

# 水石榴中总黄酮的提取工艺优化<sup>△</sup>

李金洲\*, 陈勇#, 陈子隽, 吕培群, 林玉港, 卢慧敏, 黄艳茹(广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)20-2807-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.20.14

**摘要** 目的:建立水石榴中总黄酮的含量测定方法,并优化其提取工艺。方法:以三氯化铝为显色剂,采用紫外-可见光分光光度法测定水石榴中总黄酮的含量。在单因素试验的基础上,以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取温度、提取次数为考察因素,以水石榴中总黄酮含量为指标,采用Plackett-Burman试验筛选对总黄酮含量有显著影响的因素,利用最陡爬坡试验确定最佳取值范围,再结合Box-Behnken响应面法优化总黄酮的提取工艺。结果:总黄酮的检测质量浓度线性范围为0.012~0.036 mg/mL( $r=0.9999$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3%;加样回收率为92.98%~99.86%(RSD=2.71%, $n=6$ )。优化所得提取工艺为乙醇体积分数60%,料液比1:34(g/mL),提取次数3次,提取时间60 min,提取温度80℃;在此工艺条件下,水石榴中总黄酮的平均含量为2.71%(RSD=1.69%, $n=6$ ),与模型预测值(2.64%)的相对误差为2.65%。结论:所建含量测定方法稳定性、重复性均较好,可用于测定水石榴中总黄酮的含量;优化所得提取工艺稳定、可行。

**关键词** 水石榴;总黄酮;提取工艺;Plackett-Burman试验;Box-Behnken响应面法;紫外-可见光分光光度法;含量测定

## Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Combretum alfrdii*

LI Jinzhou, CHEN Yong, CHEN Zijun, LYU Peiqun, LIN Yugang, LU Huimin, HUANG Yanru (College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for content determination of total flavonoids from *Combretum alfrdii*, and to optimize the extraction technology of total flavonoids from *C. alfrdii*. METHODS: Using aluminium trichloride as chromogenic agent, UV spectrum was adopted to determine the content of total flavonoids from *C. alfrdii*. Based on single factor test, ethanol

- [5] 殷之武,李娟阁.HPLC法测定复方酸枣仁软胶囊中阿魏酸和五味子甲素[J].中草药,2012,43(10):1961-1963.
- [6] 刘爱朋,马东来,郭利霄,等.酸枣仁价格波动与影响因素研究[J].农技服务,2017,34(8):12-13.
- [7] 国家中医药管理局,卫生部.76种中药材商品规格标准[S].1984.
- [8] 李鹏英,王海洋,李健,等.中药材商品规格等级的形成和演变[J].中国中药杂志,2016,41(5):764-768.
- [9] 石莉,赵焯清,欧阳臻,等.僵蚕药材商品规格等级标准研究[J].时珍国医国药,2018,29(12):3015-3018.
- [10] 刘爱朋,郑玉光,温子帅,等.基于层次分析法及多指标综合评价微波炮制对酸枣仁品质的影响[J].中药材,2018,41(1):84-88.
- [11] 夏成凯,胡云飞,陈思宇,等.基于中药质量常数的牡丹皮饮片等级划分[J].中成药,2018,40(3):647-653.
- [12] 曹雪,蔡广知,赵凌,等.基于复合质量常数的北柴胡饮片等级评价[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):36-41.
- [13] 邓哲,焦梦姣,章军,等.基于质量常数评价方法划分黄柏饮片等级研究[J].中国中药杂志,2017,42(17):3356-3361.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].1963年版.北京:人民卫生出版社,1963:296.
- [15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].1977年版.北京:人民卫生出版社,1977:630.
- [16] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第七册第十九卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:169-170.
- [17] 卢赣鹏.500味常用中药材的经验鉴别[M].北京:中国中医药出版社,1999:397.
- [18] 张贵君.现代中药材商品通鉴[M].北京:中国中医药出版社,2001:1826.
- [19] 金世元.金世元中药材传统鉴别经验[M].北京:中国中医药出版社,2010:254.
- [20] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006:3577.
- [21] 武延生.抢青对酸枣生物量积累的变化研究[J].北方园艺,2013(6):31-32.

