

# 响应面法优化番石榴叶总三萜的超声提取工艺

谢郁峰, 陈日佳, 严春艳\*  
(广东药学院 药科学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优选番石榴叶中总三萜超声提取工艺。方法: 以总三萜提取率为指标, 在单因素试验基础上, 通过响应面法考察乙醇体积分数、料液比、超声功率对总三萜提取率的影响。采用 UV 测定总三萜含量, 检测波长 540 nm。结果: 最佳提取工艺条件为加 60 倍量 70% 乙醇于 150 W, 50 °C 超声提取 2 次, 每次 30 min。总三萜提取率 7.93%, 与理论值 7.86% 偏差较小。结论: 通过响应面分析法优选番石榴叶总三萜提取工艺可行性较好, 为该植物部位的开发与利用提供实验依据。

**[关键词]** 响应面法; 番石榴叶; 总三萜; 超声提取法

**[中图分类号]** R282.71; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0032-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230032

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1523.006.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-27 15:23

## Optimization of Ultrasonic Extraction Process of Total Triterpenoids from Leaves of *Psidium guajava* by Response Surface Methodology

XIE Yu-feng, CHEN Ri-jia, YAN Chun-yan\*

(College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize extraction process of total triterpenoids from leaves of *Psidium guajava*. **Method:** Considering yield of total triterpenoids as index, based on single factor experiments, response surface methodology was adopted to optimize extraction process by taking ethanol concentration, liquid-solid ratio and ultrasonic power as factors. UV was employed to determine the content of total triterpenoids at 540 nm. **Result:** Optimum technological conditions were as follows: extracted twice with 60 times the amount of 70% ethanol at 150 W and 50 °C for 30 min of per time; yield of total triterpenoids was 7.93%, whose deviation was small by comparing with the theoretical value of 7.86%. **Conclusion:** Response surface analysis used in optimization of total triterpenoids is feasible, this study can provide experimental basis for development and utilization of this plant part.

**[Key words]** response surface analysis; *Psidium guajava*; total triterpenoids; ultrasonic extraction

番石榴叶具有明显的降血糖、抗病毒、抗菌、止泻、抗疟等活性<sup>[1]</sup>, 其化学成分主要有三萜类、倍半萜类和黄酮类等<sup>[2]</sup>。其中三萜类化合物具有显著降低 II 型糖尿病大鼠的血糖和血脂水平、明显改善糖尿病动物的糖脂代谢紊乱、升高血清胰岛素水平、提高胰岛素敏感指数、保护糖尿病肾损伤等作用, 口服可治

疗一些病毒感染性腹泻、抗 HIV-1 病毒等<sup>[3-6]</sup>, 具有很高的开发利用价值。目前, 番石榴叶活性成分的提取工艺研究常选择总黄酮为目标物质, 且均采用正交设计法优化提取工艺<sup>[7-10]</sup>, 关于总三萜提取工艺的研究则尚未见报道。故本实验拟采用超声法提取番石榴叶中总三萜, 在单因素试验基础上, 以指标成分提取

**[收稿日期]** 20140405(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102779); 广东药学院药科学院青年教师科研培育基金项目

**[第一作者]** 谢郁峰, 学士, 讲师, 从事天然药物化学研究, Tel: 020-39352140, E-mail: phytochemistry@163.com

**[通讯作者]** \* 严春艳, 博士, 教授, 从事天然药物化学研究, Tel: 020-39352052, E-mail: ycybridge@163.com

率为评价指标,利用响应面分析法优选提取工艺条件,为该植物部位的开发与利用提供参考。

## 1 材料

UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),AY120型电子分析天平(日本岛津公司),BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司),Laborota 4000-efficient型旋转蒸发仪(德国Heidolph公司),FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),GZX-9240 MBE型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

番石榴叶采自广东韶关,经广东药学院中药标本馆刘基柱副教授鉴定为桃金娘科番石榴属植物番石榴 *Psidium guajava* 的叶;齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号100080-200704,纯度 $\geq 98\%$ ),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 药材前处理** 将干燥的番石榴叶粉碎后过20目筛,加10倍量石油醚于50℃回流2次,每次30 min,脱脂后经烘箱60℃干燥至恒重。

