

# 响应面法优化黄芩中黄芩苷闪式提取工艺

范成杰\*, 江道峰, 凌宗士

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部  
共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 利用响应面分析方法优化黄芩苷闪式提取工艺条件。方法: 以 HPLC 测定黄芩苷含量, 以黄芩苷得率为指标, 单因素试验考察乙醇体积分数、提取时间及料液比; 采用 Box-Behnken 设计、响应面分析统计学方法对工艺参数进行优化。结果: 最佳工艺条件为 14 倍量 70% 乙醇提取 102 s, 在此条件下得到黄芩苷的实测值达 13.588%, 理论值可达 13.592%, 两者较吻合。结论: 闪式提取法是一种高效、快速提取黄芩中黄芩苷的方法。

**[关键词]** 黄芩苷; 闪式提取; 响应面法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0048-04

## Optimization of Flash-type Extraction Technology of Baicalin from *Scutellaria baicalensis* by Response Surface Methodology

FAN Cheng-jie\*, JIANG Dao-feng, LING Zong-shi

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese herbal medicines, Ministry of Education, Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Traditional Chinese Medicine Constructioned by China and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize flash-type extraction technology of baicalin from *Scutellaria baicalensis* by response surface methodology (RSM). **Method:** With yield of baicalin as index, the content of baicalin was determined by HPLC. Concentration of ethanol, extracting time and liquid-material ratio were selected by single-factor test; Technology parameters were optimized by Box-Behnken design and response surface analysis statistical method. **Result:** Optimal extraction technology conditions were as follows: concentration of ethanol 73%, extraction time 102 s, liquid-solid ratio 14:1 (mL:g), under these optimum conditions, measured value of baicalin was 13.588%, it was in line with theoretical value of 13.592%. **Conclusion:** Flash-type extraction was proved to be a kind of efficient and rapid method for extraction of baicalin from *S. baicalensis*.

**[Key words]** baicalin; flash-type extraction; response surface methodology

黄芩苷是黄芩中的主要有效成分, 具有抗菌、消炎等作用<sup>[1-2]</sup>。传统的提取方法有温浸、煎煮、加热回流、索氏等。闪式提取法具有提取快速、完全, 且不需加热的特点, 可以节约大量的时间、溶剂和能源<sup>[3]</sup>。本研究采用闪式提取法对黄芩进行提取, 且

采用 Box-Behnken 法进行试验设计并通过响应面分析法对黄芩苷闪式提取工艺进行了优化, 以确定最佳提取条件, 为黄芩开发利用提供参考。

### 1 材料

黄芩药材经成都中医药大学药用植物教研室卢先明教授鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 200512), 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

TU-1901 型双管束紫外-可见分光光度计(北京

**[收稿日期]** 20110702(006)

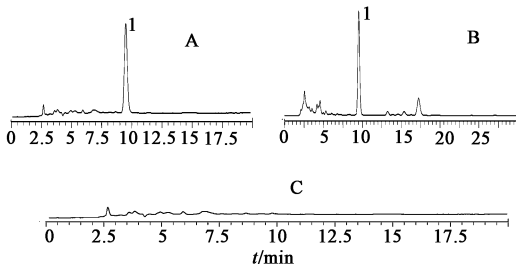
**[通讯作者]** \* 范成杰, 实验师, 从事中药质量控制与标准化实验技术研究, Tel: 13808031684, E-mail: fejedutem@163.com

普析通用仪器有限公司), LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津), R-205 型旋转蒸发仪(上海申胜生物技术有限公司), BP-211D 型电子天平(德国 Sartorius), JHBE-50S 型闪式提取器(河南金鼎科技发展有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 指标成分的测定<sup>[4-5]</sup>

**2.1.1 色谱条件与系统适用性试验** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-冰醋酸(50:50:1), 检测波长 277 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温, 25 °C, 进样量 10 μL。理论塔板数按黄芩苷峰计算均不低于 3 500(图 1)。



A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 黄芩苷

图 1 黄芩 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芩苷对照品 3.14 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液(0.062 8 g·L<sup>-1</sup>)。精密量取对照品储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.1.3 供试品溶液的制备** 取约 4 g 黄芩, 精密称定, 研细, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 的甲醇 25 mL, 密塞称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 用 50% 的甲醇稀释至刻度, 摇匀, 静置后精密量取上清液 20 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

**2.1.4 线性关系考察** 分别精密吸取质量浓度为 6.28 mg·L<sup>-1</sup> 的黄芩苷对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL, 注入色谱仪, 依法测定, 以峰面积为纵坐标, 黄芩苷质量浓度为横坐标, 作线性回归, 得回归方程  $Y = 334\ 331X - 348.6$  ( $r^2 = 0.999\ 8$ )。结果表明进样量在 0.012 55 ~ 0.125 6 μg 与黄芩苷峰面积值呈现良好的线性关系。