(收稿日期:2019-05-08 修回日期:2019-08-22)

(编辑:陈宏)

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81660701);广西壮族自治区食品药品监督管理局瑶药材质量评价与标准研究项目;广西高校重点实验室项目(No.桂教科研[2014]6号);广西“2011协同创新中心”项目(No.桂教科研[2013]20号);广西中药药效研究重点实验室系统性研究课题(No.17-259-20-A5);广西中医药大学大学生创新创业训练项目(No.201813643055)

\* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:981530708@qq.com

# 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药物分析、中药制剂质量分析。E-mail:cy6381@163.com

volume fraction, material-liquid ratio, extraction time, extraction temperature and times were selected as investigation factors, and the content of total flavonoids was selected as response value, Plackett-Burman design was used to screen the factors that had significant influence on the content of total flavonoids from *C. alfrdii*. Then steepest climbing test was adopted to confirm the optimum valuing range; the extraction technology of total flavonoids was optimized by Box-Behnken response methodology. RESULTS: The linear range of total flavonoids were 0.012-0.036 mg/mL ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3%; the recovery ranged from 92.98% to 99.86% (RSD=2.71%,  $n=6$ ). The optimal extraction technology included that 60% ethanol, material-liquid ratio of 1:34 (g/mL), extracting for 3 times, lasting for 60 min, extraction temperature of 80 °C. Under this technology, average content of total flavonoids from *C. alfrdii* was 2.71% (RSD=1.69%,  $n=6$ ), and the relative error was 2.65% compared with predicted value of the model (2.64%). CONCLUSIONS: Established method is stable and reproducible, and can be used for content determination of total flavonoids from *C. alfrdii*. The optimized extraction method is stable and feasible.

**KEYWORDS** *Combretum alfrdii*; Total flavonoids; Extraction technology; Plackett-Burman experiment; Box-Behnken response surface methodology; UV spectrophotometry; Content determination

水石榴为使君子科风车子属植物风车子(*Combretum alfrdii* Hance)的干燥根、茎、叶,别名水蜜桃、清凉树,是广西壮族和瑶族等少数民族常用药材,主产于广西、广东、云南等地,其性平、淡,味微苦、甘,常被用于治疗黄疸型肝炎、蛔虫病、消化不良等疾病<sup>[1]</sup>。有文献报道,水石榴主要含有二苯乙烯类、三萜类、菲类及黄酮类等化学成分<sup>[2]</sup>。黄酮类化合物广泛存在于多种植物中,对心血管系统、生殖系统、消化系统、内分泌系统、神经系统均具有较好的药理作用<sup>[3-4]</sup>。目前对于水石榴的研究主要集中在其化学成分研究方面<sup>[5-7]</sup>,尚未见对其黄酮类成分的提取工艺及含量测定的相关研究。为此,本研究采用紫外-可见光分光光度法测定水石榴中总黄酮的含量,通过 Plackett-Burman 试验结合 Box-Behnken 响应面法优化其总黄酮的提取工艺,旨在为水石榴中总黄酮的质量控制以及药材资源的有效利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV1780 型紫外-可见光分光光度计(日本 Shimadzu 公司);SQP 型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);SDFY-200A 型高速万能粉碎机(上海比朗仪器有限公司);UPC-11-10T 型优普系列超纯水器(四川优普超纯科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

芦丁对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:131105,纯度:≥99%);三氯化铝(分析纯,广东光华科技股份有限公司);乙醇(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);水为超纯水。

### 1.3 药材

水石榴药材(编号:S1~S10),来源见表1,经广西中医药大学药学院郭敏副教授鉴定为使君子科风车子属植物风车子(*C. alfrdii* Hance)的干燥茎与叶。药材经粉碎后,过50目筛,密封保存,备用。

