

## 星点设计-效应面法优选苦参提取工艺

涂瑶生<sup>1,2</sup>, 李绍林<sup>1,2\*</sup>, 孙冬梅<sup>1,2</sup>, 张建军<sup>2</sup>, 江志强<sup>1,2</sup>, 付建武<sup>1,2</sup>  
(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] 目的:优化苦参的提取工艺。方法:采用单因素和星点设计-效应面法,以苦参碱、氧化苦参碱、苦参总黄酮提取率和干膏得率为考察指标对苦参提取工艺进行优化。结果:优选的最佳提取工艺为加 11 倍量 65% 乙醇提取 2 次,每次 65 min。结论:优选的提取工艺合理、稳定、可行。

[关键词] 苦参碱; 氧化苦参碱; 总黄酮; 星点设计-效应面法; 提取工艺

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)05-0034-04

## Optimization of Extraction Technology for *Sophora flavescens* by Central Composite Design-Response Surface Methodology

TU Yao-sheng<sup>1,2</sup>, LI Shao-lin<sup>1,2\*</sup>, SUN Dong-mei<sup>1,2</sup>, ZHANG Jian-jun<sup>2</sup>,  
JIANG Zhi-qiang<sup>1,2</sup>, FU Jian-wu<sup>1,2</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;  
2. Guangdong Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extracting technology of *Sophora flavescens*. **Method:** Taking extraction rate of matrine, oxymatrine, total flavonoids from *S. flavescens* radix and yield of dry extract as index, extraction process of *S. flavescens* was optimized by single factor test and central composite design-response surface methodology. **Result:** Optimum condition of extraction technology was extracted 2 times with 11-fold, the amount of 65% ethanol for 65 minutes each time. **Conclusion:** Optimum extraction process was reasonable, stable and feasible.

[Key words] matrine; oxymatrine; total flavonoids; central composite design-response surface methodology; extraction technology

苦参具有清热燥湿、杀虫、利尿之功<sup>[1]</sup>,主要活性成分为生物碱和黄酮,其中生物碱具有杀菌、抗炎、免疫抑制抗过敏、安定镇痛等作用,主要成分是苦参碱和氧化苦参碱<sup>[2]</sup>;黄酮类物质具有清热解毒、抗菌、抑制脂肪酶活性等功能<sup>[3]</sup>。苦参有效部位也是医药、食品、保健品、生物农药的重要原料<sup>[4]</sup>。目前苦参提取多采用单一成分作为考察指标,且评价方法不完善,易造成有效成分提取不完

全,在工艺中使用有毒、易燃的有机溶剂,易造成环境污染及有机溶剂残留<sup>[5]</sup>。

本实验采用星点设计-效应面试验设计方法,精度高,预测指导性更强,可提高优化效果<sup>[6-8]</sup>。以苦参碱、氧化苦参碱、苦参总黄酮提取率及干膏得率为考察指标,在单因素考察的基础上,进行星点设计试验,经效应面法优化苦参提取工艺,以使苦参的有效成分提取更完全。

### 1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦),UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津),AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士 METTLER),VAP G3 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph),DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏)。

[收稿日期] 20110716(006)

[第一作者] 涂瑶生,研究员,博士生导师,从事中药制剂研究,  
Tel:020-83482683, E-mail: tuyaos@21.cn.com

[通讯作者] \*李绍林,在读博士,从事中药制剂研究, Tel:020-83501292, E-mail: xyecolin@163.com

苦参药材购自广州致信中药饮片有限公司,经广东省中医研究所孙冬梅主任中药师鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait., 苦参碱对照品(批号 110805-200507)、氧化苦参碱对照品(批号 110780-200405)、芦丁对照品(批号 0080-9504)均购于中国药品生物制品检定所,甲醇、无水乙醇、乙腈均为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 苦参碱、氧化苦参碱含量测定** 精密量取苦参提取浓缩液样品适量,通过中性氧化铝柱(100~200目,5g,内径1cm),依次用三氯甲烷,三氯甲烷-甲醇(7:3)混合溶液各20mL洗脱,合并洗脱液,回收溶剂至干,残渣加无水乙醇适量使溶解,转移至10mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,过0.45 $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,照《中国药典》2010年版一部附录VID高效液相色谱法测定。

**2.1.1 色谱条件** Purospher STAR-NH2 色谱柱(4.6mm $\times$ 250mm,5 $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-无水乙醇-3%磷酸溶液80:10:10,检测波长220nm,流速1.0mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.1.2 标准曲线绘制** 苦参碱标准曲线方程为 $Y=0.496X+0.386$ ( $r=1.0000$ ),氧化苦参碱标准曲线方程为 $Y=514.307X+1.699$ ( $r=1.0000$ ),苦参碱、氧化苦参碱分别在52.6~736.4,0.18~2.52 $\mu\text{g}$ 呈良好线性关系。

