

星点设计-效应面法优化老鹳草总黄酮的提取工艺

朱明慧, 尹海波*, 王洪成, 陈静, 姚佳, 姜忠韬
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**采用星点设计-效应面法优化老鹳草中总黄酮的醇提取工艺。**方法:**以乙醇体积分数、回流时间、溶剂用量和提取温度为自变量,总黄酮得率为因变量,对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合,通过效应面法优选提取工艺条件,并进行预测分析。**结果:**最佳提取工艺为加 35 倍量 65% 乙醇于 90 °C 提取 2 次,每次 70 min;总黄酮提取率的实测值与预测值偏差 -1.25%,二项式拟合复相关系数 0.960 9。**结论:**优选的醇提工艺稳定简便,且预测性良好。

[关键词] 老鹳草; 星点设计; 效应面优化法; 总黄酮; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0031-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjzz2013070031

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids in *Geranium wilfordii* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

ZHU Ming-hui, YIN Hai-bo*, WANG Hong-cheng, CHEN Jing, YAO Jia, JIANG Zhong-tao
(Department of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids in *Geranium wilfordii*. by central composite design/response surface methodology. **Method:** Independent variables were ethanol concentration, reflux time, the amount of solvent and reflux temperature, dependent variable was extraction rate of total flavonoids, linear or no-liner mathematic models were used to estimate the relationship between independent variables and dependent variable, response surface methodology was used to optimize extraction technology, and prediction was carried out through comparing the observed and predicted value. **Result:** Regression coefficients of binomial fitting complex model was as high as 0.960 9, optimal extraction technology conditions were as followings: extracted 2 times with 35 times the amount of 65% ethanol at 90 °C, 70 min per time. Bias between the observed and predicted value was -1.25%. **Conclusion:** Central composite design/response surface methodology was convenient and highly predictive for optimizing extraction technology of total flavonoids.

[Key words] *Erodium stephanianum*; central composite design; response surface methodology; total flavonoids; extraction technology

老鹳草为临床常用中药,来源于牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.、老鹳草

Geranium wilfordii Maxim. 或野老鹳草 *Geranium carolinianum* L. 的干燥地上部分,前者习称“长嘴老鹳草”,后两者习称“短嘴老鹳草”^[1]。其中老鹳草为商品药材短嘴老鹳草的主要来源之一,分布较为广泛,以东北和华北为主。其黄酮类成分具有抗氧化、抗菌、抗病毒等生理活性^[3]。因此,开发利用老鹳草的药用植物资源,优化老鹳草总黄酮提取工艺,对扩大其应用和工业化生产具有现实意义。目前,对老鹳草总黄酮提取工艺的优选多采用正交设计法

[收稿日期] 20121018(012)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A498)

[第一作者] 朱明慧,在读硕士,从事种质资源鉴定及中药品质评价研究,Tel:0411-87586003

[通讯作者] *尹海波,教授,博士,从事种质资源鉴定及中药品质评价研究,Tel:15998530628,E-mail:yhb0528@sina.com

和均匀设计法,但这 2 种方法存在试验精度不够,建立的数学模型预测性较差等缺点;而星点设计效应面法可利用中心组合试验拟合出一个完整的二次多项式模型,在试验设计与结果表达方面更加优良,更利于表述和研究各因素对提取效果的影响。本实验以总黄酮得率为指标,通过星点设计效应面法优选老鹳草的提取工艺,为其扩大应用及工业化生产提供准确的实验依据。

1 材料

UV3010 型紫外分光光度计(日本日立公司),AG285 及 AE240 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo)。芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),老鹳草(2011 年自采于辽宁千山,经由本院药用植物教研室尹海波教授鉴定为老鹳草 *Geranium wilfordii* Maxim. 的地上部分,凭证标本保存于本院药用植物教研室),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 4 mg,用 60% 乙醇溶解并定容于 25 mL 量瓶中,即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取经石油醚脱脂后的老鹳草粉末 1 g 进行提取,合并提取液,过滤,蒸干,加 60% 乙醇 20 mL 复溶,用改良明胶沉淀法除鞣质^[4],于 100 mL 量瓶中定容,摇匀,即得。

2.1.3 检测波长的确定 精密量取上述芦丁对照品溶液 4 mL,置 25 mL 量瓶中,加 5% 亚硝酸钠试液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝试液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加 4% 氢氧化钠试液 10.0 mL,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂做空白,于 400 ~ 700 nm 扫描,结果在 510 nm 处有最大吸收,故选取 510 nm 为检测波长。