表1 药材样品来源

Tab 1 Source of samples

编号	来源	采集时间	药用部位	干燥方式
S1	广西金秀桐木	2017年12月	茎与叶	自然阴干
S2	广西来宾迁江	2017年12月	茎与叶	自然阴干
S3	广西恭城莲花	2017年12月	茎与叶	自然阴干
S4	广西隆安龙虎山	2018年4月	茎与叶	自然阴干
S5	广西柳州太平乡	2018年5月	茎与叶	自然阴干
S6	广西武鸣罗圩	2018年4月	茎与叶	自然阴干
S8	广西中医药大学药用植物园	2017年11月	茎与叶	自然阴干
S9	广西柳州沙塘	2018年5月	茎与叶	自然阴干
S10	广西都安地苏	2018年4月	茎与叶	自然阴干

## 2 方法与结果

### 2.1 水石榴中总黄酮的含量测定

采用紫外-可见光分光光度法测定水石榴中总黄酮的含量。

2.1.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品 12.0 mg,置于 50 mL 量瓶中,加 70% 乙醇稀释并定容,即得质量浓度为 0.24 mg/mL 的对照品溶液。

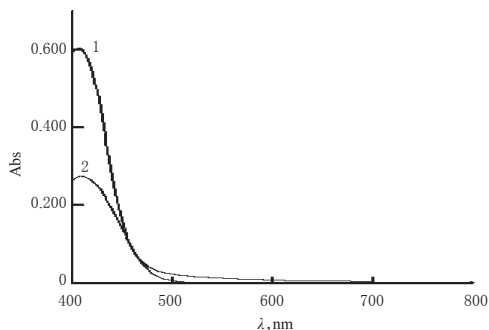
2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取药材样品粉末 1.00 g,置于 50 mL 锥形瓶中,加 70% 乙醇 30 mL,称定质量,于 70 °C 水浴加热回流提取 1 h,放冷,用 70% 乙醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 显色剂的制备 取三氯化铝 18.10 g,置于 1 000 mL 量瓶中,加水溶解并定容,即得 1% 三氯化铝水溶液。

2.1.4 空白对照溶液的制备 取 70% 乙醇 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,精密加入“2.1.3”项下 1% 三氯化铝水溶液 5 mL 进行显色反应,加 70% 乙醇定容,作为空白对照溶液。

2.1.5 检测波长的确定 以上述空白对照溶液在 400~800 nm 波长范围内进行基线调零,取对照品溶液和供试品溶液适量,在 400~800 nm 波长范围内扫描,结果见图 1。由图 1 可知,对照品溶液、供试品溶液分别在 410、406 nm 波长处有最大吸收,空白对照溶液在对应波长处均无吸收,故确定 406 nm 为检测波长。

2.1.6 线性关系考察 取“2.1.1”项下对照品溶液 0.5、



注:1.供试品溶液;2.对照品溶液

Note: 1. test sample solution; 2. substance control solution

图1 紫外扫描图

Fig 1 UV scanning spectra

0.75、1、1.25、1.5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加“2.1.4”项下1%三氯化铝水溶液5 mL进行显色反应,再加70%乙醇稀释至刻度,得质量浓度分别为0.012、0.018、0.024、0.030、0.036 mg/mL的系列线性工作溶液。将上述工作溶液于45℃水浴加热20 min后,冷却至室温,于406 nm波长处测定吸光度。以芦丁质量浓度( $x$ , mg/mL)为横坐标、吸光度( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得芦丁回归方程为 $y=24.093 4x+0.017 410 3(r=0.999 9)$ ,结果表明芦丁在0.012~0.036 mg/mL范围内线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液1 mL,按“2.1.4”项下方法显色反应并定容后,于406 nm波长处连续测定6次吸光度。结果,芦丁吸光度的RSD=0.17% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号:S10)1 mL,按“2.1.4”项下方法显色反应并定容后,分别于室温下放置5、10、20、30、40、50、60 min时,于406 nm波长处测定吸光度。结果,芦丁吸光度的RSD=0.74% ( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温下放置60 min内基本稳定。

2.1.9 重复性试验 取药材样品粉末(编号:S10),共6份,每份1.0 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下方法显色反应并定容后,于406 nm波长处测定吸光度。并入计算方法按公式[总黄酮含量(% )= $c_{测} \times DV_1/mV_2 \times 100\%$ 。式中, $c_{测}$ 为总黄酮的实际测得浓度, $D$ 为稀释倍数, $V_1$ 为溶剂体积, $m$ 为药材样品质量, $V_2$ 为取样量]计算样品中总黄酮的含量。结果,总黄酮的平均含量为1.75%,RSD=2.46% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取药材样品粉末(编号:S10),共6份,每份0.2 g,分别加入质量浓度为0.218 mg/mL的对照品溶液16 mL,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下方法显色反应并定容后,于406 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=6$ )

