

Box-Behnken 设计优化荷叶总黄酮的温浸提取工艺

侯莉伟¹, 杨凤梅¹, 杨明^{1,2*}, 邹文铨³, 许润春¹, 黄晶¹

- (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;
2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
3. 四川大学分析测试中心, 成都 610054)

[摘要] 目的: 优化荷叶总黄酮的温浸提取工艺。方法: 在单因素试验基础上, 以总黄酮提取率为指标, 通过 Box-Behnken 响应面设计考察乙醇体积分数、温浸时间、液固比及温浸温度对荷叶总黄酮提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为加 39 倍量 51% 乙醇于 71 °C 温浸 2 次, 每次 62 min, 总黄酮提取率 6.21%。结论: 利用温浸方法提取荷叶总黄酮的工艺稳定可行。

[关键词] 荷叶; 总黄酮; 温浸提取; Box-Behnken 设计

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0051-04

[doi] 10.11653/syjf2013180051

Optimization of Soaking Extraction Technology of Total Flavonoids from Nelumbinis Folium by Box-Behnken Design

HOU Li-wei¹, YANG Feng-mei¹, YANG Ming^{1,2*}, ZOU Wen-quan³, XU Run-chun¹, HUANG Jing¹

- (1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China;
2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM,

[收稿日期] 20130306(014)

[第一作者] 侯莉伟, 硕士, 从事中药药剂学研究, Tel: 18782085707, E-mail: 514296193@qq.com

[通讯作者] * 杨明, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂研究, E-mail: yangming16@126.com

烷后容器内压力比二氯二氟甲烷高数倍有关。

在抛射剂与药液体系中, 加入表面活性剂可稳定混悬的药物微粒或增溶药物, 表面活性剂应溶解在抛射剂中。但体系若不含助溶剂(如乙醇), 在二氯二氟甲烷中互溶的表面活性剂司盘-80、油酸和卵磷脂, 在四氟乙烷中均难溶^[4]。但在体系中含有乙醇时, 此问题将不存在。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 12.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 吸入制剂质量控制研究技术指导原则[S]. [H]GPH9-1, 2007.
- [3] 蒋国民. 气雾剂理论与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 1167.
- [4] 雷伯开, 金方. 药用定量吸入气雾剂中氟里昂抛射剂替代的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38

(6): 447.

- [5] 季艳艳, 周林, 常新全, 等. HPLC-ELSD 测定咽速康气雾剂中胆酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 91.
- [6] 常新全, 杨娜, 宋潇. HPLC-ELSD 测定咽速康气雾剂中每揆胆酸含量[J]. 中国现代中药, 2013, 15(8): 694.
- [7] 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: 316.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 已上市吸入气雾剂变更抛射剂研究技术要求[S]. 国食药监注[2011]185号, 2011.
- [9] 丁立, 张钧寿, 游一中, 等. 药用气雾剂抛射剂的替代: 从 CFC 到 HFA[J]. 药学进展, 2001, 25(2): 93.
- [10] 刘海静, 王豆, 杨欣, 等. 医药用 1, 1, 1, 2-四氟乙烷(HFC-134a)及其主要杂质毒副作用的概述[J]. 中国药事, 2012, 26(12): 1393.

[责任编辑 全燕]

Nanchang 330004, China; 3. Analytical and Testing Center of Sichuan University, Chengdu 610054, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize soaking extraction technology of total flavonoids from *Nelumbinis Folium*. **Method:** Based on single factor experiments, with yield of total flavonoids as index, factors such as ethanol concentration, extraction time, liquid-solid ratio and extraction temperature were optimized by Box-Behnken response surface design. **Result:** The best technology parameters were as follows: extracted twice with 39 times the amount of 51% ethanol at 71 °C, 62 min per time, yield of total flavonoids was 6.21%. **Conclusion:** This extraction process by constant temperature soaking was stable and practicable.

