姜炭炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):8.
- [13] 洪振丰,郑海音,徐伟,等. 康美肤烧伤膏抗炎、镇痛作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2007,14(6):410.

[责任编辑 仝燕]