**2.2 苦参总黄酮含量测定** 分别精密吸取芦丁对照品溶液(111.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0mL,置于25mL量瓶中,加乙醇至6mL,加NaOH试液2mL,加水至刻度,摇匀。以相应试液为空白,于327nm处测定其吸光度,并以吸光度( $A$ )为纵坐标,对照品溶液质量浓度( $C$ )为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程 $A=0.0313C+0.0071$ ( $r=0.9984$ ),苦参总黄酮在4.464~26.784 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与吸光度呈良好线性关系。

**2.3 总固体得率测定** 精密吸取苦参提取浓缩液样品适量,至已恒重的蒸发皿中水浴蒸干,《中国药典》2010年版一部附录IXG照干燥失重法测定,计算固形物得率。

### 2.4 单因素试验

**2.4.1 乙醇体积分数考察** 准确称取苦参药材11份,每份40g,分别加6倍量水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、90%乙醇提取1h,滤过,滤液减压浓缩,定容至200mL量瓶中,分别测定苦参碱与氧化苦参碱总和( $Z$ ),总黄酮含量,计算其提取

率及样品干膏得率,结果见图1。

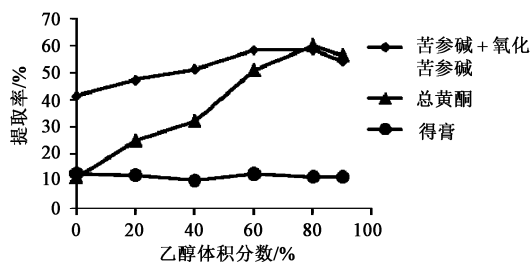


图1 不同乙醇体积分数对苦参提取工艺的影响

**2.4.2 溶媒倍量考察** 准确称取苦参药材5份,每份40g,分别加4,6,8,10,12倍量60%乙醇提取1h,滤液减压浓缩定溶至200mL量瓶中,各考察指标测定结果见图2。

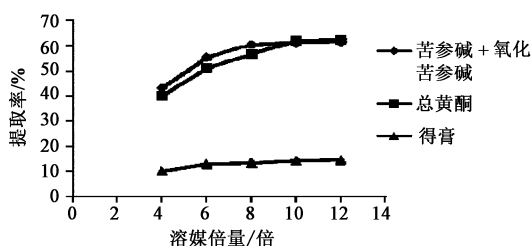


图2 不同溶媒倍量对苦参提取工艺的影响

**2.4.3 提取时间考察** 准确称取苦参药材5份,每份40g,分别加6倍量60%乙醇,分别于20,40,60,80,100min提取1次,滤过,滤液减压浓缩,定容至200mL量瓶中,各考察指标测定结果见图3。

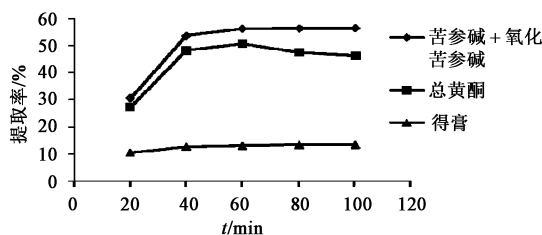


图3 不同提取时间对苦参提取工艺的影响

**2.4.4 提取次数考察** 准确称取苦参药材40g,加6倍量60%乙醇,提取3次,每次1h,各指标成分第1次提取量占总量的绝大部分,前2次提取量占总提取量的比例为86.63%,总黄酮99.34%,得膏率89.91%。故选择提取2次。

### 2.5 星点设计-效应面法优化苦参提取工艺

**2.5.1 试验设计** 在单因素试验考察的基础上,进一步采用星点设计效应面法优化提取工艺,确定回流提取的考察因素为提取次数、乙醇体积分数、提取时间和溶媒倍量。提取次数确定为2次,其余因素根据星点设计的原理,每个因素设5水平,用代码值 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 来表示(3因素星点设计的 $\alpha =$

1.682)。代码值所代表的实际操作物理量见因素水平表 1。以 Z 提取率、苦参总黄酮提取率、总固形物得率为考察指标,其中苦参碱、氧化苦参碱作为苦参生物碱药效作用代表成分,苦参总黄酮亦为苦参药效作用的重要组分,选择其作为评价指标之一,权重系数各定为 0.4。总固形物得率权重系数定为 0.2。采用星点设计优化提取条件,试验安排及结果见表 2。

