

响应面法优化秦岭龙胆有效成分的提取工艺

许海燕^{1*}, 郑伶俐², 多本加³, 刘瑞林⁴

(1. 陕西国际商贸学院医药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 步长集团, 陕西 咸阳 712000;
3. 青海师范大学民族学院, 西宁 810001; 4. 陕西师范大学化工学院, 西安 710062)

[摘要] 目的: 优选秦岭龙胆中齐墩果酸的乙醇回流提取工艺。方法: 采用 HPLC 测定齐墩果酸含量, 流动相乙腈-甲醇-水-磷酸-三乙胺(25:15:10:0.01:0.02), 检测波长 210 nm。在单因素试验基础上, 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 利用三因素三水平响应面分析法考察料液比、提取次数、提取时间对齐墩果酸提取量的影响。结果: 最佳提取工艺为料液比 1:12, 提取数 2 次, 提取时间 76 min; 齐墩果酸提取量 $0.583 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与预测值 $0.605 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的偏差仅 3.64%。结论: 采用响应面法优选的秦岭龙胆回流提取工艺稳定可行, 为秦岭龙胆的资源开发及临床推广提供参考。

[关键词] 秦岭龙胆; 齐墩果酸; 乙醇回流提取法; 响应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0031-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014150031

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1533.004.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:33

Optimization of Extraction Process for Active Ingredients in *Gentiana apiata* by Response Surface Methodology

XU Hai-yan^{1*}, ZHENG Ling-li², DUO Ben-jia³, LIU Rui-lin⁴

(1. Medical College, Shaanxi Institute of International Trade and Commerce, Xianyang 712046, China;
2. Buchang Group, Xianyang 712000, China;
3. College of Nationalities, Qinghai Normal University, Xining 810001, China;
4. School of Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ethanol reflux extraction process of oleanolic acid in *Gentiana apiata*. **Method:** HPLC was employed to determine the content of oleanolic acid with mobile phase of acetonitrile-methanol-water-phosphoric acid-triethylamine (25:15:10:0.01:0.02) and detection wavelength at 210 nm. On the basis of single factor tests, according to Box-Behnken design principles, response surface analysis was adopted to investigate effects of solid-to-liquid ratio, extraction times and extracting time on yield of oleanolic acid. **Result:** Optimal extraction conditions were as follows: solid-to-liquid ratio of 1:12, extracted twice, extracting time of 76 min; under these conditions, yield of oleanolic acid was $0.583 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, closed to predicted yield of $0.605 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This optimized process was feasible and stable, it had a certain reference value for resource development and clinical promotion of *G. apiata*.

[Key words] *Gentiana apiata*; oleanolic acid; ethanol reflux extraction; response surface methodology

秦岭龙胆又名茺菘草, 味苦, 性平, 功效调经活血、清热明目、利小便, 民间常用于治疗妇科病及消

化道疾病^[1], 目前已从该药材中提取到异菝葜苷、龙胆苦苷、秦岭龙胆二糖、齐墩果酸^[2]等成分。其

[收稿日期] 20131127(018)

[基金项目] 陕西省教育厅项目(2013JK0804)

[通讯作者] * 许海燕, 硕士, 讲师, 从事中草药的化学成分研究, Tel:15769201632, E-mail:xpzwd@126.com

中齐墩果酸为三萜皂苷类化合物,具有护肝、解肝毒、降糖、抗高血压、强心、抗癌等活性,是临床辅助治疗肝病的药物之一^[3-4]。该成分的提取常采用水(酸水、碱水)提法、乙醇回流法等^[5],后者更贴近大生产,故本实验采用乙醇回流提取法,选择提取时间、提取次数、料液比为考察因素,以齐墩果酸提取量为评价指标,采用响应面法优化秦岭龙胆的提取工艺,为秦岭龙胆的资源开发提供参考。

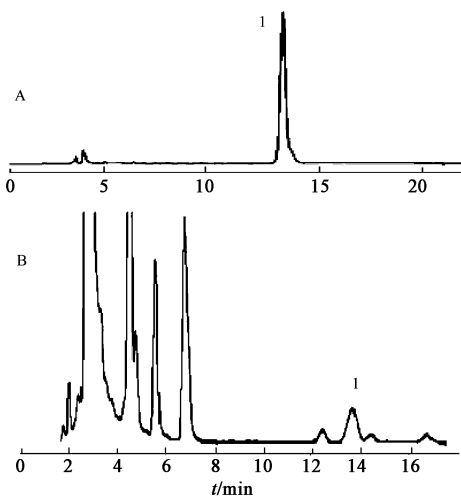
1 材料

2195 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司),FZ-102 型中草药粉碎机(天津天斯特仪器有限公司)。秦岭龙胆购自陕西省眉县药材总公司,经陕西国际商贸学院生药教研室雷国莲教授鉴定为龙胆科植物秦岭龙胆 *Gentiana apiata* N. E. Br. 的带花全草;齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0709-9803),乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 齐墩果酸的含量测定

2.1.1 色谱条件^[6] 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,流动相乙腈-甲醇-水-磷酸-三乙胺(25:15:10:0.01:0.02),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温为室温,检测波长 210 nm,进样量 10 μL,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 齐墩果酸

图 1 秦岭龙胆提取液 HPLC

2.1.2 供试品溶液的制备 将秦岭龙胆药材粉碎为细粉,过 80 目筛。称取药材粉末 5 g,加入无水乙醇 100 mL,于一定条件下回流提取,抽滤,将滤液减压浓缩蒸干,加甲醇溶解,过滤并转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 对照品溶液配制 精密称取已恒重的齐墩

果酸对照品 2.5 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,即得。

2.1.4 标准曲线绘制 将齐墩果酸对照品溶液依次稀释为 0.005,0.01,0.02,0.03,0.04,0.05 g·L⁻¹,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 4\,571.8X + 96.3$ ($R^2 = 0.995$),线性范围 0.005 ~ 0.05 g·L⁻¹。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取时间 称取秦岭龙胆粉末 5 份,每份 5 g,各加入无水乙醇 100 mL,依次回流提取 30,60,90,120,150 min,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果随着提取时间的增加,齐墩果酸提取量相应增加,至 60 min 时达峰值,再延长提取时间,提取量反而有所下降。因为在药材和溶剂加入量相同的条件下,提取 60 min 时,药材中齐墩果酸几乎被提取完全,随时间的延长,药材中杂质的提出增多,故选择提取时间 60 min。

2.2.2 料液比 称取秦岭龙胆粉末 5 份,每份 5 g,分别按料液比 1:25,1:20,1:15,1:10,1:5 加入无水乙醇,回流提取 60 min,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果齐墩果酸提取量分别为 0.479,0.513,0.598,0.600,0.203 mg·g⁻¹,故选择料液比 1:10。

2.2.3 提取次数 称取秦岭龙胆细粉 5 份,每份 5 g,分别加 10 倍量无水乙醇回流提取 1,2,3,4,5 次,每次 60 min,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果齐墩果酸提取量分别为 0.300,0.573,0.569,0.544,0.492 mg·g⁻¹,故选择提取数 2 次。

2.3 响应面分析 在单因素试验基础上,结合中心组合设计原理,选择提取时间、液料比、提取次数为考察因素,以齐墩果酸提取量为响应值,设计三因素三水平的响应面试验,确定 17 组试验,其中 12 组为析因试验,5 组为中心点试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 秦岭龙胆乙醇回流提取工艺响应面试验因素水平

编码水平	A 提取时间 /min	B 液料比 /mL·g ⁻¹	C 提取数 /次
-1	30	5	1
0	60	10	2
1	90	15	3

表2 秦岭龙胆乙醇回流提取工艺响应面试验安排

No.	A	B	C	齐墩果酸/mg·g ⁻¹
1	-1	-1	0	0.289
2	0	1	-1	0.363
3	1	0	1	0.529
4	0	-1	1	0.310
5	0	0	0	0.569
6	0	0	0	0.574
7	1	-1	0	0.331
8	1	1	0	0.542
9	-1	0	-1	0.342
10	-1	0	1	0.431
11	-1	1	0	0.386
12	1	0	-1	0.396
13	0	-1	-1	0.239
14	0	0	0	0.571
15	0	1	1	0.497
16	0	0	0	0.559
17	0	0	0	0.566

采用 Design-Expert. 8.05b 软件进行数据分析,以齐墩果酸提取量为响应值,得多元二次回归模型方程 $Y = -0.640 + 6.062 \times 10^{-3} A + 0.099B + 0.356C - 6.031 \times 10^{-5} A^2 - 5.061 \times 10^{-3} B^2 - 0.089C^2 + 1.900 \times 10^{-4} AB + 3.667 \times 10^{-4} AC + 3.150 \times 10^{-3} BC (R^2 = 0.998 0)$, 回归分析见表3,结果显示模型 $P < 0.000 1, F = 387.27$,说明该二次方程模型极显著,失拟项不显著,故响应值与自变量间的多元回归关系能采用该模型表示,模型的调整相关系数 ($R^2_{adj} = 0.995 4$),说明99.54% 响应值的变化能够用该模型解释。各因素的一次项、二次项及交互项均对齐墩果酸提取量影响显著,说明各因素与齐墩果酸提取量间并非单纯的线性关系,影响排序为 $B > C > A$,响应曲面分析见图2,试验值与模型值的标准残差见图3。

由图2可知,因素A和B的曲面均较陡峭,说明二者对齐墩果酸提取量的影响均较显著,确定因素B的最佳水平11~13 mL·g⁻¹,因素A最佳范围

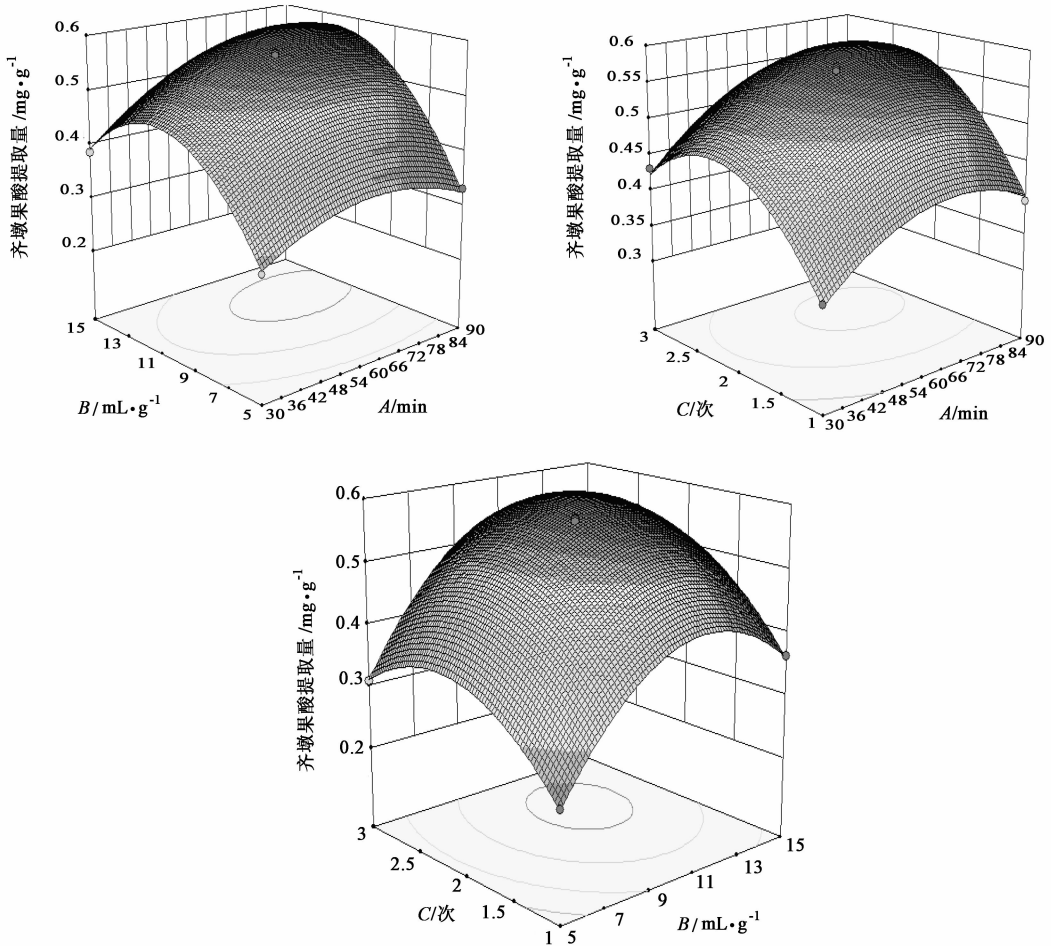


图2 液料比、提取数及提取时间相互作用对秦岭龙胆提取工艺的影响

表 3 回归方程方差分析

变异源	SS	f	MS	F	P
模型	0.22	9	0.024	387.27	<0.000 1
A	0.015	1	0.015	247.80	<0.000 1
B	0.048	1	0.048	775.09	<0.000 1
C	0.023	1	0.023	368.83	<0.000 1
AB	3.249×10^{-3}	1	3.249×10^{-3}	52.58	0.000 2
AC	4.840×10^{-4}	1	4.840×10^{-4}	7.83	0.026 6
BC	9.923×10^{-4}	1	9.923×10^{-4}	16.06	0.005 1
A ²	0.012	1	0.012	200.72	<0.000 1
B ²	0.067	1	0.067	1 090.81	<0.000 1
C ²	0.033	1	0.033	540.04	<0.000 1
失拟项	3.017×10^{-4}	3	1.006×10^{-4}	3.08	0.153
误差项	1.308×10^{-4}	4	3.270×10^{-5}		
总和	0.22	16			

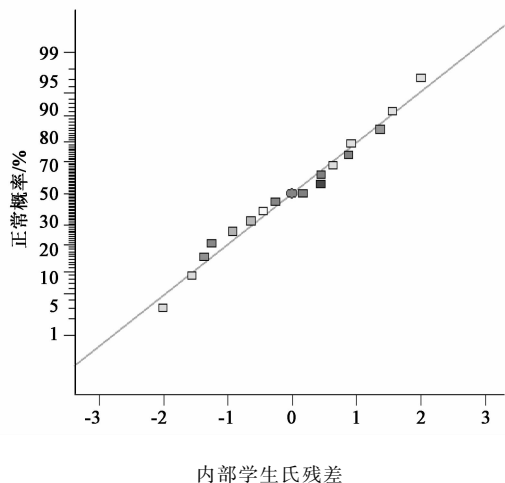


图 3 秦岭龙胆提取工艺标准残差

