

Box-Behnken 效应面法优化侧柏叶总黄酮提取工艺

丘思兰^{1,2}, 谭志灿^{3△}, 黄洁靖³, 利创华^{2,3}

(1. 广州医科大学附属第五医院, 广东 广州 510700; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405;

3. 广州市医药职业学校, 广东 广州 510430)

摘要: 目的 优选侧柏叶总黄酮的提取工艺条件。方法 以总黄酮提取率为指标, 通过 Box-Behnken 效应面法考察乙醇浓度、溶剂体积、提取时间对提取工艺的影响。结果 最佳提取工艺为加 15.70 倍量 75.44% 乙醇, 提取 2 次, 每次 86.46min。侧柏叶总黄酮提取率 1.6728 %。结论 优选的提取工艺稳定可行, 数学模型的预测值与试验观察值相符。

关键词: 侧柏叶; 总黄酮; 提取工艺; Box-Behnken 效应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)01-0031-03

侧柏叶, 别名柏叶、扁柏叶、丛柏叶, 为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶。一般在夏、秋二季采收, 阴干, 我国大部分地区均有产。侧柏叶味苦、涩, 性寒。归肺、肝、脾经。具有凉血止血, 化痰止咳, 生发乌发的作用。用于吐血, 衄血, 咯血, 便血, 崩漏下血, 肺热咳嗽, 血热脱发, 须发早白等症^[1]。

侧柏叶主要含有黄酮类化合物、挥发油、鞣质等成分^[2-4]。现代药理研究表明, 侧柏叶具有抑菌、止血、抗肿瘤、抗炎、抗红细胞氧化等作用^[5-9]。侧柏叶的主要药效成分为黄酮类化合物。本实验采用 Box-Behnken 效应面法对侧柏叶总黄酮的提取工艺进行研究, 为充分发挥其药用价值提供实验依据。

1 仪器与材料

SP-756PC 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司); HH-8 型数显恒温水浴锅(金坛市成辉仪器厂); AL104 型电子分析天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

侧柏叶药材购自广东和翔制药有限公司(批号 20140203), 经鉴定为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢和叶; 槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111538-200504); 乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等试剂

均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 侧柏叶总黄酮的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取槲皮苷对照品 12.05mg, 置 25mL 量瓶中, 加乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。含槲皮苷 0.482mg/mL。

2.1.2 供试品溶液的制备

精密称取侧柏叶药材粉末 1g, 置 50mL 圆底烧瓶中, 加石油醚 25mL, 回流脱脂两次, 每次 2h, 取药渣干燥, 并按照表 1 试验设计制备供试品溶液。

2.1.3 标准曲线的绘制

精密吸取上述槲皮苷对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0mL, 分别置 25mL 量瓶中, 加乙醇至 6mL, 加 5% 亚硝酸钠溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min, 加 10% 硝酸铝溶液 1mL, 摇匀, 放置 6min, 加 4% 氢氧化钠溶液 10mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15min, 以相应试剂为空白对照, 照紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010 年版一部附录 V A), 在最大吸收波长 500nm 处测定其吸光度 A , 以吸收度 A 为纵坐标, 浓度 C 为横坐标, 绘制标准曲线。得标准曲线 $A = 14.070 3C - 0.003 3$, $r = 0.999 7$, 线性范围为 0.009 64~0.057 84mg/mL。

收稿日期: 2014-11-04

作者简介: 丘思兰(1985-), 女, 广东兴宁人, 主管中药师, 主要从事医院药剂工作。

△通信作者: 谭志灿, E-mail: tanzhican@163.com

2.1.4 样品测定

精密量取供试品溶液 0.5mL,置 25mL 量瓶中,照“2.1.3”项下的方法,自“加乙醇至 6mL”起依法测定其吸光度,并计算样品中总黄酮的含量。

2.2 Box-Behnken 效应面法优选最佳提取工艺

在单因素试验的基础上,采用回流提取法,固定提取数为 2 次,提取温度 85℃,选取乙醇浓度、溶剂体积、提取时间为考察因素,以侧柏叶总黄酮的提取率为响应值,试验安排及结果见表 1。

