

## ◆实验研究论著◆

## 星点设计 - 效应面法优化苕麻根总黄酮超声提取工艺

吴康郁, 袁伟彬, 黄伟斌

广州中医药大学附属骨伤科医院, 广东 广州 510240

[摘要] 目的: 采用星点设计-效应面法优化苕麻根中总黄酮的超声提取工艺。方法: 在单因素实验的基础上, 以乙醇浓度、料液比、超声时间为自变量, 总黄酮得率为因变量, 通过效应面法优选提取工艺条件, 并进行预测分析。结果: 最佳提取工艺为: 乙醇浓度为 63%, 料液比为 1:33, 超声时间为 53 min。结论: 优选的超声提工艺所得结果精确、简便, 且预测性良好。

[关键词] 苕麻根; 总黄酮; 星点设计-效应面优化法; 超声提取

[中图分类号] R284.2 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2015) 08-0262-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.08.121

## Optimization of Ultrasonic Extraction Process of Total Flavonoids in Radix Boehmeriae by Central Composite Design-Response Surface Methodology

WU Kangyu, YUAN Weibin, HUANG Weibin

Abstract: Objective: To optimize the ultrasonic extraction process of the total flavonoids from radix boehmeriae by central composite design-response surface methodology. Method: Based on the single factor experiment, ethanol concentration, solid-liquid ratio and ultrasonic time were selected as independent variables, the yield of total flavonoids was used as dependent variable, and the ultrasonic extraction process was optimized by response surface methodology. And then predictive analysis was carried out to compare the value. Results: The optimal technological parameters were as follows: ethanol concentration was 63%, solid-liquid ratio was 1:33, and ultrasonic time was 53 min. Conclusion: The ultrasonic extraction process optimized by central composite design/response surface methodology is convenient, precise, and highly predictive.

Keywords: Radix Boehmeriae; Total flavonoids; Central composite design-response surface methodology; Ultrasonic extraction

苕麻根, 别名苕麻头、苕根、银苕等, 为荨麻科苕麻属植物苕麻 *Boehmeria nivea* (L.) Gaud 的干燥根。其性寒, 味甘, 归心、肝经, 具有凉血止血、安胎、利尿、清热解毒之功效, 主治血热妄行之咯血、吐血、衄血、胎漏下血, 及热毒痈肿、丹毒、毒蛇咬伤、跌打扭伤等。有研究发现, 黄酮类化合物是苕麻根的主要成分之一<sup>[1]</sup>。笔者用星点设计-效应面法优化其总黄酮超声提取工艺, 所取得工艺条件重复性较好, 数据准确度优, 现报道如下。

### 1 仪器与材料

1.1 实验仪器 BUG40-12 超声波清洗器[必能信超声(上海

有限公司)]; UV2300 分光光度计(上海天美科学仪器有限公司); XFB-400 高速多功能粉碎机(吉首市中诚制药机械厂); AE-240 电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司)。

1.2 实验药品 芦丁对照品购于中国药品生物制品检定所; 苕麻根购于亳州健仁药材有限公司, 经鉴定为荨麻科苕麻属植物苕麻的干燥根; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 2 方法及结果

#### 2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备及标准曲线的绘制 见图 1。精密称取芦丁标准品 13.6 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇

[收稿日期] 2015-01-04

[基金项目] 广东省中医药局科研课题 (20131224)

[作者简介] 吴康郁 (1973-), 男, 主管中药师, 研究方向: 医院制剂研发。

溶液定容至刻度, 摇匀, 即得 0.272 mg/mL 的芦丁对照品溶液。精密吸取上述芦丁对照品溶液 0.5、1、1.5、2.0、2.5、5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇溶液至 10 mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 0.5 mL, 摇匀静置 5 min 后, 加 10% 硝酸铝溶液 0.5 mL, 摇匀后静置 5 min, 再加 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL, 摇匀, 加 70% 乙醇定容至 25 mL, 静置 0.5 h, 在 510 nm 下测定其吸光度(A)。以 A 为纵坐标, 芦丁标准品浓度 C ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标, 得回归方程  $y=0.015x+0.0004$  ( $r=0.9998$ ), 线性范围 5.44~54.4  $\mu\text{g/mL}$ 。

