

响应面法优选刺槐花中刺槐苷提取工艺

初正云^{1*}, 郑永芹¹, 程军²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 大连辉瑞制药有限公司, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 优化刺槐花中刺槐苷的提取工艺。方法: 根据 Box-Behnken 中心组合设计原理, 采用响应面分析法优化乙醇体积分数、液料比、浸提时间及提取次数 4 个自变量对刺槐苷得率的影响, 利用 SAS 9.2 软件对试验数据进行回归分析。结果: 最佳提取工艺为加 23 倍量 76% 乙醇浸提 2 次, 每次 60 min。刺槐苷平均得率达 1.834%, 转移率 86.88%。结论: 优选的工艺条件稳定可行, 为刺槐花中刺槐苷的提取提供实验依据。

[关键词] 响应面法; 刺槐花; 刺槐苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0024-04

[doi] 10.11653/syfy2013100024

Optimization of Extraction Technology for Robinin from Flowers of *Robinia pseudoacacia* by Response Surface Method

CHU Zheng-yun^{1*}, ZHENG Yong-qin¹, CHENG Jun²

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Pfizer Pharmaceutical, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of robinin from flowers of *Robinia pseudoacacia*. **Method:** According to the design principle of Box-Behnken, effects of ethanol volume fraction, liquid-material ratio, extraction time and extraction times on extraction rate of robinin were studied by response surface method, meanwhile regression analysis of these experimental data was used by SAS 9.2 software. **Result:** Optimum extraction conditions were obtained as follows: extracted 2 times with 23 times the amount of 76% ethanol, 60 min per time. Under these conditions, the average extraction rate of robinin could be up to 1.834% with the transfer

[收稿日期] 20121213(026)

[基金项目] 辽宁省科技攻关项目(2009209001)

[通讯作者] * 初正云, 教授, 从事中药资源与新药开发研究, Tel: 0411-87586003, E-mail: chuzhengyun@163.com

- [2] Wu J, Nantz M H, Zern M A. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications[J]. Front Biosci, 2002, 7: 717.
- [3] Wang S N, Deng Y H, Xu H, et al. Synthesis of a novel galactosylated lipid and its application to the hepatocyte-selective targeting of liposomal doxorubicin [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 62(1): 32.
- [4] 程怡, 吴卫, 张冬青, 等. 非水相酶促催化合成去唾液酸糖蛋白配体修饰物 [J]. 药学学报, 2010, 45(9): 1134.
- [5] Yoshimoto K, Itatani Y, Tsuda Y. ¹³C-Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of O-acylglucoses. Additivity of shift parameters and its application to structure elucidation [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 28(7): 2065.
- [6] Pleiss J, Fischer M, Schmid R D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site [J]. Chem Phys Lipids, 1998, 93(1/2): 67.
- [7] Watanabe K, Koshiha T, Yasufuku Y, et al. Effects of substituent and temperature on enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of 2-(4-substituted phenoxy) propionic acids in organic solvents [J]. Bioorg Chem, 2001, 29(2): 65.
- [8] 陈志鹏, 肖璐, 李伟东, 等. 活体成像系统检测甘草次酸修饰脂质体在小鼠体内的分布 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 148.

[责任编辑 全燕]

rate of 86.88%. **Conclusion:** These optimized conditions could provide experimental evidence for extracting of robinin from flowers of *R. pseudoacacia*.

[**Key words**] response surface method; *Robinia pseudoacacia*; robinin

刺槐花又名洋槐、江南槐、胡滕^[1],其花期虽短但花量较大,且资源极为丰富,目前除极少量被当作蔬菜食用外,大部分落地废弃^[2-3]。其主要化学成分为黄酮类化合物,具有光谱活性和低毒性,如山奈酚、山奈酚-7-鼠李糖苷、刺槐苷、山奈酚-3,7-二鼠李糖苷、刺槐素均具有明显的抗炎作用,且后三者的活性均超过芦丁,同时由刺槐花制成的复方制剂还具有强利尿作用^[4]。

响应面分析法(RSM)是由 Box 等人于 20 世纪 50 年代提出的一种优化工艺条件的有效方法^[5],采用多元二次回归的形式,将试验中因子指标的相互关系用多项式近拟合,通过对函数响应面和等高线的分析,精确地研究各因子与相应值之间的关系^[6]。为充分利用刺槐花资源,本实验运用响应面法对刺槐花中刺槐苷的提取条件进行优化,为其活性及临床应用研究提供实验依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent), CP225D 型 1/10 万电子天平(德国 sartorius 公司)。

