

响应面法优化鹿衔草总黄酮的酶联半仿生法提取工艺

雒馨怡, 陈晓辉, 毕开顺, 李伟*
(沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 优选鹿衔草中总黄酮的酶联半仿生法提取工艺。方法: 以总黄酮提取率为指标, 在单因素试验基础上, 选取加酶量、料液比、酶解时间、提取时间、提取温度 5 个因素进行 Box-Behnken 中心组合设计, 利用响应面法优选提取工艺。结果: 优选的提取工艺为加酶量 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 料液比 1:65, 酶解时间 1.0 h, 提取时间 1.75 h, 提取温度 $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 总黄酮提取率达 5.54%, 与预测值 5.68% 较为接近。结论: 采用响应面法优选的提取工艺合理可行, 具有良好预测性。

[关键词] 响应面法; 酶联半仿生法; 鹿衔草; 总黄酮

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0019-04

[doi] 10.11653/syjf2013120019

Optimization of Enzyme-linked Semi-bionic Extraction Technology of Total Flavanoids from *Pyrola decorata* by Response Surface Methodology

LUO Xin-yi, CHEN Xiao-hui, BI Kai-shun, LI Wei*
(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize enzyme-linked semi-bionic extraction technology of total flavanoids from *Pyrola decorata*. **Method:** With yield of total flavanoids as index, based on single factor test, Box-Behnken central composite design was adopted by selecting the amount of enzyme, material-liquid ratio, enzymolysis time, extraction time and temperature as factors, extraction technology was optimized by response surface methodology. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: the amount of enzyme $1.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, ratio of material to liquid 1:65, enzymolysis time 1.0 h, extraction time 1.75 h, extraction temperature $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Under this conditions, yield of total flavanoids was up to 5.54%, which was close to the predicted value (5.68%). **Conclusion:** Optimized technology was reasonable and feasible with good predictability.

[Key words] response surface methodology; enzyme-linked semi-bionic extraction; *Pyrola decorata*; total flavanoids

黄酮类化合物作为鹿衔草中重要成分, 近年来以其广谱的药理作用倍受青睐。该类化合物能防治心脑血管系统疾病, 具有抗菌抗炎、抗癌、抗氧化、抗衰老等药理作用。酶解法为中药提取的新兴技术,

可降解植物细胞壁, 使胞内有效成分最大限度溶出, 同时较温和地将植物组织分解, 保证了提取物性质和结构的稳定。半仿生法是模拟口服给药及药物经胃肠道转运的原理, 为经消化道给药的中药试剂设计的一种提取工艺。

响应面法是利用统计学的综合试验技术解决复杂系统输入(试验变量)与输出(响应或试验指标)间关系的一种方法。其可通过设计合理的有限次数试验, 建立数学模型, 拟合因素与响应值的全局函数关系, 克服了正交试验只能对一个个孤立的试验点进行分析而不能给出直观图形的缺陷。

国内关于酶联半仿生法提取丹参、半夏白术天

[收稿日期] 20130121(017)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2010535)

[第一作者] 雒馨怡, 硕士, 从事中药提取物的质量控制研究, Tel: 15102406596, E-mail: xinyi8946@yahoo.cn

[通讯作者] * 李伟, 硕士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究及药物分析中统计学应用研究, Tel: 13514287013, E-mail: sybylee@gmail.com

麻汤有效成分等已有报道^[14],而用于提取鹿衔草总黄酮的研究未见报道。本实验采用酶联半仿生法提取鹿衔草总黄酮,显著增加了提取率且避免了溶剂残留问题,通过响应面法进行工艺优化,为深入鹿衔草总黄酮的深入研究提供实验依据。

1 材料

TU-1800 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),RRHP-200 型万能高速粉碎机(欧凯莱芙实业公司),PHS-25 型数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),AGBP2100 型电子天平(Sartorius 公司),AB135 S 型电子天平(瑞典 Mettler Toledo 公司)。

鹿衔草(辽宁沈阳市中街同仁堂药店,经沈阳药科大学中药鉴定研究室孙启时教授鉴定为鹿蹄草科植物鹿蹄草 *Pyrola decorata* H. Andres 的干燥全草,干燥后粉碎机粉碎过 20 目筛,密封保存,备用),芦丁对照品(辽宁省食品药品检验所,批号 100080-200707),纤维素酶(150 000 U·g⁻¹,宁夏和氏璧生物技术有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 取芦丁对照品约 20 mg,精密称定,用 70% 乙醇溶解并定容至 100 mL。准确吸取该溶液 0,1,2,4,8,10 mL 于 25 mL 量瓶中,加 5% 亚硝酸钠溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1.0 mL,放置 6 min,加 4% NaOH 溶液 5.0 mL,用 70% 乙醇定容,摇匀,得系列对照品溶液。于 510 nm 处测定吸光度(A),以芦丁质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 12.21X - 0.022$ ($R^2 = 0.9995$),表明芦丁在 0.008 ~ 0.08 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2 供试品溶液的制备 准确称取鹿衔草粗粉 1 g,加入一定量纤维素酶,加一定体积 pH 酶解溶液,酶解一定时间后,高温灭活 5 min,依次在一定条件下用 pH 2.0,7.5,8.3 的提取剂提取,冷却后过滤,合并滤液,减压浓缩得鹿衔草提取液,转移至 100 mL 量瓶中定容,即得。