### 2.2 总三萜的含量测定

**2.2.1 对照品溶液制备** 精密称取齐墩果酸对照品10.20 mg,加甲醇溶解并定容至50 mL量瓶中,即得。

**2.2.2 供试品溶液制备** 精密称取药材粉末5 g置于500 mL具塞锥形瓶中,加入一定体积分数乙醇适量,按设定的功率、温度、时间进行超声提取,提取液定容至200 mL,即得。

**2.2.3 显色剂配制** 精密称取香草醛1 g,加高氯酸溶液溶解并定容至100 mL,制成1%香草醛-高氯酸溶液。

**2.2.4 检测波长的选择** 精密吸取齐墩果酸对照品溶液0.8 mL和供试品溶液0.1 mL,分别置于60℃水浴蒸干,各加入1%香草醛-高氯酸溶液0.5 mL,60℃水浴加热15 min,冷水冷却10 min,各加入77%硫酸5 mL,以试剂为空白溶液,分别扫描二者的吸收图谱<sup>[11]</sup>。结果显示供试品溶液和对照品溶液均在540 nm处有最大吸收,故选择检测波长540 nm。

**2.2.5 线性关系考察** 精密吸取齐墩果酸对照品溶液0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,1.0 mL,分别于60℃水浴蒸干,按2.2.4项下方法显色,于540 nm处测定吸光度(A),以A为纵坐标,齐墩果酸质量为横坐标,得回归方程 $Y = 3.692X - 0.032$  ( $r = 0.9995$ ),线性范围0.0612~0.204 g·L<sup>-1</sup>。

**2.2.6 精密度试验** 精密吸取供试品溶液0.2,

0.3,0.4 mL,按2.2.4项下方法显色,于540 nm处连续测定6次,计算A的RSD分别为0.7%,0.6%,0.8%,表明仪器精密度良好。

**2.2.7 重复性试验** 称取6份番石榴叶药材粉末,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.4项下方法显色,于540 nm处测定A,计算RSD 0.8%,表明该方法重复性良好。

**2.2.8 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10 h按2.2.4项下方法显色,于540 nm处测定A,计算RSD 0.6%,表明供试品溶液在10 h内稳定。

**2.2.9 加标回收率试验** 称取7份番石榴叶药材粉末,其中6份中各加入等量齐墩果酸对照品,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,按2.2.4项下方法显色,于540 nm处测定A,计算平均加样回收率99.64%,RSD 1.7%,说明该方法测得的结果准确可靠。

## 2.3 单因素试验考察

**2.3.1 乙醇体积分数** 精密称取7份番石榴叶药材粉末,每份5.0 g,固定液料比10:1,提取温度40℃,提取时间30 min,超声波功率120 W,提取数1次,选择乙醇体积分数分别为40%,50%,60%,70%,80%,90%,100%,结果总三萜提取率分别为5.1%,6.4%,6.5%,6.9%,7.0%,5.0%,3.4%,故选择乙醇体积分数70%~90%。

**2.3.2 液料比** 精密称取7份番石榴叶药材粉末,每份5.0 g,固定乙醇体积分数60%,提取温度40℃,提取时间30 min,超声波功率120 W,提取数1次,液料比选择10:1,20:1,30:1,40:1,50:1,60:1,70:1,计算总三萜提取率分别为2.2%,5.6%,6.1%,6.5%,7.7%,8.0%,8.0%,故选择液料比40:1~60:1。

**2.3.3 超声波功率** 精密称取5份番石榴叶药材粉末,每份5.0 g,固定乙醇体积分数60%,液料比50 mL·g<sup>-1</sup>,提取温度40℃,提取时间30 min,提取数1次,超声波功率分别为90,105,120,135,150 W,计算总三萜提取率分别为5.9%,6.0%,6.5%,6.7%,6.5%,故选择超声波功率125~150 W。

**2.3.4 提取时间** 精密称取6份番石榴叶药材粉末,每份5.0 g,固定乙醇体积分数60%,液料比50 mL·g<sup>-1</sup>,提取温度40℃,超声波功率120 W,提取数1次,提取时间选择10,20,30,40,50,60 min,计算总三萜提取率分别为6.5%,6.5%,7.0%,7.1%,7.2%,7.3%,说明提取时间对提取率的影响

较小,故确定提取时间 30 min,不再优化。

**2.3.5 提取温度** 精密称取 3 份番石榴叶药材粉末,每份 5.0 g,固定乙醇体积分数 60%,液料比 50 mL·g<sup>-1</sup>,提取时间 30 min,超声波功率 120 W,提取数 1 次,提取温度选择 40,50,60 ℃,计算总三萜提取率分别为 6.7%,7.5%,7.5%,故确定提取温度 50 ℃。

