

# 响应曲面法优化野生酸荔枝核中抗乙肝成分的提取工艺

陈华妮<sup>1</sup>, 潘洁萍<sup>2</sup>, 黄小丹<sup>2</sup>, 李振中<sup>2</sup>, 钱力<sup>2\*</sup>

(1. 百色学院, 广西 百色 533000; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

**[摘要]** **目的:** 优选酸荔枝核中抗乙肝黄酮类化合物的提取工艺。**方法:** 以芦丁为对照品, 采用UV测定总黄酮含量。以总黄酮提取率为指标, 温度、粉碎度、乙醇体积分数、料液比、提取时间、搅拌速度为自变量, 在单因素试验基础上, 通过Plackett-Burman试验筛选显著影响因子, 利用Box-Behnken设计考察各自变量与响应值之间的关系, 模拟得到二次多项式回归方程的预测模型, 确定最佳提取工艺。**结果:** 粉碎度和乙醇体积分数是影响荔枝核中总黄酮提取效率的显著因子, 最佳提取工艺条件为粉碎度120目, 加14倍量75%乙醇于60℃提取2h, 搅拌速度90 r·min<sup>-1</sup>; 总黄酮平均提取率17.49% (RSD 0.63%)。**结论:** 优选的提取工艺稳定可行, 适用于酸荔枝核中抗乙肝总黄酮类化合物的工业化生产。

**[关键词]** 响应曲面法; 酸荔枝核; 抗乙肝成分; 总黄酮

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0041-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180041

## Optimization of Extraction Process for Anti Hepatitis B Constituents from Acid Litchi Semen by Response Surface Methodology

CHEN Hua-ni<sup>1</sup>, PAN Jie-ping<sup>2</sup>, HUANG Xiao-dan<sup>2</sup>, LI Zheng-zhong<sup>2</sup>, QIAN Li<sup>2\*</sup>

(1. Baise University, Baise 533000, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extracting process of total flavonoids from acid Litchi Semen. **Method:** Taking rutin as standard, the content of total flavonoids was determined by UV. With yield of total flavonoids as index, on the basis of single factor tests, Box-Behnken and Plackett-Burman tests were adopted to optimize extraction process by taking temperature, grinding degree, ethanol concentration, liquid-solid ratio, extracting time and stirring speed as factors. **Result:** Grinding degree and ethanol concentration were significant factors, optimum extraction technology was as following: grinding degree of 120 mesh, extracted 2 h with 14 times

**[收稿日期]** 20140108(021)

**[基金项目]** 广西教育厅优秀人才培养项目(20124147); 广西高校大学生创新计划项目(QJXC201335); 广西教育厅科研项目(201010LX373, 201106LX441, 200103YB114)

**[第一作者]** 陈华妮, 硕士, 讲师, 从事降糖药物研究, Tel: 13977660837, E-mail: chenhuani@126.com

**[通讯作者]** \* 钱力, 博士, 副教授, 从事药物开发研究, Tel: 0776-2849498, E-mail: qianli656@126.com

10 h后, 其含量未见明显变化; 但在酸、碱条件下极不稳定, 室温放置30 min内降低>50%, 放置3 h后均检测不到; 在100℃加热75 min后全部生成黑色沉淀物。但将6种糖与梓醇混合后于100℃加热10 h时, 梓醇含量未见明显降低, 可能地黄中其他成分的存在对其聚合反应起到了一定作用<sup>[4]</sup>。

### [参考文献]

[1] 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: 1175.

[2] 何思煌, 孙春燕, 祝红. 湿毒清胶囊质量标准研究[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(1): 36.

[3] 刘鹤香, 曹中亮, 常东明, 等. 怀地黄的降压镇静抗炎作用及有效部分分析[J]. 新乡医学院学报, 1998, 15(3): 219.

[4] 王宏洁, 边宝林, 杨健. 地黄中梓醇变化条件的探讨[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 408.