2.3 单因素试验考察

2.3.1 加酶量 固定酶解时间 1.5 h,酶解温度 50 °C,酶解料液比 1:20,考察加酶量为 0.25,0.50,0.75,1.00,1.25 mg·g⁻¹ 对鹿衔草总黄酮提取工艺的影响,结果总黄酮提取率分别为 1.27%,1.30%,1.37%,1.45%,1.45%,故选用加酶量 1.00 mg·g⁻¹。

2.3.2 料液比 在加酶量 1.0 mg·g⁻¹,酶解时间 1.5 h,酶解温度 50 °C 的条件下,考察酶解料液比为 1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60,1:70 对鹿衔草总黄酮提取工艺的影响,结果总黄酮提取率分别为 1.11%,1.36%,1.61%,1.78%,2.11%,2.54%,2.54%,故选用料液比 1:60。

2.3.3 酶解时间 在加酶量 1.0 mg·g⁻¹,酶解料液比 1:60,酶解温度 50 °C 的条件下,考察酶解时间分别为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h 对鹿衔草总黄酮提取工艺的影响。结果总黄酮提取率分别为 2.61%,2.74%,2.60%,2.54%,2.62%,故选择酶解 1.0 h。

2.4 响应面分析^[7] 在单因素试验基础上,根据 Box-Benhnken 中心组合试验设计原理,选择加酶量、料液比、酶解时间,提取时间、提取温度为考察因素,建立五因素三水平的响应面分析,以总黄酮提取率为指标,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 鹿衔草中总黄酮的酶联半仿生法提取工艺
响应面分析因素水平

编码	X ₁ 加酶量 /mg·g ⁻¹	X ₂ 料液比	X ₃ 酶解时间 /h	X ₄ 提取时间 /h	X ₅ 提取温度 /°C
-1	0.75	50:1	0.5	1.0	75
0	1.00	60:1	1.0	1.5	80
1	1.25	70:1	1.5	2.0	85

表 2 鹿衔草中总黄酮的酶联半仿生法提取工艺
响应面分析安排

No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	Y 总黄酮 提取率/%
1	0.75	50	1.0	1.5	80	4.44
2	1.25	50	1.0	1.5	80	4.52
3	0.75	70	1.0	1.5	80	4.72
4	1.25	70	1.0	1.5	80	4.78
5	1.00	60	0.5	1.0	80	4.12
6	1.00	60	1.5	1.0	80	4.22
7	1.00	60	0.5	2.0	80	4.68
8	1.00	60	1.5	2.0	80	4.70
9	1.00	50	1.0	1.5	75	3.90
10	1.00	70	1.0	1.5	75	4.17
11	1.00	50	1.0	1.5	85	5.27
12	1.00	70	1.0	1.5	85	5.59
13	0.75	60	0.5	1.5	80	4.68
14	1.25	60	0.5	1.5	80	4.72
15	0.75	60	1.5	1.5	80	4.71
16	1.25	60	1.5	1.5	80	4.74
17	1.00	60	1.0	1.0	75	3.88

续表 2

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y 总黄酮 提取率/%
18	1.00	60	1.0	2.0	75	4.17
19	1.00	60	1.0	1.0	85	5.11
20	1.00	60	1.0	2.0	85	5.48
21	1.00	50	0.5	1.5	80	4.40
22	1.00	70	0.5	1.5	80	4.71
23	1.00	50	1.5	1.5	80	4.41
24	1.00	70	1.5	1.5	80	4.72
25	0.75	60	1.0	1.0	80	4.21
26	1.25	60	1.0	1.0	80	4.27
27	0.75	60	1.0	2.0	80	4.71
28	1.25	60	1.0	2.0	80	4.78
29	1.00	60	0.5	1.5	75	4.15
30	1.00	60	1.5	1.5	75	4.20
31	1.00	60	0.5	1.5	85	5.50
32	1.00	60	1.5	1.5	85	5.51
33	0.75	60	1.0	1.5	75	4.14
34	1.25	60	1.0	1.5	75	4.21
35	0.75	60	1.0	1.5	85	5.53
36	1.25	60	1.0	1.5	85	5.60
37	1.00	50	1.0	1.0	80	4.09
38	1.00	70	1.0	1.0	80	4.35
39	1.00	50	1.0	2.0	80	4.46
40	1.00	70	1.0	2.0	80	4.76
41	1.00	60	1.0	1.5	80	4.79
42	1.00	60	1.0	1.5	80	4.73
43	1.00	60	1.0	1.5	80	4.77
44	1.00	60	1.0	1.5	80	4.81
45	1.00	60	1.0	1.5	80	4.74
46	1.00	60	1.0	1.5	80	4.73

