

# 星点设计-效应面法优选还阳参总酚酸的提取工艺

彭照琪, 贺石麟, 李小贝, 倪艳\*  
(山西省中医药研究院, 太原 030012)

**[摘要]** 目的: 优选还阳参总酚酸的提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 采用星点设计-效应面法, 选取乙醇体积分数、提取时间和溶剂倍量为自变量, 还阳参总酚酸的提取量为因变量, 对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合, 选择较佳工艺条件, 并进行预测分析。采用紫外分光光度法测定总酚酸含量。结果: 还阳参总酚酸的最佳提取工艺为加 35 倍量 70% 乙醇提取 3 次, 每次 50 min。预测值与理论值的偏差 -2.28%, 二项式拟合复相关系数 0.939 6。结论: 采用星点设计-效应面法优选的提取工艺稳定可行、精密度高、可预测性好, 适用于还阳参总酚酸的提取。

**[关键词]** 还阳参; 单因素试验; 星点设计-效应面法; 总酚酸

**[中图分类号]** R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0020-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013210020

## Optimization of Extraction Technology for Total Phenolic Acids from *Crepis turczaniowii* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

PENG Zhao-qi, HE Shi-lin, LI Xiao-bei, NI Yan\*  
(Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total phenolic acids from *Crepis turczaniowii*. **Method:** Based on single factor tests, central composite design-response surface methodology was adopted to optimize extraction process of total phenolic acids from *C. turczaniowii*, independent variables were ethanol concentration, reflux time and solvent folds, dependent variable was extraction rate of total phenolic acids. Linear or no-linear mathematic models were used to estimate relationship between independent and dependent variables,

**[收稿日期]** 20130410(017)

**[基金项目]** 山西省科技攻关项目(20120313015-1); 太原市科技项目(12024730)

**[第一作者]** 彭照琪, 在读硕士, 从事中药化学研究, Tel:15525078172, E-mail:1608567450@qq.com

**[通讯作者]** \* 倪艳, 学士, 主任药师, 从事中药药效物质基础研究, E-mail:niyan\_01@hotmail.com

- [5] 刘丹, 濮社班, 钱士辉, 等. 中国红参化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4):462.
- [6] 何道同, 王兵, 陈璐明. 人参皂苷药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(7):118.
- [7] 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 20.
- [8] 许勇, 诸艳蓉, 王柯, 等. HPLC 测定复方丹参胶囊中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>e</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub> 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6):148.
- [9] 肖盛元, 罗国安. 红参加工过程中人参皂苷化学反应 HPLC/MS/MS 研究[J]. 中草药, 2005, 36(1):40.
- [10] 李向高, 富力, 鲁歧, 等. 红参炮制加工中的皂苷水解反应及其产物的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(2):1.
- [11] 郑重, 宋凤瑞, 刘淑莹, 等. 人参、红参皂苷类成分指纹图谱研究[J]. 质谱学报, 2012, 33(6):327.
- [12] 林龙飞, 杨培, 闫磊, 等. 人参茎叶水提液中人参皂苷热稳定性研究及其有效期推算[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24):137.

[责任编辑 全燕]

optimum extraction process was optimized, then prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. The content of total phenolic acids was determined by UV. **Result:** Optimum extraction technology conditions were: extracted 3 times with 35 times the amount of 70% ethanol for 55 minutes each time. Regression coefficient of binomial fitting complex model was as high as 0.936 9, bias between the observed and predicted values was -2.28%. **Conclusion:** Optimum extraction process was reasonable, stable and feasible, it was suitable for development and utilization of total phenolic acids from *C. turczaniowii*.