取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.202	3.434	3.488	6.770	95.64	97.17	2.71
0.201	3.417	3.488	6.900	99.86		
0.200	3.400	3.488	6.780	96.90		
0.200	3.400	3.488	6.810	97.76		
0.201	3.417	3.488	6.660	92.98		
0.201	3.417	3.488	6.900	99.86		

2.1.11 样品含量测定 取10批药材样品粉末各约1.0 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下方法显色反应并定容后,于406 nm波长处测定吸光度。平行操作3次,并按“2.1.9”项下公式计算总黄酮的含量。结果,10批药材样品中总黄酮的平均含量为1.70%~2.10%。

## 2.2 水石榴中总黄酮提取工艺单因素试验

参考相关文献<sup>[8]</sup>进行水石榴中总黄酮提取工艺单因素试验。

2.2.1 乙醇体积分数 取药材样品粉末,共15份,每份1.0 g,分为5组,固定料液比为1:30(g/mL)、提取次数为1次、提取温度为70℃、提取时间为60 min的条件下,考察不同乙醇体积分数(10%、30%、50%、70%、95%)对总黄酮含量的影响,详见图2A。由图2A可知,随着乙醇体积分数的增加,药材提取后总黄酮的含量呈现先增加后降低的趋势;当乙醇体积分数为30%时,总黄酮的含量最高,故选择乙醇体积分数为30%乙醇。

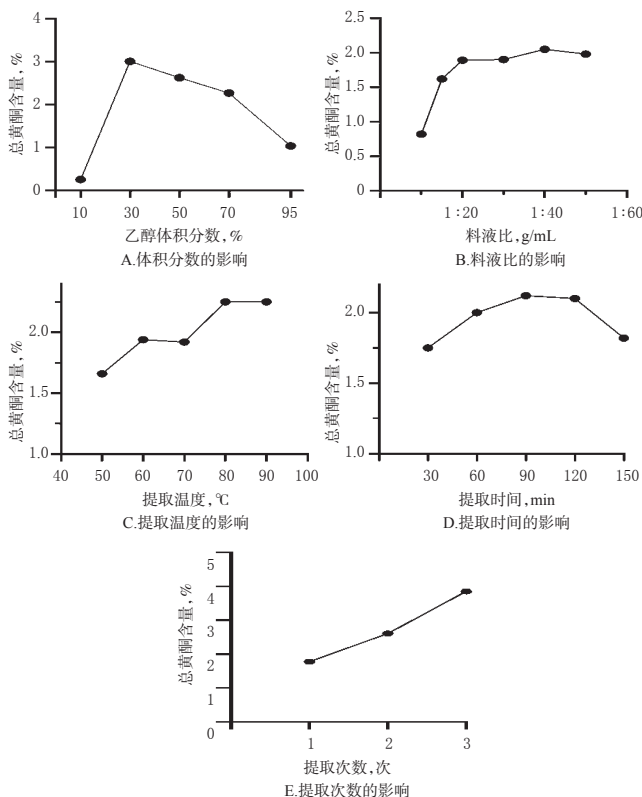


图2 单因素试验结果

Fig 2 Results of single factor tests



表4 Plackett-Burman 试验方案设计与结果

Tab 4 Trial plan and results of Plackett-Burman tests

试验号	A	B	C	D	E	Y, %
1	1	1	-1	1	1	3.51
2	1	1	1	-1	-1	2.50
3	1	-1	1	1	-1	2.31
4	1	-1	-1	-1	1	2.42
5	-1	-1	-1	-1	-1	1.86
6	1	-1	1	1	1	2.70
7	-1	-1	-1	1	-1	1.85
8	1	1	-1	-1	-1	3.16
9	-1	-1	1	-1	1	2.43
10	-1	1	1	1	-1	2.21
11	-1	1	-1	1	1	2.43
12	-1	1	1	-1	1	2.64