表 3 总黄酮提取率响应面 ANOVA 分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	9.378 8	20	0.468 9	209.245 1	<0.000 1
X_1	0.015 5	1	0.015 5	6.917 6	0.014 4
X_2	0.332 6	1	0.332 6	148.412 8	<0.000 1
X_3	0.004 3	1	0.004 3	1.903 9	0.179 9
X_4	0.760 9	1	0.760 9	339.502 5	<0.000 1
X_5	7.277 0	1	7.277 0	3247.075 4	<0.000 1
X_1X_2	0.000 1	1	0.000 1	0.033 1	0.857 0
X_1X_3	0.000 0	1	0.000 0	0.001 9	0.965 2
X_1X_4	0.000 0	1	0.000 0	0.003 3	0.954 3
X_1X_5	0.000 0	1	0.000 0	0.000 7	0.979 2
X_2X_3	0.000 0	1	0.000 0	0.001 0	0.974 7
X_2X_4	0.000 2	1	0.000 2	0.096 8	0.758 3
X_2X_5	0.000 5	1	0.000 5	0.221 9	0.641 7
X_3X_4	0.001 5	1	0.001 5	0.655 8	0.425 7
X_3X_5	0.000 4	1	0.000 4	0.162 2	0.690 5
X_4X_5	0.001 5	1	0.001 5	0.684 3	0.415 9
X_1^2	0.001 1	1	0.001 1	0.497 9	0.487 0
X_2^2	0.156 8	1	0.156 8	69.979 3	<0.000 1
X_3^2	0.030 4	1	0.030 4	13.577 0	0.001 1
X_4^2	0.503 9	1	0.503 9	224.836 7	<0.000 1
X_5^2	0.139 1	1	0.139 1	62.058 5	<0.000 1
残差	0.056 0	25	0.002 2		
失拟项	0.050 9	20	0.002 5	2.491 3	0.158 0
纯误差	0.005 1	5	0.001 0		
总和	9.434 8	45			

提取温度的二次项均为显著水平; F 值表明各因素对鹿衔草总黄酮提取率的影响次序为提取温度 > 提取时间 > 料液比 > 加酶量 > 酶解时间。所得二次多项模型具有高度的显著性, 因变量与自变量间的线性关系显著 ($R^2 = 0.994 1$), 失拟项不显著, 说明该模型拟合较好。响应面为响应值对两两交互因素所构成的三维空间曲线图, 曲面越陡峭, 表明该交互因素对试验结果影响越大, 见图 1~4。

2.5 验证试验 采用 Design-Expert 软件对方程求解, 得鹿衔草总黄酮的最佳提取工艺为加酶量 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 料液比 1:65.75, 酶解时间 0.99 h, 提取时间 1.75 h, 提取温度 $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 由方程预测的总黄酮理论提取率达 5.68%。结合实际操作考虑, 将各条件调整为加酶量 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 料液比 1:65, 酶解时间 1.0 h, 提取时间 1.75 h, 提取温度 $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 。按优选的提取工艺进行 5 次验证试验, 结果总黄酮平均提取

应用 Design Expert 软件进行多远回归拟合分析, 得总黄酮提取率与各因素变量的二次方程模型为 $Y = 4.76 + 0.031X_1 + 0.14X_2 + 0.016X_3 + 0.22X_4 + 0.67X_5 - 0.004X_1X_2 - 0.001044X_1X_3 + 0.001369X_1X_4 - 0.000624X_1X_5 + 0.000758X_2X_3 + 0.007365X_2X_4 + 0.011X_2X_5 - 0.019X_3X_4 - 0.009534X_3X_5 + 0.020X_4X_5 - 0.011X_1^2 - 0.13X_2^2 - 0.059X_3^2 - 0.24X_4^2 + 0.13X_5^2$, 该二次回归方程的方差分析见表 3。

