

响应面法优化天山花楸总黄酮回流提取工艺

马俊鹏¹, 马迪², 安晓晶¹, 常军民^{3*}

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院米东医院, 新疆 乌鲁木齐 830021; 2. 新疆生产建设兵团第十师北屯医院, 新疆 北屯 836099; 3. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 通过响应面法优化天山花楸 *Sorbus tianshanica* Rupr. 总黄酮回流提取工艺。方法 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数、料液比、提取温度为影响因素, 总黄酮含量为评价指标, 响应面法优化提取工艺。结果 最佳条件为乙醇体积分数 50%, 料液比 1:18, 提取温度 90 °C, 提取 3 次, 每次 1 h, 总黄酮含量 101.07 mg/g。结论 该方法稳定可靠, 可用于回流提取天山花楸总黄酮。

关键词: 天山花楸; 总黄酮; 回流提取; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)03-0509-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.013

Optimization of reflux extraction for total flavonoids from *Sorbus tianshanica* by response surface method

MA Jun-peng¹, MA Di², AN Xiao-jing¹, CHANG Jun-min^{3*}

(1. Miton Hospital, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830021, China; 2. Beitun Hospital of the Tenth Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Beitun 836099, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

KEY WORDS: *Sorbus tianshanica* Rupr.; total flavonoids; reflux extraction; response surface method

天山花楸 *Sorbus tianshanica* Rupr. 系蔷薇科花楸属植物, 主要分布在西南、西北等地区, 维吾尔族和哈萨克族民间常以其果实、嫩枝叶及茎皮入药, 用于治疗慢性支气管炎、咳嗽、胃炎、维生素 A、维生素 C 缺乏症等^[1-3], 黄酮类为该植物的主要有效成分^[4-5]。

响应面法与正交试验设计有相似之处, 两者都能优化工艺条件, 但前者可信度更高, 其所建立的数学模型也更为精准和智能, 不仅可以得到相对比较精确的实验条件, 发现单因素对考察指标的影响, 还能分析出不同因素之间的相互作用, 以及其对整个实验考察指标的影响^[5-6], 已被广泛应用于各种科研领域。目前, 天山花楸总黄酮提取工艺的优化方法主要以单因素试验和正交设计为主, 尚未应用响应面法^[7]。本实验将通过该方法对天山花楸总黄酮回流提取工艺进行优化, 为相关制剂的开发奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津公司); AB135-S 电子分析天平 (0.01、0.1 mg, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); DK-S22 电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); DZTW 电子调温电热套 (北京市永光明医疗仪器有限公司); N-2500 旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); SHB-3 循环式多用真空泵 (郑州长城贸易有限公司); DS-Y300A 粉碎机 (浙江省温岭市创力药材机械厂)。

1.2 试剂 天山花楸于 2013 年 7 月中旬采自新疆呼图壁果园, 经新疆医科大学药学院生药学教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为天山花楸 *Sorbus tianshanica* Rupr. 的干燥嫩枝叶和果实。芦丁对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 100080-200804)。乙醇 (天津富宇精细化工有限公司, 批号 130322); 氢氧化钠、硝酸铝、亚硝酸钠均为分

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技支撑计划 (201133127)

作者简介: 马俊鹏 (1976—), 男, 硕士, 副主任药剂师, 研究方向为药学。E-mail: 326890743@qq.com

* 通信作者: 常军民 (1965—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为天然药物分析。E-mail: 1617265908@qq.com

析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含量测定

2.1.1 对照品溶液配制 精密称取干燥至恒重的芦丁对照品 10.25 mg，置于 50 mL 量瓶中，60% 乙醇完全溶解并定容至刻度，即得 0.2 mg/mL 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液配制 取天山花楸药材粗粉约 10 g (枝叶：果实 = 7：3)，蒸馏水 (料液比 1：20) 提取 2 次，每次 1 h，抽滤，滤液定容至 500 mL。精密吸取 4 mL，置于 25 mL 量瓶中，蒸馏水定容至刻度，即得。

2.1.3 检测波长选择 精密吸取配置好的芦丁对照品溶液 5 mL、供试品溶液 4 mL、蒸馏水 4 mL，置于 25 mL 量瓶中，加 60% 乙醇至 6 mL，再加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL，摇匀后静置 6 min，加 10% Al (NO₃)₃ 溶液 1 mL，摇匀，静置 6 min，再移取 4% NaOH 溶液 10 mL 于量瓶中，60% 乙醇定容后摇匀，放置 15 min。以蒸馏水管溶液为空白进行全波长扫描，发现最大吸收波长在 508 nm 处，故选择其作为检测波长。

