

正交设计在灯盏乙素提取优化中的应用

熊华斌^{1,2}, 阿新祥³, 杨欣雨², 陈毅坚^{1,2}, 陈孟生², 陈名红^{1,2}

(1. 云南民族大学, 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500; 2. 云南民族大学 化学与生物技术学院, 云南 昆明 650500; 3. 云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650223)

摘要:以灯盏花为原料, 利用正交实验对灯盏乙素提取的工艺参数进行了优化研究。结果表明: 料液比为 1:2、甲醇浓度为 80% 和超声时间为 30 min 的提取方案最优, 其精密度和重复性试验的相对标准偏差仅为 0.19% 和 2.46%, 加标回收率达到了 99.88%。通过正交设计优化后的灯盏乙素提取方法具有较好的重复性和可行性。

关键词:灯盏乙素; 正交优化; 紫外分光光度法; 检验

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0164-03

灯盏花是中医临床中常用的一味中药, 性寒、微苦、甘温辛, 具有微寒解毒、祛风除湿、活血化瘀、通经活络、消炎止痛的功效, 临床上主要用于心脑血管系统疾病、糖尿病、肾病、颈性眩晕等的治疗^[1]。灯盏花素是从灯盏花中提取的黄酮类有效成分, 主要为灯盏乙素(又名黄芩素苷、野黄芩苷)和少量灯盏甲素的混合物^[2-3]。灯盏乙素占灯盏花素的 90% 以上, 是主要药效成分^[4-5]。近年来超声提取技术的发展为药材样品的大批量快速提取分析提供了方便, 且主要适合于黄酮^[6]、皂苷^[7]和生物碱^[8]等成分的提取。关于灯盏乙素的提取和测定至今仅有少量文献报道^[9-12], 且在文献中对提取操作的描述具有一定的不一致性, 如料液比、提取溶剂浓度和超声功率、超声时间等, 而这些因素在一定程度上都会影响到测定结果的准确性和可靠性。在检测手段上, 常用的有 HPLC 法和紫外分光光度计法。虽然 HPLC 法精确度和检测限都要优于分光光度计法, 但 HPLC 法通常针对多组分的含量检测和样品含量的精确测定, 且检测时间长, 对仪器设备要求条件高, 对于实验室中常规的、大量的样品含量测定则分光光度法应用较为普遍, 其具有操作快速、简便等优点。然而, 从云南特产中

药材—灯盏花中提取灯盏乙素后采用分光光度计法进行优化测定的研究还鲜有报道^[13-14], 这对开展灯盏花的进一步研究带来一些不利的影响。该研究旨在采用正交设计法对影响灯盏乙素含量提取的 3 个关键因素料液比、提取溶剂浓度和超声时间进行优化以确定最佳提取工艺, 并进一步分析验证该方法的重复性和稳定性, 以期为进一步开展灯盏花的研究提供一套高效、可行的提取和检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灯盏花干燥叶片取自云南民族大学温室, 灯盏乙素对照品为野黄芩苷, 购自上海源叶生物科技有限公司(批号 YY20110513), 纯度 $\geq 98\%$ (HPLC)。甲醇为分析纯, 水为蒸馏水。仪器: UV-9200 紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); LCD Series 超声仪器(FUNGILAB 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 灯盏乙素提取 将灯盏花叶片粉碎后过 80 目筛, 根据料液比准确称取灯盏花粉末适量后移入 25 mL 容量瓶中, 加入 15 mL 甲醇浸提 30 min 后超声波提取(60℃, 59 kHz)。超声结束后取出冷却至室温, 用甲醇定容至刻度。过滤后取滤液适量加入到比色杯中, 以相同浓度的甲醇作为空白, 参照分光光度法在 335 nm 波长下测定吸光度, 每个样品重复测量 3 次。

1.2.2 标准曲线的绘制 分别称取适量灯盏乙素对照品配制成 0.0000、0.0025、0.0050、0.0075、0.0100、0.0150 mg/mL 的标准溶液, 然后取适量用分光光度计测定其吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制

第一作者简介:熊华斌(1977-), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为药用植物生态学。E-mail: 344192363@qq.com.

责任作者:陈名红(1974-), 男, 在读博士, 副教授, 研究方向为药用植物种质资源。E-mail: cmhkm@yahoo.com.cn.

