

Plackett-Burman 设计联用星点设计-响应面法优选大青叶中靛玉红的提取工艺

滕 毅, 杨海玲*

浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

摘要: **目的** 运用 Plackett-Burman 实验设计联用星点设计-响应面法 (CCD-RSM) 筛选超声-微波协同提取大青叶中靛玉红的提取工艺。 **方法** 运用 Plackett-Burman 实验设计筛选主要影响因素, 采用 CCD-RSM 优选靛玉红的提取工艺。以乙醇体积分数、料液比、提取时间为自变量, 靛玉红提取量为因变量, 通过对自变量与因变量的完全 2 次响应曲面的回归拟合, 利用三维曲面图直观分析大青叶中靛玉红提取最佳工艺, 并进行预测分析。 **结果** 靛玉红的最佳提取工艺为乙醇体积分数为 62%, 液料比为 26, 提取时间为 9 min。在此最佳条件下, 大青叶中靛玉红提取量的最大估计值为 4.37 mg/g, 实验结果与模型预测值相符。 **结论** 利用 Plackett-Burman 实验设计联用 CCD-RSM 确定了大青叶中靛玉红的提取工艺, 该方法简便, 精度更高、重现性好、预测性强。

关键词: 大青叶; 靛玉红; Plackett-Burman 设计; 星点设计-效应面法; 提取工艺

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)08-1942-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.025

Optimal extraction of indirubin from *Isatidis Folium* based on Plackett-Burman design combined with central composite design-response surface methodology

TENG Yi, YANG Hai-ling

Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

Abstract: Objective To investigate the significance of each influencing factor and optimize the process of extracting indirubin from *Isatidis Folium* by Plackett-Burman design combined with central composite design-response surface methodology (CCD-RSM). **Methods** Plackett-Burman experimental design was used to screen the main influencing factors, and CCD-RSM was used to optimize the extraction process of indirubin. With the concentration of ethanol, the ratio of material to liquid, and the extraction time as independent variables and the extraction amount of indirubin as dependent variable, the optimum extraction process of indirubin from *Isatidis Folium* was predicted and analyzed by multiple linear regression and binomial fitting models with independent and dependent variables and the three-dimensional surface graph. **Results** The optimal extraction process of indirubin was as follows: ethanol concentration 62%, solvent/sample ratio of 26, and extraction time 9 min. Under these conditions, the maximal extraction rate of indirubin was 4.37 mg/g which was consistent with model predictions. **Conclusion** The optimal process is simple and convenient for extracting indirubin from *Isatidis Folium* with high precision, reproducibility, and predictability.

Key words: *Isatidis Folium*; indirubin; Plackett-Burman design; central composite design-response surface methodology; extraction process

大青叶 *Isatidis Folium* 为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶。其味苦, 性寒, 归心、胃经, 具有清热解毒、凉血消斑功效, 临床用于温病高热、神昏、发斑发疹、疟腮、喉痹、丹毒、痈肿等证的治疗^[1]。大青叶为临床常用清热解毒中

药, 应用广泛, 疗效确切, 含有靛玉红、靛蓝、有机酸、苷类及甾醇类等药效物质^[2]。现代药理学研究表明, 大青叶中含有的靛玉红具有清除自由基、抗炎、抗氧化、抗病毒、抗菌、抗肿瘤等作用^[3-7]。目前, 对于大青叶中靛玉红的提取工艺优化多

收稿日期: 2019-01-21

作者简介: 滕 毅, 男, 硕士, 讲师, 从事中药活性成分研究。Tel: (0574)88223287 E-mail: 77272206@qq.com

*通信作者 杨海玲, 女, 硕士, 高级工程师, 从事中药制剂、新药开发及药效物质基础研究。Tel: (0574)88222351 E-mail: 17483121@qq.com

采用正交试验设计法,而采用 Plackett-Burman 设计筛选关键因素及星点设计-响应面法 (CCD-RSM) 优化提取工艺的报道较少。Plackett-Burman 实验设计联用 CCD-RSM 采用非线性数学模型拟合,较常用的正交试验设计实验精度高、预测性好、可信度高^[8-12]。选用超声-微波协同萃取相对于传统方法可缩短提取时间、提高提取效率、降低能耗^[13]。本实验以大青叶为原料,采用 Plackett-Burman 设计法筛选影响大青叶提取液中靛玉红提取量的主要因素,并通过 CCD-RSM 优化提取工艺,确定较优的提取工艺条件,为大批量生产提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2010A HT 高效液相色谱仪,日本岛津公司; CW-2000 型超声-微波协同萃取仪,上海新拓微波溶样测试技术有限公司,微波功率 0~800 W 连续可调,超声功率 50 W; FA2004N 电子天平,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 药材与试剂