2.1.4 芦丁标准曲线绘制 精密吸取芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5、6 mL，置于 25 mL 量瓶中，加 60% 乙醇至 6 mL，再加入 5% NaNO₂ 溶液 1 mL，摇匀，静置 6 min，加 10% Al (NO₃)₃ 溶液 1 mL，摇匀，静置 6 min，再移取 4% NaOH 溶液 10 mL 于量瓶中，60% 乙醇定容，摇匀，静置 15 min，在 508 nm 波长处测定吸光度 (A)，作为纵坐标，以溶液质量浓度为横坐标 (C) 进行回归，得到标准曲线为 $A = 12.618C + 0.0010$ ($R^2 = 0.9999$)，在 0.008 ~ 0.048 mg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.1.5 精密密度试验 取芦丁对照品溶液适量，按“2.1.3”项下方法操作，连续 6 次，测得吸光度 RSD 为 0.13%，表明仪器精密密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液，室温下于 0、10、20、30、40、50、60 min 测定，测得吸光度 RSD 为 1.70%，表明溶液在 60 min 内稳定性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密吸取总黄酮含量已知的天山花楸提取液 6 份，加入同体积芦丁对照品适量，按“2.1.3”项下方法操作，测得平均回收率为 99.1%，RSD 为 1.45%。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数 取天山花楸枝叶和果实粉碎，过 20 目筛，称取 10 g (枝叶：果实 = 7：3)，固定料液比 1：15，提取温度 85 °C，提取时间 1 h，提取次数 3 次，考察 30%、40%、50%、60%、70% 乙醇对总黄酮提取率的影响。结果，当乙醇体积分数从 30% 逐渐增加到 50% 时，提取率有上升趋势；当其大于 50% 时，提取率基本不变，甚至还略有下降。综合考虑后，选择乙醇最佳体积分数为 50%。

2.2.2 料液比 取天山花楸枝叶和果实粉碎，过 20 目筛，称取 10 g (枝叶：果实 = 7：3)，固定乙醇体积分数 50%，提取温度 85 °C，提取时间 1 h，提取次数 3 次，考察 1：9、1：12、1：15、1：18、1：21 料液比对总黄酮提取率的影响。结果，1：12、1：15、1：18 料液比下提取率较高，故选择其进行响应面分析。

2.2.3 提取温度 取天山花楸枝叶和果实粉碎，过 20 目筛，称取 10 g (枝叶：果实 = 7：3)，固定乙醇体积分数 50%，料液比 1：15，提取时间 1 h，提取次数 3 次，考察 75、80、85、90、95 °C 提取温度对总黄酮提取率的影响。结果，85、90、95 °C 提取温度下提取率较高，故选择其进行响应面分析。

2.2.4 提取次数 取天山花楸枝叶和果实粉碎，过 20 目筛，称取 10 g (枝叶：果实 = 7：3)，固定乙醇体积分数 50%，料液比 1：15，提取时间 1 h，提取温度 85 °C，考察提取 1、2、3、4 次对总黄酮提取率的影响。结果，随着提取次数增加，总黄酮提取率逐渐增加，但由 3 次增加到 4 次时，增加趋势变缓，表明总黄酮已提取完全。因此，提取次数可直接确定为 3 次，无需进一步考察。

2.3 响应面法

2.3.1 工艺优化 在单因素试验基础上，选择乙醇体积分数 (A)、料液比 (B)、提取温度 (C) 作为影响因素，总黄酮含量 (Y) 为评价指标，参考文献 [8-12]，选取 3 因素 3 水平响应面法进行优化。因素水平见表 1，设计结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素		
	A 乙醇/%	B 料液比	C 提取温度/°C
-1	40	15	85
0	50	18	90
1	60	21	95

表2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

试验号	A	B	C	总黄酮/(mg·g ⁻¹)
1	-1	-1	0	94.80
2	1	-1	0	98.58
3	-1	1	0	97.46
4	1	1	0	98.59
5	-1	0	-1	93.87
6	1	0	-1	98.89
7	-1	0	1	97.80
8	1	0	1	97.69
9	0	-1	-1	97.34
10	0	1	-1	99.17
11	0	-1	1	99.20
12	0	1	1	100.03
13	0	0	0	102.16
14	0	0	0	102.16
15	0	0	0	102.16
16	0	0	0	102.16
17	0	0	0	102.16

