

星点设计-效应面法优选凤仙透骨草的提取工艺

顾媛媛¹, 王建明¹, 宋成贵², 代金红², 田振坤^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 采用星点设计-效应面法优化凤仙透骨草的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、提取时间、溶媒比为自变量, 凤仙透骨草总黄酮提取率为因变量, 通过对自变量各水平的多元线性回归及二项式拟合, 采用效应面法优选工艺条件, 并进行预测分析。结果: 最佳提取工艺为加 23.83 倍量 81.55% 乙醇提取 164.08 min, 提取预测值与真实值偏差 -1.08%, 二项式拟合复相关系数 0.987 1。结论: 优化的凤仙透骨草提取工艺简便、精密度高、可预测性良好。

[关键词] 凤仙透骨草; 星点设计; 效应面法; 总黄酮

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0059-03

Optimization of Extraction Technology for *Impatiens balsamina* by Central Composite Design/Response Surface Methodology

GU Yuan-yuan¹, WANG Jian-ming¹, SONG Cheng-gui², DAI Jin-hong², TIAN Zhen-kun^{3*}

(1. Academy of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of *Impatiens balsamina* by central composite design/response surface methodology. **Method:** With ethanol concentration, extraction time and solvent ratio as independent variables, yield of total flavonoids from *I. balsamina* as dependent variable, levels of independent variables were regressed by multiple linear and fitted by binomial, response surface method was used to optimize extraction process, and prediction analysis was carried out by comparing observed and predicted values. **Result:** Optimal extraction technology was as following: extracted 164.08 min with 23.83 times the amount of 81.55% ethanol, deviation between observed and predicted values was -1.08%, multiple correlation coefficient of binomial fitting model was 0.987 1. **Conclusion:** This optimized extraction process of *I. balsamina* was simple with high precision and good predictability.

[Key words] *Impatiens balsamina*; central composite design; response surface methodology; total flavonoids

凤仙透骨草主要用于治疗风湿痹痛、痛经、鹅掌风等症, 凤仙花主要化学成分有黄酮类、醌类、甾醇

类、香豆素类等^[1-2]。黄酮类化合物广泛存在于药用植物中, 具有抗炎、降低血胆固醇、增强骨强度等多种药理活性^[3]。目前对凤仙透骨草中黄酮类化合物的提取工艺研究未见报道。本实验采用星点设计-效应面法^[4-6], 以凤仙透骨草中总黄酮提取率为指标, 进行提取工艺优化, 为更好的开发利用该药材资源提供实验依据, 同时为黄酮类新药开发提供参考。

[收稿日期] 20120815(010)

[第一作者] 顾媛媛, 助理研究员, 博士生, 从事中药质量控制研究, Tel: 13633660816, E-mail: yuanwas@163.com

[通讯作者] * 田振坤, 教授, 博士生导师, 从事中药新药开发研究, Tel: 82193007, E-mail: tzkoffice@hljuem.net

1 材料

756-PC 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)JA2003 型精密电子天平(良平仪器厂),芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,供含量测定用,批号 100080-200707),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。药材采摘于黑龙江省兰西县,由本校药学院中药资源教研室王振月教授鉴定为凤仙花科凤仙花属植物凤仙透骨草 *Impatiens balsamina* L.。

2 方法与结果

2.1 凤仙透骨草总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁对照品 10.03 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,制成 1.003 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取凤仙透骨草样品 2 g,用 20 倍量 70% 乙醇回流 3 次,每次 2 h,过滤,滤液蒸干,用甲醇超声溶解并定容于 25 mL 量瓶中,即得。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取 2.1.1 项下对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中,各加 5% 亚硝酸钠溶液 0.5 mL, 放置 6 min, 加 10% 硝酸铝溶液 0.5 mL, 放置 6 min, 加 4% 氢氧化钠溶液 4.0 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min。以相应试剂作空白, 在 510 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 $Y = 5.9536X + 0.3087$ ($r = 0.9999$), 芦丁在 4.012 ~ 24.072 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验 精密吸取 2.1.1 项下对照品溶液 0.2 mL, 用甲醇定容于 50 mL 量瓶中, 按 2.1.3 项下方法显色, 测定 A, 于 510 nm 处连续测定 6 次, 结果 RSD 1.16%, 说明仪器精密良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取样品 6 份, 每份约 2.0 g, 按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 精密吸取 0.2 mL 于 50 mL 量瓶中, 按 2.1.3 项下方法显色, 测定 A, 结果 RSD 0.98%, 表明该方法重复性较好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取 2.1.2 项下供试品溶液 0.2 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 按 2.1.3 项下方法显色, 分别于 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 测定 A, RSD 2.32%, 表明供试品溶液在 60 min 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密称取已知总黄酮含量的样品 6 份, 每份约 2.0 g, 分别加入一定量芦丁对照品, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按