**2.3.6 提取次数** 精密称取 3 份番石榴叶药材粉末,每份 5.0 g,固定乙醇体积分数 60%,液料比 50 mL·g<sup>-1</sup>,提取时间 30 min,超声波功率 120 W,提取温度 40 ℃,提取数分别为 1,2,3 次,计算总三萜提取率分别为 6.7%,7.7%,8.1%,由于提取数 > 2 次时,提取率增大趋于平缓,故确定提取数 2 次。

**2.4 响应面试验** 根据中心组合设计原理,综合单因素试验考察结果,选取乙醇体积分数、液料比、超声波功率为自变量,总三萜提取率为响应值,称取药材粉末 5.0 g,共 17 份,设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面分析试验,其中 12 个析因试验,5 个中心试验,试验安排与结果见表 1。表 1 中试验数据采用响应面分析软件 Design-Expert Version 8.0.5 进行多元回归分析,得回归方程  $Y = 6.65 - 0.49A + 0.14B - 0.043C - 0.033AB - 0.13AC + 0.06BC + 0.17A^2 + 0.11B^2 + 0.11C^2$ ,方差分析见表 2。

表 1 番石榴叶中总三萜提取工艺响应面试验安排

No.	A 乙醇体积 分数/%	B 液料比 /mL·g <sup>-1</sup>	C 超声功率 /W	总三萜提取率 /%
1	80	40	120	6.82
2	80	60	150	7.03
3	80	40	150	6.66
4	80	50	135	6.84
5	90	40	135	6.23
6	80	50	135	6.49
7	90	60	135	6.49
8	80	50	135	6.66
9	70	50	150	7.42
10	70	60	135	7.69
11	70	50	120	7.28
12	90	50	120	6.71
13	90	50	150	6.31
14	80	50	135	6.65
15	70	40	135	7.30
16	80	60	120	6.96
17	80	50	135	6.59

表 2 总三萜提取率方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	2.47	9	0.27	16.68	0.000 6
A	1.95	1	1.95	118.55	<0.000 1
B	0.17	1	0.17	10.12	0.015 5
C	0.015	1	0.015	0.90	0.373 2
AB	4.287 × 10 <sup>-3</sup>	1	4.287 × 10 <sup>-3</sup>	0.26	0.625 6
AC	0.072	1	0.072	4.36	0.075 3
BC	0.014	1	0.014	0.86	0.384 5
A <sup>2</sup>	0.12	1	0.12	7.51	0.028 9
B <sup>2</sup>	0.050	1	0.050	3.03	0.125 1
C <sup>2</sup>	0.050	1	0.050	3.03	0.125 1
残差	0.12	7	0.016		
失拟项	0.050	3	0.017	1.03	0.468 5
纯误差	0.065	4	0.016		
总离差	2.59	16			
变异系数	0.019				

由方差分析可知,回归方程模型高度显著,决定系数( $R^2$ ) = 2.47/2.59 = 95.37%,说明响应值的变化有 95.37% 来源于所选自变量;模型的变异系数 1.88%,说明该模型精密度良好;失拟项不显著,说明回归方程在整个回归区域的拟合情况良好,可用该回归模型代替试验真实点对结果进行分析。各因素中一次项 A 对响应值的影响高度显著,一次项 B 和二次项 A<sup>2</sup> 对响应值的影响显著,说明响应值与自变量间并不是简单的线性关系,交互项均不显著。

各自变量对总三萜提取率影响的二维等高线图和三维响应面见图 1~3。由图 1 可知,在超声波功率一定的条件下,随乙醇体积分数的降低,响应值明显增高,至乙醇体积分数约 70% 时存在极大值;响应值也随液料比的增大而增大,约至 60 mL·g<sup>-1</sup> 时,响应值达最大;乙醇体积分数对响应值的影响最显著。由图 2 可知,在液料比一定的条件下,乙醇体积分数为 70% 时,响应值随超声波功率的增加而升高,在超声波功率 150 W 处达最大值,而且响应值始终随乙醇体积分数的降低而明显升高。由图 3 可知,在乙醇体积分数一定的条件下,响应值随液料比的升高而升高,而超声功率对响应值的影响不显著。

**2.5 验证试验** 通过响应面分析软件得到回归模型预测的总三萜最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 70%,液料比 60 mL·g<sup>-1</sup>,超声功率 150 W,此时,总三萜理论提取率 7.86%。称取脱脂后番石榴叶粉末 3 份,每份 5 g,按最佳工艺条件进行验证试验,按

