

星点设计-响应面法优选地桃花中总黄酮的提取工艺

谢臻, 陈勇*, 曾海生, 韦韬, 卢森华
(广西中医学院药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 优选地桃花中总黄酮的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、提取时间、溶剂量为考察因素, 采用星点设计-响应面法, 以地桃花中总黄酮的提取率为指标, 优化地桃花的提取工艺条件。结果: 确定最优提取工艺为 55% 乙醇, 回流提取时间 21 min, 溶剂量 17 mL。结论: 优选得到的地桃花总黄酮提取工艺, 方法简便。以此条件进行提取, 可得到较高的总黄酮含量。

[关键词] 地桃花; 星点设计; 响应面; 总黄酮

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0027-04

Application of CCD-RSM for Optimization of Total Flavonoids Extraction in *Urena lobata*

XIE Zhen, CHEN Yong*, ZENG Hai-sheng, WEI Tao, LU Sen-hua

(Faculty of Pharmacy, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extracting process of total flavonoids for *Urena lobata*. **Method:** Independent variables were ethanol concentration, reflux time, and solvent, dependent variables were extracting rate of total flavonoids. Central composite design and response surface methodology were used to optimize the extracting process. **Result:** Analysis indicated that the optimum conditions were 55% ethanol, 21 min, 17 mL solvent for extractable conditions. **Conclusion:** The optimum process is simple and more convenient for extracting, by which higher total flavonoids content in *Urena lobata* L. can be obtained.

[Key words] *Urena lobata*; central composite design; response surface methodology; total flavonoids

地桃花为锦葵科植物肖梵天花 *Urena lobata* L. 的干燥地上部分^[1], 又名肖梵天花、野棉花、狗脚迹等, 主产于广西、云南、贵州等地, 具有祛风利湿活血消肿、清热解毒功效, 主治感冒, 风湿痹痛, 痢疾, 泄泻, 淋证, 月经不调, 带下, 跌打肿痛, 喉痹, 乳痈, 毒蛇咬伤等症^[2]。地桃花中含有黄酮类^[3-4]、酚酸

类^[5-6]、挥发油^[7]和酯类^[8]等成分。国内外未见对地桃花药材总黄酮含量测定及提取工艺的研究。本实验以总黄酮提取率为考察指标, 采用星点设计-响应面法优选地桃花总黄酮提取工艺, 为地桃花药材的质量控制及开发提供科学依据。

1 仪器与试剂

Agilent 8453 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所提供, 供含量测定用, 批号 100081-200406), METTLER-AE100 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); 水为纯净水, 其他试剂为分析纯; 地桃花分别采于广西各个产地, 经广西中医学院刘寿养副教授鉴定为锦葵科植物肖梵天花 *U. lobata* 的地上部分。

2 方法

2.1 星点设计试验 根据预试验结果, 考察因素为

[收稿日期] 20110216(005)

[基金项目] 广西中医学院重点课题(ZD09011); 广西研究生教育创新计划项目(2009106001007M)

[第一作者] 谢臻, 博士, 讲师, 从事中药质量控制、复方配伍研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: xie_zhen@126.com

[通讯作者] * 陈勇, 教授, 硕士研究生导师, 从事药物分析、中药制剂分析的教学与科研, Tel: 0771-2948376, E-mail: cy6381@163.com

乙醇体积分数、提取时间和溶剂量。因提取次数为非连续变量,不能进行回归处理,结合预试验结果和工业生产的实际,暂固定为 1 次。因素的水平见表 1。

表 1 地桃花中总黄酮提取工艺星点设计因素与水平

水平	X_1 乙醇体积分数	X_2 时间	X_3 溶剂量
	/%	/min	/mL
-1.633	17.3	17.3	6.8
-1	30	30	10
0	50	50	15
1	70	70	20
1.633	82.6	82.6	23.2

2.2 总黄酮含量测定方法

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定芦丁对照品适量,置 50 mL 量瓶中,加 55% 乙醇至刻度,得 0.248 0 g·L⁻¹ 的对照品溶液,摇匀,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取地桃花药材粉末约 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入 55% 乙醇 17 mL,摇匀,加热回流 21 min,放冷,滤过,水浴浓缩至约 5 mL,并转移至 10 mL 量瓶中,用 55% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 最大吸收波长的确定^[9] 精密吸取上述芦丁对照品溶液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,加 55% 乙醇 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,室温放置 6 min,再加入 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,室温放置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,加 55% 乙醇至刻度,摇匀,室温放置 15 min,以相应试剂为空白,照紫外-可见分光光度法《中国药典》2010 年版一部附录 VA),于 200 ~ 800 nm 扫描,结果在 510 nm 处有最大吸收,故以 510 nm 为测定波长。

2.3 响应面优化 响应面法是通过建立响应值与被考察因素的函数关系,从响应面上选择最佳的响应值,从而回推出自变量取值范围即最佳实验条件的方法。本次试验响应曲面待拟合方程为 $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 +$

$b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3$ 。运用统计分析软件对实验数据进行多元回归和方差分析,得回归方程,再根据回归方程,绘制出响应曲面图。