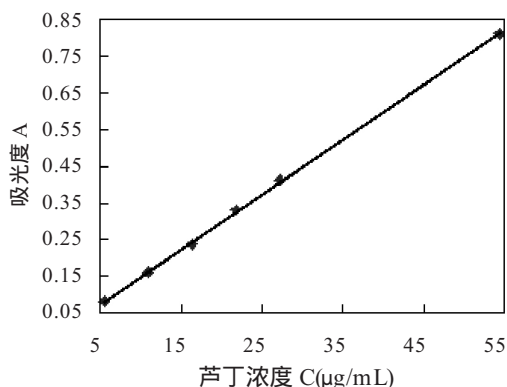


图1 芦丁对照品标准曲线

2.1.2 样品中总黄酮含量测定 取一定提取条件下所得的供试品溶液, 在 510 nm 处测定样品的吸光度。根据 2.1.1 项下标准曲线计算样品中总黄酮的浓度 C。总黄酮得率计算公式: 总黄酮得率(%) =  $[(C \times V \times D) / m] \times 100\%$ 。式中: C 为特定条件下提取所得总黄酮的浓度, V 为特定条件下提取所用溶剂的体积, D 为样品的稀释倍数, m 为样品取样量。

2.1.3 精密度试验 精密量取 2.1.1 项下芦丁对照品溶液, 重复测定 6 次吸光度 A, 结果 RSD 值为 0.83%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取药材粗粉约 1 g, 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 25 mL, 30℃ 条件下超声处理(功率 300W, 频率 50kHz)20 min, 取出, 静置, 移取上清液 5 mL 至 10 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇定容至刻度, 即得。

2.1.5 稳定性试验 精密称取药材粗粉约 1 g, 按 2.1.4 项下的方法制备供试品溶液, 室温放置, 在第 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 分别测定吸光度 A, 并按 2.1.2 项下方法计算总黄酮得率的 RSD 值为 1.72%, 表明样品溶液在 12 h 内较为稳定。

2.1.6 重复性试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 按 2.1.4 项下的方法制备供试品溶液, 分别测定吸光度 A, 并按 2.1.2 项下方法计算总黄酮得率的 RSD 值为 1.47%, 表明方法的重复性很好。

2.1.7 加样回收率试验结果 见表 1。精密称取已知含量药材粗粉 6 份, 均约 0.5 g, 精密加入 2.1.1 项下对照品溶液

9.2 mL, 按 2.1.4 项下的方法制备供试品溶液, 分别测定吸光度 A, 计算加样回收率。平均加样回收率为 100.09%, RSD% = 0.59%, 表明提取方法回收率良好。

表1 加样回收率试验结果

试验编号	测得总含量 (mg)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	5.032	2.52	2.502	100.4		
2	5.018	2.514	2.502	100.08		
3	4.997	2.5	2.502	99.8	100.09	0.59
4	5.022	2.497	2.502	100.92		
5	4.984	2.503	2.502	99.16		
6	5.016	2.51	2.502	100.16		

## 2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇浓度对总黄酮得率影响试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 分别加入浓度为 30%、45%、60%、75%、90% 乙醇和无水乙醇 25 mL, 在超声温度 40℃、超声功率 120 W 条件下超声 40 min, 以考察乙醇浓度对总黄酮得率的影响, 结果总黄酮得率分别为 0.426%、0.454%、0.491%、0.483%、0.469%、0.452%, 由试验数据得知, 乙醇浓度对总黄酮得率有一定影响。

2.2.2 料液比对总黄酮得率影响试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 分别按 1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45 为比例加入 70% 乙醇溶液, 在超声温度 40℃、超声功率 120 W 条件下超声 40 min, 以考察料液比对总黄酮得率的影响, 结果总黄酮得率分别为 0.417%、0.446%、0.487%、0.478%、0.466%、0.476%, 由试验结果可知, 料液比对总黄酮得率有一定影响。

