

回归正交设计优化西红花苷的提取工艺

战峰, 李超, 韩泳平* (西南民族大学化学与环境保护工程学院, 成都 610041)

摘要: 目的 研究从西红花中提取西红花苷的最佳工艺条件。方法 以西红花苷的提取率为指标, 在使用单因素试验方法考察乙醇浓度、提取时间、提取温度对西红花中西红花苷提取率的基础上, 应用回归正交方法建立 3 元 2 次方程优化西红花苷的提取工艺。结果 最佳的提取工艺是: 乙醇浓度 52%, 提取时间 30 min, 提取温度 30 ℃。此条件下, 提取率为 0.643 5 mg·g⁻¹。结论 在优化的提取工艺下, 西红花中西红花苷提取率较高。

关键词: 西红花; 西红花苷; 回归正交试验

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)08-0729-04

Optimization of Extraction of Crocin from *Crocus Sativus* L. by Orthogonal Regression Design

ZHAN Feng, LI Chao, HAN Yongping* (Southwest University for Nationalities, College of Chemistry and Environment Protection Engineering, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the optimal extraction condition of crocin from *Crocus sativus* L. **METHODS** Taking the total extraction ratio of crocin from *Crocus sativus* L. as an index, the quadratic orthogonal regression design which was based on the single factor method including the concentration of ethanol, extraction time and extraction temperature was employed to build the equation and to optimize the extraction technique. **RESULTS** The optimized condition was as follows: the concentration of ethanol was 0.52%, extracted 30 minutes at the temperature of 30 ℃, and the extraction ratio reached 0.643 5 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** Under the optimal extraction condition, the total extraction ratio of crocin from *Crocus sativus* L. is much higher.

KEY WORDS: *Crocus sativus* L.; crocin; orthogonal regression design

西红花又称藏红花、番红花, 是鸢尾科番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头, 属名贵药材, 具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神^[1]等功效。西红花中的苷类成分是其主要的活性部位, 包括西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III, 其中以西红花苷-I^[2-4]为主。目前对西红花苷的含量测定主要有薄层扫描法^[2]、高效液相色谱法^[4]、分光光度法^[5]。对于提取工艺一般采用超声提取法, 但优化条件的研究尚未见报道。考虑到回归正交法能够在因素的试验范围内选择适当的试验点, 可以克服一般正交试验法中优化点只能限制在已定水平的缺点, 本试验应用回归正交法对西红花苷的优化提取条件进行探索, 为西红花药材的提取工艺提

供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂); 202-AD 电热恒温干燥箱(金坛市荣华仪器制造有限公司); KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂); MOOEL ESJ200-4 电子天平(沈阳龙腾电子有限公司)。

1.2 材料

西红花药材(药材市场购买, 经西南民族大学化学与环境保护工程学院刘圆教授鉴定为 *Crocus*

基金项目: 国家外专局项目(Y-2010-12)

作者简介: 战峰, 女, 硕士生 Tel: 13408060390
13550391197 E-mail: yphan65@tom.com

E-mail: zhanfeng198622@yahoo.com.cn

*通信作者: 韩泳平, 男, 博士, 教授 Tel:

sativus L.的干燥柱头); 西红花苷- I 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111588-200501, 纯度: 98%)。

2 方法与结果

2.1 西红花中西红花苷的 UV 测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取西红花苷- I 对照品 0.010 0 g 置于 100 mL 棕色量瓶中, 用 50% 乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀。再用移液管量取 0.1 mL 至 100 mL 的棕色量瓶中, 定容至刻度, 制备成浓度为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 至 4 °C 冰箱避光保存。

2.1.2 最大吸收波长的确定 取 5 mL 对照品溶液, 在 350~500 nm 波长扫描, 结果最大吸收波长为 440 nm。

2.1.3 标准曲线制备 精密量取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0 mL 对照品溶液于 50 mL 棕色量瓶中并定容至刻线, 按照紫外可见分光光度法(中国药典 2010 年版附录 VA)分别测定吸光度。以溶液中西红花苷- I 的质量对吸光度进行线性回归, 得方程为: $Y=6.471\ 5X+0.007$, $r=0.999\ 6$, 线性范围为 0.05~6.5 μg 。

2.2 西红花苷的提取

精密称取 0.010 1 g 西红花粉末于 50 mL 棕色量瓶中, 按照试验预先安排的因素和水平用一定浓度和体积的乙醇超声提取, 将提取液过滤, 转入另一棕色量瓶中, 用相应浓度的乙醇溶液定容至刻度视为待测液, 用一定量的待测液在 440 nm 处测定吸光度并计算提取率。