3 结果

3.1 总黄酮含量测定

3.1.1 标准曲线的测定 精密量取上述芦丁对照品溶液 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中,分别加 55% 乙醇 6 mL;加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,室温放置 6 min;加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,室温放置 6 min;分别加 4% 氢氧化钠溶液 10 mL,加 55% 乙醇至刻度,摇匀,室温放置 15 min,在 510 nm 测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标,对照品质量浓度 $X(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,得线性回归方程 $A = 0.012 2X - 0.040 6 (r = 0.999 4)$,线性范围 19.84 ~ 69.44 mg·L⁻¹。

3.1.2 精密度试验 取同一对照品溶液,连续测定 6 次,对照品溶液吸光度平均值为 0.233 3, RSD 0.06%,表明测定方法的精密度良好。

3.1.3 稳定性试验 取供试品溶液 1 份,每间隔 5 min 测定吸光度,在 30 min 内,吸光度平均值为 0.471 4, RSD 1.44%,说明供试品溶液在 30 min 内显色稳定。

3.1.4 重复性试验 取同一批次地桃花药材 6 份,按 2.2.2 和 2.2.3 项下供试品溶液的制备及显色方法处理样品,于 510 nm 测定吸光度并计算总黄酮含量。结果总黄酮平均质量分数为 33.88 mg·g⁻¹, RSD 0.97%,表明方法的重复性良好。

3.1.5 加样回收率试验 取已知含量地桃花药材粉末 6 份,每份约 0.25 g,精密称定。分别置锥形瓶中,各加入芦丁对照品溶液(1.286 0 g·L⁻¹) 5 mL,按 2.2.2 项下供试品溶液的制备方法制备,再按 2.2.3 项下显色方法处理样品,于 510 nm 测定吸光度,计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 总黄酮加样回收率

No.	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.250 3	5.358	6.43	11.757	9.51	99.65	2.33
2	0.250 3	5.358	6.43	11.770	99.72		
3	0.250 5	5.362	6.43	12.034	103.75		
4	0.250 4	5.360	6.43	11.777	99.79		
5	0.250 2	5.356	6.43	11.577	96.75		
6	0.250 4	5.360	6.43	11.685	98.37		

3.2 试验数据的统计分析 取地桃花药材粉末 0.5 g,精密称定,按表 4 试验号进行提取,滤过,提取液浓缩至 10 mL,按照上述测定方法,测定地桃花中总黄酮的含量,结果见表 3。

表 3 星点试验设计

No.	X_1	X_2	X_3	总黄酮 /mg·g ⁻¹
1	-1	-1	-1	11.7
2	-1	1	1	17.99
3	1	-1	1	25.91
4	1	1	-1	18.58
5	0	0	0	26.06
6	0	0	0	25.34
7	-1	-1	1	20.81
8	-1	1	-1	9.98
9	1	-1	-1	19.67
10	1	1	1	23.15
11	0	0	0	24.73
12	0	0	0	26.37
13	-1.633	0	0	11.87
14	1.633	0	0	19.49
15	0	-1.633	0	25.62
16	0	1.633	0	22.66
17	0	0	-1.633	14.11
18	0	0	1.633	30.45
19	0	0	0	23.37
20	0	0	0	27.82

应用 STATISTICA 7.0 软件包对按星点设计矩阵获得的数据进行多元回归与方差分析,得优化后的二次多项式方程 $Y = -38.409137 + 1.276832X_1 + 3.101185X_3 - 0.01011X_1^2 - 0.000565X_2^2 -$

$0.062904X_3^2 - 0.007904X_1X_3$ ($r=0.96996$) 表明有 96.996% 总黄酮提取率的变差归因于 3 个因素的变化,也说明了只有 3.004% 的变差不被此方程所解释。从表 4 中的各个 P 值可以看出乙醇体积分数 (X_1)、溶剂量 (X_3) 的线性效应和二次效应都有较高的显著性 ($P < 0.01$),说明在提取条件中,乙醇浓度和溶剂量细微的变差就会在一定程度上影响总黄酮含量的变化。(X_1X_3) 项没有显著性差异,但如果除去这一项,各项的 P 值均变大,方程的 r 值变小,说明 (X_1X_3) 项对整个方程的拟合程度有一定的影响,因此保留了这一项。

表 4 非线性评估系数(回归系数显著性)

No.	相关系数	相关系数值	标准误	t -值	P
常数	B_0	-38.409137	6.890525	-5.574196	0.000090 ²⁾
X_1	b_1	1.276832	0.149516	8.539742	0.000001 ²⁾
X_3	b_3	3.101185	0.643388	4.820086	0.000335 ²⁾
X_1^2	b_4	-0.010110	0.001169	-8.651499	0.000001 ²⁾
X_2^2	b_5	-0.000565	0.000229	-2.470698	0.028098 ¹⁾
X_3^2	b_6	-0.062904	0.018697	-3.364330	0.005079 ²⁾
X_1X_3	b_8	-0.007904	6.890525	-5.574196	0.211928