[ **Key words** ] *Crepis turczaniowii*; single factor test; central composite design-response surface methodology; total phenolic acids

还阳参别名屠还阳参、驴打滚儿草,味苦,性微寒,具有益气、止咳平喘、清热降火之功效<sup>[1-3]</sup>,主要含有酚酸类(咖啡酸、绿原酸)、甙类( $\beta$ -谷甙醇)及内酯类等化学成分<sup>[4]</sup>。现代药理研究表明,酚酸类化合物具有抗炎、解热、镇痛、镇静、抗氧化等作用<sup>[5]</sup>。本实验选取还阳参总酚酸得率为评价指标,采用单因素试验和星点设计-效应面法优选总酚酸提取工艺,为还阳参药材的研究与开发提供参考。

## 1 材料

DV215CD型电子分析天平(美国奥豪斯),TU-1901型双束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。还阳参(2011年8月采集于山西山阴,经山西省中医药研究院中药方剂研究所倪艳教授鉴定为菊科植物还阳参 *Crepis turczaniowii* C. A. Mey. 的干燥全草,药材粉碎,过2号筛待用),咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110885-200102),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 还阳参总酚酸的含量测定<sup>[6]</sup>

**2.1.1 对照品溶液制备** 取咖啡酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,备用。

**2.1.2 供试品溶液制备** 准确称取还阳参粗粉1.0 g,加20倍量70%乙醇回流提取3次,每次1 h,合并滤液,水浴蒸干,用甲醇溶解定容至50 mL,即得。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 精密吸取咖啡酸对照品溶液0.25, 0.30, 0.40, 0.45, 0.60 mL,分别置于25 mL量瓶中,加甲醇至5 mL,加0.3%十二烷基硫酸钠试液2 mL,加入1%  $\text{FeCl}_3$ -0.5%  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1)显色剂2 mL,暗处放置5 min,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl定容至刻度,摇匀,暗处放置20 min。同时做空白对照试验,照紫外分光光度法(《中国药典》2010年版一部附录V A)于756 nm处测定吸光度( $A$ ),以质量浓度为横坐标, $A$ 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.167X - 0.0216$ ( $r = 0.9991$ ),表明咖啡

酸在 $0.001 \sim 0.024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

**2.1.4 精密度试验** 精密称取还阳参药材粗粉1.0 g,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,以甲醇为空白,于756 nm处测定 $A$ ,连续测定6次,计算RSD 0.37%,表明仪器精密度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取还阳参粗粉1份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,以甲醇为空白,分别于0, 5, 10, 15, 20, 30 min在756 nm处测定 $A$ ,计算RSD 1.30%,表明供试品溶液在30 min内稳定性良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批次还阳参粗粉6份,按2.1.2项下方法平行制备6份供试品溶液,以甲醇为空白,于756 nm处测定 $A$ ,计算还阳参总酚酸平均质量分数 $30.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD 0.18%,表明该方法重复性良好。

**2.1.7 加样回收率试验** 精密称取已知总酚酸含量的还阳参粗粉6份,每份约1.0 g,分成3组,每组分别精密加咖啡酸对照品溶液1, 2, 3 mL,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,于756 nm处测定 $A$ ,计算平均回收率97.91%,RSD 1.60%,说明该方法符合要求。

## 2.2 单因素试验考察

**2.2.1 乙醇体积分数** 准确称取还阳参粗粉10.0 g,共6份,分别加入40倍量体积分数为40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%的乙醇溶液水浴回流提取3次,每次60 min,滤过,合并滤液并减压浓缩,定容至100 mL,测定总酚酸含量,结果显示总酚酸得率随乙醇体积分数增大而升高,60%~80%时提取率加速上升,>80%时提取率增速下降。

**2.2.2 溶剂倍量** 准确称取还阳参粗粉10.0 g,共6份,分别加入10, 20, 30, 40, 50, 60倍量70%乙醇水浴回流提取3次,每次60 min,滤过,合并滤液并减压浓缩,定容至100 mL,测定总酚酸含量,结果显示随溶剂倍量的提高,总酚酸得率随之升高,在30~50倍时提取率加速上升,而>50倍时提取率趋于

稳定。

**2.2.3 提取时间** 准确称取还阳参粗粉 10.0 g, 共 6 份, 加 40 倍量 70% 乙醇水浴回流提取 3 次, 每次提取时间分别为 15, 30, 45, 60, 75, 90 min, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩并定容至 100 mL, 测定总酚酸含量, 结果发现总酚酸提取率随提取时间的增加而上升, 当提取时间 > 80 min 后, 提取率趋于不变。

**2.2.4 提取次数** 准确称取还阳参粗粉 10.0 g, 加 40 倍量 70% 乙醇回流回流提取 4 次, 每次 60 min, 结果总酚酸提取量分别为 247.0, 100.1, 33.13, 9.11 mg, 表明前 2 次总酚酸提取量占总提取量的 89.15%, 故暂定提取 3 次。