表5 Plackett-Burman 试验方差分析结果

Tab 5 Results of variance analysis for Plackett-Burman tests

误差来源	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
A	0.84	1	0.84	9.81	0.020 3
B	0.69	1	0.69	8.04	0.029 7
C	0.02	1	0.02	0.19	0.679 9
D	0.00	1	0.00	0.00	1.000 0
E	0.42	1	0.42	4.87	0.069 5
模型	1.97	5	0.39	4.58	0.045 6
残差	0.52	6	0.09		
总离差	2.48	11			

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 4 数据进行多项式拟合回归,得回归方程为  $Y=2.50+0.27A+0.24B-0.04C+0.00D+0.19E$  ( $P=0.045 6 < 0.05$ ), 这表明方程拟合显著性具有统计学意义。方差分析结果显示, 5 个因素对总黄酮含量影响的大小顺序为:  $A > B > E > C > D$ 。

2.3.2 最陡爬坡试验 根据 Plackett-Burman 试验结果, 选择对总黄酮含量具有显著性影响的因素, 即乙醇体积分数和料液比进行最陡爬坡试验, 再根据其效应大小, 设定变化方向和步长, 以逼近其最佳取值范围<sup>[9-10]</sup>; 同时结合单因素试验结果, 确定提取次数为 3 次、提取时间为 60 min、提取温度为 80 ℃, 结果见表 6。

表6 最陡爬坡试验设计与结果

Tab 6 Design and results of steepest climbing test

试验号	乙醇体积分数, %	料液比, g/mL	总黄酮含量, %
1	10	1:10	2.00
2	15	1:13	2.26
3	20	1:16	2.42
4	25	1:19	2.55
5	30	1:22	2.56
6	35	1:25	2.58
7	40	1:27	2.73
8	45	1:29	2.81
9	50	1:31	2.72
10	55	1:33	2.47

2.3.3 Box-Behnken 响应面法 在 Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验的基础上进行 Box-Behnken 试验。以

2.2.2 料液比 取药材样品粉末, 共 15 份, 每份 1.0 g, 分为 5 组, 固定乙醇体积分数为 70%、提取次数为 1 次、提取温度为 70 ℃、提取时间为 60 min 的条件下, 考察不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:30、1:40、1:50, g/mL) 对水石榴中总黄酮含量的影响, 详见图 2B。由图 2B 可知, 随着料液比的增加, 药材提取后总黄酮的含量呈现逐渐增加的趋势; 当料液比  $> 1:20$  (g/mL) 时, 总黄酮的含量增加不明显。考虑节约溶剂, 故选择料液比为 1:20 (g/mL)。

2.2.3 提取温度 取药材样品粉末, 共 15 份, 每份 1.0 g, 分为 5 组, 固定乙醇体积分数为 70%、料液比为 1:30 (g/mL)、提取次数为 1 次、提取时间为 60 min 的条件下, 考察不同提取温度(50、60、70、80、90 ℃) 对总黄酮含量的影响, 详见图 2C。由图 2C 可知, 随着提取温度的增加, 总黄酮的含量呈现逐渐增加的趋势; 当提取温度为 80 ℃ 时, 总黄酮的含量最高, 继续增加提取温度, 其含量不再增加, 故选择提取温度为 80 ℃。

2.2.4 提取时间 取药材样品粉末, 共 15 份, 每份 1.0 g, 分为 5 组, 固定乙醇体积分数为 70%、料液比为 1:30 (g/mL)、提取次数为 1 次、提取温度为 70 ℃ 的条件下, 考察不同提取时间(30、60、90、120、150 min) 对总黄酮含量的影响, 详见图 2D。由图 2D 可知, 随着提取时间的增加, 药材提取后总黄酮的含量呈现先增加后略有降低的趋势, 虽然在提取时间为 90 min 时总黄酮的含量最高, 但与提取时间为 60 min 时无明显差异。考虑到节约时间和成本, 故选择提取时间为 60 min。

