

响应面法优化黔产金樱子总黄酮超声提取工艺^{*}

安冬琴, 王晓丽^{**}

(贵阳医学院 药用植物与生药学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 优选黔产金樱子中总黄酮的提取工艺。方法: 选取液料比、乙醇浓度和提取时间为自变量, 黔产金樱子中总黄酮的提取率为因变量, 对自变量各水平进行多元线性回归和二项式拟合, 采用响应面法选择最佳工艺条件, 并进行预测分析。结果: 确定最优提取工艺是料液比为 1:30, 乙醇浓度为 65%, 提取时间为 90 min。结论: 响应面法优化的金樱子中总黄酮的超声提取工艺简便可靠。

[关键词] 金樱子; 黄酮; 超声处理; 响应面法

[中图分类号] R931.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)05-0459-04

Optimization of Extraction Parameters of Total Flavonoids from *Rosa laevigatae Michx.* from Guizhou Applying Response Surface Technique

AN Dongqin, WANG Xiaoli

(School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the extracting process of total flavonoids in *Rosa laevigata Michx.* from Guizhou. **Method:** Selecting solid-liquid ratio, ethanol concentration and extraction time as independent variables, and yield of the total Flavonoids in *Rosa Laevigatae Michx.* from Guizhou as dependent variables. Multiple linear regression and binomial fitting was adopted to handle each level of independent variables, and determine optimized extraction process by applying response surface technique, then predict analysis results. **Result:** The best extraction process was as following: ratio of solid to liquid 1:30, ethanol concentration 65%, extraction time 90 min. **Conclusions:** This optimized extraction process is simple and reliable.

[Key words] *Rosa laevigatae Michx.*; total flavonoids; sonication; response surface method

金樱子是蔷薇科植物金樱子 (*Rosa laevigata Michx.*) 的干燥成熟果实, 又名蜂糖罐, 糖罐子、刺榆子、金壶瓶等, 临床用于遗精滑精, 遗尿尿频, 崩漏带下, 久泻久痢的治疗, 在我国西南、华南、华中、华东均有分布, 尤其以贵州省分布广, 产量高^[1-2]。《中国药典》规定金樱子的质量控制指标为多糖, 所以对其多糖研究甚多^[3-5]。在金樱子中黄酮也是含量较高的化合物, 对其提取工艺的研究很少。星点设计是在二水平析因设计的基础上增加了中心点和极值点, 具有试验次数低、精密度高等优势^[6]。本试验采用星点设计-响应面法优选金樱子的超声提取工艺, 为黔产金樱子的资源开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

芦丁标准品 (贵州省食品药品检验所, 批号 100080-200707), 金樱子: 采于黔东南晒干产品, 经贵阳医学院药学院王晓丽教授鉴定, 亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、乙醇等所以试剂均为分析纯。电子天平 HZT-A500 (福州华志科学仪器有限公司)、植物粉碎机 (河北黄骅县齐家务科学仪器厂)、标准检验筛 (浙江上虞市道墟张兴纱筛厂)、KDM 型调温电热套 (武汉精华科教仪器有限公司)、98-1-B 型电子调温电热套 (天津市泰斯特

^{*} [基金项目] 贵州省科学技术厅基金项目 (黔科合 ZY 字 (2012)3004 号)

^{**} 通信作者 E-mail: 346195348@qq.com

网络出版时间: 2015-05-21 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150521.1253.018.html>

仪器有限公司)、UV-2401 紫外分光光度计(日本岛津)、HH-2 数恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司)、101-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海路达实验仪器有限公司)、台式低速离心机(上海医疗器械有限公司分术器械厂)。

1.2 标准曲线的绘制

参照文献[7-8]绘制标准曲线。精密称取芦丁 0.012 5 g 于 25 mL 容量瓶中,加适量 60% 乙醇水浴加热使其完全溶解,在加 60% 乙醇定容,得到终浓度为 0.5 g/L 的对照品溶液。精密量取 0 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL 的 0.5 g/L 芦丁标准溶液于 15 mL 容量瓶中,再依次加 5% 亚硝酸钠 0.3 mL 摇匀静置 6 min,加 10% 硝酸铝 0.3 mL 摇匀静置 6 min,加 1mol/L 氢氧化钠 4 mL 再加 60% 乙醇定容至刻度,摇匀静置 15 min,在最大吸收波长处检测其吸光度值;再以吸光度值为纵坐标 y ,芦丁浓度为横坐标 x ,绘制标准曲线。回归方程为: $A = 4.154 4C + 0.051 6$ ($R^2 = 0.999 4$),浓度在 0.033 3 g/L ~ 0.266 7 g/L 范围内具有线性关系。