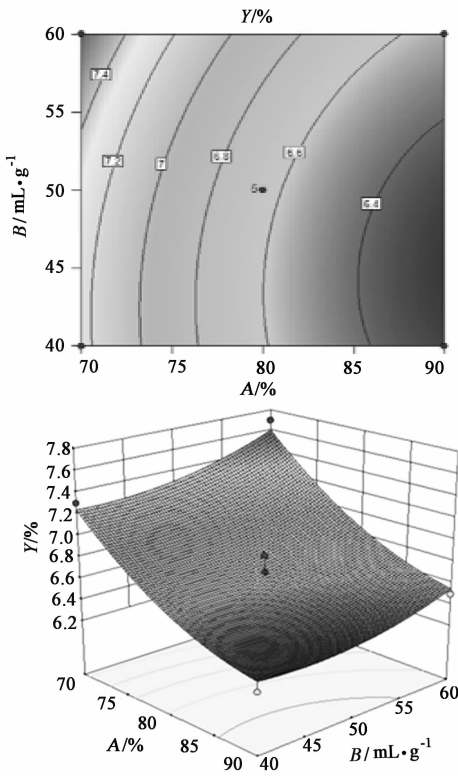


图1 乙醇体积分数和液料比对提取率影响的等高线和响应面

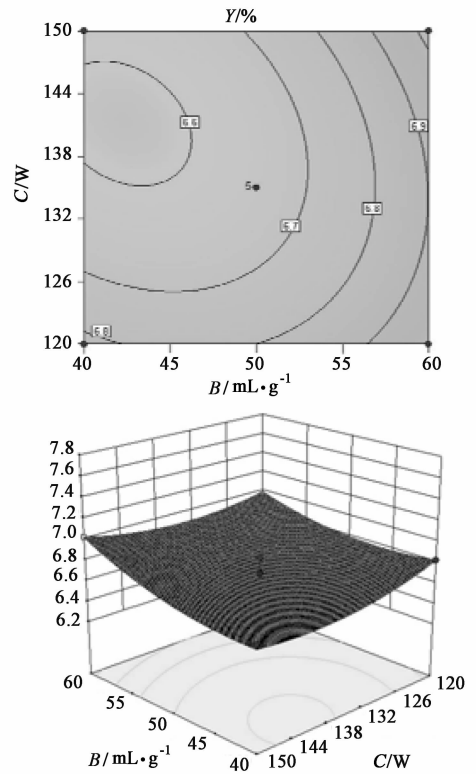


图3 超声功率和液料比对提取率影响的等高线和响应面

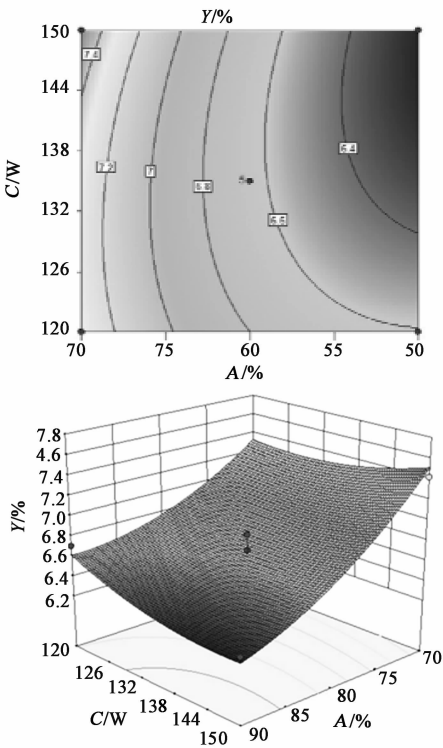


图2 乙醇体积分数和超声功率对提取率影响的等高线和响应面

偏差 0.891% ,表明该方程预测性较好,表明采用响应面法优选番石榴叶总三萜提取条件具有可行性。

### 3 讨论

本文采用响应面分析法对番石榴叶总三萜提取的主要影响因素进行多元二次回归拟合,通过方差分析表明建立的模型显著,拟合度高,变异系数小,失拟项不显著,预测结果准确。响应面分析结果表明,乙醇体积分数对总三萜提取率的影响最显著,其次液料比,超声功率影响不明显。由于提取工艺条件选择 70% 乙醇为提取溶解效果最好,推测番石榴叶溶出的总三萜可能以三萜皂苷类成分为主。