2.1.4 标准曲线的制备 分别精密量取上述芦丁对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,依次置 25 mL 量瓶中,按 2.1.3 项下方法于 510 nm 处测定吸光度(A)。以 A 为纵坐标,总黄酮质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.012X - 0.0047 (r = 0.9994)$,线性范围 6.388 ~ 38.328 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度的试验 精密量取同一对照品溶液,重复测定 6 次 A,结果 RSD 0.71%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取按 2.1.2 项下方法制备的供试品溶液 1 份,以乙醇为空白溶剂,分别于 0,5,10,20,40,60 min 取样,于 510 nm 处测定 A,结果 RSD 1.57%,表明供试品溶液于 1 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 按 2.1.2 项下方法制备 6 份

供试品溶液,分别测定 A,结果 RSD 1.87%。

2.1.8 加样回收率试验 称取已知含量老鹳草粉末 3 份,每份 1.0 g(总黄酮含量 12.61 mg·g⁻¹),各加入芦丁对照品适量,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,分别测定 A。结果平均加样回收率 100.07%,RSD 1.82%。

2.2 提取工艺优化

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 提取时间考察 在加 40 倍量 60% 乙醇于 80 °C 提取 2 次的条件下,考察提取 30,60,90,120,150 min 对提取工艺的影响,结果总黄酮得率分别为 10.5,11.0,12.0,11.8,10.7 mg·g⁻¹。

2.2.1.2 乙醇体积分数考察 固定液料比 40:1,提取时间 90 min,提取温度 80 °C,提取 2 次,考察乙醇体积分数 50%,60%,70%,80%,90% 对提取工艺的影响,结果总黄酮得率分别为 10.0,12.1,12.1,10.8,10.2 mg·g⁻¹。

2.2.1.3 提取温度考察 在加 40 倍量 60% 乙醇提取 2 次,每次 90 min 的条件下,考察 60,70,80,90,100 °C 提取温度对提取工艺的影响,结果总黄酮得率分别为 9.5,10.8,12.0,13.2,12.5 mg·g⁻¹。

2.2.1.4 溶剂用量考察 在加 60% 乙醇于 90 °C 提取 2 次,每次 90 min 的条件下,考察乙醇 20,30,40,50,60 倍用量对提取工艺的影响,结果总黄酮得率分别为 11.2,12.4,13.4,12.6,12.5 mg·g⁻¹。

2.2.1.5 提取次数考察 在加 40 倍量 60% 乙醇于 90 °C 提取 90 min 的条件下,考察提取次数分别为 1,2,3,4,5 次对提取工艺的影响,结果总黄酮得率分别为 12.1,13.3,13.3,13.1,13.3 mg·g⁻¹。

2.2.2 星点设计法优化

2.2.2.1 试验设计 在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、提取时间、温度及溶剂用量为考察因素,确定提取 2 次,以总黄酮得率为指标,称取老鹳草粉末 30 份,每份 1 g,根据星点设计原理,因素水平见表 1,试验安排与结果见表 2。

表 1 老鹳草总黄酮提取工艺星点试验因素水平

水平	X ₁ 提取时间 /min	X ₂ 乙醇用量 /倍	X ₃ 提取温度 /°C	X ₄ 乙醇体积 分数/%
-2	30	20	60	50
-1	50	70	90	110
0	27.5	35	42.5	50
1	67.5	75	82.5	90
2	57.5	65	72.5	80

表2 老鹳草总黄酮提取工艺星点试验设计和结果

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	总黄酮得率/%
1	-1	-1	-1	-1	0.916
2	1	-1	-1	-1	0.976
3	-1	1	-1	-1	0.911
4	1	1	-1	-1	0.973
5	-1	-1	1	-1	1.099
6	1	-1	1	-1	1.099
7	-1	1	1	-1	1.076
8	1	1	1	-1	1.052
9	-1	-1	-1	1	1.002
10	1	-1	-1	1	0.977
11	-1	1	-1	1	0.895
12	1	1	-1	1	0.982
13	-1	-1	1	1	1.138
14	1	-1	1	1	1.111
15	-1	1	1	1	1.175
16	1	1	1	1	1.262
17	-2	0	0	0	0.934
18	2	0	0	0	1.088
19	0	-2	0	0	1.040
20	0	2	0	0	1.112
21	0	0	-2	0	0.967
22	0	0	2	0	1.254
23	0	0	0	-2	0.984
24	0	0	0	2	1.057
25~30	0	0	0	0	1.132