2.2.3 超声温度对总黄酮得率影响试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 加入 70% 乙醇溶液 25 mL, 超声温度分别为 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃ 和 70℃, 超声功率为 120 W, 超声 40 min, 以考察超声温度对总黄酮得率的影响, 结果总黄酮得率分别为 0.472%、0.477%、0.481%、0.482%、0.480%、0.479%, 由试验结果可知, 超声温度对总黄酮得率影响较小。

2.2.4 超声功率对总黄酮得率影响试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 加入 70% 乙醇溶液 25 mL, 超声温度 40℃, 超声功率分别为 60 W、120 W、180 W、240 W、300 W, 超声 40 min, 以考察超声功率对总黄酮得率的影响, 结果总黄酮得率分别为 0.453%、0.478%、0.484%、0.489%、0.494%、0.497%, 由试验结果可知, 超声功率对总黄酮得率有一定影响。

2.2.5 超声时间对总黄酮得率影响试验 精密称取 6 份药材粗粉, 均约 1 g, 加入 70% 乙醇溶液 25 mL, 超声温度 40℃, 超声功率 120 W, 分别超声 20 min、30 min、40 min、50

min、60 min、70 min，以考察超声时间对总黄酮得率的影响，结果总黄酮得率分别为 0.426%、0.441%、0.467%、0.505%、0.486%、0.473%，由试验结果可知，超声时间对总黄酮得率有一定影响。

2.3 星点设计-效应面法优化苎麻根中总黄酮超声提取工艺

2.3.1 试验设计与结果 见表 2、表 3。在单因素基础上，确定乙醇浓度、料液比和超声时间为考察因素，以总黄酮得率为指标，根据星点设计原理，每个因素确定 5 个水平，用代码 -α、-1、0、1、α 来表示(3 因素星点设计的 α=1.682)，代码所代表的实际操作物理量星点实验设计与结果。

表 2 星点设计因素及水平

水平	乙醇浓度(X <sub>1</sub> )(%)	料液比(X <sub>2</sub> )(g/mL)	超声时间(X <sub>3</sub> )(min)
-1.682	30	1:13.18	30
-1	45	1:20	40
0	60	1:30	50
1	75	1:40	60
1.682	90	1:46.82	70

表 3 星点试验设计及结果

Nb.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	总黄酮得率(%)
1	-1	-1	-1	0.439
2	-1	1	1	0.453
3	1	1	-1	0.452
4	-1	1	-1	0.441
5	1	-1	-1	0.433
6	1	1	1	0.474
7	-1	-1	1	0.423
8	1	-1	1	0.438
9	0	0	0	0.514
10	0	0	0	0.511
11	0	0	0	0.512
12	0	0	0	0.515
13	0	0	1.682	0.48
14	0	0	0	0.513
15	0	0	0	0.51
16	0	-1.682	0	0.421
17	0	1.682	0	0.476
18	0	0	-1.682	0.447
19	-1.682	0	0	0.427
20	1.682	0	0	0.472

2.3.2 数据统计分析 见表 4、图 2、图 3、图 4。应用 Design-Expert8.0.5b 软件对所得数据进行效应面试验分析，得到为乙醇浓度(X<sub>1</sub>)、料液比(X<sub>2</sub>)及超声时间(X<sub>3</sub>)与总黄酮得率(y)之间的二次多项回归方程，回归方程为：y=5.12+