表 1 侧柏叶总黄酮的提取工艺优选 Box-Behnken 试验安排及结果

实验编号	编码值			真实值			Y 总黄酮提取率/%
	X ₁	X ₂	X ₃	A 乙醇浓度/%	B 溶剂体积/倍	C 提取时间/min	
1	-1	-1	0	50	10	75	1.42
2	1	-1	0	80	10	75	1.51
3	-1	1	0	50	18	75	1.46
4	1	1	0	80	18	75	1.61
5	-1	0	-1	50	14	60	1.29
6	1	0	-1	80	14	60	1.44
7	-1	0	1	50	14	90	1.53
8	1	0	1	80	14	90	1.67
9	0	-1	-1	65	10	60	1.32
10	0	1	-1	65	18	60	1.41
11	0	-1	1	65	10	90	1.55
12	0	1	1	65	18	90	1.63
13	0	0	0	65	14	75	1.64
14	0	0	0	65	14	75	1.61
15	0	0	0	65	14	75	1.57

利用 ANOVA 分析效应面的回归参数。采用 Design Expert 7.0.0 软件对表 1 数据进行多元线性回归拟合,得二次多项回归模型方程:

$$Y = -2.73329 + 0.031120A + 0.094271B + 0.057861C + 2.50000 \times 10^{-4}AB - 1.11111 \times 10^{-5}AC - 4.16667 \times 10^{-5}BC - 2.25926 \times 10^{-4}A^2 - 3.48958 \times 10^{-3}B^2 - 3.25926 \times 10^{-4}C^2$$

(相关系数 $R^2 = 0.9847$, 变异系数 C.V.为 1.61%)

结果表明,该模型拟合度良好。

表 2 为回归方程的显著性检验及方差分析。乙醇浓度的一次项,溶剂体积、提取时间的一次项和二次项对侧柏叶总黄酮提取率达极显著水平 ($P <$

0.01),乙醇浓度的二次项对侧柏叶总黄酮提取率达显著水平($P < 0.05$)。采用 Design Expert 软件作出相应的等高线图和效应面图,见图 1-6。

表 2 回归方程的显著性检验及方差分析

Source	均方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.19	9	0.021	35.8	0.0005**
A	0.035	1	0.035	59.68	0.0006**
B	0.012	1	0.012	20.42	0.0063**
C	0.11	1	0.11	179.83	<0.0001**
AB	9.00×10^{-4}	1	9.00×10^{-4}	1.53	0.2711
AC	2.50×10^{-5}	1	2.50×10^{-5}	0.042	0.8448
BC	2.50×10^{-5}	1	2.50×10^{-5}	0.042	0.8448
A ²	9.54×10^{-3}	1	9.54×10^{-3}	16.22	0.0101*
B ²	0.012	1	0.012	19.56	0.0069**
C ²	0.02	1	0.02	33.75	0.0021**
残差	2.94×10^{-3}	5	5.88×10^{-4}		
失拟检验	4.75×10^{-4}	3	1.58×10^{-4}	0.13	0.9351
纯误差	2.47×10^{-3}	2	1.23×10^{-3}		
总误差	0.19	14			