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 响应曲面图绘制及工艺条件优化 根据拟合的二次多项式方程,绘制总黄酮含量随因素变化的响应面图,确定地桃花的最佳工艺条件,结果见图 1。对方程进行求导,可得当提取条件为 54.86% 乙醇、提取时间为 21.21 min,溶剂比为 17.34 mL 时, Y 有预测的最大值 29.33 mg·g⁻¹。地桃花的最佳提取条件为 55% 乙醇、提取时间为 21 min,溶剂比为 17 mL。

3.4 验证试验 根据最佳工艺条件测定地桃花药材中总黄酮的含量,平均质量分数为 33.90 mg·g⁻¹

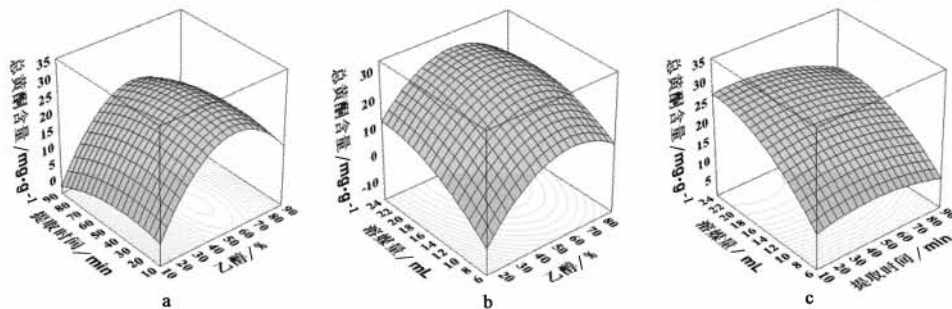


图 1 总黄酮含量响应曲面

a. 乙醇体积分数与提取时间; b. 乙醇体积分数与溶剂量; c. 提取时间与溶剂量

(RSD 0.51%, $n = 3$, 预测值 $29.33 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。结果表明,应用优化得到的工艺条件,可得到较高的总黄酮提取率。

3.5 样品测定 取不同产地样品各 3 份,精密称定。以上述方法测定并计算药材中总黄酮的含量。结果见表 6。

表 6 不同产地样品中总黄酮质量分数

产地	总黄酮/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	产地	总黄酮/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
广西博白	33.77	广西玉林	21.41
广西南宁	75.40	广西蒙山	90.10
广西北流	74.18	广西来宾	67.30

4 讨论

研究表明,不同产地的药材,总黄酮含量有较大变化,其中以广西蒙山产药材含量较高。本实验分别以博白产和蒙山产药材为标准确定样品的取样量,保证供试品溶液吸光度值落在 0.2 至 0.8 之间。在预试验中,比较了不同提取温度,甲醇和乙醇作为溶剂的提取效果,结果以采用乙醇在 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 时回流提取,总黄酮的提取率较好。本实验中考察因素溶剂量以 mL 为单位而不是倍数。如果以倍数计算,跨越太大,量取的误差也大,量太少不能完全浸泡过药材粉末,会影响回流提取的效果。本研究采用星点设计的方法设计试验矩阵,对地桃花中总黄酮的提取率进行优化,将拟合得到的二次多项式方程进行求导,计算提取率最高时被考察因素精确的提取条件。星点设计法在国内外药学领域已经得到了广泛的应用^[10-12],其原理是计算各因素和响应值之间的非线性函数关系。此方法有专业的数学软件(如 STATISTICA)模块来计算和分析,以及相关的文献介绍如何运用 STATISTICA 软件进行方程拟合^[13],具有实验设计方便、分析快速的优点。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:

广西科学技术出版社,1992:42,180.

- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 14 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:372.
- [3] 贾陆,敬林林,周胜安,等. 地桃花化学成分研究 I 黄酮类化学成分[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(9):662.
- [4] 谢臻,陈勇,韦韬. 地桃花化学成分预试验及紫外-可见光谱研究[J]. 广西科学院学报,2010,26(3):225.
- [5] 贾陆,郭海波,敬林林,等. 地桃花化学成分研究 II 酚酸类等化学成分[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(10):746.
- [6] Jia L, Bi Y F, Jing L L, et al. Two new compounds from *Urena lobata* L[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(11):962.
- [7] 杨彪,郭新东,宋小平,等. 肖梵天花挥发油的气相色谱-质谱分析[J]. 广东化工,2009,36(11):124.
- [8] Carlo F Morelli, Paola Cairolì, Giovanna Speranza. Triglycerides from *Urena lobata* [J]. Fitoterapia, 2006, 77:296.
- [9] 张雪辉,赵元芬,陈建民. 甘草中总黄酮的含量测定[J]. 中国中药杂志,2001,26(11):746.
- [10] 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.
- [11] 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]. Sep. Purif Technol, 2008,60: 278.
- [12] Arockiasamy S, Banik R M. Optimization of gellan gum production by *sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design [J]. J Biosci Bioeng, 2008,105(3): 204.
- [13] 洪楠. STATISTICA for Windows 统计与图表分析教程[M]. 北京:清华大学出版社,2002:227,389.

[责任编辑 全燕]