

# 星点设计-效应面法优选青天葵总黄酮提取工艺

刘常青<sup>1</sup>, 谢友良<sup>1,2</sup>, 赖小平<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006;

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

**[摘要]** **目的:**采用星点设计-效应面法优选青天葵中总黄酮的提取工艺。**方法:**采用星点设计进行实验,以乙醇体积分数、乙醇倍量、提取时间为自变量,总黄酮含量为因变量,对各水平进行多元线性回归及二项式拟合,通过效应面法优化工艺参数,并对预测值和实测值进行比较分析。**结果:**建立的数学模型复相关系数较高,指标与因素的关系适合采用二项式方程拟合( $R^2 = 0.9870$ ),验证试验结果与模型预测值偏差较小,确定最优提取工艺为30倍量65%乙醇提取2次,每次75 min。**结论:**该优选工艺简便,可预测性较优,适用于青天葵中总黄酮的开发利用。

**[关键词]** 青天葵; 星点设计; 效应面法; 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(2012)12-0024-04

## Optimization of Extraction Process for Total Flavonoids from *Nervilia fordii* by Central Composite Design and Response Surface Methodology

LIU Chang-qing<sup>1</sup>, XIE You-liang<sup>1,2</sup>, LAI Xiao-ping<sup>1,2\*</sup>

(1. Research & Development Centre of New Drugs, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510006, China; 2. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total flavonoids from *Nervilia fordii* by central composite design and response surface methodology. **Method:** Central composite design was used with the concentration of ethanol, extraction time and the amount of ethanol as independent variables, the content of total flavonoids as dependent variables, each level was done with multiple linear regression and binomial fitting. Technology parameters was optimized by response surface methodology, and predictive analysis was carried out by comparing observed and predicted value. **Result:** Established mathematical model had high multiple correlation coefficients, relationship between factors and indexes was suitable for fitting with binomial equation ( $R^2 = 0.9870$ ), verification test result and model prediction value had small deviation. Optimum extraction process was: extracted 2 times with 30 times the amount of 65% ethanol, 75 min per time. **Conclusion:** This optimized process was simple, and had well prediction, it was suitable for development and utilization of total flavonoids from *N. fordii*.

**[Key words]** *Nervilia fordii*; central composite design; response surface methodology; total flavonoids; extraction process

青天葵又名独叶莲、独脚莲、珍珠叶等,性寒味甘,归心、肺、肝经,具有润肺止咳、清热解毒、散瘀止

痛之功效,主治肺癆咯血、肺热咳嗽、口腔炎等症<sup>[1-3]</sup>。药理试验表明<sup>[4-6]</sup>,青天葵中主要药效物质为黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用,

**[收稿日期]** 20120113(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30472209);广东省科技计划项目(2009A03010004)

**[第一作者]** 刘常青,硕士,从事中药新药开发研究,Tel:020-39358183,E-mail:changqingzb@sina.com

**[通讯作者]** \*赖小平,博士,教授,研究员,从事中药新药开发研究,Tel: 020-39358013,E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn

在医药领域有广阔的应用前景。目前对其提取工艺的研究未见报道,本试验采用星点设计-效应面法优选青天葵中总黄酮的提取工艺,该方法<sup>[7]</sup>采用非线性数学模型拟合,在中心点进行重复性实验以提高实验精度,预测值更接近真实值,是国外常用的实验设计方法<sup>[8-14]</sup>。本试验旨在优选青天葵中总黄酮提取工艺,同时为该实验设计法用于优选中药提取工艺的可行性提供试验依据。

## 1 材料

UV mini-1240 型紫外分光光度仪(日本岛津公司),AB204-N 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),YF-114 型中药粉碎机(浙江温州瑞安市永历制药机械有限公司),BP-110S 型 1/万电子天平(德国 Sartorius),CP225D 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius)。

青天葵药材(购自清平药材市场,经广州中医药大学赖小平研究员鉴定为兰科植物毛唇芋兰 *Nervilia Fordii* (Hance) Schltr. 的干燥全草,沙苑子苷对照品(实验室自制,经 HPLC-DAD 和 ELSD 测定纯度 > 98%),水为超纯水,试验所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 含量测定