2.1.3 项下方法显色, 测定 A, 计算回收率。结果平均加样回收率 99.08%, RSD 2.62%。

2.2 回流提取工艺优化 在预试验基础上, 确定影响凤仙透骨草回流提取的因素主要有乙醇体积分数、溶剂倍量、提取时间及提取次数。因提取次数为非连续变量, 在模型拟合中处理比较困难, 结合预试验结果, 确定提取 3 次。根据星点设计的原理, 每因素设 5 水平, 用代码值 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 来表示 ($\alpha = 1.732$)。精密称取凤仙透骨草样品质量 20 g, 加适量乙醇提取, 进行提取工艺优选, 因素水平见表 1, 试验安排与结果见表 2。

表 1 凤仙透骨草中总黄酮回流提取工艺星点试验因素水平

水平	X ₁ 溶剂量 / 倍	X ₂ 提取时间 / min	X ₃ 乙醇体积分数 / %
-1.732	12	30	50
-1	15.17	65.92	58.45
0	19.50	115	70
1	23.83	164.08	81.55
1.732	27	200	90

表 2 凤仙透骨草中总黄酮回流提取工艺星点试验安排

No.	X ₁	X ₂	X ₃	总黄酮/mg
1	-1	-1	-1	15.42
2	1	-1	-1	16.89
3	-1	1	-1	17.54
4	1	1	-1	19.13
5	-1	-1	1	15.82
6	1	-1	1	17.71
7	-1	1	1	18.36
8	1	1	1	20.35
9	-1.732	0	0	16.52
10	1.732	0	0	19.44
11	0	-1.732	0	15.47
12	0	1.732	0	19.49
13	0	0	-1.732	17.04
14	0	0	1.732	18.42
15	0	0	0	19.11
16	0	0	0	19.12
17	0	0	0	19.14
18	0	0	0	19.11
19	0	0	0	19.12
20	0	0	0	19.16

2.3 数据分析 将表 2 中数据用 Design-Expert 7.0.0 软件进行分析, 以凤仙透骨草总黄酮得率为因变量对各因素进行二项式拟合, 拟合模型为 $Y = 19.13 + 0.87X_1 + 1.19X_2 + 0.41X_3 + 0.027X_1X_2 + 0.10X_1X_3 + 0.10X_2X_3 - 0.40X_1^2 - 0.58X_2^2 -$

$0.49X_3^2$ ($r = 0.9871$),表明该回归模型的拟合情况良好,拟合度高。

对上述回归模型进行显著性检验,结果见表3。结果表明,溶剂量、提取时间和乙醇体积分数对总黄酮得率的线性效应极显著; X_1^2, X_2^2, X_3^2 对总黄酮得率的曲面效应显著;各因素间交互作用不显著。

表3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
X_1	10.80	1	10.80	204.86	<0.01
X_2	16.22	1	16.22	307.67	<0.01
X_3	2.53	1	2.53	47.96	<0.01
X_1X_2	0.034	1	0.034	0.64	0.4420
X_1X_3	0.16	1	0.16	2.97	0.1153
X_2X_3	0.16	1	0.16	2.97	0.1153
X_1^2	2.02	1	2.02	38.30	<0.01
X_2^2	7.53	1	7.53	142.79	<0.01
X_3^2	3.07	1	3.07	58.20	<0.01
残差	0.53	10	0.053		
失拟项	0.53	5	0.11	271.74	<0.01
误差	1.933×10^{-3}	5	3.867×10^{-4}		
总离差	40.85	19			
模型	40.32	9	4.48	84.96	<0.01