2.2.5 提取次数 取药材样品粉末, 共 9 份, 每份 1.0 g, 分为 3 组, 固定乙醇体积分数为 70%、料液比为 1:30 (g/mL)、提取温度为 70 ℃、提取总时间为 60 min 的条件下, 考察不同提取次数(1、2、3 次) 对总黄酮含量的影响, 详见图 2E。由图 2E 可知, 随着提取次数的增加, 药材提取后总黄酮的含量呈现逐渐增加的趋势; 当提取时间为 3 次时, 总黄酮的含量最高, 故选择提取次数为 3 次。

### 2.3 水石榴中总黄酮提取工艺优化

2.3.1 Plackett-Burman 试验 在单因素试验基础上, 以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取温度(C)、提取时间(D)、提取次数(E)为考察因素, 以总黄酮含量(Y)为指标, 采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行 Plackett-Burman 试验<sup>[8]</sup>, 每个因素取 2 个水平。因素与水平见表 3, 试验方案设计与结果见表 4, 方差分析结果见表 5。

表3 Plackett-Burman 试验的因素与水平

Tab 3 Factors and levels of Plackett-Burman tests

水平	因素				
	A, %	B, g/mL	C, ℃	D, min	E, 次
-1	10	1:10	70	30	1
1	50	1:20	90	90	3

乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取次数(E)为自变量,以总黄酮含量(Y)为因变量,采用3因素3水平设计试验<sup>[11-12]</sup>,同时结合单因素试验结果确定提取时间为60 min、提取温度为80 ℃。因素与水平见表7,试验设计方案与结果见表8。

表7 Box-Behnken响应面法的因素与水平

Tab 7 Factors and levels of Box-Behnken response surface methodology

水平	因素		
	A, %	B, g/mL	E, 次
-1	35	1:25	1
0	45	1:29	2
1	55	1:33	3

表8 Box-Behnken试验设计方案与结果

Tab 8 Trial plan and results of Box-Behnken response surface methodology

试验号	A	B	E	Y, %
1	0	0	0	3.67
2	-1	0	1	3.55
3	0	0	0	3.71
4	0	0	0	3.77
5	-1	0	-1	2.39
6	1	0	-1	2.50
7	0	-1	-1	2.31
8	-1	-1	0	3.34
9	1	0	1	3.52
10	0	1	-1	2.38
11	0	0	0	3.73
12	0	-1	1	3.50
13	-1	1	0	3.18
14	1	1	0	3.10
15	0	1	1	3.38
16	1	-1	0	3.03
17	0	0	0	3.77

采用 Design Expert 8.0.6 软件对表8数据进行二次多元拟合,得 $Y=3.37-0.04A-0.02B+0.55E+0.06AB-0.04AE-0.05BE-0.24A^2-0.33B^2-0.51E^2$ ( $R=0.996$ ),这提示模型拟合度及预测性均较好。对模型进行方差分析,结果见表9。由表9可知,所建模型拟合显著性具有统计学意义( $P<0.01$ ),表明模型与实际情况吻合良好;模型失拟项显著性无统计学意义( $P=0.0736$ ),表明未知因素对模型拟合结果干扰小,模型误差较小。

2.3.4 响应面分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件,以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取次数(E)为响应因子,以总黄酮含量为响应值,绘制响应面和等高线图<sup>[13]</sup>,详见图3。由图3可知,在因素A与B的交互作用下,总黄酮的含量呈现先增加后降低的趋势;在因素A与E的交互作用下,总黄酮的含量呈现逐渐增加的趋势;在因素B与E的交互作用下,总黄酮的含量呈现逐渐增加的趋势。

表9 Box-Behnken试验方差分析结果

Tab 9 Results of variance analysis of Box-Behnken response surface methodology

方差来源	偏差平方和	自由度	均方差	F	P
模型	4.38	9	0.49	97.32	<0.0001
A	0.01	1	0.01	2.40	0.1652
B	$2.45 \times 10^{-3}$	1	$2.45 \times 10^{-3}$	0.49	0.5067
E	2.39	1	2.39	477.08	<0.0001
AB	0.01	1	0.01	2.64	0.1480
AE	$4.90 \times 10^{-3}$	1	$4.90 \times 10^{-3}$	0.98	0.3553
BE	$9.03 \times 10^{-3}$	1	$9.03 \times 10^{-3}$	1.80	0.2212
A <sup>2</sup>	0.23	1	0.23	46.47	0.0002
B <sup>2</sup>	0.47	1	0.47	93.03	<0.0001
E <sup>2</sup>	1.07	1	1.07	214.60	<0.0001
残差	0.04	7	$5.00 \times 10^{-3}$		
失拟项	0.28	3	$9.28 \times 10^{-3}$	5.15	0.0736
纯误差	$7.20 \times 10^{-3}$	4	$1.80 \times 10^{-3}$		
总离差	4.42	16			