2.3 单因素试验

分别考察乙醇浓度为 40%, 50%, 60%, 70%, 提取时间为 10, 20, 30, 40 min, 提取温度为 20, 30, 40, 50, 60 °C 对西红花苷提取率的影响。

2.4 单因素试验结果

2.4.1 乙醇浓度 在保持温度 25 °C、超声时间 30 min 的条件下, 分别使用浓度为 40%, 50%, 60% 及 70% 的乙醇, 结果乙醇浓度为 50% 时, 提取液的提取率最高, 见图 1。

2.4.2 提取时间 在保持乙醇浓度 50%, 温度 25 °C 的条件下, 超声时间分别为 10, 20, 30 及 40 min, 结果提取率随时间延长而增大, 但超过 30 min 后开始下降, 可能是长时间超声造成西红花苷分解, 故提取时间以 30 min 为宜, 见图 2。

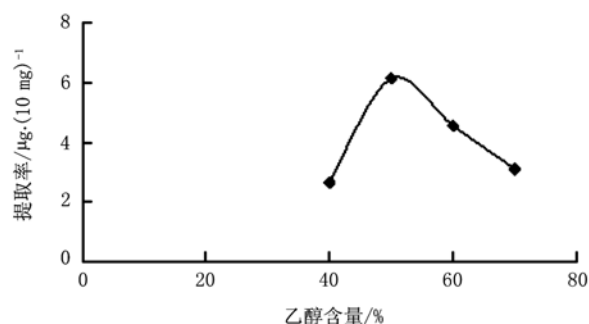


图 1 乙醇浓度对西红花苷提取率的影响

Fig 1 Effects of ethanol concentration on extraction rate of corcinn

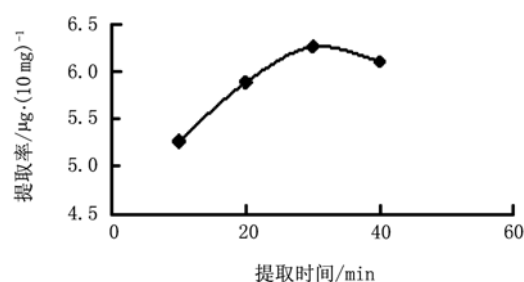


图 2 提取时间对西红花苷的提取率的影响

Fig 2 Effects of extraction time on extraction rate of corcinn

2.4.3 提取温度 在保持乙醇浓度为 50%, 超声时间为 30 min 的条件下, 分别选择提取温度为 20, 30, 40, 50 及 60 °C, 提取率随温度的升高而增大, 温度达一定时, 提取率趋于不变, 为避免高温使西红花苷分解, 提取温度以 30 °C 为宜, 见图 3。

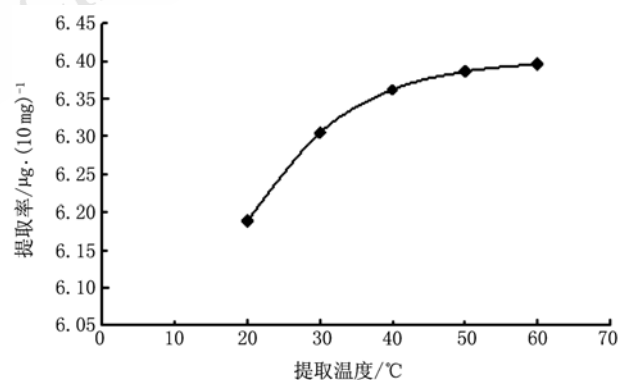


图 3 提取温度对西红花苷提取率的影响

Fig 3 Effects of extraction temperature on extraction rate of corcinn

2.5 回归正交组合设计试验与结果

2.5.1 回归正交组合设计 根据考察因素和零水平试验次数确定星号臂值 r 为 1 353。因素水平编码见表 1。

表 1 回归正交设计因素水平编码

Tab 1 Factor and level coding of orthogonal regression design

项 目	乙醇浓度/%	提取时间/min	提取温度/℃
变化间距	0.074	7.0	7.4
上星号臂(+r)	0.600	35.0	40.0
上水平(+1)	0.574	32.0	37.4
零水平(0)	0.500	25.0	30.0
下水平(-1)	0.426	18.0	22.6
下星号臂(-r)	0.400	15.0	20.0