由表 3 可知, 加酶量、酶解料液比、提取时间、提取温度的一次项, 酶解料液比、酶解时间、提取时间、

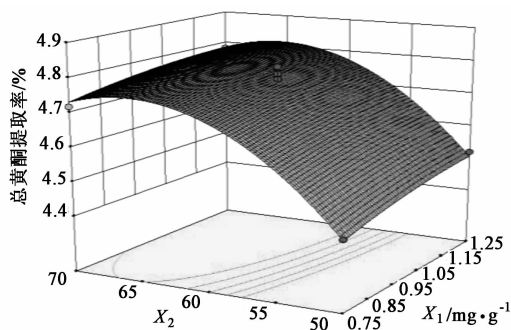


图 1 料液比和酶添加量对总黄酮提取率的影响

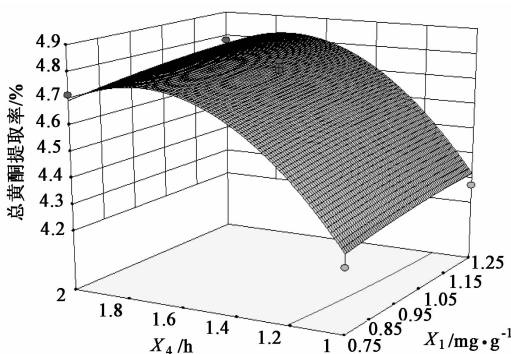


图 2 酶添加量和 SBE 提取时间对总黄酮提取率的影响

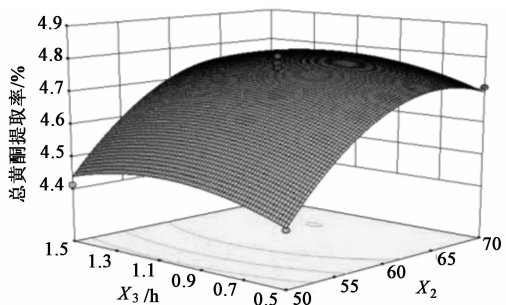


图 3 酶解时间和料液比对总黄酮提取率的影响

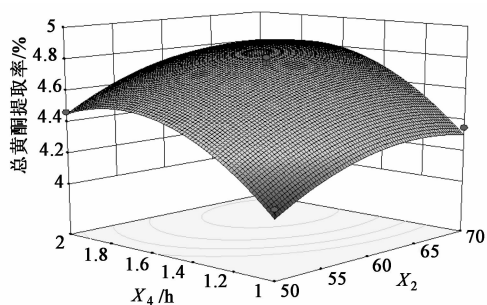


图 4 料液比和 SBE 提取时间对总黄酮提取率的影响

3 讨论

目前鹿衔草总黄酮的提取多采用醇提,但提取率不高,约 1.43%。本实验采用酶联半仿生法提取鹿衔草中总黄酮,总黄酮提取率达 5.54%,较醇提法提高了 2.87 倍,说明可采用响应面法优选鹿衔草总黄酮的提取工艺,为鹿衔草的资源开发提取实验依据。

[参考文献]

- [1] 蔡蕊,谢茵,金伟,等.鹿衔草中总黄酮的提取及含量测定[J].山西医科大学学报,2011,42(11):899.
- [2] 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.
- [3] 李东,杨松,宋宝安,等.鹿蹄草属植物的研究进展[J].贵州大学学报,2008,25(2):188.
- [4] 沈小钟,杨帆,于荣敏.响应面法优化黄芪提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(18):34.
- [5] 欧阳辉,余信,张永康.纤维素酶提取湘西椴柑皮中总黄酮的工艺优化研究[J].食品科学,2010,31(12):67.
- [6] 蓝峻峰,谢济运,玉澜.纤维素酶辅助提取叶下珠黄酮的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):26.
- [7] 蓝峻峰,谢济运.叶下珠总黄酮的半仿生提取工艺[J].中成药,2012,34(4):742.
- [8] 张瑞亭,张兆旺,孙秀梅.思维方式的转换与中药“半仿生提取法”[J].中国中药杂志,1997,22(9):542.
- [9] 黄仁福,吴周和,韩春城,等.响应面法优化红景天总黄酮提取工艺的研究[J].氨基酸和生物资源,2010,32(1):59.
- [10] 李佩艳,王锋,尹飞,等.响应面法优化酶法提取红薯叶总黄酮的工艺[J].食品工业科技,2012,33(1):275.
- [11] 张泽志,韩春亮,李成未.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].河南教育学院学报,2011,20(4):34.
- [12] 杨青林,李雷光,李志良.银杏叶黄酮类化合物提取方法的研究[J].化学工业与工程技术,2009,30(1):10.
- [13] 余小翠,刘高峰,王鑫.响应面法优化乌梅透骨口服液制备工艺的研究[J].中药材,2011,34(2):285.
- [14] 孙福东,孙秀梅,张兆旺,等.半仿生-酶法提取半夏白术天麻汤中天麻素的含量测定[J].中华中医药,2008,26(8):1823.

[责任编辑 全燕]

率 5.54%,与理论预测值相差不大,说明所建模型稳定可靠。