2.3.2 方程拟合 通过 Design-Expert 8.0.6 软件对数据进行回归拟合, 方差分析见表3。

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	103.51	9	11.50	85.72	<0.000 1
A	12.05	1	12.05	89.84	<0.000 1
B	3.52	1	3.52	26.27	0.001 4
C	3.74	1	3.74	27.88	0.001 1
AB	1.76	1	1.76	13.08	0.008 5
AC	6.58	1	6.58	49.04	0.000 2
BC	0.25	1	0.25	1.86	0.214 5
A ²	46.87	1	46.87	349.35	<0.000 1
B ²	9.02	1	9.02	67.26	<0.000 1
C ²	13.03	1	13.03	97.10	<0.000 1
残差	0.94	7	0.13	-	-
失拟项	0.68	3	0.23	3.56	0.125 8
出纯误差	0.26	4	0.064	-	-
总误差	104.45	16	-	-	-

注: $R^2 = 0.979 4$

由此得到, 回归方程为 $Y = 102.16 + 1.23A + 0.66B + 0.68C - 0.66AB - 1.28AC - 0.25BC - 3.34A^2 - 1.46B^2 - 1.76C^2$ 。由表2可知, $F_{模型} = 85.72 > F_{0.01(9,4)} = 14.80$, $P < 0.000 1$, 表明模型极显著; $F_{失拟} = 3.56 < F_{0.05(9,3)} = 8.81$, $P > 0.05$, 表明失拟项不显著, 建模成功。乙醇体积分数(A, $P < 0.000 1$)、料液比(B, $P = 0.001 4$)、提取温度(C, $P = 0.001 1$)均有极显著差异, 二次项亦然, 交互项 AB ($P = 0.008 5$)、AC ($P = 0.000 2$)极显著, 而 BC ($P = 0.214 5$)不显著。同时, 该模型的调整确定系数 R^2_{adj} 为 0.979 4, 能

与 97.94% 的响应值变化匹配, 即其拟合程度良好, 误差小, 可用于优化提取工艺。

2.3.3 响应面分析 利用 Design Expert 8.0.6 软件, 对表2 数据进行拟合, 结果见图1~3。

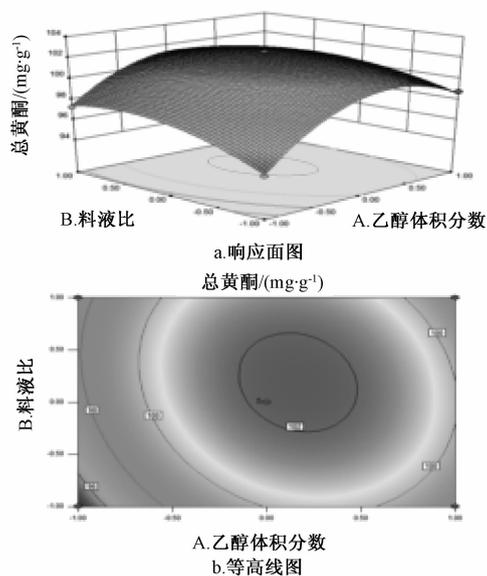


图1 乙醇体积分数和料液比对总黄酮提取率的影响
Fig. 1 Effects of ethanol concentration and solid-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

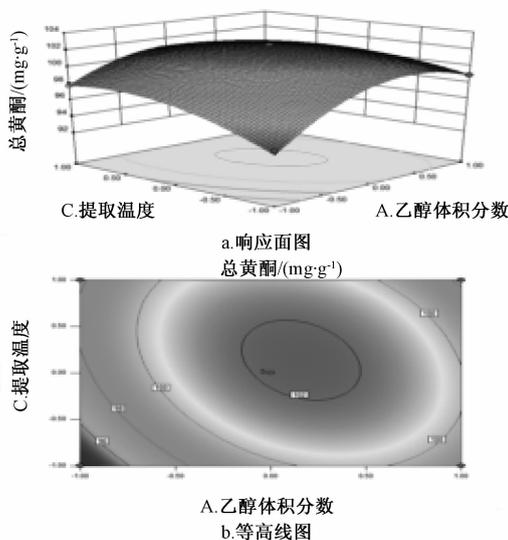


图2 乙醇体积分数和提取温度对总黄酮提取率的影响
Fig. 2 Effects of ethanol concentration and extraction temperature on the extraction rate of total flavonoids