[责任编辑 刘德文]

the amount of 75% ethanol at 60 °C, stirring speed of 90 r·min<sup>-1</sup>. Under these conditions, average extraction rate of total flavonoids was 17.49% with RSD of 0.63%. **Conclusion:** This optimized technology is stable and feasible, which is suitable for industrial production of anti-hepatitis B flavonoids from acid Litchi Semen.

[ **Key words** ] response surface methodology; acid Litchi Semen; anti-hepatitis B component; total flavonoids

荔枝核具有调节血脂、降低血糖、抗氧化能力、抑制乙型肝炎病毒等药理作用<sup>[1-7]</sup>。其黄酮类化合物包括黄烷酮类、花色素类、黄酮醇类等,均具有很好的抑制乙型肝炎病毒表面抗原 HBsAg 的功效<sup>[8]</sup>。广西野生酸荔枝果实小、核大、肉薄、酸度高,生长处于野生状态,管理粗放,未得到系统管理,造成资源的极大浪费,因此对其相关特性开展研究具有重要意义。本实验以酸荔枝核为原料,运用紫外分光光度法测定酸荔枝核中抗乙肝黄酮类化合物的含量,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,采用响应曲面法考察温度、粉碎度、乙醇体积分数、料液比、提取时间、搅拌速度对酸荔枝核总黄酮提取工艺的影响,为野生酸荔枝的资源开发提供参考。

### 1 材料

TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),CPA64 型分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),S21-1 型磁力搅拌器(金坛市医疗仪器厂)。野生酸荔枝核采自广西靖西深山,经右江民族医学院张数球教授鉴定为无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的成熟种子,经洗净、干燥、粉碎后备用;芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液配制** 称取芦丁对照品 5.0 mg,加 50% 乙醇超声溶解并定容至 50 mL 量瓶中,即得。

**2.2 标准曲线的绘制** 精密量取对照品溶液 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0 mL, 分别置于 25 mL 比色管中,编号 1~6,各加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 1.0 mL,混匀后静置 6 min;加入 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;加入 4% 氢氧化钠溶液 10.0 mL,加水至刻度,静置 15 min;以 1 号溶液为空白,在 400~700 nm 扫描,发现对照品溶液在 505 nm 处有最大吸收峰,以吸光度(A)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得芦丁回归方程  $A = 0.009\ 03 + 0.012\ 31C$  ( $r = 0.999\ 8$ ),线性范围 8.0~48.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3 单因素试验考察** 在预试验基础上,选择温度、粉碎度、乙醇体积分数、料液比、提取时间、搅拌

速度为考察因素。将酸荔枝核粉末过筛后,精确称取 10.0 g,共 30 份,按表 1 中参数进行提取,过滤,除去滤渣,浓缩挥发乙醇,加水饱和正丁醇萃取,取下层液浓缩,加甲醇定容至 25 mL,精密量取酸荔枝核总黄酮提取液 20 μL,按 2.2 项下方法显色,于 505 nm 处测定 A,计算总黄酮含量,见表 1,结果初步确定适宜的工艺参数为温度 60 °C,粉碎度 80 目,乙醇 60%,料液比 1:14,提取时间 2 h,搅拌速度 90 r·min<sup>-1</sup>。

表 1 野生酸荔枝核中总黄酮提取工艺单因素试验考察

No.	温度 /°C	粉碎度 /目	乙醇体积分数 /%	料液比	时间 /h	搅拌速度 /r·min <sup>-1</sup>	总黄酮提取率 /%
1	40	60	60	14	2.0	90	10.2
2	50						10.5
3	60						14.2
4	70						12.9
5	80						9.6
1	60	20	60	14	2.0	90	10.1
2		40					8.0
3		60					12.6
4		80					16.5
5		100					7.6
1	60	60	30	14	2.0	90	9.7
2			45				11.5
3			60				11.8
4			75				11.0
5			90				12.3
1	60	60	60	24	2.0	90	11.6
2				18			9.0
3				14			12.7
4				10			8.8
5				6			10.4
1	60	60	60	14	1.0	90	9.6
2					1.5		9.1
3					2.0		12.9
4					2.5		12.1
5					3.0		12.2
1	60	60	60	14	2.0	30	10.8
2						60	11.5
3						90	16.6
4						120	11.3
5						150	11.8