**2.3 提取工艺优选**

**2.3.1 星点试验设计** 在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、溶剂倍量和提取时间为自变量, 以总酚酸提取量为因变量, 提取数固定为 3 次, 根据星点设计原理, 每因素设 5 个水平, 分别用代码值  $-\alpha$ ,  $-1, 0, 1, \alpha$  表示, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2。

表 1 还阳参总酚酸提取工艺星点设计因素水平

水平	$X_1$ 乙醇体积 分数/%	$X_2$ 溶剂用量 /倍	$X_3$ 提取时间 /min
-1.682	50	15	30
-1	59.15	22.09	42.16
0	70	30	60
1	85.88	42.90	77.84
1.682	95	50	90

**2.3.2 模型拟合及显著性检验** 应用 Design Expert 7 软件对各因素进行多元线性回归和二项式拟合, 结果多元线性方程  $Y = 0.250 + 4.66 \times 10^{-4} X_1 + 0.054 5X_2 - 0.03X_3$  ( $r = 0.462 5$ ), 二项式拟合方程  $Y = -46.87 + 1.787X_1 + 0.706X_2 - 0.130X_3 + 1.824 \times 10^{-3} X_1X_2 + 5.963 \times 10^{-3} X_1X_3 - 2.956 \times 10^{-4} X_2X_3 - 0.015 4X_1^2 - 0.012 1X_2^2 - 2.886 \times 10^{-3} X_3^2$  ( $r = 0.939 6$ )。表明多元线性回归模型未通过检验, 拟合度不佳, 预测性较差, 因此不采用线性模型拟合; 二项式拟合复相关系数较高, 拟合效果较好, 故可用此模型对还阳参总酚酸的提取工艺进行分析和预测, 对该模型进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 因素  $X_3$  的一次项和二次项均对总酚酸提取量具有显著性影响, 因素  $X_1, X_2$  的二次项均具有显著性影响, 且  $X_1$  与  $X_3$  的交互项达极显著性差异, 说明各试验因子对响应值的影响不是简单

表 2 还阳参总酚酸提取工艺星点设计安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总酚酸提取量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	-1	-1	-1	18.563
2	1	-1	-1	16.355
3	-1	1	-1	22.343
4	1	1	-1	19.499
5	-1	-1	1	14.521
6	1	-1	1	16.355
7	-1	1	1	16.430
8	1	1	1	18.189
9	-1.682	0	0	16.355
10	1.682	0	0	19.760
11	0	-1.682	0	21.969
12	0	1.682	0	23.952
13	0	0	-1.682	20.996
14	0	0	1.682	21.519
15~20	0	0	0	23.391

注: 每次试验药材的取样量均为 10.0 g; 15~20 号为重复试验, 用平均值表示。

表 3 还阳参总酚酸提取工艺拟合回归方程方差分析

方差来源	SS	$f$	MS	F	P
模型	162.83	9	18.09	8.17	0.001 5 <sup>2)</sup>
$X_1$	1.98	1	1.98	0.90	0.366 4
$X_2$	1.99	1	1.99	0.90	0.365 6
$X_3$	12.62	1	12.62	5.70	0.038 1 <sup>1)</sup>
$X_1X_2$	0.52	1	0.52	0.23	0.639 7
$X_1X_3$	16.21	1	16.21	7.32	0.022 1 <sup>1)</sup>
$X_2X_3$	0.024	1	0.024	0.011	0.919 0
$X_1^2$	109.53	1	109.53	49.48	0.000 1 <sup>2)</sup>
$X_2^2$	24.57	1	24.57	11.10	0.007 6 <sup>2)</sup>
$X_3^2$	12.16	1	12.16	5.49	0.004 1 <sup>2)</sup>
残差	22.14	10	2.12		
总差	184.97	19			

注: <sup>1)</sup> 显著性差异; <sup>2)</sup> 极显著性差异。

线性关系。

**2.3.3 工艺条件优化与预测** 根据回归方程作效应曲面图, 分析各因素对还阳参总酚酸提取量的影响, 见图 1~3, 故选择最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 69.18%, 溶剂用量 33.92 倍, 提取时间 47.14 min。结合实际生产考虑, 对各因素条件取整, 确定最佳提取工艺为加 35 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次, 每次 50 min。