1.3 金樱子样品溶液的制备

称取金樱子粉末 2 g,置于 100 mL 三角烧瓶中,加入 60% 乙醇 40 mL,超声回流提取 2 次,每次 40 min,抽滤,用 60% 乙醇少量多次洗涤,合并两次滤液,浓缩为 10 mL,60% 乙醇定容至 100 mL,即得样品溶液。

1.4 星点设计试验

参照文献[9-11]进行星点设计实验。根据预试验结果,考虑因素为液料比、乙醇浓度和提取时间。通过 Design-Expert7.0.0 软件,根据星点设计原理,每因素 5 水平,用代码值 $-\alpha, -1, 0, 1, \alpha$ 表示三因素^[12], $\alpha = (2^3)^{1/4}$,以液料比、乙醇浓度和提取时间为自变量,金樱子总黄酮提取率为因变量进行优化,设计因素水平表见表 1,星点试验设计见表 2。用软件 Design-Expert7.0.0 软件包对各因素进行多元回归与方差分析,回归分析结果见表 3。优化后的二次多项式方程:黄酮提取率 = $+7.73 + 0.39 \times A - 0.16 \times B + 0.79 \times C - 0.18 \times A \times B - 0.029 \times A \times C - 0.11 \times B \times C + 0.12 \times A^2 - 0.30 \times B^2 - 0.35 \times C^2$ ($r = 0.972 4$),表明有 97.24% 总黄酮提取率的变差归因于 3 个因素的变化。用上述回归方程描述各因素与响应值的关系时,其因变量和全体自变量之间的线性关系显著($r = 0.972 4$),见表 3。

表 1 响应曲面因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of response surface method

因素	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
A 料液比(mL/g)	2.68	10	20	30	37.32
B 乙醇浓度(%)	52.68	60	70	80	87.32
C 提取时间(min)	8.04	30	60	90	111.96

表 2 响应面设计方案与结果

Tab. 2 Experiment design and result of response surface method

序号	A	B	C	总黄酮提取(%)
1	0	0	0	7.74
2	0	1.732	0	6.68
3	-1	1	1	7.56
4	1	-1	-1	6.93
5	1	-1	1	8.94
6	-1	-1	-1	5.97
7	1	1	-1	6.74
8	0	0	0	7.83
9	0	0	-1.732	5.35
10	-1	-1	1	7.46
11	-1	1	-1	5.88
12	1	1	1	7.67
13	1.732	0	0	8.78
14	0	0	0	7.51
15	0	0	0	7.95
16	0	-1.732	0	7.12
17	0	0	1.732	8.20
18	-1.732	0	0	7.59
19	0	0	0	7.65
20	0	0	0	7.71

表 3 回归分析结果

Tab. 3 Regression analysis results

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
回归模型	15.18	9	1.69	39.15	<0.000 1
A-液料比	2.14	1	2.14	49.63	<0.000 1
B-乙醇浓度	0.35	1	0.35	8.11	0.017 3
C-提取时间	8.72	1	8.72	202.32	<0.000 1
AB	0.27	1	0.27	6.27	0.031 2
AC	6.612E-003	1	6.612E-003	0.15	0.703 4
BC	0.099	1	0.099	2.30	0.160 5
A ²	0.24	1	0.24	5.61	0.039 4
B ²	1.46	1	1.46	33.89	0.000 2
C ²	1.89	1	1.89	43.80	<0.000 1
残差	0.43	10	0.043		
失拟项	0.32	5	0.063	2.79	0.142 3
净误差	0.11	5	0.023		
总离差	15.61	19			

1.5 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,见图 1~3。每个响应面都具有较优区域,将各较优区域重叠,可以进一步