对照品靛玉红,中国食品药品检定研究院,批号 110717-200204,质量分数 $\geq 98.5\%$;大青叶药材,安徽亳州市双华中药饮片厂,经宁波立华制药有限公司总工程师周海滨鉴定为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶;娃哈哈饮用纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;色谱甲醇,天津四友试剂厂;95%乙醇,沈阳市华东试剂厂。

2 方法与结果

2.1 大青叶中靛玉红的提取

选取经过鉴定的大青叶样品,挑选、洗净、50 °C 干燥、粉碎,过四号筛,备用。

2.2 靛玉红含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);柱温 25 °C;流动相为甲醇-水 (75:25);体积流量为 1 mL/min;检测波长 289 nm;进样量 20 μ L;理论塔板数按靛玉红峰计算应不低于 4 000^[1]。

2.2.2 对照品溶液的制备 取靛玉红对照品适量,精密称定,加甲醇制成含 2 μ g/mL 的溶液,即得靛玉红对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 4 g,精密称定,置 250 mL 锥形瓶中,按照 Plackett-Burman 试验和 CCD-RSM 试验加入一定量试剂,放入超声-微波协同萃取仪中加热。放冷,抽滤后,滤

液用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别取“2.1.2”项下对照品溶液,加甲醇稀释制成质量浓度为 0.50、1.00、2.00、4.00、8.00 μ g/mL 的对照品溶液,摇匀。在选定的色谱条件下分别进样 20 μ L,记录各色谱峰峰面积,以对照品进样量为横坐标 (X),峰面积积分值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,计算回归方程为 $Y=168\ 119 X-122\ 169$, $r=0.999\ 9$,表明靛玉红进样量在 0.01~0.16 μ g 具有良好的线性关系。

2.3 Plackett-Burman 实验优化

2.3.1 Plackett-Burman 实验设计 Plackett-Burman 设计法是一种经济而有效的 2 水平实验方法,可以通过较少的实验快速地从众多影响因素中筛选出显著影响因素^[14]。实验过程中对微波功率 (x_1)、提取次数 (x_2)、液料比 (x_3)、粒径 (x_4)、提取时间 (x_5)、超声功率 (x_6)、乙醇体积分数 (x_7)、溶剂类型 (x_8) 8 个因素分别编码,并设置 1 个常量 (x_9)。每个因素设置 2 个水平,高水平赋值为+1,低水平赋值为-1,以大青叶提取液中靛玉红提取量 (Y ,提取液中靛玉红质量/药材质量) 为响应值,采用 Minitab 软件进行实验设计,共 12 组实验,因素水平编码、实验设计与结果见表 1。

2.3.2 Plackett-Burman 设计数据分析 应用 Minitab 软件对表 1 中的数据进行逐步回归分析,以 Y 作为响应值的最优方程为 $Y=3.207\ 8+0.274\ 5 x_1-0.715\ 7 x_2-0.040\ 1 x_3-0.102\ 1 x_4-0.520\ 7 x_5-0.171\ 8 x_6+1.198\ 2 x_7-0.439\ 7 x_8$, $r=0.996\ 9$,结果表明该回归模型的拟合情况良好,回归方程的代表性较好,其校正决定系数 (r_{adj}) 为 0.983 1,表明此模型能解释 98.31% 效应值变化,因此该模型拟合程度良好。对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 2、3 和图 1。由表 2、3 可知, F 检验 ($P=0.027$) 说明回归在统计学上是显著的,即该模型在被研究的整个回归区域拟合较好。影响大青叶提取液中靛玉红提取量的主要因素为乙醇体积分数、提取次数、提取时间、溶剂类型。标准化效应的正态图表明,乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数对大青叶提取液中靛玉红提取量的影响极显著。综合分析,影响靛玉红提取量的主要因素为乙醇体积分数、料液比、提取时间和提取次数。