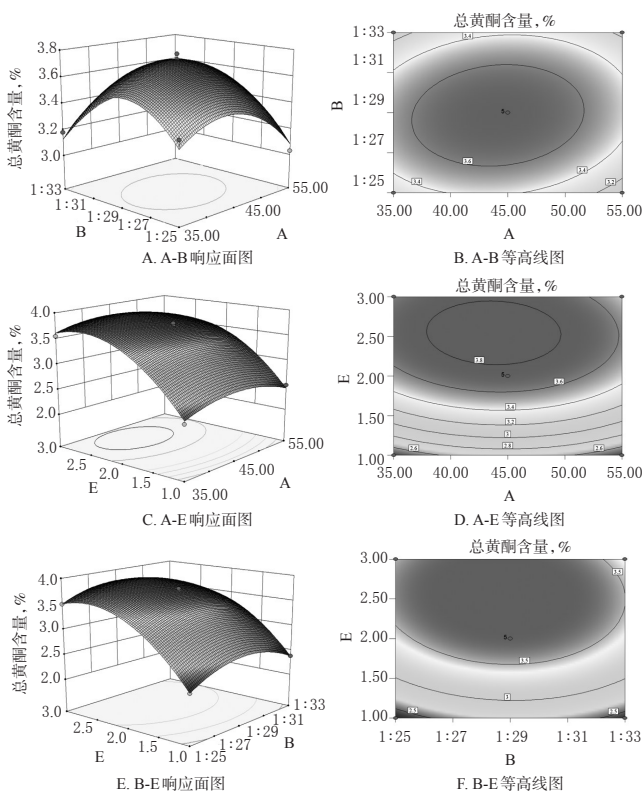


图3 各因素对总黄酮含量影响的响应面和等高线图  
Fig 3 Response surface and contour plots for the effects of each factor on the total flavonoids content

2.3.5 最优提取工艺的确定 基于 Design-Expert 8.0.6 软件分析得到水石榴中总黄酮的最优提取工艺为:乙醇体积分数59.18%,料液比1:33.63(g/mL),提取次数3.18次,提取时间60 min,提取温度80 ℃;总黄酮含量预测值为2.64%。考虑到实际操作的可行性,确定最优提取工艺为:乙醇体积分数60%,料液比1:34(g/mL),提取次数3次,提取时间60 min,提取温度80 ℃。

2.3.6 验证试验 按最优提取工艺平行操作6次,结果

显示,水石榴中总黄酮的平均含量为2.71% (RSD=1.69%, $n=6$ ),与预测值的相对误差为2.65%,提示所得最优工艺条件稳定、可靠。

### 3 讨论

Plackett-Burman 试验设计是基于各因素间无交互影响时,以优选因素主效应而进行的多因素高、低两个水平的试验设计,主要用于因素较多且未确定的因素对于响应变量有显著性影响的情况。但该试验设计不能区分主效应与交互作用的影响,仅能确定具有显著性影响的因素<sup>[14]</sup>。本研究通过 Plackett-Burman 试验发现,乙醇体积分数与料液比是影响水石榴中总黄酮含量的显著性因素。随后进行最陡爬坡试验以确定这两个因素的正、负效应,正效应即当增大因素水平时,总黄酮含量由低变高,反之则为负效应。通过设计合理的步长、增加试验的密集度,以逼近总黄酮含量最高值,确定2个显著性因素的最佳取值范围。