注:* $P < 0.05$ 显著性差异;** $P < 0.01$ 极显著性差异。

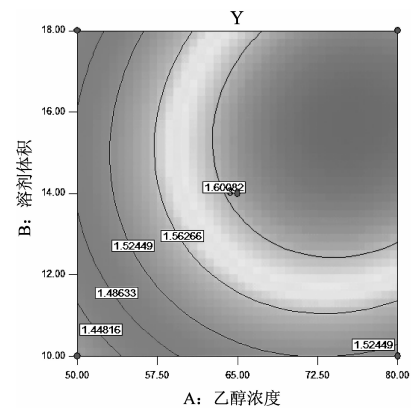


图 1 因素 A 和因素 B 对响应值 Y 的等高线图

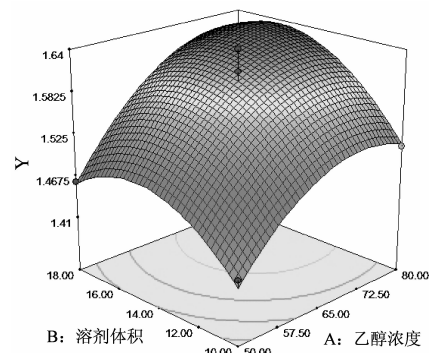


图 2 因素 A 和因素 B 对响应值 Y 的效应面图

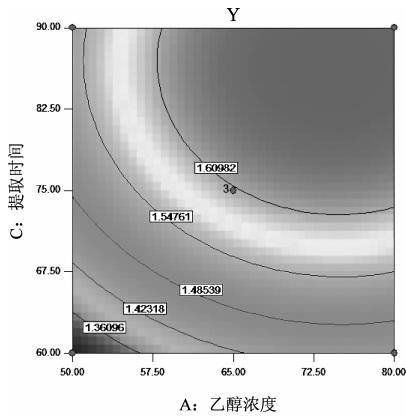


图 3 因素 A 和因素 C 对响应值 Y 的等高线图

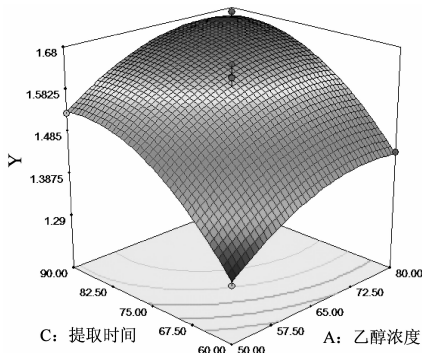


图 4 因素 A 和因素 C 对响应值 Y 的效应面图

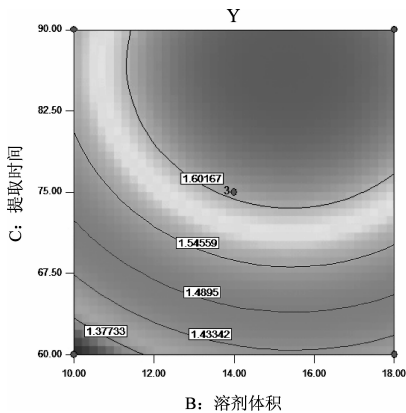


图 5 因素 B 和因素 C 对响应值 Y 的等高线图

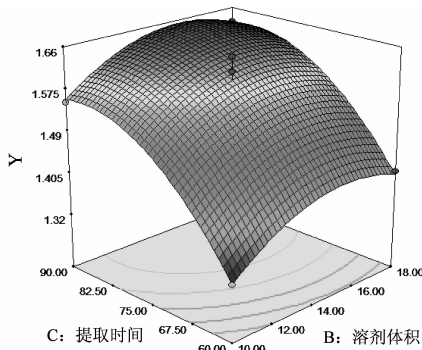


图 6 因素 B 和因素 C 对响应值 Y 的效应面图

2.3 验证试验

由二次多项式回归模型得出最佳提取工艺参数为乙醇浓度 75.44%, 溶剂体积 15.70 倍, 提取时间 86.46min。在此条件下, 侧柏叶总黄酮理论提取率为 1.681 9%。对最佳提取工艺进行 3 次验证试验, 结果总黄酮平均提取率 1.6728% (RSD = 0.902%)。表明所优选的提取工艺稳定可行、重复性良好。

3 讨论

目前, 提取工艺的优选多采用正交设计和均匀设计, 虽然试验次数少, 但结果精度低。在给出的整个区域内, 不能找到因素和响应值之间的一个明确的函数表达式, 从而无法找到整个区域中因素的最佳组合和响应的最优值。Box-Behnken 效应面法采用多元二次方程, 拟合因素和响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析以寻求最优工艺参数, 是解决多变量问题的一种统计方法^[10-12]。

本实验在单因素试验的基础上, 采用 Box-Behnken 效应面法, 考察乙醇浓度、溶剂体积、提取时间 3 个因素对侧柏叶总黄酮提取率的影响。方差分析结果可见, 3 个因素的一次项和二次项均具有显著性, 3 个因素之间的乘积项均无显著性, 表明各因素之间的相互作用较小。二次多项式回归模型可以达到极显著水平, 且失拟项不显著, 表明回归方程对试验拟合较好。通过验证试验, 最终确定最佳提取工艺参数为乙醇浓度 75.44%, 溶剂体积 15.70 倍, 提取时间 86.46min。本实验为充分发挥侧柏叶药用价值提供实验依据, 也为效应面法在中药提取工艺的应用提供示范性研究。

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: 200.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(精选本)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 321.
- [3] 林启寿. 中草药成分化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 577.
- [4] 王建新, 周忠, 严冲, 等. 化妆品植物原料手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 370.
- [5] 刘爱如, 田樱, 程立方. 山东地区侧柏叶止血和抑菌作用比较[J]. 山东中医学院学报, 1995, 19(1): 47-49.
- [6] 李园园, 郝双红, 王大伟, 等. 侧柏乙醇提取物对 21 种植物病原真菌的抑菌活性 [J]. 西北植物学报, 2005, 28(5): 1056-1060.