### [参考文献]

- [ 1 ] Gutiérrez R M P, Mitchell S, Solis R V, et al. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology [ J ]. J Ethnopharmacol, 2008, 117 ( 1 ): 1.
- [ 2 ] 邵萌,范春林,王英,等. 番石榴叶的化学成分及药理活性研究进展 [ J ]. 天然产物研究与开发, 2009, 21 ( 3 ): 525.
- [ 3 ] 王婧茹,赵晶晶,叶春玲,等. 番石榴叶总三萜对 2 型糖尿病大鼠的降血糖和血脂作用 [ J ]. 中国病理生理杂志, 2012, 28 ( 6 ): 1109.

2.2.4 项下方法显色,于 540 nm 处测定 A,计算总三萜平均提取率 7.93% ,RSD 1.5% ,与理论值的相对

# 正交试验法优选治郁颗粒提取工艺

孙敬蒙, 才秀丽, 周昕琪, 张炜煜\*  
(长春中医药大学, 长春 130117)

**[摘要]** 目的: 优选治郁颗粒的醇提工艺和水提工艺, 为该制剂的工业化生产提供参考。方法: 采用 HPLC 测定栀子苷含量, 流动相乙腈-水(10:90), 检测波长 238 nm; 以栀子苷提取率为指标, 通过正交试验考察乙醇体积分数、加醇量、提取时间及提取次数对醇提工艺的影响。采用 UV 测定总多糖含量, 检测波长 490 nm; 以总多糖提取率为指标, 通过正交试验考察加水量、提取时间及提取次数对水提工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 6 倍量 70% 乙醇提取 2 次, 每次 1.0 h, 药渣加 10 倍量水煎煮 3 次, 每次 2.0 h; 栀子苷、总多糖提取率分别为 0.013 29, 0.030 39 g·g<sup>-1</sup>。结论: 该优选工艺合理可行, 有效成分提取率高。

**[关键词]** 治郁颗粒; 栀子苷; 总多糖; 提取率

**[中图分类号]** R283.6; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0036-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230036

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1523.005.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-27 15:23

## Optimization of Extraction Process for Zhiyu Granules by Orthogonal Test

SUN Jing-meng, CAI Xiu-li, ZHOU Xin-qi, ZHANG Wei-yu\*  
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize alcohol and water extraction processes of Zhiyu granules, in order to provide a reference for commercial production of this preparation. **Method:** HPLC was employed to determine the content of geniposide with mobile phase of acetonitrile-water (10:90) and detection wavelength at 238 nm; taking yield of geniposide as index, orthogonal test was adopted to optimize alcohol extraction process with extracting

**[收稿日期]** 20140512(013)

**[基金项目]** 吉林省中医药管理局中医药科技项目(2012-075)

**[第一作者]** 孙敬蒙, 在读硕士, 从事药物新剂型与新型给药系统研究, Tel: 0431-86172198, E-mail: mmhoney7@126.com

**[通讯作者]** \*张炜煜, 硕士, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新型给药系统研究, Tel: 0431-86172198, E-mail: weiyuzhang2003@126.com

- [4] 匡乔婷, 赵晶晶, 叶春玲, 等. 番石榴叶总三萜对 2 型糖尿病大鼠肾损伤的保护作用[J]. 中药材, 2012, 35(1):94.
- [5] 周迎春, 黄海军, 鄢文, 等. 番石榴叶对诺瓦克样病毒性腹泻患儿唾液中 IFN- $\gamma$ 、IL-2 水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(2):7.
- [6] 毛芹超, 周迎春, 李润明, 等. 番石榴叶总皂苷对 HIV-1 包膜蛋白介导细胞融合的影响[J]. 中药材, 2010, 33(11):1751.
- [7] 徐金瑞, 张瑞芬, 潘国伟. 番石榴叶黄酮的微波提取及其抗氧化作用研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(5):166.
- [8] 李玲, 何宇新, 吴晶晶, 等. 番石榴叶提取工艺研究[J]. 陕西中医, 2009, 30(11):1529.
- [9] 王光, 张海林. 番石榴叶总黄酮两种提取方法的比较研究[J]. 商品与质量, 2012(5):305.
- [10] 钟方丽, 祝波, 王慧竹. 番石榴叶总黄酮提取工艺的优选[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(7):567.
- [11] 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, 2010:367.

[责任编辑 刘德文]