2.4 CCD-RSM 实验优化

2.4.1 CCD-RSM 实验设计 在 Plackett-Burman 实

表 1 Plackett-Burman 实验设计与结果

Table 1 Plackett-Burman experimental design and results

试验号	x_1/W	x_2	x_3	x_4/mm	x_5/h	x_6/W	$x_7/\%$	x_8	x_9	靛玉红/(mg·g ⁻¹)
1	100 (+1)	1 (-1)	10 (-1)	0.15 (-1)	0.3 (+1)	0 (+1)	70 (+1)	乙醇 (-1)	(+1)	3.778
2	30 (-1)	1 (-1)	30 (+1)	0.25 (+1)	0.3 (+1)	50 (-1)	70 (+1)	水 (+1)	(-1)	4.579
3	30 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	0.25 (+1)	0.3 (+1)	0 (+1)	30 (-1)	水 (+1)	(+1)	1.124
4	30 (-1)	3 (+1)	30 (+1)	0.15 (-1)	0.3 (+1)	50 (-1)	30 (-1)	乙醇 (-1)	(+1)	4.048
5	100 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	0.15 (-1)	0.1 (-1)	50 (-1)	70 (+1)	水 (+1)	(+1)	3.837
6	100 (+1)	3 (+1)	30 (+1)	0.15 (-1)	0.3 (+1)	0 (+1)	30 (-1)	水 (+1)	(-1)	4.285
7	30 (-1)	3 (+1)	30 (+1)	0.25 (+1)	0.1 (-1)	0 (+1)	70 (+1)	乙醇 (-1)	(+1)	4.994
8	100 (+1)	1 (-1)	30 (+1)	0.25 (+1)	0.1 (-1)	0 (+1)	30 (-1)	乙醇 (-1)	(-1)	4.017
9	30 (-1)	1 (-1)	10 (-1)	0.15 (-1)	0.1 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	乙醇 (-1)	(-1)	1.468
10	100 (+1)	3 (+1)	10 (-1)	0.25 (+1)	0.3 (+1)	50 (-1)	70 (+1)	乙醇 (-1)	(-1)	0.551
11	100 (+1)	3 (+1)	10 (-1)	0.25 (+1)	0.1 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	水 (+1)	(+1)	3.692
12	30 (-1)	3 (+1)	10 (-1)	0.15 (-1)	0.1 (-1)	0 (+1)	70 (+1)	水 (+1)	(-1)	1.119

表 2 Plackett-Burman 设计方差分析

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman design results

因素	效应	系数	系数标准误	T 值	P 值
常量		3.207 8	0.088 84	36.11	0.001
x_1	0.549 0	0.274 5	0.088 84	3.09	0.091
x_2	-1.431 5	-0.715 7	0.088 84	-8.06	0.015
x_3	-0.080 1	-0.040 1	0.088 84	-0.45	0.696
x_4	-0.204 3	-0.102 1	0.088 84	-1.15	0.369
x_5	-1.041 5	-0.520 7	0.088 84	-5.86	0.028
x_6	-0.343 6	-0.171 8	0.088 84	-1.93	0.193
x_7	2.396 5	1.198 2	0.088 84	13.49	0.005
x_8	-0.879 5	-0.439 7	0.088 84	-4.95	0.038
x_9	-0.423 3	-0.211 7	0.088 84	-2.38	0.140

表 3 Plackett-Burman 设计回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman design results

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
主效应	30.891 5	9	3.432 40	36.24	0.027
残差误差	0.189 4	2	0.094 71		
总离差	31.080 9	11			
r^2	0.993 9				
r_{adj}^2	0.966 5				
r_{pred}^2	0.780 6				

验的基础上, 根据星点设计原理, 以靛玉红含量为响应值, 在固定微波功率 100 W、超声功率 50 W、提取 2 次、药材粒径以通过三号筛为准的前提下,

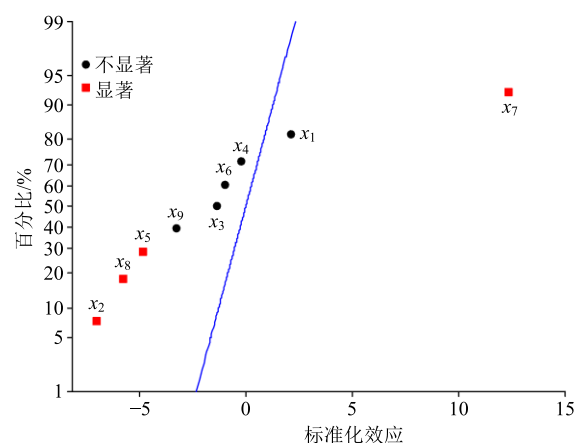


图 1 标准化效应的正态图

Fig. 1 Normal graph of standardization effect

选择乙醇体积分数 (x_1)、液料比 (x_2) 和提取时间 (x_3) 3 个因素为自变量, 每个因素确定 5 个水平, 共 20 个试验点 (6 个中心点), 以靛玉红提取量作因变量考察指标, 采用 CCD-RSM 分析以寻求最优工艺参数, 因素水平编码、试验安排和结果见表 4。