[Key words] *Nelumbinis Folium*; total flavonoids; soaking extraction; Box-Behnken design

荷叶为多年生水生草本,生于水泽、池塘、湖沼或水田内,是一种价格低廉、营养丰富、功能显著的天然原料^[1],具有清热解暑、升发清阳、凉血止血、利湿的作用^[2],含有总黄酮、生物碱、挥发油等活性成分,是药食两用之品^[3]。荷叶总黄酮具有降脂减肥、抗氧化、抗衰老等功效^[4-5]。温浸法是中药传统提取方法之一,具有操作简单、能耗小、生产成本低等优点^[6]。本实验通过比较不同提取方法对荷叶总黄酮提取率的影响,确定最佳提取方式,在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 设计优化荷叶总黄酮的提取工艺^[7],为荷叶资源的开发利用提供依据。

1 材料

UV-1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DZF-1B 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂),BSA224S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),HX-500A 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂),DZKW-4 型电热恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。荷叶(四川科伦药业股份有限公司,经成都中医药大学卢先明教授鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶,烘干,粉碎成粗粉),芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100080-200707),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮的含量测定^[1] 精密称取芦丁对照品 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇适量,超声处理使溶解完全,加无水乙醇至刻度,摇匀,得对照品溶液。准确吸取对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,加水至 6 mL,加 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,摇匀,放置 6 min,加 4.3% 氢氧化钠溶液 10 mL,加水至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂为空白,于 500 nm 处测定吸光度(A),以 A 为

纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.0872X - 0.0072$ ($R^2 = 0.9993$),芦丁线性范围 8 ~ 48 mg·L⁻¹。

2.2 提取方式比较 称取荷叶 12 份,每份 3 g,均分为 4 组(a,b,c,d),各加入 40 倍量 60% 乙醇浸泡 2 h。a 组闪提 2 次,每次 1 min;b 组 70 °C 水浴温浸 2 次,每次 30 min;c 组于 40 kHz 超声 2 次,每次 30 min;d 组回流提取 2 次,每次 30 min;过滤,合并 2 次滤液,测定,结果总黄酮提取量分别为 3.755,4.154,2.551,3.796 mg·g⁻¹,出膏率依次为 8.7%,11.33%,8.36%,12.8%,综合考虑(总黄酮提取量和干膏率的加权系数分别为 70%,30%),表明温浸提取荷叶总黄酮的方法较好。原因可能是闪式和超声提取属常温提取,使提取率较低;回流提取温度较高,会破坏总黄酮结构导致提取率偏低。

2.3 荷叶总黄酮提取率的测定 分别准确吸取不同提取方法所得滤液 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,加水至 6 mL,按 2.1 项下方法测定总黄酮含量,计算总黄酮提取率。

2.4 干膏率的测定 精密量取不同提取方法所得提取液 50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,于 105 °C 烘箱干燥 3 h,置干燥器中冷却 30 min,迅速精密称定质量,计算干膏率。

2.5 单因素试验考察^[8-9]

2.5.1 乙醇体积分数 称取荷叶 6 份,每份 3 g,分别加入 100 mL 体积分数为 40%,50%,60%,70%,80%,90% 的乙醇溶液浸泡 2 h,于 70 °C 水浴温浸 2 次,每次 30 min,结果总黄酮提取率分别为 3.88%,4.63%,3.88%,3.50%,2.69%,1.62%,表明 50% 乙醇的总黄酮提取率达最大值。

2.5.2 液固比 称取荷叶 7 份,每份 3 g,分别加入 20,25,30,35,40,45,50 倍量的 50% 乙醇浸泡 2 h,于 70 °C 水浴温浸 2 次,每次 30 min,结果总黄酮提取率分别为 3.79%,4.42%,4.50%,5.07%,

5.76% ,5.50% ,4.45% ,表明液固比 40:1 时总黄酮提取率最大。

2.5.3 浸提时间 称取荷叶 6 份,每份 3 g,加 40 倍量 50% 乙醇浸泡 2 h,于 70 ℃ 水浴温浸 2 次,每次提取时间分别为 30,45,60,75,90,105 min,结果总黄酮提取率分别为 3.63% ,3.88% ,5.40% ,5.13% ,4.41% ,4.40% ,表明提取约 60 min 时达最大值。

2.5.4 浸提温度 称取荷叶 7 份,每份 3 g,加 40 倍量 50% 乙醇浸泡 2 h,分别于 30,40,50,60,70,80,90 ℃ 温浸 2 次,每次 60 min,结果总黄酮提取率分别为 1.27% ,2.35% ,3.20% ,3.93% ,5.36% ,6.14% ,4.38% ,表明 80 ℃ 左右达最大值。

2.5.5 浸提次数 称取荷叶 4 份,每份 3 g,加 40 倍量 50% 乙醇浸泡 2 h,分别于 80 ℃ 温浸 1,2,3,4 次,每次 60 min,结果总黄酮提取率分别为 3.43% ,5.97% ,6.05% ,5.96% ,结合提取率及生产成本考虑,选择温浸数 2 次。

