

响应面法优化连翘中桦木酸超声辅助提取工艺

张生, 王宇, 王少明, 魏焕勇, 郭盛磊, 阎秀峰*

(东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与
重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:应用响应面法优化超声辅助提取连翘中桦木酸的工艺条件。方法:在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 试验设计和响应面分析法考察乙醇体积分数、提取温度、液固比对桦木酸提取率的影响。HPLC 测定桦木酸含量, Thermo Hypersil GOLD AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(9:1), 流速 1.2 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 210 nm。结果:最佳超声提取工艺为乙醇体积分数 80%, 提取温度 37 °C, 液固比 32 mL·g⁻¹, 桦木酸提取率(4.28 ± 0.05) mg·g⁻¹, 与模型预测值(4.30 mg·g⁻¹)基本一致。结论:该工艺合理、可靠,有效成分提取率高。

[关键词] 连翘; 桦木酸; 超声辅助提取; 单因素试验

[中图分类号] R283.6; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)17-0015-04

[doi] 10.11653/syjf2013170015

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Technology for Betulinic Acid from Forsythiae Fructus by Response Surface Methodology

ZHANG Sheng, WANG Yu, WANG Shao-ming, WEI Huan-yong, GUO Sheng-lei, YAN Xiu-feng*

(Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-Alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of betulinic acid from Forsythiae Fructus using response surface methodology. **Method:** On the basis of single factor tests, Box-Behnken experimental design and response surface methodology was adopted to optimize extraction conditions with the concentration of ethanol, extraction temperature and solid-liquid ratio as factors. HPLC was used to determine the content of betulinic acid from Forsythiae Fructus, chromatographic conditions were as follows: Thermo Hypersil GOLD AQ-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile-water (9:1) as mobile phase, flow rate of 1.2 mL·min⁻¹, injection volume 20 μL, detection wavelength at 210 nm. **Result:** Optimal ultrasound-assisted extraction technology of betulinic acid from Forsythiae Fructus was as following: the volume fraction of ethanol 80%, extraction temperature 37 °C, liquid-solid ratio 32 mL·g⁻¹. The actual value of betulinic acid yield was (4.28 ± 0.05) mg·g⁻¹, which was consistent with the predicted value of 4.30 mg·g⁻¹. **Conclusion:** This optimized extraction process was reasonable and reliable with high yield of effective components.

[Key words] Forsythiae Fructus; betulinic acid; ultrasound-assisted extraction; single factor test

连翘又名黄花条、连壳、青翘、落翘、黄奇丹 等^[1], 味苦, 性微寒, 具有抗菌、强心、利尿、镇吐等

[收稿日期] 20130228(009)

[基金项目] 林业公益性行业科研专项(201004069); 浙江省自然科学基金重点项目(Z2100435); 黑龙江省自然科学基金项目(C201101)

[第一作者] 张生, 硕士, 从事生物活性物质利用研究, Tel:15245083587, E-mail: ajiangliua@126.com

[通讯作者] * 阎秀峰, 教授, 博士生导师, 从事植物次生代谢研究, Tel:0451-82190052, E-mail: xyfan@nefu.edu.cn

药理作用^[2]。桦木酸又称白桦脂酸,是羽扇烷型五环三萜,具有抗肿瘤、抗艾滋病病毒、抗炎等多种生物活性^[3],在植物中含量普遍偏低,在白桦树皮中仅 0.025%^[4]。Chiba M^[5]等在连翘中分离得到了 3 个五环三萜类化合物(白桦脂酸、齐墩果酸、熊果酸)。目前尚无关于连翘中桦木酸提取工艺的报道。本实验采用超声辅助提取法,通过 Box-Behnken 试验和响应面分析法优选连翘中桦木酸的提取工艺,为桦木酸的开发利用提供参考。

1 材料

Water 1525 型高效液相色谱系统(717 型自动进样器,2996 型二极管检测器,美国 Waters 公司), Thermo Hypersil GOLD AQ-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 辽宁省大连伊利特公司), Sorvall Legend Micro 17 型离心机(美国 Thermo 公司), B3510E-DTH 型台式超声清洗机(美国 Branson 公司), FW80 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司), BSA-124S 型 1/万分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司), 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)。