**2.4 Plackett-Burman 试验设计** 采用 Design-Expert 8.0.7.1 设计软件对温度、粉碎度、乙醇体积分数、料液比、时间、搅拌速度进行全面考察,精确称取酸荔枝核粉末 10.0 g,按表 2 中工艺参数设计进行提取,以总黄酮提取率为响应值,选用 12 次试验的 Plackett-Burman 设计筛选对总黄酮提取率影响

显著的因子,试验安排及结果见表 2。

根据表 2 中数据进行方差分析,结果表明温度、料液比、提取时间、搅拌速度、粉碎度及乙醇体积分数的  $P$  分别为 0.889 1,0.179 8,0.235 0,0.447 6,0.004 9,0.018 9,说明粉碎度和乙醇体积分数是影响总黄酮提取工艺的显著因子。

表 2 野生酸荔枝核中总黄酮提取工艺 Plackett-Burman 试验安排

No.	温度/℃	粉碎度/目	乙醇体积分数/%	料液比	时间/h	搅拌速度/ $r \cdot \min^{-1}$	提取率/%
1	40	120	75	1:10	2.5	150	11.86
2	40	120	75	1:18	1.0	30	12.78
3	80	40	30	1:10	2.5	30	11.44
4	80	40	75	1:18	1.0	150	7.52
5	80	40	30	1:10	1.0	30	9.62
6	40	40	75	1:10	2.5	150	10.67
7	40	120	30	1:18	2.5	150	21.94
8	80	120	30	1:10	1.0	150	15.98
9	40	40	30	1:18	1.0	150	10.48
10	80	40	75	1:18	2.5	30	11.87
11	80	120	75	1:10	1.0	30	14.71
12	40	120	30	1:18	25	30	28.47

**2.5 响应曲面设计与模型分析** 根据 Plackett-Burman 试验的筛选结果,采用响应曲面法中 Box-Behnken 设计,以乙醇体积分数( $A$ )和粉碎度( $B$ )为自变量,精确称取酸荔枝核粉末 10.0 g,按表 3 中工艺参数进行提取,以总黄酮提取率( $Y$ )为响应值进行了 13 个提取试验,试验安排及结果见表 3。结果得响应面方程  $Y = 16.43 - 0.61A + 1.13B - 0.18AB - 4.22A^2 - 3.94B^2 - 0.14A^2B + 1.33AB^2$ ,转换后的拟合方程为  $Y = 34.92 + 1.045A + 0.725B + 5.420 \times 10^{-3}AB - 7.802 \times 10^{-3}A^2 - 4.405 \times 10^{-3}B^2 - 6.696 \times 10^{-3}A^2B + 3.704 \times 10^{-3}AB^2$ ,该模型方差分析见表 4。

表 3 野生酸荔枝核中总黄酮提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	A 乙醇体积分数/%	B 粉碎度/目	总黄酮提取率/%
1	75	40	8.58
2	30	40	11.78
3	52.5	80	10.46
4	52.5	80	10.71
5	52.5	80	11.48
6	75	120	17.21
7	52.5	80	14.29
8	52.5	23.43	14.57
9	30	120	16.12
10	52.5	80	10.23
11	52.5	136.57	16.76
12	84.32	80	8.73
13	20.68	80	13.46