**2.1.1 对照品溶液的制备** 取沙苑子苷对照品适量,精密称定,加 65% 乙醇制成  $0.107 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液,即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 准确称取青天葵样品粉末 5.00 g,加 20 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,用 70% 乙醇定容至 500 mL,取 1 mL 加 70% 乙醇定容至 25 mL 量瓶中,即得。

**2.1.3 标准曲线的绘制** 分别精密吸取  $0.107 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的沙苑子苷对照品溶液 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,加 65% 乙醇稀释至刻度,得到质量浓度为 6.42, 8.56, 10.7, 12.84, 17.12, 21.4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液,以 65% 乙醇为空白试剂,于 266 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为横坐标,质量浓度( $C, \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )为纵坐标,得回归方程为  $C = 0.028 \ 3A - 0.001 \ 7$  ( $r = 0.999 \ 7$ )。表明沙苑子苷在 6.42 ~ 21.4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  与 A 呈良好线性关系。

**2.1.4 精密度试验** 精密称取青天葵样品粉末 5.00 g,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,以相应乙醇溶液为空白溶剂,于 266 nm 波长处测定吸光度,连续测定 6 次,计算 RSD 0.12%,表明仪器精密

度良好。

**2.1.5 稳定性试验** 取青天葵样品粉末 1 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,以相应乙醇溶液为空白,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 在 266 nm 波长处测定吸光度,计算 RSD 1.57%,表明样品在 12 h 内稳定性良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批次青天葵样品粉末 6 份,按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,以相应乙醇溶液为空白,于 266 nm 波长处测定吸光度,测得青天葵中总黄酮平均质量分数为  $35.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.89%,表明该方法重复性良好。

**2.1.7 加样回收率试验** 精密称取已知总黄酮含量的青天葵样品粉末 6 份,每份约 2.5 g,分成 3 组,每组分别精密加沙苑子苷对照品溶液 ( $0.107 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1.0, 2.0, 3.0 mL,各加入 20 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,定容至 500 mL,各取 1 mL 分别定容至 25 mL 量瓶中,0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,于 266 nm 波长处测定 A,计算平均回收率为 96.37%, RSD 1.58%。说明该方法符合要求。

### 2.2 回流提取工艺优化

**2.2.1 正交试验设计** 选取乙醇体积分数、提取时间、料液比和提取次数为考察因素,因为提取次数为非连续变量,回归处理较困难,结合预试验结果暂定为提取 2 次。根据星点设计原理,每因素五水平,用代码值  $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$  表示[三因素星点设计的  $\alpha = (2^3)^{1/4}$ ]。因素水平表见表 1,试验安排见表 2。

表 1 青天葵中总黄酮提取工艺优选星点设计因素水平

水平	$X_1$ 乙醇体积 分数/%	$X_2$ 提取时间 /min	$X_3$ 溶剂用量 /mL
-1.682	50	30	50
-1	59.12	42.16	70
0	72.5	60	100
+1	85.88	77.84	130
+1.682	95	90	150

**2.2.2 模型拟合** 以总黄酮量为因变量,采用 Statistica 9.1 软件包软件,对各因素进行多元线性回归和二项式拟合,拟合模型如下。

$$\text{多元线性回归 } Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$$

$$\text{二项式拟合 } Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3$$

根据结果分析,多元线性回归  $Y = 36.405 \ 2 - 0.084 \ 14X_1 + 0.021 \ 32X_2 + 0.013 \ 21X_3$  ( $R^2 =$

表 2 青天葵中总黄酮提取工艺优选星点设计安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	总黄酮/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	-1	-1	-1	32.48
2	+1	-1	-1	31.18
3	-1	+1	-1	33.52
4	+1	+1	-1	31.82
5	-1	-1	+1	33.78
6	+1	-1	+1	31.84
7	-1	+1	+1	34.90
8	+1	+1	+1	31.89
9	-1.682	0	0	33.11
10	+1.682	0	0	28.69
11	0	-1.682	0	32.41
12	0	+1.682	0	33.80
13	0	0	-1.682	34.06
14	0	0	+1.682	35.25
15~20	0	0	0	34.86