2.6 响应面设计 在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 试验设计,以荷叶总黄酮提取率为因变量,乙醇体积分数、温浸时间、液固比、浸提温度为自变量,中心点试验 5 次,因素水平编码见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 荷叶总黄酮温浸提取工艺优选 Box-Behnken 试验因素水平

水平	A 乙醇体积 分数/%	B 温浸时间 /min	C 液固比 /mL·g ⁻¹	D 浸提温度 /℃
-1	40	45	30	70
0	50	60	40	80
1	60	75	50	90

应用 Design-Expert 软件对表 2 中数据进行分析,方差分析见表 3。结果表明 AC, A² 为极显著性影响因素, B², C² 为显著性影响因素,平方项对荷叶总黄酮提取率的影响最为显著,其次为交互项,一次项的影响相对较小。回归方程为 $Y = 6.03496 - 0.020658A + 0.11282B - 0.25005C - 0.21546D - 0.22772AB - 0.99015AC - 0.0915AD - 0.19383BC + 0.1734BD + 0.43433CD - 0.6297A^2 - 0.50644B^2 - 0.42277C^2 - 0.03263D^2$, 整体模型的显著性水平 $P = 0.0089 < 0.01$, 表明该二次方程模型达极显著水平,拟合良好。

利用 Design-Expert 软件绘制各影响因素对总黄酮提取率的响应曲面图,见图 1。

由图 1 可知,乙醇体积分数与液固比的交互作

表 2 荷叶总黄酮温浸提取工艺优选 Box-Behnken 试验安排

No.	A	B	C	D	总黄酮 提取率/%
1	-1	0	1	0	6.124
2	1	0	0	-1	6.172
3	0	1	-1	0	5.833
4	0	0	0	0	6.101
5	0	0	0	0	5.891
6	0	-1	-1	0	5.647
7	0	-1	0	-1	5.995
8	-1	0	0	1	5.211
9	1	0	0	1	5.234
10	0	-1	0	1	5.122
11	0	1	0	-1	5.686
12	1	-1	0	0	4.534
13	-1	0	-1	0	4.607
14	0	0	-1	-1	5.822
15	0	0	0	0	6.118
16	-1	-1	0	0	3.804
17	0	0	-1	1	4.943
18	-1	1	0	0	5.101
19	0	0	1	1	5.587
20	0	1	1	0	4.632
21	0	1	0	1	5.507
22	0	0	0	0	6.205
23	-1	0	0	-1	5.784
24	1	0	-1	0	5.984
25	0	0	1	-1	4.729
26	-1	1	0	0	4.919
27	0	0	0	0	5.860
28	0	-1	1	0	5.222
29	1	0	1	0	3.541

表 3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	R ²	F	P
模型	10.87	14	0.78	3.80	0.0089
A	5.121 × 10 ⁻³	1	5.121 × 10 ⁻³	0.025	0.8765
B	0.15	1	0.15	0.75	0.4021
C	0.75	1	0.75	3.67	0.0761
D	0.56	1	0.56	2.72	0.1212
AB	0.21	1	0.21	1.01	0.3310
AC	3.92	1	3.92	19.17	0.0006
AD	0.033	1	0.033	0.16	0.6919
BC	0.15	1	0.15	0.73	0.4058
BD	0.12	1	0.12	0.59	0.4560
CD	0.75	1	0.75	3.69	0.0754
A ²	2.57	1	2.57	12.57	0.0032
B ²	1.66	1	1.66	8.13	0.0128
C ²	1.16	1	1.16	5.67	0.0320
D ²	6.906 × 10 ⁻³	1	6.906 × 10 ⁻³	0.034	0.8569
残差	2.86	14	0.20		
纯误差	0.092	4	0.023		
总和	13.73	28			