0.14X<sub>1</sub>+0.12X<sub>2</sub>+0.029X<sub>3</sub>+8.750E-003X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>+0.076X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>+3.750E-003X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-0.22X<sub>1</sub><sup>2</sup>-0.21X<sub>2</sub><sup>2</sup>-0.13X<sub>3</sub><sup>2</sup>。回归方程系数 r=0.975，说明该模型能解释 95.11% 响应值的变化，这也说明本回归方程的代表性很好，能够较为准确的预测实际情况。其校正决定系数(adj-R<sup>2</sup>)为 r=0.95，表明该模型拟合程度良好，该回归模型能解释 95% 的试验数据的变化，有大约 5% 不能用该模型进行解释。综上所述，该模型能较好地解释响应值的变化，可考虑用该回归模型代替试验真实点对实验结果进行分析。模型的 F=39，P<0.0001，表明只有小于 0.01% 的失误差。回归模型方差显著性检验表明，一次项乙醇浓度和料液比对总黄酮得率的线性效应均极显著，三因素的二次项对总黄酮得率的线性效应均极显著，一次项超声时间对总黄酮得率的线性效应显著，交互项的 P 值均>0.05，说明各因素间的交互作用无统计学意义。将其中两个因素与因变量拟合为三维曲面图，在图上选取提取含量较佳工艺范围：乙醇浓度 X<sub>1</sub>：45%~75%；料液比 X<sub>2</sub>：1：20~1：40；超声时间 X<sub>3</sub>：40~60 min。依据效应值选择极大值，得到最佳提取工艺条件：乙醇浓度为 63.26%，料液比为 1：33.12，超声 52.24 min，此时总黄酮得率达到最大值为 0.521%。考虑实际生产操作，将各因素取整改为：乙醇浓度为 63%，料液比为 1：33，超声时间为 53 min。

2.4 验证试验 为了验证所得模型的适应性和准确性，按 2.3.2 项下得到最佳工艺条件提取并测定总黄酮得率，重复试验 3 次，总黄酮得率分别为：0.523%、0.518%、0.519%，平均总黄酮得率为 0.52%，RSD%=0.484%，试验数据表明，通过模型优选出的工艺条件重现性良好。预计值为 0.518%，偏差为 -0.579%<5%，表明该模型较为可靠。

表 4 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.022	9	0.00246	39	< 0.0001
X <sub>1</sub>	0.000997	1	0.000997	15.82	0.0032
X <sub>2</sub>	0.00236	1	0.00236	37.45	0.0002
X <sub>3</sub>	0.000451	1	0.000451	7.16	0.0254
XX <sub>1</sub>	0.0000661	1	0.0000661	1.05	0.3323
XX <sub>2</sub>	0.00012	1	0.00012	1.91	0.2006
XX <sub>3</sub>	0.000253	1	0.000253	4.02	0.076
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.00804	1	0.00804	127.67	< 0.0001
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.00829	1	0.00829	131.52	< 0.0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.00503	1	0.00503	79.79	< 0.0001
残差	0.000567	9	0.000063	-	-
失拟项	0.000553	5	0.000111	30.48	0.0028
误差	0.0000145	4	0.00000363	-	-
总离差	0.023	19	-	-	-
R-Squared	0.975			Pred R-Squared	0.7577
Adj R-Squared	0.95			Adeq Precision	15.751