刺槐花采自于辽宁大连市,经辽宁中医药大学初正云教授鉴定为豆科植物刺槐 *Robinia pseudoacacia* L. 的干燥花(刺槐苷含量 2.11%)。刺槐苷对照品(自制,纯度 >98%),甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均是分析纯。

2 方法与结果

2.1 刺槐苷粗提液的制备 取干燥的刺槐花,精密称取 10 g,置于圆底烧瓶中,加乙醇适量,于热水浴中回流浸提数次,冷却后过滤,合并上清液,减压浓缩,即得。

2.2 刺槐苷含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适应性试验 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.3% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 20% ~ 32% A; 5 ~ 25 min, 32% ~ 45% A; 25 ~ 30 min, 45% ~ 68% A; 30 ~ 40 min, 68% ~ 80% A),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,检测波长 348 nm,进样量 10 μL。理论板数以刺槐苷色谱峰计算不低于 2 500。

2.2.2 标准曲线的制作 精密称定刺槐苷对照品 1.55 mg,置 50 mL 量瓶中,加 70% 甲醇水溶液溶解

并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。分别精密吸取刺槐苷对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 μL 注入液相色谱仪,测定,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得标准曲线 $Y = 14\ 935X + 13.075$ ($R^2 = 1$),表明刺槐苷进样量在 0.062 ~ 0.496 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.2.3 样品测定 取一定体积的刺槐苷粗提液,挥干溶剂,用 70% 甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,即得供试品溶液。按 2.2.1 项下方法测定峰面积,计算刺槐苷质量浓度,并按下式计算刺槐苷得率及转移率。

得率 = 提取液中刺槐苷质量/刺槐花质量 × 100% ;

转移率 = 得率/刺槐花中刺槐苷质量分数 × 100%

2.3 单因素试验考察

2.3.1 乙醇体积分数 固定料液比 1:20,提取时间 60 min,提取 2 次,考察不同体积分数(40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%)乙醇对刺槐苷得率的影响。结果分别为 1.156%, 1.214%, 1.534%, 1.758%, 1.592%, 1.349%, 故选择 70% 乙醇。

2.3.2 料液比 固定乙醇体积分数 70%,提取时间 60 min,提取 2 次,考察不同料液比(1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30)对刺槐苷得率的影响,结果分别为 1.030%, 1.531%, 1.744%, 1.761%, 1.783%, 因此选择料液比 1:20。

2.3.3 浸提时间 固定料液比 1:20,乙醇体积分数 70%,提取 2 次,考察不同浸提时间(40, 60, 80, 100, 120 min)对刺槐苷得率的影响,结果分别为 1.388%, 1.656%, 1.672%, 1.683%, 1.584%, 故选择提取时间 60 min。

2.3.4 提取次数 固定料液比 1:20,乙醇体积分数 70%,提取时间 60 min 时,考察不同提取次数(1, 2, 3, 4, 5 次)对刺槐苷得率的影响,结果分别为 1.507%, 1.814%, 1.820%, 1.834%, 1.853%, 故选择提取 2 次。

2.4 提取工艺优选 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,选取乙醇体积分数、料液比、浸提时间和提取次数为考察因素,每个因素设 3 个水平,分别以 1, 0, -1 进行编码,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

对表 2 中数据进行多元回归拟合,得回归方程

表 1 刺槐花中刺槐苷的提取工艺 Box-Behnken 试验因素水平

水平	X_1 乙醇 体积分数/%	X_2 料液比	X_3 提取 时间/min	X_4 提取 数/次
-1	60	15:1	40	1
0	70	20:1	60	2
1	80	25:1	80	3

表 2 刺槐花中刺槐苷的提取工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	X_1	X_2	X_3	X_4	刺槐苷得率(Y)/%
1	-1	-1	0	0	1.613
2	-1	1	0	0	1.685
3	1	-1	0	0	1.639
4	1	1	0	0	1.767
5	0	0	-1	-1	1.578
6	0	0	-1	1	1.707
7	0	0	1	-1	1.583
8	0	0	1	1	1.783
9	-1	0	0	-1	1.520
10	-1	0	0	1	1.523
11	1	0	0	-1	1.548
12	1	0	0	1	1.843
13	0	-1	-1	0	1.532
14	0	-1	1	0	1.691
15	0	1	-1	0	1.687
16	0	1	1	0	1.791
17	-1	0	-1	0	1.564
18	-1	0	1	0	1.687
19	1	0	-1	0	1.798
20	1	0	1	0	1.668
21	0	-1	0	-1	1.516
22	0	-1	0	1	1.696
23	0	1	0	-1	1.553
24	0	1	0	1	1.78
25	0	0	0	0	1.795
26	0	0	0	0	1.834
27	0	0	0	0	1.851