基金项目:云南省教育厅科学研究基金重点计划资助项目(2010Z073); 云南民族大学生物技术试验示范中心资助项目(0205-2001015209)。

收稿日期:2012-12-10

标准曲线。

1.2.3 正交实验设计 选择甲醇作为提取溶剂,以甲醇浓度(浓度为 60%、80%、100%)、料液比(1 : 1、1 : 2、1 : 4)和超声时间(10、20、30 min)3 个因素进行 $L_9(3^3)$ 正交实验设计(表 1)。

表 1 正交设计方案

Table 1 Orthogonal design program

编号	A 甲醇浓度/%	B 料液比/mg : mL	C 超声时间/min
1	60	1 : 4	30
2	60	1 : 2	10
3	60	1 : 1	20
4	80	1 : 4	20
5	80	1 : 2	30
6	80	1 : 1	10
7	100	1 : 4	10
8	100	1 : 2	20
9	100	1 : 1	30

1.2.4 精密度和重复性试验 精密度越高表明偶然误差越小,而重复性越高则表明所测的结果越可靠。根据正交优化后选出的提取方法对其中一样品提取了灯盏乙素,并将该提取液进行了 5 次含量测定以检验仪器的精密度。同时,对同一样品称取相同质量(0.0250 g)的灯盏花干材料 5 份,采用优化的方法提取灯盏乙素测定含量以检验试验的可重复性。

1.2.5 加标回收率试验 根据加标试验的要求,该研究选择已知样品含量的 100% 作为加标量,按照正交实验优化出来的方法提取灯盏乙素,然后在分光光度计的 335 nm 下测定其灯盏乙素含量。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

由图 1 可知,该试验所建立的标准溶液浓度梯度较为合理,所测的吸光度具有较好的线性关系,其相关系数已经非常接近 1,说明该标准曲线可信度较好。

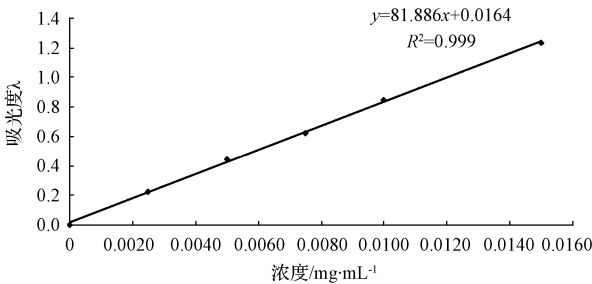


图 1 灯盏乙素对照品标准曲线图

Fig. 1 The standard curve of scutellarin standard sample

2.2 正交实验

由表 2 可知,各因素的主次顺序依次为甲醇浓度、料液比、超声时间。根据正交优化的选择原则,主要因素应取最好的水平,而次要因素则可根据成本、时间、收益等方面统筹考虑选取适当的水平^[15],灯盏乙素提取工艺中各因素的最佳搭配为 80% 的甲醇浓度,1 : 2 的料液比和 30 min 的超声时间。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

编号	A 甲醇浓度/%	B 料液比/mg : mL	C 超声时间/min	浓度 /mg · g ⁻¹
1	60	1 : 4	30	2.8585
2	60	1 : 2	10	5.5414
3	60	1 : 1	20	5.5767
4	80	1 : 4	20	3.3012
5	80	1 : 2	30	6.1514
6	80	1 : 1	10	5.8756
7	100	1 : 4	10	0.5218
8	100	1 : 2	20	2.6988
9	100	1 : 1	30	2.8561
I	13.9766	14.3084	11.9388	
II	15.3282	14.3916	11.5767	
III	6.0767	6.6815	11.8660	
K1	4.6589	4.7695	3.9796	
K2	5.1094	4.7972	3.8589	
K3	2.0256	2.2272	3.9553	
R	3.0838	2.5700	0.1207	

2.3 方差分析

F 检验结果表明,3 个因素对浓度的影响都不显著。分析原因可能是该试验误差大且误差自由度小(仅为 2),导致检验的灵敏度偏低,从而使考察因素的显著性被掩盖。由于各因素对结果影响都不显著,各因素水平间的多重比较可不进行,故灯盏乙素提取的最优水平组合与 2.2 中的结果一致。

表 3 正交实验方差分析

Table 3 The analysis of variance for orthogonal experiment

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
甲醇浓度(A)	16.6473	2	8.3236	3.781	0.087
料液比(B)	13.0691	2	6.5346	2.336	0.178
超声时间(C)	0.0245	2	0.0122	0.002	0.998
误差	0.1158	2	0.0579		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.01}(2,2) = 99.0$ 。

2.4 精密度和重复性试验

测定结果表明,同一提取液的 5 个吸光度值分别为 0.516、0.515、0.517、0.517 和 0.517,其相对标准偏差 = $0.19\% < 0.2\%$,远远低于 5% 的要求,表明仪器具有较

好的精密度。而 5 份材料中的灯盏乙素吸光度分别为 0.501、0.521、0.508、0.531 和 0.504,其相对标准偏差也仅为 2.46%,表明测定结果具有较好的可重复性。