用对总黄酮提取率影响较大。利用 Design-Expert 软件求解方程,计算出荷叶总黄酮的最佳提取工艺

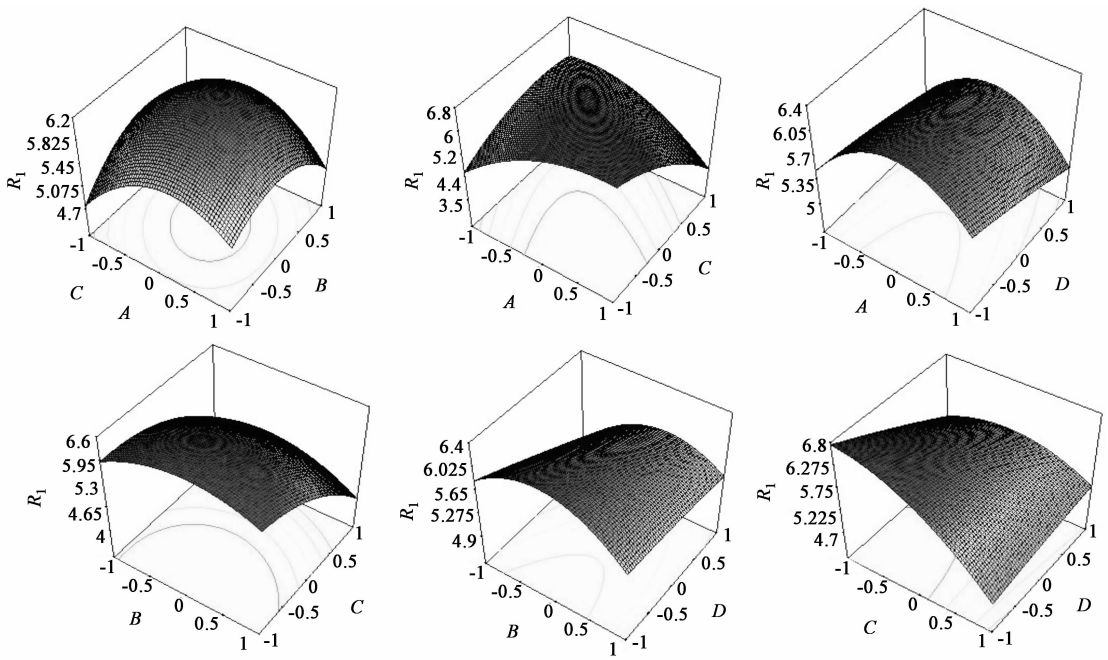


图 1 乙醇体积分数、温浸时间、液固比及浸提温度相互作用对总黄酮提取率影响的响应面

条件为乙醇体积分数 51.4%，温浸时间 61.8 min，液固比 38.7:1，浸提温度 71.4 °C，荷叶总黄酮提取率 6.27%。结合实际操作的可性，提取工艺调整为乙醇体积分数 51%，温浸时间 62 min，液固比 39:1，浸提温度 71 °C。按调整的提取条件进行 3 次验证试验，结果荷叶总黄酮平均提取率 6.21% (RSD 0.22%)，与理论预测值具有良好的拟合性。

3 讨论

响应面法将多因子试验中因子指标的相互关系用多项式近似拟合，通过对函数响应面和等高线的分析，能精确地反映各因子与响应值的关系，具有使用简单、精密度高、预测性好等优点^[8,10]。黄酮类化合物极具开发价值，可广泛用于治疗心血管疾病、内分泌疾病、抗肿瘤等医疗方面及食品添加剂和保健品方面。我国荷叶资源十分丰富，是提取黄酮类化合物的优良潜在资源。荷叶中黄酮类化合物含量较高，主要以糖苷形式存在，游离苷元含量较低^[11]，采用温浸提取荷叶总黄酮具有提取率较高、有效成分损失小、设备简单等优点，为荷叶总黄酮的工业开发提供参考。

[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,2010:258,333.
[2] 高学敏. 中药学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2007:500.

[3] 陶波,陈慕英,李晓宁,等. 荷叶药用研究概况[J]. 中医药信息,2001,18(2):14.
[4] 王福刚,曹娟,刘斌,等. 荷叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(9):2339.
[5] Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, et al. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nutifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids [J]. Bioorg Med Chem,2005,13(2):443.
[6] 李凤启. 温浸法制备中药汤剂的实验研究[J]. 陕西中医,2010,31(2):224.
[7] 赵子龙,薛培凤,倪佩东,等. 天然药物中总黄酮的提取工艺研究进展[J]. 内蒙古医学院学报,2012,34(6):512.
[8] 周向军,高义霞,张霞. 响应面法优化黄花菜总黄酮提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):29.
[9] 蒋宝军,陈绍民,田景振. 温浸醇提除蜡蜂胶总黄酮的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):15.
[10] 蒋志华,俞力超,冯子旺,等. 响应面法优化仙鹤草总黄酮的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):17.
[11] 王宇辉,周超凡. 中药降脂研究进展[J]. 中国中药杂志,1999,24(3):184.

[责任编辑 全燕]