拟合方程为二次多项回归模型,方差分析结果显示  $F = 111.45$ ,表示该模型方程极显著;决定系数  $R^2 = 0.993 6$ , $R_{adj}^2 = 0.984 7$ ,信噪比  $S/N = 24.247 > 4$ ,说明可采用该模型分析和预测不同条件下酸荔枝核总黄酮的含量变化。由回归方程的显著性检验可知,模型、一次项  $B$  和二次项  $A^2$ , $B^2$  影响极显著,交互项  $AB^2$  影响显著,其他因素则均无显著性影响,说明各自变量对响应值的影响不是简单的线性关系,确定最佳提取工艺条件为温度 60 ℃,粉碎度 120 目,乙醇体积分数 75%,料液比 1:14,提取时间 2 h,

搅拌速度 90  $r \cdot \min^{-1}$ 。

**2.6 验证试验** 称取荔枝核 6 份,每份 10.0 g,按最佳工艺条件进行验证试验,结果总黄酮平均提取率 17.49%,(RSD 0.63%),表明该工艺具有较好的

表 4 响应曲面二次回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	217.80	7	31.11	111.45	<0.000 1
A	1.49	1	1.49	5.34	0.068 8
B	5.09	1	5.09	18.23	0.007 9
AB	0.13	1	0.13	0.45	0.530 9
A <sup>2</sup>	123.93	1	123.93	443.92	<0.001 0
B <sup>2</sup>	107.80	1	107.80	386.14	<0.001 0
A <sup>2</sup> B	0.037	1	0.037	0.13	0.731 5
AB <sup>2</sup>	3.56	1	3.56	12.74	0.016 1
残差	1.40	5	0.28		
失拟项	1.25	1	1.25	35.51	0.004 0
纯误差	0.14	4	0.035		
总和	219.19	12			

重复性。取同一荔枝核提取液按 2.2 项下方法显色,每隔 10 min 测定 1 次吸光度,结果发现在 1 h 内总黄酮提取率平均值 16.85% (RSD 0.27%),说明供试品溶液在 1 h 内显色稳定。

### 3 讨论

荔枝的果皮和种子等副产物每年产量 > 70 万吨,绝大部分都随便丢弃。荔枝核具有调节血脂、降低血糖、抑制乙肝病毒等药理作用,但该资源未得到大量利用。本文在单因素试验基础上,通过

Plackett-Burman 试验发现粉碎度和乙醇体积分数是影响总黄酮提取效率的显著因子,使总黄酮提取率高达 17.49%,而且乙醇可回收利用,大大降低了酸荔枝核提取黄酮类化合物的成本,为野生酸荔枝资源的开发利用提供参考。

### [参考文献]

[1] 葛如意,卢文菊,张萃.荔枝核抗肿瘤及其作用机制研究进展[J].广东药学院学报,2012,28(6):693.

[2] 李伟,杨兆丽,詹利之,等.荔枝核总黄酮提取测定方法及工艺的优化[J].中医学报,2011,26(6):701.

[3] 姜振国.荔枝核的化学成分及降血糖活性研究[D].长春:长春中医药大学,2011.

[4] 张哲浩,李宝珍,赵谋明,等.响应面分析法优化荔枝核总黄酮提取工艺的研究[J].食品与机械,2006,22(1):30.

[5] 补朝阳,汤建萍.不同工艺的荔枝核提取物抗氧化活性的比较[J].化学研究,2010,21(6):63.

[6] 郭洁文,潘竞锋.荔枝和荔枝核的化学成分、生物活性及药理作用研究[J].中国新药杂志,2006,15(8):585.

[7] 汤建萍,周春山,涂秋云,等.荔枝核黄酮类化合物的提取工艺研究[J].应用化工,2007,36(2):109.

[8] 徐庆,宋芸娟,陈全斌,等.荔枝核黄酮类化合物对 HepG2.2.15 细胞系 HBsAg 与 HBeAg 表达及 HBVDNA 含量的影响[J].第四军医大学学报,2004,25(20):1862.

[责任编辑 刘德文]

## 《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届全国期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline,Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn