

Box-Behnken 响应面分析法优化乌苏里瓦韦中绿原酸提取工艺

王丽红^{1*}, 谭凤田¹, 赵宏¹, 姜博²

(1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯中心医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

[摘要] **目的:** 优选乌苏里瓦韦中绿原酸的提取工艺。**方法:** 在单因素试验基础上, 选取料液比、乙醇体积分数、提取时间为自变量, 绿原酸提取量为响应值, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 利用响应面分析法优化乌苏里瓦韦中绿原酸的醇提工艺。**结果:** 最佳提取工艺为加 68 倍量 75% 乙醇提取 2 次, 每次 41 min; 绿原酸提取量达 $8.26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与理论预测值 $8.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 偏差较小。**结论:** 醇提法与传统工艺比较, 具有提取率高、能耗少、时间短和低成本等特点。优选的工艺稳定可行, 为乌苏里瓦韦的工业化生产提供参考。

[关键词] 乌苏里瓦韦; 绿原酸; Box-Behnken 响应面分析法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0024-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170024

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1326.006.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:26

Optimization of Extraction Process for Chlorogenic Acid from *Lepisorus ussuriensis* by Box-Behnken Response Surface Methodology

WANG Li-hong^{1*}, TAN Feng-tian¹, ZHAO Hong¹, JIANG Bo²

(1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;

2. The Central Hospital of Jiamusi City, Jiamusi 154002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of chlorogenic acid from *Lepisorus ussuriensis*. **Method:** On the basis of single factor tests, taking material-liquid ratio, ethanol concentration and extracting time as independent variables, yield of chlorogenic acid in response to a value, according to Box-Behnken experiment design principle, extraction process of chlorogenic acid from *L. ussuriensis* was optimized by response surface analysis. **Result:** Optimum extraction process was as following: extracted twice with 68 times the amount of 75% ethanol for 41 min per time; extracting amount of chlorogenic acid was $8.26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, which was close to the theoretical prediction of $8.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** Compared with traditional processes, alcohol extraction process had characteristics, such as high extraction efficiency, less energy consumption, low cost, et al. This optimized process was stable and feasible for providing a reference for industrial production of *L. ussuriensis*.

[Key words] *Lepisorus ussuriensis*; chlorogenic acid; Box-Behnken Response surface methodology

乌苏里瓦韦别名石茶、树茶、还阳草、大石韦等, 具有清热解暑、利尿、止咳、止血、消肿等功效^[1], 主要成分为绿原酸。该成分是一种缩酚酸, 属酚类化合物, 是植物在有氧呼吸过程中经莽草酸途径形成的一种苯丙素类化合物。目前关于乌苏里瓦韦的研

究报道主要针对全草鉴定^[2]及其化学成分分离^[3-4], 尚未见其提取工艺的报道。故本实验采用 Box-Behnken 响应面分析法优选乌苏里瓦韦中绿原酸的提取工艺, 为该药材的工业化生产和资源开发提供参考。

[收稿日期] 20131006(006)

[基金项目] 黑龙江省教育厅课题(12521529)

[通讯作者] * 王丽红, 硕士, 教授, 从事植物药的研究与开发, Tel: 13846175975, E-mail: wlh_6663@163.com

1 材料

BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司),FA2004 型分析天平仪(上海恒平科学技术有限公司),Spectrum lab54 型紫外-可见分光光度仪(上海凌光技术有限公司)。乌苏里瓦韦药材采自佳木斯市汤原县,经佳木斯大学药学院生药教研室王丽红教授鉴定为水龙骨科植物乌苏里瓦韦 *Lepisorus ussuriensis* (Regel et Maack) Ching 全草;绿原酸对照品(天津一方科技有限公司,批号 20121019),试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 材料预处理 将乌苏里瓦韦全草置于通风避光处阴干至恒重,用中药粉碎机粉碎成细粉,过 60 目筛,备用。

2.2 标准曲线的绘制 精密称取绿原酸对照品 5.22 mg,用 75% 乙醇定容至 10 mL 量瓶中,得对照品储备液。精密吸取该储备液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加 75% 乙醇定容至刻度,配成系列对照品溶液,以 75% 乙醇作为空白对照,于 327 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 24.727C - 0.9068 (R^2 = 0.9966)$,线性范围 5.22 ~ 26.1 mg·L⁻¹。

2.3 单因素试验考察^[5-7] 称取乌苏里瓦韦粉末 0.2 g,采用超声提取法,通过单因素试验考察料液比(1:30 ~ 1:75)、乙醇体积分数(30% ~ 90%)、超声时间(20 ~ 50 min)、提取次数(1 ~ 4 次)对绿原酸提取量的影响。

2.3.1 料液比 设定乙醇体积分数 75%,提取温度 30 ℃,考察料液比 1:30,1:45,1:60,1:75 对绿原酸提取量的影响,结果表明当料液比为 1:45 时,绿原酸提取量基本达最大值,之后增加溶剂用量绿原酸提取量基本稳定。

2.3.2 超声时间 设定料液比 1:60,乙醇体积分数 75%,考察提取时间 20,30,40,50 min 对绿原酸提取量的影响,结果表明绿原酸提取量随时间增加而增加,至 30 min 时达最高值,随后提取量急剧降低。

2.3.3 乙醇体积分数 设定料液比 1:60,提取温度 30 ℃,提取时间 30 min,考察不同乙醇体积分数(30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%)对绿原酸提取量的影响,结果表明当乙醇体积分数为 40% 和 80% 时,绿原酸提取量最高,乙醇体积分数 50% ~ 70% 时,提取量下降。

2.3.4 提取次数 设定乙醇体积分数 40%,提取温度 30 ℃,提取时间 30 min,考察提取数(1,2,3,4 次)对绿原酸提取量的影响,结果表明绿原酸提取量随提取数增加而增加,当提取数 > 2 次时,提取量下降。

2.4 响应面法试验 在单因素试验基础上^[8-9],选择液料比、乙醇体积分数、提取时间为考察因素,根据 Box-Behnken 试验设计原理,以绿原酸提取量为响应值,运用 Design-Expert 7.1.3 设计试验方案,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 乌苏里瓦韦中绿原酸提取工艺 Box-Behnken 试验因素水平

编码水平	X_1 料-液比	X_2 乙醇体积 分数/%	X_3 提取时间 /min
-1	1:45	40	30
0	1:60	60	40
1	1:75	80	50

表 2 乌苏里瓦韦中绿原酸提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	绿原酸提取量 (Y)/mg·g ⁻¹
1	1	0	-1	5.22
2	1	-1	0	6.71
3	1	1	0	5.75
4	0	-1	1	7.69
5	0	-1	-1	6.84
6	-1	0	-1	4.91
7	0	0	0	6.61
8	0	0	0	6.49
9	1	0	1	5.46
10	0	1	-1	5.01
11	0	0	0	8.26
12	0	0	0	8.34
13	-1	0	1	3.92
14	-1	-1	0	7.69
15	0	1	1	7.23
16	0	0	0	7.43
17	-1	1	0	5.81

采用 Design-Expert 7.1.3 软件对各因素进行回归拟合,得回归方程 $Y = 7.43 + 0.1X_1 - 0.64X_2 + 0.23X_1X_2 + 0.31X_1X_3 + 0.34X_2X_3 - 1.38X_1^2 + 0.44X_2^2 - 1.17X_3^2$,该模型的方差分析见表 3。结果表明建立的二次多项模型具有显著性($r = 0.8768$),模型拟合度较好,试验误差小,可用此模

表 3 绿原酸提取量回归统计方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	19.99	9	2.22	2.60	0.010 5
X_1	0.08	1	0.08	0.10	0.765 7
X_2	13.29	1	3.29	3.85	0.090 5
X_3	0.67	1	0.67	0.79	0.404 3
X_1X_2	0.21	1	0.21	0.25	0.633 9
X_1X_3	0.38	1	0.38	0.44	0.527 1
X_2X_3	0.47	1	1.00	0.55	0.482 7
X_1^2	7.97	1	7.97	9.33	0.018 5
X_2^2	0.81	1	0.81	0.95	0.361 7
X_3^2	5.79	1	5.79	6.78	0.035 2
残差	5.98	7	0.85		
失拟项	2.91	3	0.97	1.26	0.399 9
纯误差	3.07	4	0.77		
总离差	25.97	16			

型对乌苏里瓦韦的提取工艺进行预测分析,因素 X_1, X_3 影响不显著, X_1^2 和 X_3^2 影响极显著, X_2^2 不显著,交互项 X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 不显著。

根据拟合模型绘制乌苏里瓦韦绿原酸的响应面的三维图与等高线,可得到各参数范围内的极值及因素间相互作用对响应值的影响,采用 Design-Expert 7.1.3 软件处理,见图 1。结果显示该回归方程存在极大值,最大的响应值 $8.47 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,此时最优工艺条件为提取时间 41.990 min,乙醇体积分数 75.050%,液料比 68.730:1。

2.5 验证试验 结合生产实际考虑,将最佳提取工艺调整为提取时间 41 min,乙醇体积分数 75%,液料比 68:1。精密称取乌苏里瓦韦粉末 3 份,每份 0.2 g,按该提取条件进行验证试验,结果绿原酸平均提取量 $8.26 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与理论预测值基本吻合,说明采用响应面法优选的提取工艺参数基本准确可靠。

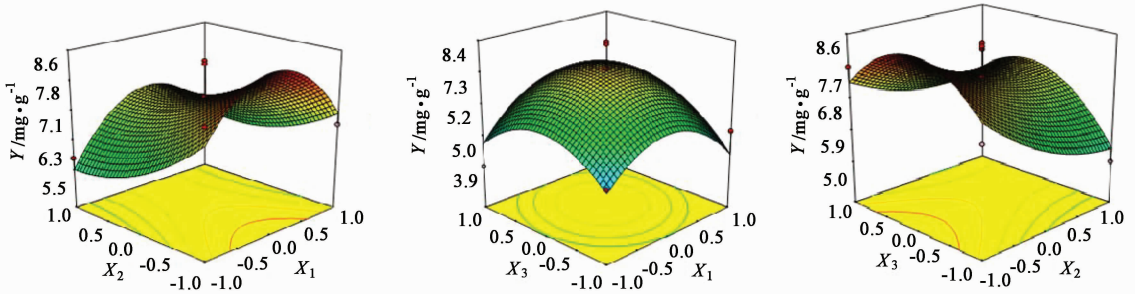


图 1 液料比、乙醇体积分数、提取时间交互作用对绿原酸提取量影响的响应面和等高线

3 讨论

响应面分析法在提取条件寻优过程中,可连续对影响因素的各个水平进行分析,并在影响因素与响应值间确立数学模型,通过对数据拟合得到较好的试验参数。本文在单因素试验基础上,通过对乙醇体积分数、料液比、提取时间各水平的多元回归及二项拟合建立绿原酸提取量与各因素的回归方程,确定最佳提取工艺,为乌苏里瓦韦的资源深加工提供参考。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 2 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:238.
[2] 王丽红,赵龙,刘德江,等. 乌苏里瓦韦的性状及显微鉴定[J]. 中药材,2013,36(3):394.
[3] Choi Y H, Lim Y H, Yeo H, et al. A flavonoid diglycoside from *Lepisorus ussuriensis* [J]. Phytochemistry, 1996, 43

(5):1111.
[4] Choi Y H, Kim J, Choi Y-H. A steroidal glycoside from *Lepisorus ussuriensis* [J]. Phytochemistry, 1999, 51 (3):453.
[5] 李玉山,范鹏辉. 杜仲叶中绿原酸提取工艺的优化[J]. 湖北农业科学,2012,51(17):3830.
[6] 胡鲜宝,范贵生,吕加平. 绿原酸提取纯化及检测方法的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2009,11(11):85.
[7] 周舟,彭森,钟晓红. 绿原酸提取分离及检测研究进展[J]. 长江大学学报:自然科学版,2011,8(2):243.
[8] 王芳芳,余陈欢,聂彝,等. 利用响应面分析法优化杭白中绿原酸提取工艺研究[J]. 食品科技,2007,33 (9):96.
[9] 黄家卫,盛振华,余陈欢,等. 利用响应面分析法优化金银花中的绿原酸的超声提取工艺[J]. 中国现代应用药学,2010,27(11):995.

[责任编辑 刘德文]