60 ~ 84 min; 选定最佳液料比时, 齐墩果酸提取量随提取时间和提取数的增加呈现先增大后减小的趋势。由图 3 可知, 模型值与试验值拟合度较高, 说明该模型能够解释响应值与各因素间的关系, 可利用此模型优选提取工艺^[7]。通过对模型方程求导计算, 得秦岭龙胆中齐墩果酸的最佳提取条件为提取时间 76.26 min, 提取数 2.37 次, 料液比 1:11.95, 此

时齐墩果酸提取量 $0.605 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 结合实际操作考虑, 将最佳工艺参数修正为提取时间 76 min, 提取数 2 次, 加醇量 12 倍。按优选的提取工艺进行 3 次重复试验, 结果齐墩果酸平均提取量 $0.583 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 0.48%), 与预测值的偏差较小 (3.64%), 说明优选的提取工艺稳定可行。

3 讨论

提取工艺的优化常采用正交试验和均匀设计, 试验次数虽少, 但精确性差。响应面法是集数学、统计学和计算机科学为一体, 采用多元二次回归方程来拟合各因素与响应值之间函数关系的一种统计方法, 具有直观、方便、高效的特点, 该方法既保留了试验次数少的优点, 又能在较短时间对优选的试验参数进行全面研究。秦岭龙胆中化学成分较复杂, 尚缺乏系统化研究, 指标性成分或有效成分对照品的制备及质量标准尚未建立, 故本文以齐墩果酸为指标成分, 对秦岭龙胆的质量标准研究具有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] 吴振海, 傅青, 陈书文, 等. 陕西特有的中草药[J]. 中国药学杂志, 1991, 26(11): 654.
- [2] 许海燕. 秦岭龙胆化学成分的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(6): 168.
- [3] 李龙, 昌盛. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 广州化工, 2011, 39(14): 30.
- [4] 张蜀艳, 李政. 齐墩果酸研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 23.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 43.
- [6] Zhang Q A, Fan X H, Zhang Z Q, et al. Optimization of SC-CO₂ extraction of oil from almond pretreated with autoclaving [J]. LWT-Food Sci Technol, 2009, 42(9): 1530.
- [7] 牛江进, 王瑛, 张琳, 等. 响应面法优化超声提取甘青铁线莲总皂苷[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 199.

[责任编辑 刘德文]