表 1 苦参提取工艺星点设计因素水平

水平	A 溶媒倍量 /倍	B 提取时间 /min	C 乙醇体积 分数/%
+1.682	11.36	93.64	91.82
+1	10	80	85
0	8	60	75
-1	6	40	65
-1.682	4.64	26.36	58.18

表 2 苦参提取工艺星点试验安排

No.	A	B	C	Z 提取 率/%	总黄酮提 取率/%	得膏率 /%	综合 得分
1	-1	-1	-1	64.04	61.42	17.14	68.65
2	1	-1	-1	85.05	79.24	24.51	91.56
3	-1	1	-1	70.67	70.67	19.02	77.13
4	1	1	-1	85.19	87.37	23.04	94.04
5	-1	-1	1	80.21	76.67	23.24	87.31
6	1	-1	1	93.66	89.36	21.33	97.14
7	-1	1	1	80.43	80.88	18.60	85.49
8	1	1	1	91.61	86.43	21.93	95.45
9	-1.682	0	0	86.03	81.16	16.48	86.28
10	1.682	0	0	93.38	88.10	23.84	98.51
11	0	-1.682	0	68.92	65.02	19.21	74.02
12	0	1.682	0	81.50	76.89	20.31	85.57
13	0	0	-1.682	85.49	79.16	20.80	88.68
14	0	0	1.682	85.22	81.39	20.55	89.36
15	0	0	0	86.29	83.40	20.27	90.48
16	0	0	0	90.96	85.81	19.98	93.31
17	0	0	0	90.08	84.98	20.27	92.80
18	0	0	0	85.91	82.05	19.95	89.45
19	0	0	0	93.97	89.65	20.67	96.86
20	0	0	0	87.03	83.10	20.67	90.98

2.5.2 模型拟合 将所得数据用 Design-Expert 7.1.5 软件进行效应面试验分析,以各考察指标的综合得分为效应值,对各因素进行多元线性回归和

二项式拟合。

多元线性回归方程

$$R = 39.970 + 2.935A + 0.098B + 0.257C (r = 0.06329), F_{(3,16)} = 2.63$$

二项式拟合方程

$$R = -180.047 + 13.019A + 2.230B + 3.441C - 0.018AB - 0.125AC - 0.009BC + 0.025A^2 - 0.011B^2 - 0.011C^2 (r = 0.9456)$$

从拟合方程的相关系数可见,多元线性回归方程的相关系数较低,表示自变量与因变量之间线性相关性较差,多元线性回归拟合度不佳,预测性较差,因此该数学模型不合适。多元二项式拟合方程相关系数较高,拟合效果较好。其中,A,B,C,A<sup>2</sup>,B<sup>2</sup>及 C<sup>2</sup> 项为 3 因素对指标的单独作用,而 AB、AC 和 BC 项为因素的交互作用,方程从整体上反映了各因素及其相互作用对指标值的影响。

2.5.3 方差分析 采用 ANOVA 分析效应面的回归参数。由表 3 可知溶媒倍量线性项,提取时间二次项达极显著水平,乙醇体积分数线性项达显著水平,所有交互项未达显著性。二项式回归方程失拟检验不显著,说明未知因素对试验结果干扰很小。拟合检验极显著,说明该方程与实际情况拟合很好,较好地反映了各考察指标综合得分与溶媒倍量,提取时间和乙醇体积分数的关系,可以对不同条件下提取结果进行预测。

表 3 效应面二次模型的方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	979.121	9	108.791	6.651	0.003 3 <sup>2)</sup>
A	470.502	1	470.502	28.764	0.000 3 <sup>2)</sup>
B	52.866	1	52.866	3.232	0.102 4
C	90.469	1	90.469	5.531	0.040 5 <sup>1)</sup>
AB	4.311	1	4.311	0.264	0.618 8
AC	50.157	1	50.157	3.066	0.110 5
BC	26.230	1	26.230	1.604	0.234 1
A <sup>2</sup>	0.149	1	0.149	0.009	0.925 9
B <sup>2</sup>	273.075	1	273.075	16.694	0.002 2 <sup>2)</sup>
C <sup>2</sup>	17.197	1	17.197	1.051	0.329 4
残差	163.572	10	16.357		
失拟项	128.350	5	25.670	3.644	0.091 1
纯误差	35.222	5	7.044		
总误差	1142.693	19			