$Y = 1.827 + 0.056X_1 + 0.048X_2 + 0.028X_3 + 0.086X_4 - 0.088X_1^2 + 0.014X_1X_2 - 0.063X_1X_3 + 0.073X_1X_4 - 0.076X_2^2 - 0.014X_2X_3 + 0.011X_2X_4 - 0.061X_3^2 + 0.018X_3X_4 - 0.116X_4^2 (R^2 = 0.921)$, 说明方程可靠性高; Y 的变异系数 2.74%, 表明试验操作可信。对回归方程进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 各因素的一次项均达到显著水平,

表 3 回归方程的方差分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
X_1	1	3.752 008	3.752 008	17.826 44	0.001 2 ²⁾
X_2	1	2.745 633	2.745 633	13.044 98	0.003 6 ²⁾
X_3	1	0.946 408	0.946 408	4.496 55	0.055 5
X_4	1	8.875 2	8.875 2	42.16 762	<0.000 1 ³⁾
X_1^2	1	4.102 801	4.102 801	19.493 12	0.000 8
X_1X_2	1	0.078 4	0.078 4	0.372 492	0.553 0
X_1X_3	1	1.600 225	1.60 0225	7.602 947	0.017 4 ¹⁾
X_1X_4	1	2.131 6	2.131 6	10.127 6	0.007 9 ²⁾
X_2^2	1	3.087 293	3.087 293	14.668 26	0.002 4
X_2X_3	1	0.075 625	0.075 625	0.359 308	0.560 0
X_2X_4	1	0.050 625	0.050 625	0.240 528	0.632 7
X_3^2	1	1.981823	1.981 823	9.415 986	0.009 7
X_3X_4	1	0.126 025	0.126 025	0.598767	0.454 0
X_4^2	1	7.186 848	7.186 848	34.145 96	<0.000 1
模型	14	29.430 92	2.102 208	9.987 957	0.000 1 ³⁾
一次项	4	16.319 25	4.079 813	19.383 9	<0.000 1 ³⁾
二次项	4	9.049 166	2.262 291	10.748 54	0.000 6 ²⁾
交互项	6	4.062 5	0.677 083	3.216 941	0.040 3 ¹⁾
误差	12	2.525 692	0.210 474		
失拟项	10	2.360 825	0.236 083	2.863 92	0.286 5
纯误差	2	0.164 867	0.082 433		
总离差	26	31.956 61			

注: ¹⁾ 差异显著 $P < 0.05$, ²⁾ 差异高度显著 $P < 0.01$, ³⁾ 差异极显著 $P < 0.001$ 。

乙醇体积分数和浸提时间及提取次数的交互项也达到显著水平。各因素对刺槐苷得率的影响顺序为 $X_4 > X_1 > X_2 > X_1X_4 > X_1X_3$ 。为更直观表现其中 2 个因素同时对刺槐苷得率的影响, 拟进行降维分析, 绘制相应的响应面图和等高线图(图 1~2)。结果表明乙醇体积分数和浸提时间及提取次数对刺槐苷得率的影响较为明显, 与方差分析结果一致。

2.5 验证试验 根据回归模型的数学分析可知, 刺槐苷的最佳提取工艺为乙醇体积分数 76.11%, 料液比 22.09:1, 浸提时间 59.01 min, 提取数 2.58 次, 刺槐苷的理论得率 1.878%。结合实际操作条件考虑, 将最佳提取工艺修正为乙醇体积分数 76%, 料液比 23:1, 浸提时间 60 min, 提取数 2 次; 按此条件进行 3 次验证试验, 结果刺槐苷的平均得率 1.834%, 与理论预测值偏差 <1%, 说明该模型稳定可行。

3 讨论

在中药提取过程中, 常常受到诸多因素的影响, 如提取方法、影响因素, 所以对试验设计要求较高。响应面法在中药有效成分提取中的应用越来越受到重视, 其具有试验次数少、精确度高的优点, 即减少