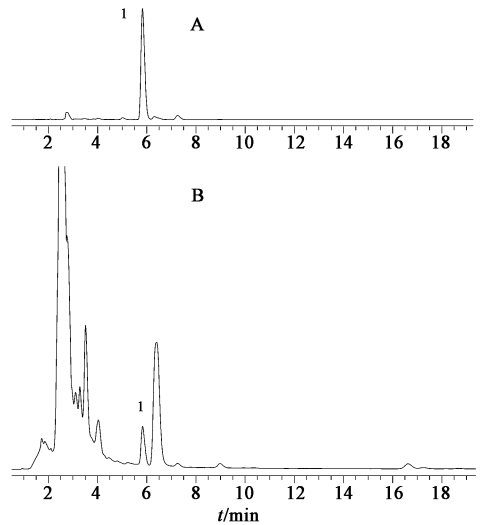
桦木酸对照品(自制,纯度 > 95%),连翘(购自北京同仁堂哈尔滨分店,经东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心阎秀峰教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD AQ-C₁₈ 色谱柱,流动相乙腈-水(9:1),流速 1.2 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,进样量 20 μL,检测波长 210 nm,见图 1。

2.2 标准曲线的建立 精密称取桦木酸对照品 10 mg 至 25 mL 量瓶中,加乙醇超声溶解并定容,得对照品母液。精密量取该母液 12.5 mL,置于 25 mL 量瓶中,加乙醇定容,按此方法稀释 3 次,得质量浓度为 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg·L⁻¹ 系列对照品溶液,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 5\ 196.797\ 1X - 1.936\ 5$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围 12.5 ~ 400 mg·L⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 称取适量连翘药材,于 60 °C 烘干至恒重后粉碎过 40 目筛,备用。精密称取一定量连翘粉样品,置于 10 mL 量瓶中,加一定体积分数的乙醇溶液 9 mL,于一定温度下超声辅助提取一定时间(40 kHz, 170 W),冷却至室温,定容摇匀。取 1.8 mL 提取液于 2 mL 离心管中,13 000 r·



A. 对照品; B. 供试品; 1. 桦木酸

图 1 连翘 HPLC

min⁻¹离心 15 min,取 0.8 mL 上清液作为供试品溶液。

2.4 单因素试验考察

2.4.1 乙醇体积分数 称取连翘 0.45 g,固定超声时间 20 min,提取温度 30 °C,液固比 20 mL·g⁻¹,分别用体积分数 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇溶液提取,结果桦木酸提取量分别为 0.92, 3.04, 3.81, 4.05, 3.81, 3.72 mg·g⁻¹,故选择 80% 乙醇。

2.4.2 提取时间 称取连翘 0.45 g,固定乙醇体积分数 80%,提取温度 30 °C,液固比 20 mL·g⁻¹,分别提取 5, 10, 15, 20, 25, 30 min,结果桦木酸提取量分别为 3.25, 3.49, 3.40, 3.30, 3.50, 3.35 mg·g⁻¹,说明提取时间对桦木酸提取率影响不大。

2.4.3 提取温度 固定乙醇体积分数 80%,提取时间 10 min,液固比 20 mL·g⁻¹,分别于 25, 35, 45, 55, 65 °C 进行提取,结果桦木酸提取量分别为 3.00, 3.70, 3.24, 3.12, 3.21 mg·g⁻¹,故选择提取温度约 35 °C。

2.4.4 液固比 固定提取温度 35 °C,乙醇体积分数 80%,提取时间 10 min,分别于液固比 10, 20, 30, 40, 50 mL·g⁻¹ 条件下进行提取,结果桦木酸提取量分别为 3.20, 3.99, 4.00, 3.90, 3.90 mg·g⁻¹,故选择液固比 30 mL·g⁻¹。

2.5 提取工艺优选 在单因素试验基础上,选择乙醇体积分数、提取温度、液固比为自变量,自变量的低、中、高水平分别以 -1, 0, 1 进行编码,采用进行三因素三水平 Box-behnken Design 试验设计^[6-8],因素

水平见表1,试验安排及结果见表2。

表1 连翘中桦木酸超声辅助提取工艺
Box-behnken 试验因素水平编码

水平	X_1 乙醇体积 分数/%	X_2 提取温度 /℃	X_3 液固比 /mL·g ⁻¹
-1	60	25	15
0	75	35	30
1	90	45	45

表2 连翘中桦木酸超声辅助提取工艺 Box-behnken 试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	桦木酸提取量/mg·g ⁻¹
1	1	0	-1	3.92
2	-1	0	1	3.47
3	0	-1	1	3.87
4	0	1	1	3.90
5	1	0	1	3.94
6	1	1	0	3.90
7	0	0	0	4.25
8	0	0	0	4.22
9	0	1	-1	3.97
10	0	0	0	4.16
11	0	0	0	4.21
12	1	-1	0	3.84
13	-1	1	0	3.64
14	-1	0	-1	3.11
15	-1	-1	0	2.88
16	0	-1	-1	3.10
17	0	0	0	4.21