2.4 工艺参数优化、验证和预测 把因变量与另2个因素拟合为三维曲面图,固定3个变量中的1个为中值,以拟合的目标函数为数学模型,采用Design-Expert7.0.0软件绘制因变量曲面图,考察 X_1, X_2, X_3 对总黄酮得率的影响,结果见图1~3。

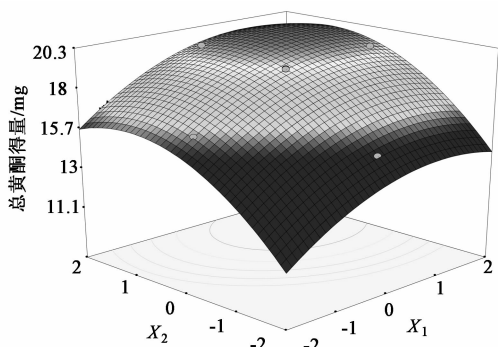


图1 溶剂量和提取时间对总黄酮得率影响的响应面

由图1~3可知,溶剂量、提取时间和乙醇体积分数对凤仙透骨草总黄酮得率的影响均显著,结合Design-Expert7.0.0软件对工艺进行优化,确定最佳工艺条件为加23.83倍量81.55%乙醇提取164.08 min。按优选工艺进行3次验证试验,结果预测值20.36,真实值20.14,偏差率-1.08%,表明建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件简便、重复性较好。

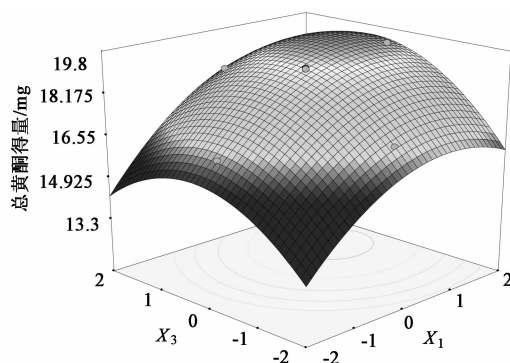


图2 溶剂量和乙醇体积分数对总黄酮得率影响的响应面

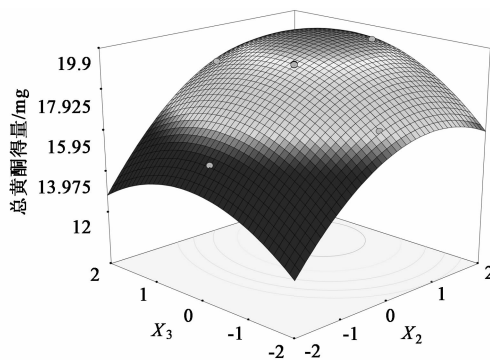


图3 提取时间和乙醇体积分数对总黄酮得率影响的响应面

3 讨论

本实验以凤仙透骨草总黄酮得率为指标,采用星点设计法综合考虑乙醇体积分数、提取时间、溶剂倍数三因素间的交互作用,并通过效应面法分析得出最佳的提取条件,为探讨星点设计-效应面法应用于中药提取工艺的可行性提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 迟玉明,阎文玫,李家实. 中药透骨草原植物初考[J]. 中药材,1990,13(4):43.
- [2] 苏秀芳,蓝金. 凤仙花化学成分及药理作用研究进展[J]. 广西民族师范学院学报,2010,27(3):13.
- [3] 王海生,王隶书,范艳君. 酢浆草提取物中总黄酮含量的分光光度法测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):578.
- [4] 田振坤,顾媛媛,宋成贵,等. HPLC法测定凤仙透骨草中的芦丁、槲皮素和山奈酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):104.
- [5] 刘常青,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.
- [6] 谢臻,陈勇,曾海生,等. 星点设计-效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.

[责任编辑 全燕]