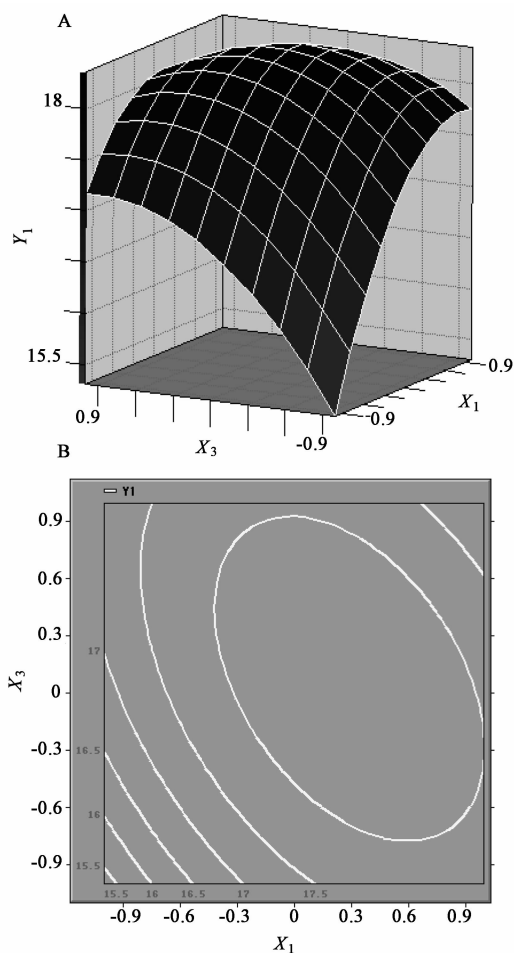


图1 乙醇体积分数和浸提时间对刺槐苷得率影响的响应面(A)及等高线(B)

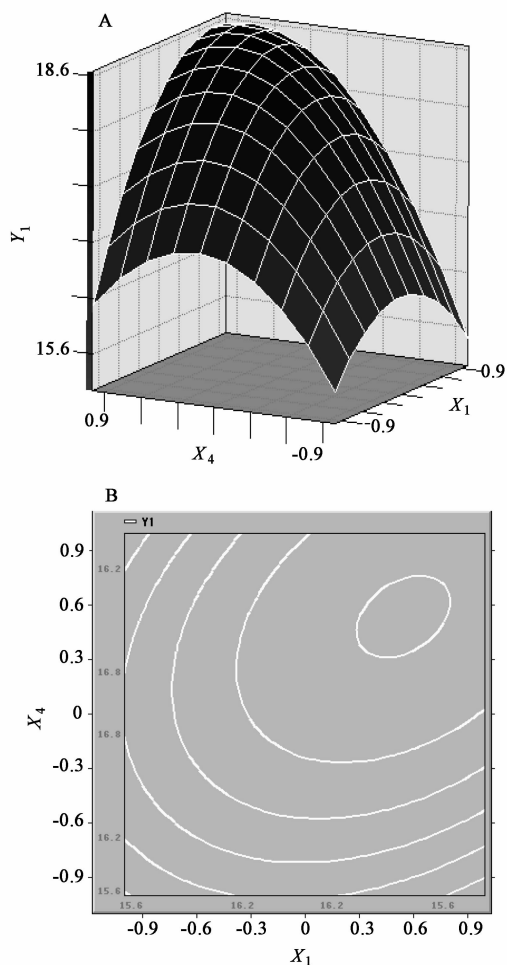


图2 乙醇体积分数和提取次数对刺槐苷得率影响的响应(A)及等高线(B)

了工作量,又节省了人力资源、物质资源,且在一定程度上缩短了试验周期^[7-9]。本试验采用响应面法,以刺槐苷得率为因变量,对最佳工艺进行验证试验,得到了理想的提取条件,为充分利用刺槐花资源及其临床应用研究提供实验依据。

[参考文献]

[1] 谢宗万,余友琴. 全国中草药名鉴[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:485.
 [2] 宋永芳. 刺槐资源的开发利用[J]. 林业科技开发, 2002,16(5):11.
 [3] 王林,章敏,胡秋辉. 刺槐花营养成分及其开发利用[J]. 食品科学,2006,27(2):274.
 [4] ПогодинаЛИ,袁以苇. 刺槐属植物的生物活性物质及

其药理作用[J]. 国外医学. 药学分册,1981,8(6):332.

[5] 曹新志,金征宇. 响应面法在环糊精糖基转移酶反应中应用[J]. 郑州工程学院学报,2004,25(1):58.
 [6] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中应用[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(3):91.
 [7] 徐伟,凌伟坚,褚克丹,等. 响应面法优化车前子油的提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 中国中药杂志, 2011,36(3):3253.
 [8] 彭晓霞,路莎莎. 响应面优化法在中药研究中的应用和发展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):296.
 [9] 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.

[责任编辑 仝燕]