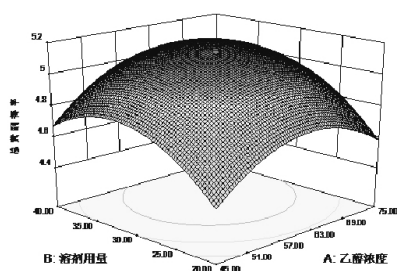


图2 乙醇浓度和料液比响应面图

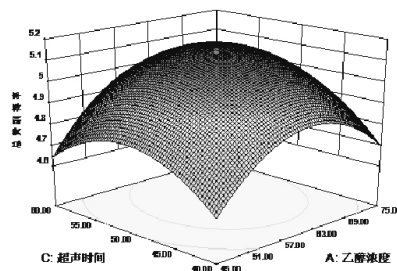


图3 乙醇浓度和超声时间响应面图

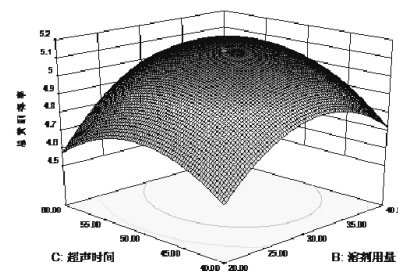


图4 料液比和超声时间响应面图

### 3 讨论

苘麻根是一味常用的中药材,黄酮类化合物是苘麻根的主要成分之一,其生物活性较为广泛,研究苘麻根的超声提取工艺具有重要的意义。目前中药中总黄酮提取工艺的优选多采用正交设计或均匀设计,但正交设计和均匀设计都是基于线性模型的设计,存在一定缺陷。星点设计-效应面法可进行非线性拟合,能提高数学模型的预测性,更好地体现各因素、指标与效应值的关系<sup>[2]</sup>。笔者先用单因素试验考察对总黄酮得率有影响的相关因素,筛选出乙醇浓度、料液比和超声时间等3个影响较大的因素,然后用星点设计-效应面法建立上述3个因素与总黄酮得率之间关系的模型,并对苘麻根超声提取工艺进行了优化,得到苘麻根中超声提取总黄酮的最佳工艺为:

乙醇浓度为63%,料液比为1:33,超声时间为53 min。在该工艺条件下得到的结果较为精确,重现性良好,所得模型较为可靠,预测性良好。

### [参考文献]

- [1] 许琼明,陈国庆,范金胤,等. 苘麻根化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2610-2612.
- [2] 孟江,许舒娅,卢国勇,等. 星点设计-效应面法优化姜炭炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 8-11.

(责任编辑:骆欢欢)

## 内病外治新疗法常年招生(教社证字 G03005 号)

一、鼻炎头痛学习班:重点讲解为什么鼻炎、鼻窦炎、过敏性鼻炎不在鼻部肺部治疗能快速神奇治愈。顽固性正偏头痛、头晕、三叉神经痛、牙痛、口腔溃疡,结膜炎,失眠神经衰弱,不在头部治疗的新理论和快速治愈方法。二、颈肩腰腿痛学习班:重点讲解为什么腰痛不治腰,腿疼不治腿,足跟痛不治脚,肩周炎有真假,骨质增生能软化,治股骨头坏死与膝关节炎取穴一样等关节软组织疼痛的新理论和快速治愈方法。三、内科病学习班:讲解2型糖尿病,胃病,结肠炎,冠心病,胆囊炎,小儿腹泻,厌食同治一个病根新理论。四、男科妇科病学习班:讲解男女乳腺增生,痛经,前列腺炎,阳痿,早泄,慢性肾炎,同治一个病根的外治新理论。五、皮肤病科:讲解点耳穴,根治青春痘,湿疹,皮炎,各种癣疮等皮肤病的外治方法。六、快速查病诊断班:患者无需开口,看一眼患者的双腿便知道患者的病根在哪里,超前诊断患者现在或将来易患什么病。让患者心服口服,是大夫接诊快速准确诊断不可少的绝招技术。七、特效针法学习班:一秒钟埋线法治疗各种慢性疑难病。泻血法,六针法、X针法、穿针法一次性治疗肱骨外上髁炎,急性腰扭伤,牙痛,尾骨痛,足跟痛,踝关节扭伤,棘上韧带损伤等症收效神速,大多患者入针即效,拔针即愈。以上各科明确全身慢性疑难病原发病因和继发病症的鉴别诊断治疗,本疗法防治结合治未病,可作为大夫本人即家庭治疗保健康复之首选。本校为学员可代为办理劳动和社会保障部门颁发的全国通用高级按摩师证书,中医康复保健证书,高级针灸师证书,网上可查,凭证可开业。每月1号,15号开班。本疗法把疑难病的诊断治疗简单化。有无医学基础7~10天即可学会,学校有实习门诊,患者很多,不熟练可多学几天,学会为止。七个科学费5000元。地址:河北省石家庄市健康路省第四人民医院西200米,石家庄内病外治新疗法培训学校,联系人:王卫平。手机13930962015。详情登陆www.nbwzxf.com,农行卡号:6228481250018026419,邮政账号:601331001200114327,乘车路线:石家庄火车站乘131路省四院下西行200米即到或石家庄北站乘5路省四院下西行200米即到。