2.4.2 CCD-RSM 数据分析 应用 Design-Expert 8.0 软件对表 4 中的数据进行 2 次多元回归拟合, 得到乙醇体积分数、料液比和提取时间与靛玉红提取量之间的 2 次多项回归方程, 回归方程为 $Y=4.51+0.46 X_1+0.63 X_2+0.18 X_3-0.07 X_1 X_2+0.12 X_1 X_3+0.12 X_2 X_3-0.2 X_1^2-0.29 X_2^2-0.25 X_3^2$, 回归方程系数 $r=0.964 4$, 说明模型能解释 96.44% 响应值的变化, 表明该回归模型的拟合情况良好, 回归方程的代表性较好, 能准确的预测实际情况。其校正决定系数 r_{adj} 为 0.931 1, 表明此模型能解释 93.11% 效应

值变化, 因此该模型拟合程度良好。

对上述回归模型进行显著性检验, 结果见表 5。表 5 回归方程显著性检验 $P < 0.000\ 1$, 1 次项、2 次项中乙醇体积分数、料液比和提取时间对大青叶提取液中靛玉红提取量的曲面效应差异显著 ($P < 0.001$ 、 0.01 、 0.05); 3 个因素的两两交互项对靛玉红提取量的曲面效应作用不显著 ($P > 0.05$)。

2.4.3 响应面分析及最优提取条件的确定 依据回归方程, 在保持 1 个因素编码值为 0 时, 借助 Design-Expert 8.0 软件绘制其他 2 个因素与响应值关系的三维响应面图, 结果见图 2。由图 2 可以看出乙醇体积分数、料液比和提取时间 3 个因素中任意 2 个因素之间对靛玉红提取量的提取影响均较为显著, 且响应曲面陡峭。为确定这 3 个影响因素的最佳取

表 4 CCD-RSM 实验设计与结果

Table 4 Design and results of CCD-RSM experiment

试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/min	靛玉红/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/min	靛玉红/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	38 (-1)	14 (-1)	9 (-1)	2.44	11	50 (0)	10 (-1.682)	12	3.20
2	62 (+1)	14	9	3.21	12	50	30 (+1.682)	12	4.60
3	38	26 (+1)	9	3.82	13	50	20	6 (-1.682)	3.67
4	62	26	9	4.45	14	50	20	18 (+1.682)	4.32
5	38	14	15 (+1)	2.19	15	50	20	12	4.48
6	62	14	15	3.62	16	50	20	12	4.52
7	38	26	15	4.21	17	50	20	12	4.51
8	62	26	15	5.21	18	50	20	12	4.49
9	30 (-1.682)	20 (0)	12 (0)	3.41	19	50	20	12	4.53
10	70 (+1.682)	20	12	4.86	20	50	20	12	4.47

表 5 CCD-RSM 实验设计回归模型方差分析

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for CCD-RSM experimental results

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
X_1	2.92	1	2.92	34.32	0.000 2	模型	11.32	9	1.26	14.78	<0.000 1
X_2	5.43	1	5.43	63.86	<0.000 1	失拟项	0.85	5	0.17		
X_3	0.43	1	0.43	5.09	0.047 6	误差	0.00	5	0.00		
X_1X_2	0.04	1	0.04	0.46	0.512 7	总离差	12.17	19			
X_1X_3	0.12	1	0.12	1.35	0.271 6	拟合度	0.93				
X_2X_3	0.12	1	0.12	1.35	0.271 6	校正拟合度	0.87				
X_1^2	0.60	1	0.60	7.07	0.023 9	展望拟合度	0.47				
X_2^2	1.18	1	1.18	13.82	0.004 0	信噪比	12.93				
X_3^2	0.92	1	0.92	10.76	0.008 3						

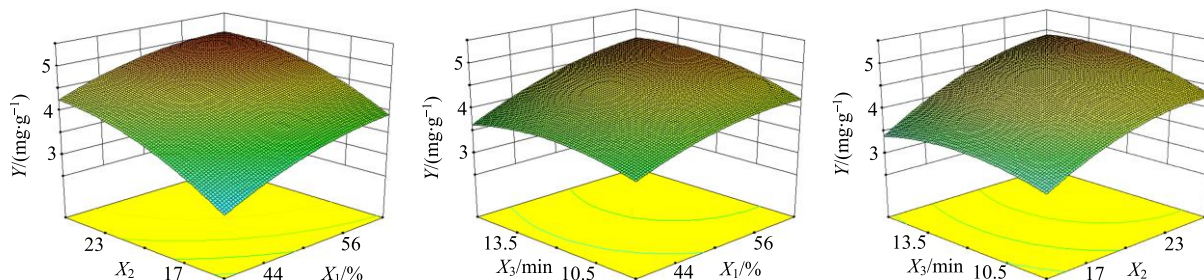


图 2 乙醇体积分数、料液比和提取时间对靛玉红含量影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plots for effects of ethanol concentration, sample/solvent ratio, and extraction time on content of indirubin