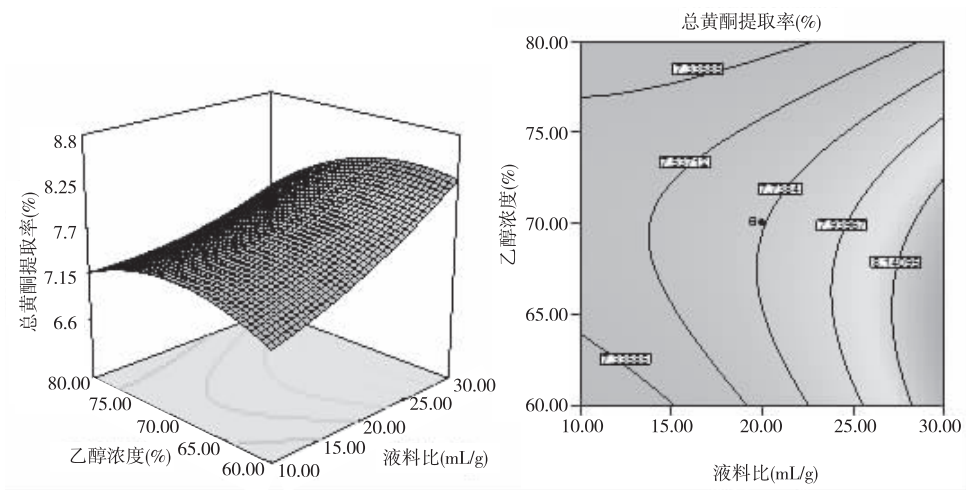


图 1 液料比和乙醇浓度影响总黄酮提取率的 3D 响应面图和等高线图
Fig.1 3D response surface and contour plot of the effect of liquid ratio and ethanol concentration on flavonoid extraction yield

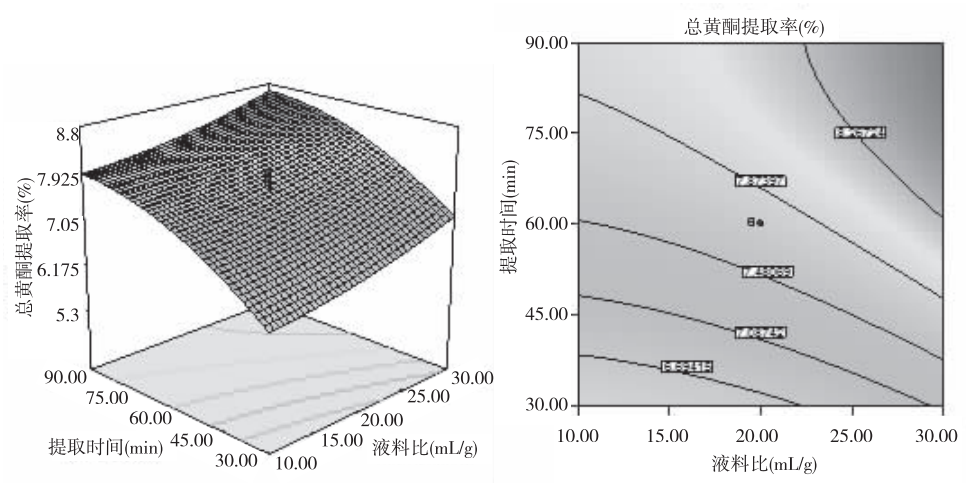


图 2 液料比和提取时间影响总黄酮提取率的 3D 响应面图和等高线图
Fig.2 3D response surface and contour plot of the effect of liquid ratio and extracting time on flavonoid extraction yield

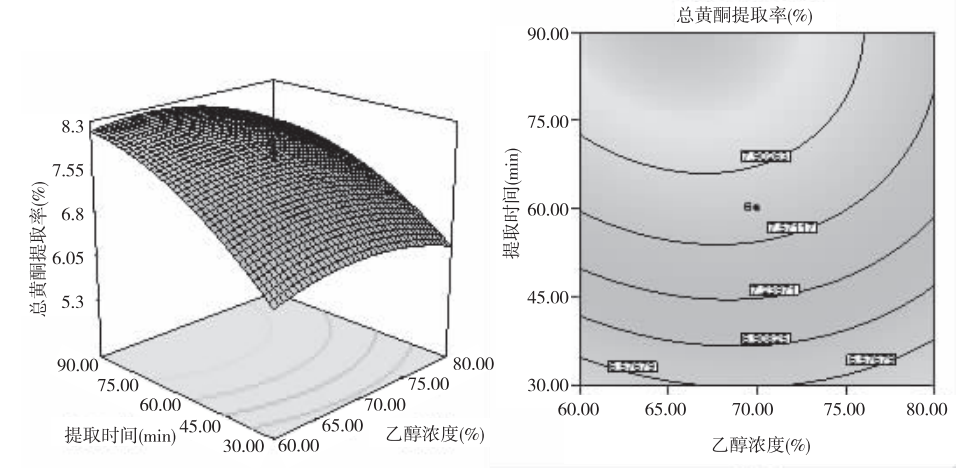


图 3 提取时间和乙醇浓度影响总黄酮提取率的 3D 响应面图和等高线图
Fig.3 3D response surface and contour plot of the effect of extracting time and ethanol concentration on flavonoid extraction yield