注:青天葵的投料量为 5.0 g; 15~20 号为重复试验,试验结果用平均值表示。

0.520 8),  $P=0.038 0$ 。虽模型通过检验,但拟合度不佳,预测性较差,因此线性模型不合适,宜采用二项式拟合,结果见表 3。

表 3 二次多项式非线性估计

项目	估计值	标准误差	$t$	$P$
$b_0$	-20.310 2	6.056 7	-3.35	0.0203
$b_1$	1.177 0	0.104 95	11.21	<0.000 1
$b_2$	0.332 4	0.059 26	5.61	0.002 5
$b_3$	0.086 1	0.035 42	2.43	0.059 4
$b_4$	-0.008 0	0.000 67	-11.79	<0.000 1
$b_5$	-0.002 0	0.000 38	-5.34	0.003 1
$b_6$	-0.000 1	0.000 14	-0.80	0.458 1
$b_7$	-0.000 8	0.000 44	-1.75	0.141 3
$b_8$	-0.000 6	0.000 26	-2.30	0.069 5
$b_9$	-0.000 12	0.000 20	-0.60	0.576 5

模型的复相关系数  $R^2=0.989 2$ ,  $P=0.000 2$ , 与线性拟合相比有较大的提高,剔除最不可信的  $b_6$  项,再重新拟合(表 4)。

二项式数学模型  $Y = -16.262 2 + 1.128 3X_1 + 0.297 9X_2 + 0.057 1X_3 - 0.007 625X_1^2 - 0.001 839X_2^2 - 0.000 771 2X_1X_2 - 0.000 605 2X_1X_3$

复相关系数  $R^2=0.987 0$ ,  $P < 0.000 1$ , 相对于线性拟合有大幅提高,与二项拟合简化前相比,简化后的方程  $r$  值降幅较小,说明此方程有较高的可

表 4 简化后二次多项式非线性估计

项目	估计值	标准误差	$t$	$P$
$b_0$	-16.262 2	3.927 3	-4.14	0.004 3
$b_1$	1.128 3	0.079 36	14.22	<0.000 1
$b_2$	0.297 94	0.044 68	6.67	0.000 3
$b_3$	0.057 09	0.017 81	3.20	0.015 0
$b_4$	-0.007 63	0.000 49	-15.52	<0.000 1
$b_5$	-0.001 84	0.000 28	-6.66	0.000 3
$b_7$	-0.000 77	0.000 41	-1.89	0.101 4
$b_8$	-0.000 61	0.000 24	-2.49	0.041 7

信度。

**2.2.3 工艺参数优化与预测** 把因变量与另两因素拟合为三维曲面图,因只能表达含 2 个因素变量的函数,故固定 3 个变量中的一个为中值,再以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量曲面和等高线图(图 1~6),在等高线图上直接读取总黄酮最佳提取工艺范围,  $X_1:62\% \sim 72\%$ ,  $X_2:60 \sim 77 \text{ min}$ ,  $X_3:27 \sim 30$  倍。结合工业生产实际情况,确定提取青天葵中总黄酮的最优工艺为 30 倍量 65% 乙醇回流提取 2 次,每次 75 min。