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

2.5.4 效应面优化、预测与验证 根据二次多项式模型,绘制各考察指标综合得分与各自变量间的三维效应曲面图及等高线图(图 4)。

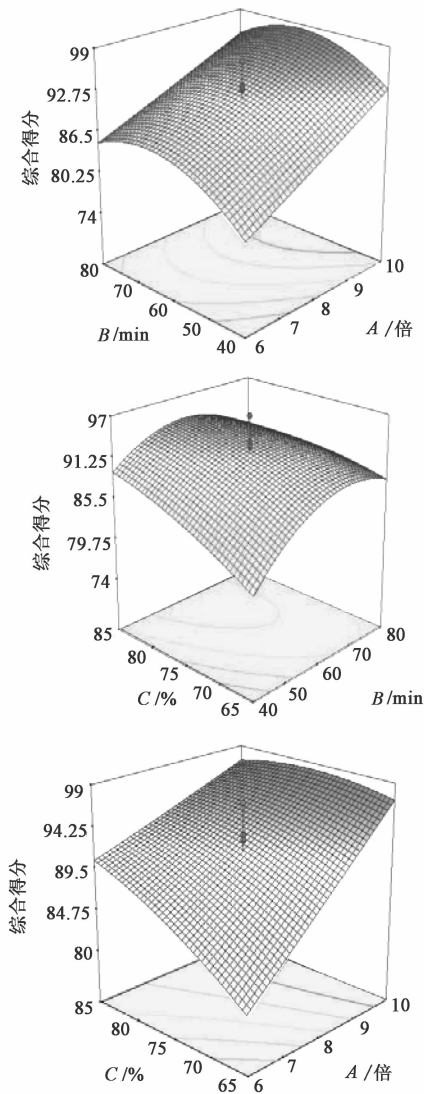


图4 因素A,B,C间对综合得分的三维效应面及等高线的影响

Design Expert 软件为效应面分析提供了最佳条件优化模块,在进行数字化优化时,根据各素水平设定各因素自变量区间,效应值选择极大值,得到最佳提取工艺条件:溶媒倍量 11.36 倍,提取时间 65.78 min,乙醇体积分数 65.11%,此时效应值综合得分预测值 103.36。考虑到实际生产情况,将各因素条件取整,确定苦参最佳提取工艺条件:提取 2 次,每次加 11 倍量 65% 乙醇提取 65 min。

**2.5.5 验证试验** 在选取的最佳提取工艺条件下,分别称取 40 g 苦参药材 3 份进行实验验证,结果平均 Z 提取率 92.78%,平均总黄酮提取率 90.83%,平均得膏率 24.02%,偏差率为 -3.34%,RSD

1.30,表明所建立的数学模型具有良好的预测性,所选工艺条件稳定性、重现性好。

$$\text{偏差率} = (\text{实际值} - \text{预测值}) / \text{预测值} \times 100\%$$

### 3 讨论

星点设计各因素水平范围及中心点的确立应建立在前期的单因素考察基础上,可避免所选择的中心点由于偏离较优区过远,而造成对最佳值点预测的偏差。结合实际生产需求合理选择星点设计中的因素水平范围及中心点值,才能体现该法对最佳值点预测的精准性。星点设计不适宜对计数资料等非连续变量进行考察,以非连续变量作为星点设计的考察因素,则无法保证拟合模型具有较好的预测性能,建议在试验优化时尽量选用连续变量,对非连续变量宜分别考察。

目前苦参的提取研究,多以苦参生物碱类或黄酮类物质等单一指标评价提取工艺,本研究以苦参碱、氧化苦参碱、苦参总黄酮提取率及干浸膏得率为指标,对各指标测定值经标准化处理,加权归一得综合得分,进行综合评判,选择提取工艺,能体现中药多成分、多途径、多靶点的综合作用特点。本工艺方法简便,稳定,成本低,苦参碱、氧化苦参碱及苦参总黄酮提取率高,适合工业化生产。

### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010;附录 VID, IX G.
- [2] 丁懿,许磊,潘卫三,等.苦参类生物碱的研究概况[J].辽宁药物与临床,2001,4(4):182.
- [3] 倪士峰,刘惠,孙平文,等.苦参药理学研究新进展[J].时珍国医国药,2008,19(6):1506.
- [4] 赵慧娟,孙文基.苦参中黄酮类化合物的化学成分及药理研究进展[J].中药材,2005,28(3):247.
- [5] 全燕,王锦玉,张镨镔,等.苦参总生物碱提取纯化工艺研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):19.
- [6] 田宝成,贾昌平,杨军涛,等.Box-Behnken 效应面法优化红早莲总黄酮提取工艺的研究[J].中成药,2010,32(3):389.
- [7] Branchu S, Forbes R T, York P, et al. A central composite design to investigate the thermal stabilization of lysozyme [J]. Pharm Res, 1999, 16(5):702.
- [8] 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.

[责任编辑 全燕]