Box-Behnken 响应面的拟合方程仅在考察指标紧接区域范围时才能充分反映近似真实情形,在其他区域的拟合方程与近似函数方程几乎无相似之处,意义不大<sup>[15]</sup>。因此,本研究在 Plackett-Burman 试验和最陡爬坡试验的基础上结合 Box-Behnken 响应面法,对水石榴中总黄酮的提取工艺进行优化,可提高试验的精度和预测性<sup>[16]</sup>。

在测定总黄酮含量时,本课题组曾尝试以亚硝酸钠-硝酸铝-氢氧化钠为显色体系进行显色,并在400~800 nm 波长范围内进行全波长扫描,结果发现供试品溶液在500 nm 波长处没有特征吸收。随后改用三氯化铝法显色,结果发现供试品溶液在406 nm 波长处有最大吸收,且与对照品在410 nm 波长处的吸收峰接近,故本研究采用三氯化铝法显色。进一步对显色条件进行优化,如取供试品溶液0.3 mL,分别考察加入不同剂量显色剂(2、3、4、5、6 mL)、显色时间(5、10、15、20、25 min)、显色温度(25、35、45、55、65 ℃)时的吸光度,结果发现当显色剂剂量为5 mL、显色时间为20 min、显色温度为45 ℃时的吸光度最高。

本研究所得最优提取工艺为:乙醇体积分数60%,料液比1:34(g/mL),提取次数3次,提取时间60 min,提取温度80 ℃。在此条件下,水石榴中总黄酮含量为2.71%。

综上所述,本研究所建含量测定方法稳定性、重复性均较好,可用于测定水石榴中总黄酮的含量;优化所

得提取工艺稳定、可行。

### 参考文献

- [1] 张惠源,张志英.中国中药资源志要[M].北京:科学出版社,1994:816.
- [2] 陈子隼,陈勇,谢臻,等.风车子属植物研究概况[J].中国民族民间医药,2017,26(24):57-60.
- [3] 吴晓鹏,陈光英,蒋才武.风车子属植物的化学成分及药理作用研究进展[J].海南师范大学学报(自然科学版),2007,20(1):63-68.
- [4] 蒋才武,高淑景,黄健军.壮药风车子叶化学成分研究[J].时珍国医国药,2011,22(5):1146-1147.
- [5] 刘兆花,王艳婷,刘寿柏,等.长毛风车子的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2014,26(3):348-350.
- [6] 王洪石.崖县风车子的化学成分及药理活性研究[D].海口:海南师范大学,2015.
- [7] 刘兆花.风车子树枝叶及臀果木枝叶的化学成分研究[D].青岛:青岛科技大学,2013.
- [8] 罗旭东,李成义,李旭,等.当归根、茎中总黄酮的提取工艺优化[J].中国药房,2018,29(3):364-368.
- [9] 李杰,罗建成,李慧星,等.响应面分析法优化西瓜番茄红素提取工艺条件[J].食品研究与开发,2017,38(10):53-58.
- [10] 郑辉杰,李志强,刘伟,等.响应面法优化番茄红素提取工艺研究[J].北方园艺,2009(2):5-8.
- [11] 董满良,董小萍,李鸿翔,等. Plackett-Burman 联用 Box-Behnken 效应面与正交试验优化棘茎楸木总皂苷提取工艺及其比较研究[J].中国药房,2013,24(3):227-230.
- [12] 汪彬彬,车振明. Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖化酶发酵培养基的研究[J].食品科技,2011,36(5):41-45.
- [13] 徐东伟,王绍辉,刘同祥. Box-Behnken 响应面法优化通关藤总皂苷的超声提取工艺及其纯化工艺研究[J].中国药房,2016,27(25):3535-3538.
- [14] 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):296.
- [15] 程艳刚,谭金燕,叶文冲,等.基于 Plackett-Burman 设计和 Box-Behnken 响应面法优化仙鹤草总黄酮超声提取工艺及其抗氧化抗肿瘤活性研究[J].中华中医药学刊,2018,36(10):2414-2419.
- [16] 史亚军,王媚,吴星,等. Plackett-Burman 设计与星点设计-效应面法优化珠子参皂苷磷脂复合物制备工艺[J].中国药房,2015,26(4):518-521.

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-08-22)

(编辑:陈宏)