表 2 二次回归正交组合试验设计表

Tab 2 Orthogonal regression design and experiment result

编号	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₁ Z ₂	Z ₁ Z ₃	Z ₂ Z ₃	Z ₁₁	Z ₂₂	Z ₃₃	Y[提取率/μg·(10 mg) ⁻¹]
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.314	0.314	0.314	4.499
2	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.314	0.314	0.314	4.344
3	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.314	0.314	0.314	3.881
4	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.314	0.314	0.314	3.757
5	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	0.314	0.314	0.314	3.170
6	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	0.314	0.314	0.314	3.116
7	-1.000	-1.000	1.000	1.000	-1.000	-1.000	0.314	0.314	0.314	2.869
8	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	0.314	0.314	0.314	2.799
9	1.353	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.145	-0.686	-0.686	4.568
10	-1.353	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.145	-0.686	-0.686	2.652
11	0.000	1.353	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.686	1.145	-0.686	6.261
12	0.000	-1.353	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.686	1.145	-0.686	4.785
13	0.000	0.000	1.353	0.000	0.000	0.000	-0.686	-0.686	1.145	5.882
14	0.000	0.000	-1.353	0.000	0.000	0.000	-0.686	-0.686	1.145	5.658
15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.686	-0.686	-0.686	6.145
16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.686	-0.686	-0.686	5.727
17	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.686	-0.686	-0.686	5.874

表 3 回归方程失拟性检验表

Tab 3 The lack of fit test on regression equation

SS _e	SS _{el}	df _{el}	SS _{Lf}	df _e	df _{Lf}	F	F _{0.05} ^(3,2)
2.752	0.0899	2	1.3181	5	3	14.66	99.17

方程回归系数及显著性检验见表 4, 由表 4 可知, 各项回归系数都达到显著水平, 从而得到编码方程 $Y = -19.729 + 295.28X_1 + 0.661X_2 + 0.468X_3 - 286.017X_1^2 - 0.011X_2^2 - 0.008X_3^2$ 。

表 4 回归系数及显著性检验

Tab 4 Regression coefficient and significance

模型	非标准化回归系数	t	P
常数项	4.470	51.510	0.000
Z ₁	0.611	5.827	0.000
Z ₂	0.328	3.127	0.000
Z ₁₁	-1.562	-11.304	0.000
Z ₂₂	-0.517	-3.742	0.003
Z ₃₃	-0.382	-2.766	0.018

对上述模型进行规划求解, 得到的优化工艺条件是: 乙醇的浓度为 52%, 提取时间为 30 min, 提取温度为 30 ℃。

2.5.2 试验的结果与讨论 依据回归正交组合试验设计方法以及因素水平编码表, 选取乙醇浓度 Z₁, 提取时间 Z₂, 提取温度 Z₃, 3 因素编制试验设计表, Z₁₁, Z₂₂, Z₃₃ 为二次项中心变化后的编码。并将实验结果提取率 Y[μg·(10 mg)⁻¹]列入表 2。

2.5.3 回归方程的建立及检验 回归方程失拟性检验见表 3, 从回归方程平方和表 3 中可明显看出: $F < F_{0.05}^{(3,2)}$, 由此可知建立的回归模型的失拟性不显著, 回归模型与实际情况很符合。

2.6 验证试验

精密称取 0.100 1 g 西红花粉末各 3 份, 按照“2.5.3”项下工艺条件提取, 提取率分别为 0.643 2, 0.642 8, 0.644 5 mg·g⁻¹, 平均为 0.643 5 mg·g⁻¹, 提取率较高。

3 讨论

由于西红花属名贵药材, 且试验的目的是为西红花药材及制剂中的西红花苷定量分析过程中的优化提取条件提供依据, 故取样量较少, 定为 10 mg。试验采用棕色量瓶是因为西红花苷见光分解。在验证试验中扩大参数, 得到的结果与条件试验基本一致。

本试验利用二次回归正交设计法, 以西红花苷提取率为考察目标, 考察了乙醇浓度、提取时间、提取温度 3 个因素, 得到了从西红花中提取

西红花苷的最佳工艺：乙醇浓度为 52%，提取时间为 30 min，提取温度为 30 ℃。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010) Vol I(中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 121.
- [2] ZHANG L, ZHOU G X, ZHOU S D. Determination of saffron from different producing area [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1997, 22(11): 657-659.
- [3] MIAO Y S, HUANG G Y, NI C, et al. Determination of crocus I and crocus II in *Crocus sativus* L. from various sources by RP-HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2002, 22(11): 654-656.
- [4] LIU X, QIAN Z Y, FU J. Determination of crocin-I by HPLC [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1996, 27(12): 734-736.
- [5] WANG Z, PING Q N, HUANG L S. Study on adsorption of crocin in *Gardenia* with macroporous resin [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(7): 532-534.

收稿日期：2010-10-14