缩小较佳条件范围^[13]。Design ExperI 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,根据各因素水平设定各因素自变量区间,效应值选择极大值,得到黔产金樱子的最佳工艺条件为料液比 1:30,乙醇浓度 62.58%,提取时间 90 min。

1.6 验证实验

精密称取黔产金樱子 6 份,验证其试验的的适用性。为了实际操作将 Design ExperI 软件为效应面分析提供的最佳条件设为料液比 1:30、乙醇浓度 65% 和提取时间为 90 min,实际测得总黄酮提取率为 8.09%、8.57%、8.36%、7.92%、7.68%、8.18%,平均提取率为 8.13%,与预期值 8.83% 相差 0.7%。说明所建立的模型预测性较好,可用于金樱子中总黄酮提取工艺的优选。

2 讨论

本试验采用亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠显色法,以芦丁为标准品,在 496 nm 处测定吸光度值,该方法简单、易操作。

星点设计-响应面法采用非线性模型拟合,中心点试验的重复次数越多,精确度越高,本文采用 6 次重复试验,建立的方法简便合理、稳定,可预测性较优^[14];在优选的最佳工艺条件下,进行多次试验取平均值,再与数学模型预测值进行比较,实验值与预测值的偏差表示实验值偏离预测值的程度,其绝对值越小,说明预测性越好^[15-17]。所以星点设计-响应面法优选的最佳提取黔产金樱子中总黄酮的提取工艺为料液比 1:30,乙醇浓度 65%,提取时间 90 min。

2010 年版《中国药典》中用金樱子多糖的含量测定作为质量的控制指标,但市场上的金樱子质量参差不齐,还有一些掺假的现象,少数不法商贩利用糖水浸泡金樱子以增加含糖量,以次充好。所以只检测多糖含量存在一定的缺陷。试验增加金樱子有效成分总黄酮的含量测定来补充其质量指标,并对其提取工艺进行优化,为金樱子的质量研究提供实验依据。

3 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:206.
- [2] 刘焱,高智席,李丽,等. 金樱子中芦丁和槲皮素不同提取方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2011(8):4521-4522.
- [3] 彭颖,石兰君,等. 微波辅助提取金樱子多糖工艺的优化[J]. 轻工科技, 2014(8):24-26.
- [4] 文全泰,潘廷啟,颜祖弟,等. 正交设计优化金樱子多糖的酶提取工艺[J]. 中国执业药师, 2012(11):27-31.
- [5] 潘廷啟,文全泰,肖林彬,等. 正交设计优化金樱子多糖的超声提取工艺[J]. 右江民族医学院学报, 2012(4):465-467.
- [6] 马丽,陈家仪,陈稚,等. 星点设计-响应面法优选枳实总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(8):33-35.
- [7] 赵若晗,石秀梅. 紫外分光光度法测定葎草中总黄酮含量[J]. 中医学报, 2013(3):390-391.
- [8] 刘步东,李登昌,丁宁. 勿忘我花中总黄酮含量测定[J]. 中兽医医药杂志, 2013(1):41-43.
- [9] 刘长龙,李海涛. 正交试验联合星点设计 D 效应面法优化杨树芽总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014(10):29-30.
- [10] 张晓茹,杜冰,张婷婷,等. 星点设计-效应面法优化鸡冠花总黄酮提取工艺[J]. 中医药信息, 2013(3):74.
- [11] 苏素娇,林培玲,丁春花,等. 星点设计-效应面法优化藤茶总黄酮超声提取工艺[J]. 福建中医药大学学报, 2013(1):30.
- [12] 韩伟,刘傲霞,成悦,等. 星点设计-效应面法优化在中药提取中的应用[J]. 机电信息, 2013(9):1-5,43.
- [13] 汤秀珍,王承潇,张皓,等. 星点设计-效应面法优化关节止痛膏贴剂处方[J]. 中草药, 2012(1):86-90.
- [14] 滕坤,阮洪生,武子敬,等. 星点设计-响应面法优选藤梨根中总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国现代应用药学, 2012(7):610.
- [15] 张囡,康廷国,尹海波. 星点设计-响应面法优化穿龙薯蓣多糖提取工艺[J]. 中药材, 2011(1):123-126.
- [16] 乔东东,张云,尤新军,等. 星点设计-响应面法优化梓树果实总黄酮的超声提取工艺[J]. 西北林学院学报, 2010(3):170-174.
- [17] 孟江,许舒雅,卢国勇,等. 星点设计-响应面法优化姜炭炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012(2):8-11.

(2015-03-06 收稿,2015-04-24 修回)

中文编辑:周凌;英文编辑:赵毅