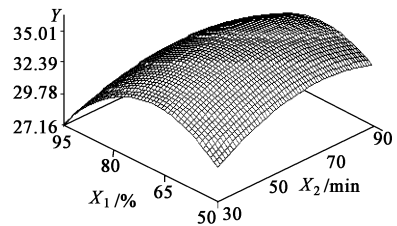


图 1 乙醇体积分数和提取时间对总黄酮影响的三维关系

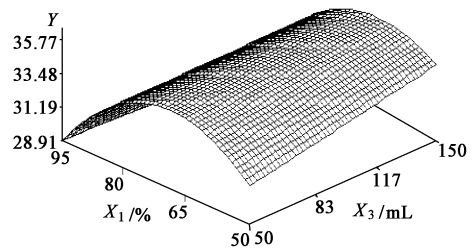


图 2 乙醇体积分数和溶剂用量对总黄酮影响的三维关系

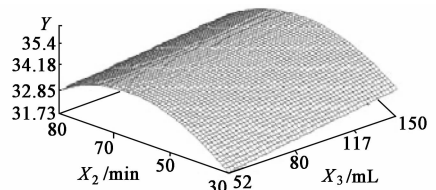


图 3 提取时间和溶剂用量对总黄酮影响的三维关系

按最优提取工艺条件提取青天葵药材 3 份,进行工艺验证试验,将测定的平均结果与拟合方程的预测值进行比较,生药质量分数预测值为 35.76

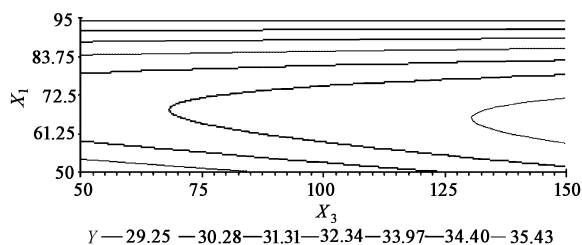


图4 乙醇体积分数和提取时间对总黄酮影响的等高线

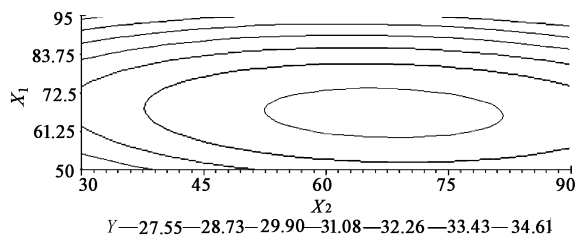


图5 乙醇体积分数和溶剂用量对总黄酮影响的等高线

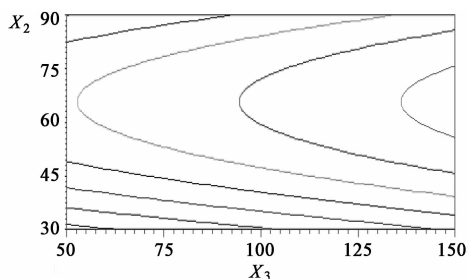


图6 提取时间和溶剂用量对总黄酮影响的等高线

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 真实值为  $(35.39 \pm 0.97) \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。计算其相对偏差 [ 相对偏差 = ( 预测值 - 实测值 ) / 预测值  $\times 100\%$  ] 为 2.75%。表明本试验所得拟合方程可较好地描述指标与因素之间的关系, 所建立的数学模型具有良好的预测性, 所选工艺条件重复性好。

### 3 讨论

通过描绘效应对考察因素的效应面, 从效应面上找出较优区域, 再回推出因素的取值范围, 此范围即为最佳条件<sup>[15]</sup>。本文应用星点设计-效应面法, 对青天葵总黄酮提取工艺进行优化, 试验中对不同产地批次品种的青天葵药材中的总黄酮进行测定, 发现差异较大。而总黄酮为该药材中的有效成分, 因而需对其有效部位进行测定。

本研究对青天葵供试品溶液和沙苑子苷对照品溶液(以随行试剂作空白)采用紫外分光光度计在 190 ~ 800 nm 进行全波长扫描, 其最大吸收波长较

一致, 均在 266 nm 波长处, 故确定此波长为检测波长。同时证明了用从中草药中自身所含的黄酮化学成分作对照品, 能较易进行检测波长的确定。

### [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8册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 740.
- [2] 蔡永敏. 中药药名辞典[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 183.
- [3] 《广东中药志》编辑委员会. 广东中药志. 第2卷[M]. 广州: 广东科技出版社, 1996: 120.
- [4] 谢友良. 南药青天葵的抗急性肺损伤作用机理及其质量标准研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [5] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 36.
- [6] 甄汉深, 周燕园, 袁叶飞, 等. 青天葵活性部位的体内抗肿瘤作用研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1095.
- [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] 张瑜, 白颖. 星点设计-效应面法优化盐酸青藤碱脉冲片处方的研究[J]. 中草药, 2011, 41(7): 1088.
- [9] 陆刚, 杜国栋, 王俊儒, 等. 星点设计-效应面法优化丹参须根有效成分的酶法提取工艺[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 1976.
- [10] 吴海健, 王建新, 黄建明, 等. 星点设计-效应面法优化柘树提取物片剂处方[J]. 复旦学报: 医学版, 2008, 35(3): 131.
- [11] 陈伟, 夏红, 吴伟. 星点设计-效应面法优化水飞蓟素滴丸的制备工艺[J]. 中草药, 2005(5): 679.
- [12] 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.
- [13] 田振坤, 马英丽, 吴伦, 等. 星点设计-效应面法优化北五味子果实提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 28.
- [14] 王秋红, 苏阳, 吴伦, 等. 星点设计-效应面法优化升麻提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 24.
- [15] Krajnc P, Kopac J, Sluga A. Design of grinding factors based on response surface methodology[J]. J Mater Process Technol, 2005(162/163): 629.

[责任编辑 全燕]