(下转第 37 页)

元含量的影响,采样时只取了同一地点,大小相近天麻切片均分为 16 组,保证了每组天麻成分是一致的,这样在探讨不同炮制方法对天麻素及其天麻苷元含量的影响时结果就具有了较高的可信度。

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,2010:54.
- [2] 王莉. 天麻化学物质基础及质量控制方法研究[D]. 大连:中国科学院大连化学物理研究所,2007.
- [3] 王俏. 天麻素和天麻苷元的体内代谢和靶向性研究[D]. 杭州:浙江大学药学院,2007.
- [4] 岑信钊. 天麻的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材,2005,28(10):958-962.
- [5] 张怡评,林丽聪,吴春敏,等. 天麻素与天麻苷元的镇痛作用研究[J]. 福建中医学院学报,2006,16(6):30-31.
- [6] 秦俊哲,张洁,周涵,等. 不同炮制方法对天麻素含量的影响[J]. 中药材,2006,29(12):1285-1288.

- [7] 宋熾,朱俊杰,罗书,等. 常压蒸制法炮制天麻的工艺研究[J]. 中成药,2008,30(7):1016-1018.
- [8] 樊启猛,陈朝银,林玉萍,等. 天麻的炮制研究与规范[J]. 中成药,2013,35(8):1737-1741.
- [9] 刘毅,张丽艳,谢宇,等. 天麻最佳炮制工艺的综合评分法研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):378-379.
- [10] 王玫瑰,张先洲. 天麻蒸制工艺的优化研究[J]. 中国药师,2012,15(1):70-72.
- [11] 郑秀艳,邓青芳,陈华国,等. 天麻中天麻素的提取工艺优化[J]. 贵州农业科学,2013(12):163-166.
- [12] 仲瑞雪,钟恋,万军,等. 天麻饮片分级的研究[J]. 中成药,2014,36(1):135-140.
- [13] 田野,李秀芳,杨莲,等. HPLC 法对三产地天麻中天麻素的含量测定[J]. 云南中医学院学报,2008,31(3):6-8.
- [14] 刘红,陈燕芹,罗树常,等. 反相高效液相色谱法同时测定天麻中天麻素和 3 种核苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(17):81-83.

(编辑:杨阳)

Influence on the Content of Gastrodin and p-hydroxybenzyl Alcho in Different Processing Methods

BI Rong-lu¹, NI Zhao-wu², LI De-xun², QIU Quan-lei³, LIU Xiang-yi¹

(1. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. Food and Drug Inspection in Zhaotong city, Zhaotong 657000, China;

3. Xiaocaoba wild Tianma Development Co., Ltd., Yiliang 657600, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of different levels of processing methods *Gastrodia* Gastrodin (Gas), p-hydroxybenzyl alcho (HBA) to thereby obtain optimum processing methods of *Gastrodia*. **Methods** *Gastrodia* fresh slices on microwave heating, direct dried, pressure cooking, freeze drying, air drying treatment, by HPLC, MD-ODS C₁₈ column(250mm × 4.6mm, 5μm) column, the contents of Gas and HMA were measured. **Results** *Gastrodia* fresh slices after microwave 30s treatment, which has the highest content of gastrodin and the total content of the gastrodin and p-hydroxybenzyl alcho also highest. **Conclusion** Comprehensive gastrodin and p-hydroxybenzyl alcho two indicators, as well as post-processing morphology *Gastrodia*, microwave treatment 30s this processing method is the best, but taking into account the actual production conditions, water vapor 5min can provide a reference for the production.

KEY WORDS: cooked; gastrodin; p-hydroxybenzyl alcho; content

(上接第 33 页)

- [7] 公衍玲,金宏,王宏波. 侧柏叶挥发油提取工艺及其抑菌活性研究[J]. 化学与生物工程,2009,26(2):36-38.
- [8] 梁统,覃燕梅,梁念慈,等. 侧柏总黄酮的抗炎作用及机制[J]. 中国药理学通报,2003,19(12):1407-1410.
- [9] 丁航,刘慧明,梁统,等. 侧柏叶中黄酮类化合物对 H₂O₂ 诱导的人红细胞氧化作用的影响[J]. 实用临床医学,2003,4(3):23-24.
- [10] 余子川,余捷婧,韩建伟. Box-Behnken 效应面法优化地

乌总皂苷提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):50-53.

- [11] 邱颖,朱玲,孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J]. 海峡药学,2011,23(2):18-20.
- [12] 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.

(编辑:杨阳)