2.2.2.2 模型拟合 以总黄酮得率为因变量,使用 Design-Expert7.1.6 软件进行响应面分析,结果多元线性回归方差 $Y = 1.07 + 0.025X_1 + 0.010X_2 + 0.086X_3 + 0.020X_4$ ($r = 0.7327, P < 0.001$),虽然模型通过检验,但拟合度不佳,预测性较差,故采用二项式拟合。二项式拟合模型为 $Y = 1.13 + 0.025X_1 + 0.010X_2 + 0.086X_3 + 0.020X_4 + 0.049X_1X_2 - 0.003X_1X_3 - 0.0047X_1X_4 + 0.021X_2X_3 + 0.004X_2X_4 + 0.011X_3X_4 - 0.033X_1^2 - 0.015X_2^2 - 0.0067X_3^2 - 0.029X_4^2$ ($r = 0.9609$);删除不显著因素重新拟合为 $Y = -1.13 + 0.25X_1 + 0.010X_2 + 0.086X_3 + 0.020X_4 + 0.019X_1X_2 + 0.021X_2X_3 - 0.032X_1^2 - 0.014X_2^2 - 0.028X_4^2$ ($r = 0.9464$),方程简化后 r 值降幅很小,说明此方程有较高的可信性。

2.3 工艺参数优化和预测 将因变量与另两因素拟合为三维曲面图(图1~6)。在图上选取提取含量较佳工艺范围, $X_1: 60 \sim 90 \text{ min}$, $X_2: 30 \sim 50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, $X_3: 80 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$, $X_4: 60\% \sim 70\%$ 。综合工业生产实际考虑,结合回归分析结果,由于液料比对总黄酮

提取的影响不是很显著(表3),故选取提取工艺为加35倍量65%乙醇于90℃回流提取2次,每次70min。根据优选的提取工艺进行3次验证试验,比较预测值与真实值,结果预测值1.277%,实际平均测得值1.261%(RSD 2.38%),预测值与真实值的偏差-1.25%。

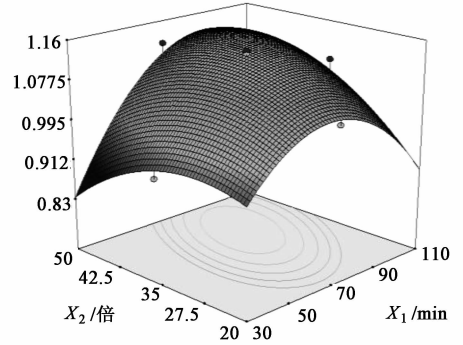


图1 时间和液料比对老鹳草总黄酮得率的效应面

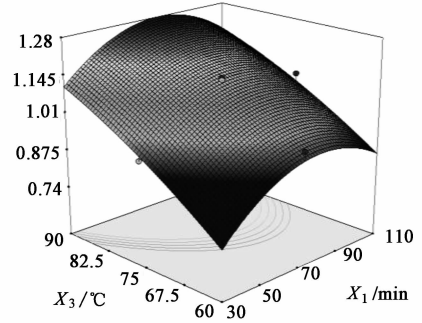


图2 时间和温度对老鹳草总黄酮得率的效应面

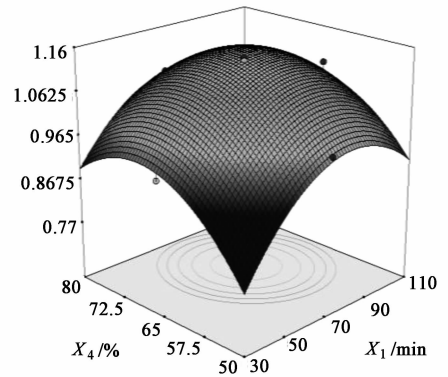


图3 时间和乙醇体积分数对总黄酮得率的效应面

3 讨论

目前,对老鹳草总黄酮提取工艺的研究较少,且多采用单因素试验考察、正交设计法和均匀设计法^[5-7],虽存在简便、实验次数较少等优点,但精度不太高。本实验采用效应面优化法,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,回推出自变量取值范围,即最佳实验条件,为生产工艺参数的选择提供准确的实验数据。