以连翘中桦木酸提取量为响应值,采用 Design-Expert 软件对表2 试验数据进行三元二次多项式逐步回归拟合,得回归方程 $Y = 4.21 + 0.31X_1 + 0.22X_2 + 0.14X_3 - 0.18X_1X_2 - 0.085X_1X_2 - 0.21X_2X_3 - 0.37X_1^2 - 0.27X_2^2 - 0.23X_3^2$,显著性检验及方差分析见表3。

由表3 可知,该模型高度显著,失拟项相对于绝对误差并不显著。模型确定系数(R^2)0.993 7,说明此模型与实际试验拟合较好,能很好地描述试验结果,各因素的一次项、二次项及交叉项均对桦木酸提取量影响非常显著,即各因素对响应值的影响不是简单的线性关系。为更直观地表现各因素对桦木酸提取量的相互关系,拟进行响应面分析,结果见图2~4,表明各因素的交互作用较显著, X_1, X_2 间存在抑制作用,这与回归方程中 X_1X_2 项系数为负值一

表3 响应面二次模型的方差分析和显著性检验

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	2.86	9	0.32	122.01	<0.000 1
X_1	0.78	1	0.78	299.66	<0.000 1
X_2	0.37	1	0.37	141.84	<0.000 1
X_3	0.15	1	0.15	55.92	0.000 1
X_1X_2	0.12	1	0.12	46.99	0.000 2
X_1X_3	0.029	1	0.029	11.08	0.012 6
X_2X_3	0.18	1	0.18	67.66	<0.000 1
X_1^2	0.58	1	0.58	224.09	<0.000 1
X_2^2	0.31	1	0.31	119.92	<0.000 1
X_3^2	0.22	1	0.22	83.59	<0.000 1
残差	0.018	7	2.607×10^{-3}	-	-
失拟值	0.014	3	4.683×10^{-3}	4.46	0.091 3
误差	4.200×10^{-3}	4	1.050×10^{-3}	-	-
总和	2.88	16	-	-	-

致,同样 X_3, X_2 及 X_1, X_3 两项间存在抑制作用。

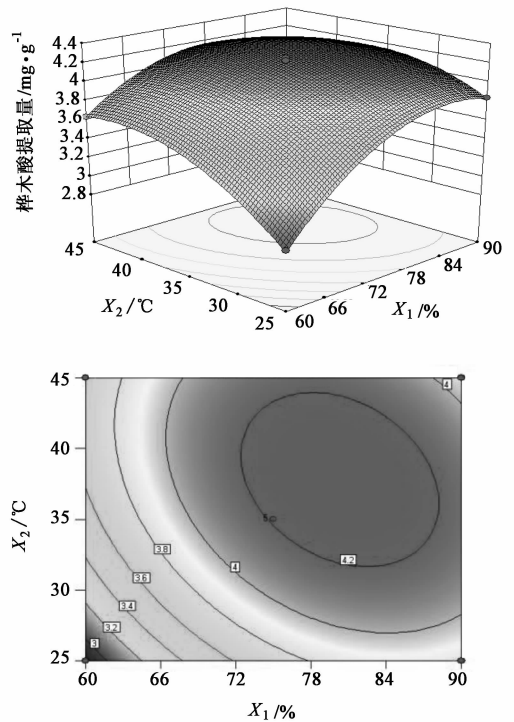


图2 乙醇体积分数与超声温度对桦木酸提取量的响应面及等高线

2.6 验证试验 通过 Design Expert V8.0.6.1 软件进行响应面设计优化,确定最佳提取工艺条件为乙醇体积分数 80.26%,提取温度 37.34 °C,液固比 31.86 mL·g⁻¹,连翘中桦木酸理论提取量 4.30 mg·g⁻¹。结合实际操作考虑,将工艺条件修正为乙醇体积分数 80%,提取温度 37 °C,液固比 32 mL·g⁻¹。

按该工艺进行 3 次验证试验,结果连翘中桦木酸提取量(4.28 ± 0.05) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与预测值基本一致,表明该三元二次方程与实际情况拟合较好,充分验证了所建模型的正确性。