由图可知, 天山花楸总黄酮的最优提取工艺为乙醇体积分数 50.00%, 提取温度 90.90 °C, 料液比 1: 18.66。考虑到实际操作, 最终将其确定为乙

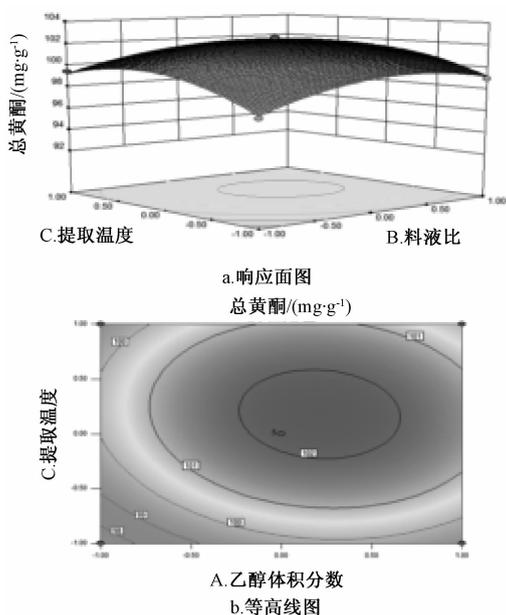


图3 提取温度和料液比对总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction temperature and solid-liquid ratio on the extraction rate of total flavonoids

醇体积分数 50%，料液比 1：18，提取温度 90℃，提取 3 次，每次 1 h。

2.4 验证试验 精密称取样品 3 份，每份 10 g (枝叶 7 g，果实 3 g)，按最优提取工艺平行实验 3 次。结果，总黄酮含有量为 101.07 mg/g。

3 讨论

目前，关于天山花楸总黄酮提取工艺的研究报道主要是采用正交试验设计，但其只是通过因素水平来组合，难以进行优化。本实验采用响应面法，将因素与结果的关系进行多项式拟合，筛选出最佳提取工艺。首先，采用单因素试验确定因素水平，然后进一步应用响应面法考察各影响因素对总黄酮

含有量的影响，再采用二次回归设计得到回归模型，确定最优工艺，测得总黄酮含有量为 101.07 mg/g，明显高于课题组前期所测得枝叶及果实中总黄酮的提取率（分别为 69.09、54.29 mg/g），进一步表明了该模型的可靠性。

参考文献：

- [1] 《新疆植物志》编辑委员会. 新疆植物志：第 2 卷第 2 分册[M]. 乌鲁木齐：新疆人民出版社，1973：62.
- [2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志：第 36 卷 [M]. 北京：科学出版社，1974：284-285.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海：上海人民出版社，1979：335.
- [4] 陈 坚，王 岩，开丽曼，等. 天山花楸原植物、化学成分及药理作用实报[J]. 中国中医基础医学杂志，2001，7 (1)：45-47.
- [5] 李毓斌，常军民，王 岩. 天山花楸药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药，2011，33(5)：742-745.
- [6] 李 倩. 离子液体微波辅助提取葛根总黄酮及纯化的研究 [D]. 武汉：武汉工程大学，2012.
- [7] 何家伟，常军民，狄 斌. 等. 天山花楸平喘胶囊的提取工艺研究[J]. 西北药学杂志，2013，28(5)：463-466.
- [8] Gupta S, Manohar C S. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures[J]. *Struct Saf*, 2004, 26(2)：123-139.
- [9] 潘亚磊，翟远坤，牛银波，等. 响应面分析法优化杜仲总木脂素提取工艺[J]. 中成药，2014，36(1)：182-185.
- [10] 易东阳，李勇华. 响应面分析法优化慢性湿疹搽剂提取工艺[J]. 中成药，2014，36(7)：1545-1548.
- [11] 许代福，方应权. 实验设计-响应面法优化大叶当归中阿魏酸的闪式提取工艺[J]. 中成药，2014，36(2)：422-424.
- [12] 邓 翀，宋小妹，董媛媛，等. 响应面法筛选杜仲的盐制工艺[J]. 中成药，2014，36(3)：585-588.