**2.1.5 精密度试验** 取黄芩苷对照品溶液, 依法连续测定 6 次。结果峰面积的 RSD 0.61%, 表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 取同一批药材 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备溶液并依法测定。结果 RSD 1.23%, 表明方法重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时进样测定。结果黄芩苷峰面积的 RSD 2.25%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.1.8 加样回收试验** 取已知含量的样品约 2 g 共 9 份, 按 2.1.3 项下方法制备溶液并定容至 200 mL, 各取 1 mL, 分别加入定量的对照品溶液 2.0, 2.5, 3.0 mL(分别约相当于样品量得 80%, 100%, 120%)各 3 份, 分别按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芩苷回收率试验

No.	含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	16.610	12.56	29.157	99.96	99.89	0.76
2	16.618	12.56	28.803	98.71		
3	16.607	12.56	29.221	100.19		
4	16.618	15.70	32.225	99.71		
5	16.602	15.70	32.406	100.32		
6	16.607	15.70	32.338	100.10		
7	16.626	18.84	35.422	99.88		
8	16.615	18.84	35.901	101.26		
9	16.610	18.84	35.057	98.89		

**2.1.9 黄芩样品含量测定** 取 3 份黄芩供试品溶液, 按既定的方法测定。结果黄芩苷含量分别为 12.436%, 12.645%, 12.016%。

**2.2 提取条件单因素考察** 精密称取黄芩药粉 20 g, 分别加入一定量不同体积分数乙醇, 闪式提取一定时间, 过滤, 取上清液, 浓缩, 得浸膏。以黄芩苷为指标, 选取乙醇体积分数、液料比、提取时间进行单因素试验。

**2.2.1 乙醇体积分数对黄芩苷提取率的影响** 加入 16 倍量乙醇, 乙醇体积分数分别为 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 时, 黄芩苷的提取率分别为 7.2%, 9.4%, 11.6%, 13.0%, 12.8%, 12.3%, 故确定最佳乙醇体积分数为 70%。

**2.2.2 液料比对黄芩苷提取率的影响** 分别加液料比为 6, 8, 12, 16, 20, 24 70% 乙醇, 黄芩苷的提取率分别为 6.4%, 9.1%, 12.3%, 12.8%, 12.5%, 12.4%, 故确定最佳液料比为 16。

**2.2.3 提取时间对黄芩苷提取率的影响** 取 16 倍

量 70% 乙醇, 提取时间为 40, 60, 80, 100, 120, 140 s 时, 黄芩苷的提取率分别为 7.3%, 7.5%, 11.0%, 12.6%, 12.1%, 11.4%。随着提取时间的延长, 提取率提高, 当提取时间超过 100 s 后, 提取率略有下降。故确定最佳提取时间为 100 s。

### 2.3 响应面分析法优化提取工艺条件<sup>[6]</sup>

**2.3.1 Box-Behnken 设计** 采用响应面方法中的 Box-Behnken 设计, 选择提取温度、乙醇体积分数、乙醇用量 3 个因素, 做 3 因素 3 水平共 17 个试验点 (5 个中心点) 的响应面分析试验, 通过 Design Expert 7.1.3 软件, 对提取工艺进行分析, 建立数学模型, 得到最佳工艺参数。因素与水平设计见表 2。

表 2 黄芩苷提取工艺 Box-Behnken 设计因素水平

水平	X <sub>1</sub> 乙醇体积分数/%	X <sub>2</sub> 液料比/倍	X <sub>3</sub> 提取时间/s
-1	60	6	60
0	75	12	90
+1	90	18	120

根据 Box-Behnken 设计进行试验, 采用响应面法对主要影响参数进行优化, 采用 Design Expert 7.1.3 统计软件进行试验设计与回归分析。试验结果见表 3, 回归分析结果见表 4。

表 3 黄芩苷提取工艺 Box-Behnken 试验设计

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	增殖率/%
1	90	12	120	11.171
2	75	6	120	9.787
3	90	6	90	8.999
4	90	12	60	6.985
5	75	12	90	13.011
6	60	12	120	11.648
7	75	12	90	12.922
8	75	18	60	8.086
9	60	12	60	8.138
10	90	18	90	11.395
11	75	12	90	13.011
12	75	12	90	13.189
13	75	12	90	13.073
14	60	18	90	11.826
15	60	6	90	9.349
16	75	18	120	11.883
17	75	6	60	7.188

表 4 提取工艺回归分析 (E 用阿拉伯数字表示)

方差来源	f	SS	MS	F	P
X <sub>1</sub>	1	0.74	0.74	6.53	0.037 8
X <sub>2</sub>	1	7.74	7.74	68.01	<0.000 1
X <sub>3</sub>	1	24.92	24.92	219.06	<0.000 1
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	1.64 × 10 <sup>-3</sup>	1.64 × 10 <sup>-3</sup>	0.014	0.907 8
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	0.12	0.12	1.09	0.332 0
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	0.36	0.36	3.15	0.119 0
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1	6.09	6.09	53.58	0.000 2
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	8.80	8.80	77.38	<0.000 1
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	1	23.44	23.44	2 006.05	<0.000 1
Model	9	76.20	8.47	74.43	<0.000 1
误差	4	0.039	0.039		