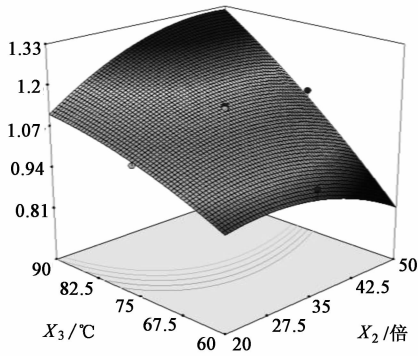


图 4 料液比和提取温度对总黄酮得率的效应面

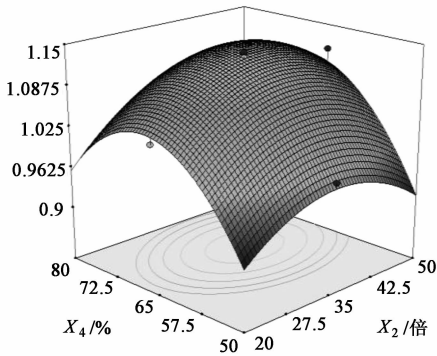


图 5 液料比和乙醇体积分数对总黄酮得率的效应面

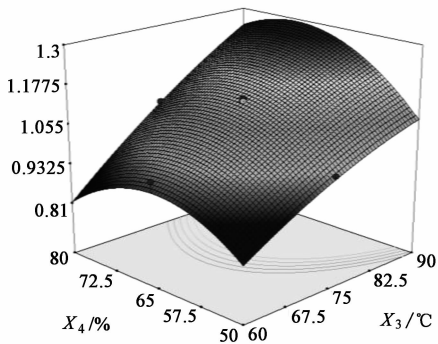


图 6 温度和乙醇体积分数对总黄酮得率的效应面

响应面优化的前提为设计的实验点应包含最佳试验条件,如果实验点选取不当,就不能得到准确的优化结果。在使用响应面优化法之前,应确立合理的因素水平范围。因此本实验首先采用单因素试验考察以确定合理的工艺条件。星点设计法在国内外药学领域已得到了广泛的应用^[8-10],其采用非线性模型拟合,在中心点进行重复性试验以提高实验的精确度,预测值更接近真实值。所以本实验采用该法对老鹳草总黄酮的提取方法进行研究,优选的工艺简便合理、稳定,且可预测性较优。

[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

表 3 总黄酮提取工艺拟合回归方程的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	26.7	14	1.91	26.3	<0.000 1 ¹⁾
X ₁	1.54	1	1.54	21.23	0.000 3 ¹⁾
X ₂	0.26	1	0.26	3.65	0.077 5
X ₃	17.58	1	17.58	242.3	<0.000 1 ¹⁾
X ₄	0.98	1	0.98	13.57	0.002 2 ²⁾
X ₁ X ₂	0.58	1	0.58	7.96	0.012 9 ³⁾
X ₁ X ₃	0.014	1	0.014	0.2	0.662 3
X ₁ X ₄	0.036	1	0.036	0.5	0.491 4
X ₂ X ₃	0.67	1	0.67	9.27	0.008 2 ²⁾
X ₂ X ₄	0.026	1	0.026	0.35	0.561 4
X ₃ X ₄	0.2	1	0.2	2.79	0.115 5
X ₁ ²	2.96	1	2.96	40.76	<0.000 1 ¹⁾
X ₂ ²	0.64	1	0.64	8.89	0.009 3 ²⁾
X ₃ ²	0.12	1	0.12	1.7	0.211 8
X ₄ ²	2.34	1	2.34	32.25	<0.000 1 ¹⁾
残差	0.19	15	0.073		
失拟性	1.08	10	0.11	48.59	0.000 2
纯误差	0.011	5	2.217 × 10 ⁻³		
总差	27.8	29			

注: ¹⁾ 差异极显著 (P < 0.001), ²⁾ 差异高度显著 (P < 0.01), ³⁾ 差异显著 (P < 0.05)。

京: 中国医药科技出版社, 2010: 113.

[2] 雷志勇, 刘岱琳, 胡迎庆, 等. 老鹳草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(10): 759.

[3] 邢涛. 老鹳草中黄酮类成分的药理、生物学作用[J]. 吉林畜牧兽医, 2009, 30(5): 11.

[4] 李前琼, 王金林, 王晓利, 等. 不同方法除鞣质后贯叶金丝桃提取物中金丝桃素的含量变化[J]. 中国药业, 2010, 19(8): 29.

[5] 刘青林. 老鹳草中总黄酮的提取及含量测定[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(8): 23.

[6] 杜列勇, 陈兴, 刘文山. 老鹳草总黄酮提取工艺研究[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(21): 10.

[7] 金晴昊, 权迎春, 关丽萍, 等. 均匀设计法优选老鹳草中芦丁和槲皮素提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(1): 28.

[8] 谢臻, 陈勇, 曾海生, 等. 星点设计-响应面法优选地桃花中总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 27.

[9] 黄元红, 卫天喜, 张发生, 等. 星点设计-效应面法优选丹参提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 28.

[10] Lamin S K, John S, Gauri S M. Optimization of supercritical fluid extraction of lycopene from tomato skin with central composite rotatable design model[J]. J Sep Purif Technol, 2008(60): 278.

[责任编辑 全燕]