**2.3.4 验证试验** 分别称取还阳参粗粉 10.0 g, 共 3

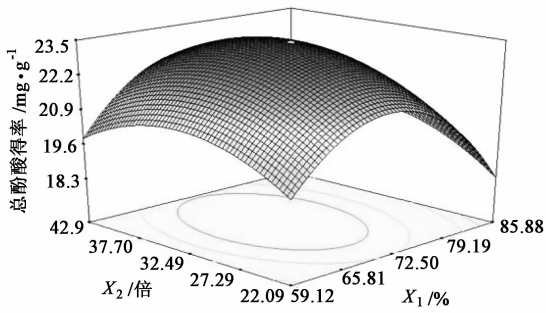


图1 乙醇体积分数和溶剂倍量对还阳参总酚酸提取量的效应曲面

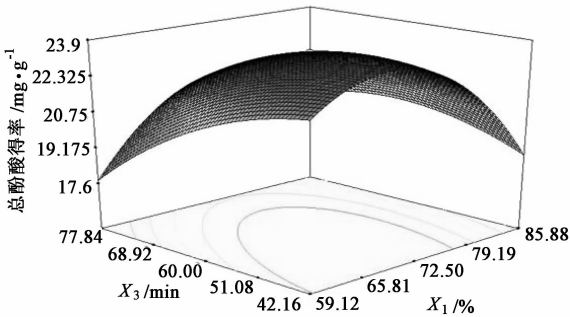


图2 乙醇体积分数和提取时间对还阳参总酚酸提取量的效应曲面

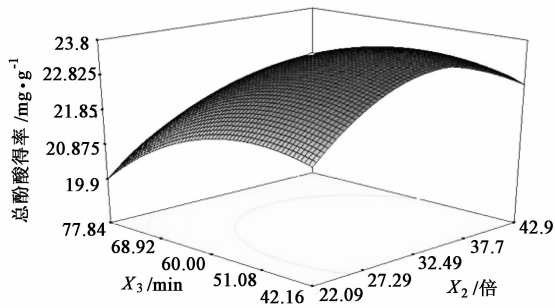


图3 溶剂倍量和提取时间对还阳参总酚酸提取量的效应曲面

份,按优选的提取工艺进行验证试验,结果总酚酸提取量分别为 22.493,23.578,23.802  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,平均提取量 23.291  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,与预测值的偏差率 -2.28%,表明建立的数学模型具有良好的预测性,优选的工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

星点设计-效应面法是通过描绘效应对考察因素的效应面,从效应面上选择较佳的效应区,确定自变量取值范围,即最佳试验条件<sup>[7-10]</sup>。该法采用非线性数学模型拟合,在中心点进行重复性试验以提高试验精度,具有试验次数较少、可信度高、预测性好等优点。通过单因素试验选取星点设计-效应面法中3个影响因素,建立各因素与效应值总酚酸得率相互作用的数学模型,绘制三维效应曲面图,通过目标函数的二次回归方程预测最佳工艺条件,总酚酸得率的实测值与预测值较接近。

### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1222.
- [2] 冉先德. 中华药海. 下卷[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:958.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:196.
- [4] 倪艳,卢方晋,郝旭亮,等. 还阳参化学成分的研究[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(4):51.
- [5] 吴寿金,赵泰,秦永祺. 现代中草药成分化学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:135.
- [6] 王昌利,吕卓,张明. 大孔吸附树脂纯化蒲公英总酚酸的工艺研究[J]. 陕西中医,2009,30(12):1656.
- [7] 吴伟,崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学·药学分册,2000,27(5):292.
- [8] 常青,谢友良,赖小平. 星点设计-效应面法优选青天葵总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):24.
- [9] 张建军,付建武,徐峻. 星点设计-效应面法优选虎杖提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(6):401.
- [10] 王国华,张保献,聂其霞,等. 星点设计-效应面法优选荷叶中荷叶碱与荷叶黄酮的提取工艺[J]. 中国中药杂志,2008,33(20):2332.

[责任编辑 全燕]