**2.3.2 模型拟合** 采用 Design Expert 软件, 对表 3 中的数据进行多元回归拟合, 选择对响应值显著的各项, 可得乙醇体积分数、液料比、及提取时间与黄芩苷的二次多项回归方程, 回归方程为  $Y = -45.561 + 0.749X_1 + 0.995X_2 + 0.481X_3 - 2.250 \times 10^{-4}X_1X_2 + 3.906 \times 10^{-4}X_1X_3 + 1.664 \times 10^{-3}X_2X_3 - 5.347 \times 10^{-3}X_1^2 - 0.040X_2^2 - 2.622 \times 10^{-3}X_3^2$ 。回归方程高度显著, 相关系数  $R = 0.994 8$ 。故回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系, 可以利用该回归方程确定 3 个参数的最佳水平。模型预测最大响应值为 13.592%。由分析结果可算出各因素的最佳取值: 乙醇体积分数 73%, 液料比 14, 提取时间 102 s。

**2.3.3 响应面分析法优化** 响应曲面图及等高线图可以直观反映各因素交互作用对响应值的影响, 见图 4~6。通过该组图即可对任何 2 因素交互影响黄芩苷提取的效应进行分析与评价, 并确定最佳因素水平范围。

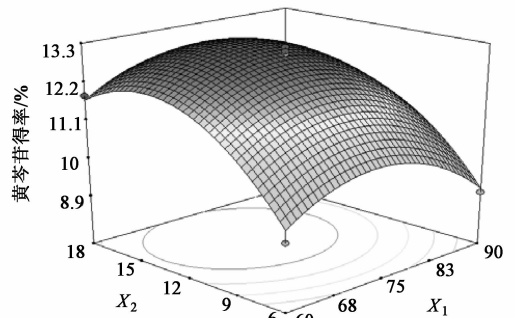


图 2 乙醇体积分数与液料比对黄芩苷得率影响的响应面及等高线

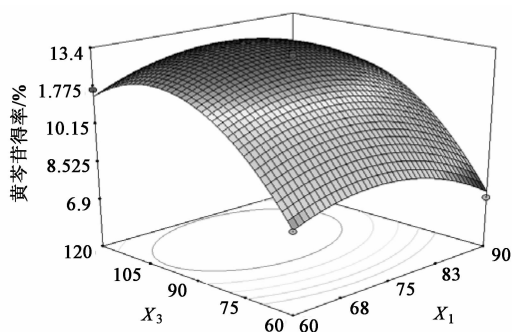


图3 提取时间与乙醇体积分数对黄芩苷得率影响的响应面及等高线

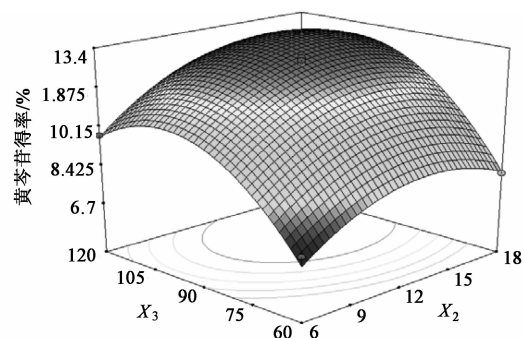


图4 提取时间与液料比对黄芩苷得率影响的响应面及等高线

**2.3.4 模型的验证** 为了验证黄芩苷提取模型方程的适用性,选取乙醇体积分数73%,液料比14,提取时间102 s,重复试验3次,得到黄芩苷的提取率达13.588%。与理论值吻合较好,说明利用响应面分析法得到的提取工艺参数是真实可靠、具有实用价值的。

### 3 讨论

本研究以黄芩为原料,以黄芩苷含量为指标,在单因素试验的基础上采用三因素三水平的响应面分析法,建立了黄芩苷含量与各因素的回归方程,并得到以黄芩苷含量为响应值的响应面图和等高线图,通过对试验结果的分析比较,确定最佳提取工艺条件为加14倍量73%乙醇提取102 s,在此条件下黄芩苷的理论含量可达13.592%。表明闪式提取法是一种高效、快速提取黄芩中黄芩苷的方法。

### [参考文献]

- [1] 王浴生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:100.
- [2] 冉先德. 中华药海. 上卷·第1册[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1998:435.
- [3] 袁珂,刘延军,冀春茹. 中草药化学成分研究中几种不同提取方法的比较研究[J]. 天然产物研究与开发,1997,9(4):57.
- [4] 方婧,付梅红,杨洪军,等. 微波协助提取在中药饮片含量测定中的应用——微波法与药典法测定黄芩中黄芩苷含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):119.
- [5] 费超,陈然,曹杰,等. HPLC测定芩翘抗感颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):63.
- [6] 周向军,高义霞,张霞. 响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):29.

[责任编辑 全燕]