值, 通过 Design-Expert 8.0 软件分析, 得出回归模型存在最大值点, X_1 、 X_2 、 X_3 的代码值分别为 1、1、-1, 与之对应的实测值乙醇体积分数为 62%、液料比为 26、提取时间为 9 min, 此时大青叶提取液中靛玉红提取量的最大估计值为 4.37 mg/g。

2.5 模型验证

为了验证此提取模型方程的适用性, 在乙醇体积分数、液料比、提取时间最优的水平上, 重复试验 3 次, 测定值为 4.27、4.34、4.35 mg/g, 提取物总量为 4.32 mg/g (RSD 为 1.01%), 与预测值 4.37 mg/g 吻合极好, 这说明响应面设计优化靛玉红提取最佳条件准确可靠^[15]。

3 讨论

Plackett-Burman 设计联用 CCD-RSM 在实验设计精度上优于正交实验设计, 为其应用于中药提取工艺优化的可行性提供了依据^[16]。Plackett-Burman 设计和星点设计的结合, 充分发挥了各自的优点。

本实验采用 Plackett-Burman 设计联用 CCD 并通过 RSM 分析乙醇体积分数、液料比和提取时间 3 个因素对大青叶提取液中靛玉红含量的影响, 优化得到的最佳提取工艺: 乙醇体积分数为 62%, 液料比为 26, 提取时间为 9 min。验证实验表明此方程具有可预测性。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[2] 于喆源, 王 勤, 宋玉霞. Box-Behnken 模型响应面法优化大青叶药材中靛蓝的提取条件 [J]. 河西学院学报, 2018, 34(5): 32-38.

[3] Zhao G H, Li T, Qu X Y, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction of indigo and indirubin from *Isatis indigotica* Fort. and their antioxidant capacities [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, 26(5): 1313-1323.

[4] 高慧娟, 刘志芳, 李彩霞, 等. 双向固体发酵对板蓝根和大青叶抑菌的增效作用初探 [J]. 中草药, 2016,

47(18): 3187-3192.

[5] 刘丽娟, 王允亮, 许树青, 等. 靛玉红、色胺酮对 LPS 诱导 RAW264.7 炎症细胞模型的抗炎作用研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(8): 1069-1072.

[6] 解光艳, 程惠娟, 汪长中, 等. 靛玉红、蛇床子素抗外阴阴道念珠菌病混合菌生物膜作用的研究 [J]. 中国微生物生态学杂志, 2012, 24(6): 493-496.

[7] 赖金伦, 刘玉辉, 刘 畅, 等. 中药靛玉红作用机理及其临床应用研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(1): 76-79.

[8] 张莹莹, 刘 伟, 周文杰, 等. 少腹逐瘀凝胶贴膏剂基质处方优化及体外透皮特性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4284-4292.

[9] 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(1): 292-298.

[10] 霍慧君, 钟凌云. 星点设计-效应面法优选江西樟帮厚朴炮制工艺 [J]. 中成药, 2012, 34(1): 105-108.

[11] 蔡恩博, 张崇禧, 朱启光, 等. 星点设计-效应面法优选暴马丁香树皮中紫丁香苷提取工艺 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1808-1811.

[12] 胡玉飘, 崔秀明, 张泽君, 等. 失效模式分析和星点设计-效应面法优化熟三七皂苷类成分纯化工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3009-3016.

[13] 钟杨生, 陈恒文, 陈芳艳, 等. 超声-微波协同萃取法提取桑叶 γ -氨基丁酸的工艺研究 [J]. 广东农业科学, 2018, 45(8): 107-112.

[14] Wu Z J, Ruan H S, Wang Y H, *et al.* Optimization of microwave-assisted extraction of puerarin from *Radix Puerariae* using response surface methodology [J]. *Sep Sci Technol*, 2013, 48: 1657-1664.

[15] 程旺开, 许月明, 张冬冬. 响应面优化黄秋葵叶多糖的提取工艺及其抗氧化活性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 38-42.

[16] 谭玉柱, 童婷婷, 谢运飞, 等. Plackett-Burman 实验设计联用星点设计效应面法优选大黄地上部位蒽醌类成分提取工艺 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(6): 410-414.