2.5 加标回收率试验

在该试验中未加标和加标后样品的吸光度分别为 0.539 和 1.06,加标回收率达到了 99.88%,表明该研究所采用的试验方法符合回收率的要求,且回收率较好。

3 结论与讨论

关于灯盏花中灯盏乙素的含量研究工作虽然已有开展,但是对灯盏乙素提取方法的研究则鲜有报道。通过对灯盏乙素不同提取方法的综合分析可知,不同组合对结果的影响相差可达 11 倍之多。所以,在灯盏乙素含量测定前对其提取方法进行优化是极为必要的,其所选择的方法对试验结果的影响是至关重要的。

为了保证所选择的方法具有较好的准确性和稳定性,该研究还对精密度、重复性和回收率进行了检验,结果也证明该研究所选择的提取和测定方法是可行的,其相关指标都能满足试验的要求。但值得注意的是,由于甲醇具有较强的挥发性,若提取液长时间放置后会导致试验的稳定性下降,这要求在灯盏乙素的提取过程中应尽量缩短试验所需的时间,尤其是在定容后应在尽可能短的时间内完成测定,从而减小由于甲醇挥发所造成结果的不准确性。

该试验结果表明,在甲醇浓度为 80%,料液比为 1:2 和超声时间为 30 min 时的灯盏乙素提取效果是最优的。同时精密度试验和重复性试验也证明,采用分光光度法测定灯盏乙素含量是可行的,可在常规的灯盏乙素含量测定中广泛使用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 张峻,李雪松,张卫东. 中药灯盏花化学成分与药理活性研究进展[J]. 药学实践杂志,2002,20(2):103-107.
- [3] 邵云,平其能,操锋,等. 灯盏花素新制剂、新剂型及其结构修饰研究进展[J]. 中国天然药物,2007,5(3):229-234.
- [4] 王桂霞. 灯盏花素药理及临床应用[J]. 时珍国医国药,1999,10(8):639.
- [5] 刘金荣,赵文斌,王宇航,等. 超声提取快速鉴定黄酮类化合物[J]. 华西药学杂志,2002,17(2):141-143.
- [6] 李光,余霜,陈庆富. 正交设计在红薯叶黄酮提取中的应用[J]. 北方园艺,2012(1):41-42.
- [7] 徐金,李晓东,刘洪章,等. 白粉玉簪甾体皂苷提取方法研究[J]. 北方园艺,2012(1):60-62.
- [8] 郭孝武,杨锐. 不同频率超声提取对益母草总碱提出率的影响[J]. 中国医院药学杂志,1999,19(8):465-466.
- [9] 王初华,赵会芬,杨生超. 不同施肥配比对灯盏花产量和灯盏乙素含量的影响[J]. 云南农业大学学报,2005,20(6):882-884.
- [10] 吴丰,刘爱民,马林. 栽培灯盏细辛中灯盏花乙素的含量测定[J]. 中国中药杂志,2007,32(11):1092-1093.
- [11] 苏文华,张光飞,周鸿,等. 氮素对短葶飞蓬生长和次生代谢产物积累的影响[J]. 云南植物研究,2010,32(1):41-46.
- [12] 张亚妮,苏文华,张光飞. 土壤水分胁迫对短葶飞蓬有效成分含量的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(10):1191-1194.
- [13] 何弥尔,王伟,吴立生,等. 星点设计-效应面法优选灯盏花乙素超声提取工艺[J]. 中药材,2010,33(6):984-988.
- [14] 孟晓彩,秦身钩,梁丽静. 紫外-可见分光光度法对灯盏乙素的电离常数的研究[J]. 河北工程大学学报(自然科学版),2009,26(4):92-95.
- [15] 滕海英,祝国强,黄平,等. 正交试验设计实例分析[J]. 药学服务与研究,2008,8(1):75-76.

Application of Orthogonal Optimization in Extracting Scutellarin

XIONG Hua-bin^{1,2}, A Xin-xiang³, YANG Xin-yu², CHEN Yi-jian^{1,2}, CHEN Meng-sheng², CHEN Ming-hong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500; 2. Institute of Chemical and Biotechnology, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500; 3. Institute of Biotechnology and Germplasm Research, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650223)

Abstract: Taking *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz as material, the extraction process of scutellarin was optimized by orthogonal experiment. The results showed that the most excellent technology was moderate ethanol concentration 80%, solid-liquid ratio 1:2 and ultrasonic time 30 min. The RSD of precision and repeatability experiment were 0.19% and 2.46% respectively, and the recovery of standard addition was 99.88%. Therefore, the extraction technology which optimized by the orthogonal experimental was better repeatability and reliability.

Key words: scutellarin; orthogonal optimization; UV spectrophotometry; test