3 讨论

在单因素试验基础上,确定乙醇体积分数、提取温度、液固比对桦木酸提取量具有显著影响,采用响应面法对超声辅助提取连翘中桦木酸的工艺条件进行优化,结果预测值与实测值基本一致,说明建立的工艺条件可靠,能有效提高连翘中桦木酸的提取量,对连翘资源的综合利用及桦木酸的工业生产具有指导意义。

[参考文献]

- [1] 王福男. 中药连翘的化学成分研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2009;10.
- [2] 刘婧,章海锋,何国庆,等. 白桦脂醇、白桦脂酸的研究进展及其前景[J]. 食品工业科技,2009,31(10):360.
- [3] Andrew J S. Quantum dots as luminescent probes in biological systems[J]. Solid State Mater Sci,2002,6(4):365.
- [4] 马慧丽,姚军,陈慧. 桦木酸制备的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2005,14(4):551.
- [5] Chiba M, Hisada S, Nishibe S. Studies on the Chinese crude drug ' Forsythiae Fructus' III. On the constituents of fruits of Forsythia viridissima and *F. suspensa* [J]. Shoyakugaku Zassi,1978,32(3):194.
- [6] 郝继伟. 响应面法优化超声辅助提取蒙山松茸多糖工艺[J]. 中药材,2010,33(7):1159.
- [7] 刘军海,任惠兰,官波,等. 响应面分析法优化白术多糖提取工艺[J]. 中成药,2008,30(5):667.
- [8] 李亚娜,林永成,余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2004,32(11):29.
- [9] 任风莲,谷芳芳,吴梅林,等. 利用响应面分析法优化山楂中总黄酮提取条件[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(1):126.
- [10] 牛立新,李章念,李红卷,等. 超声波提取卷丹鳞茎中总黄酮研究[J]. 中草药,2007,30(1):85.

[责任编辑 全燕]

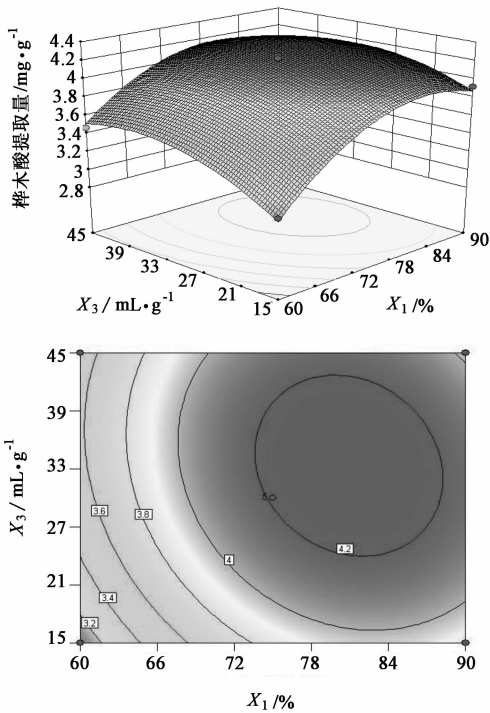


图 3 乙醇体积分数与液固比对桦木酸提取量的响应面及等高线

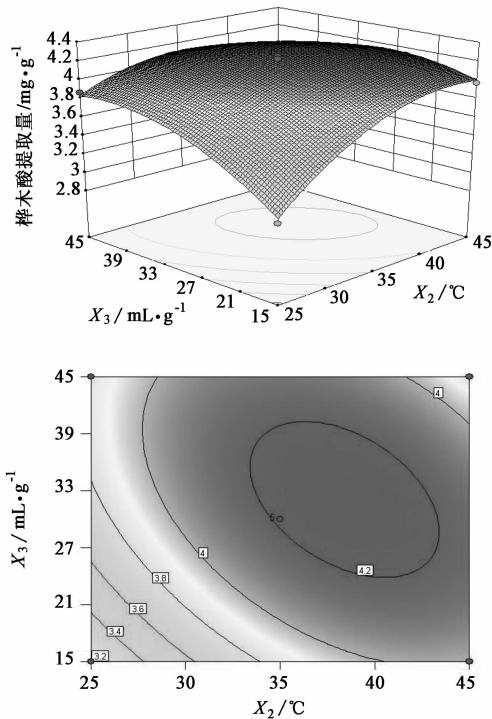


图 4 提取温度与液固比对桦木酸提取量的响应面及等高线