

响应面分析法优化藤茶中二氢杨梅素的提取工艺

谢郁峰*,陈卓瀚,吕华冲
(广东药学院药科学院药物化学系,广州 510006)

[摘要] 目的:优选藤茶中二氢杨梅素的提取工艺。方法:以二氢杨梅素提取率为考察指标,在单因素试验基础上,选取乙醇体积分数、料液比、提取时间为自变量,二氢杨梅素提取率为响应值,采用三因素三水平的响应面分析法优选二氢杨梅素的提取工艺条件。结果:最佳提取工艺条件为 17 倍量 81% 乙醇回流提取 95 min。在此条件下,二氢杨梅素提取率可达 9.58%,与理论值 9.72% 仅相差 0.14%。结论:采用响应面法优选的二氢杨梅素提取工艺是可行的。
[关键词] 响应面; 藤茶; 二氢杨梅素; 提取工艺
[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)17-0046-04

Optimization of Extraction Technology for Dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* by Response Surface Analysis Methodology

XIE Yu-feng*, CHEN Zhuo-han, LV Hua-chong
(Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To optimize extraction process of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* by response surface methodology. Method: With extraction ratio of dihydromyricetin as index, based on single factor test, the concentration of ethanol, liquid-solid ratio and extraction time were selected as independent variables and extraction rate of dihydromyricetin as response value, response surface methodology with three-factors and three-levels was carried out for optimizing extraction process of dihydromyricetin from *A. grossedentata*. Result: Optimum extraction conditions of dihydromyricetin were as followed: refluxing extracted 95 min with 17 times the amount of 81% ethanol. Under these conditions, extraction ratio of dihydromyricetin was 9.58%, relative error in comparison with the predicted one was 0.14%. Conclusion: This optimized technology was

[收稿日期] 20120424(003)
[通讯作者] * 谢郁峰,本科,讲师,从事天然药物研究,Tel: 020-39352140,E-mail: phytochemistry@163.com

表水溶性和挥发油成分,能比较全面的对提取工艺进行评价^[4]。
预试验 TLC^[5]证明,药材水提液中均不含桂皮醛成分,油水混合物中均含桂皮醛成分。故用样品的油水混合物来测定桂皮醛含量。桂皮醛为芳香性易挥发成分,提取后应及时测定成分,不过本试验样品较多,故经较长时间才测定含量,在等待期间,样品用磨口瓶存放,在冰箱冷藏,且各样品等待时间基本相同,可作为相对含量测定进行比较。

[参考文献]

[1] 刘亚男,樊金伟. 巴布剂的研究现状及发展前景[J].

黑龙江医药,2010,25(3):89.
[2] 林佳,徐丽珍,刘江云,等. 桂枝中桂皮醛,肉桂酸的含量与分布研究[J]. 中国药 学 杂 志, 2005, 40 (23):1784.
[3] 刘光斌,毛和平,姜芳宁,等. HPLC 法测定和胃散中桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):67.
[4] 高鹏飞,尹爱武. 肉桂油巴布剂的研制及体外经皮渗透性实验[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):25.
[5] 何姣,张雅惠,孙文基. 肉桂、桂枝薄层鉴别方法之改进初探[J]. 中国药品标准,2008,9(1):35.

[责任编辑 全燕]

reliable, it showed that was feasible for optimizing extraction technology of dihydromyricetin by response surface methodology.

[Key words] response surface; *Ampelopsis grossedentata*; dihydromyricetin; extraction technology

藤茶主要分布于广东、云南、贵州等省区^[1],其味甘、淡,性凉,具有清热解毒、消炎、镇痛之功效,主治感冒风热、黄疸型肝炎、咽喉肿痛等^[2]。其主要有效成分是黄酮类化合物,其中以二氢杨梅素(DMY)含量最高^[3]。现代药理研究表明,二氢杨梅素具有保肝、抗菌、抗肿瘤、降血糖、降血脂等作用^[4-5]。本研究以醇提法提取藤茶中的二氢杨梅素,在单因素考察的基础上,利用响应面分析法对各主要提取工艺条件进行优化,为二氢杨梅素的深入开发及应用提供试验依据。

1 材料

岛津 LC-10ATVP 型高效液相色谱系统(日本岛津仪器有限公司),Phenomenex 00G-4252-E0 型 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),AUW220D 型电子天平(日本岛津仪器有限公司),FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),LABOROTA4000 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph)。

藤茶购自广东连州,经本校中药鉴定教研室刘基柱副教授鉴定为葡萄科植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang 的茎叶。二氢杨梅素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUSG-10122901,纯度 ≥ 98%),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 二氢杨梅素含量测定

2.1.1 色谱条件^[6] Phenomenex 00G-4252-E0 型 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-磷酸(27:73:0.1),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,柱温 25 ℃,检测波长 290 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取二氢杨梅素对照品 10.0 mg,加甲醇溶解,定容至 10 mL。精密吸取 1 mL 溶液,加甲醇定容至 10 mL,配成 0.100 g·L⁻¹ 的对照品溶液,精密吸取 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.1.3 线性关系考察 分别精密吸取上述系列对照品溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程为 $Y = 5.70 \times 10^7 X + 3.49 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 1$),二氢杨梅素在 0.020 ~ 0.100 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.4 样品的提取与测定 分别称取粉碎后并过 20 目筛的干燥藤茶粉末 5 g,按中心组合试验设计原理设计试验方案,用乙醇进行提取,回收醇提液至无醇味,用水进行重结晶,得浅黄色针晶。精密称取该结晶 20.0 mg,加甲醇溶解,定容至 100 mL,过 0.45 μm 滤膜,即得供试品溶液。按 2.1.1 项下测定方法测定峰面积,计算二氢杨梅素的提取率。

二氢杨梅素提取率 =

$$\frac{\text{干燥提取物质量} \times \text{二氢杨梅素纯度}}{\text{藤茶粉末质量}} \times 100\%$$

2.2 单因素试验考察

2.2.1 乙醇体积分数考察 准确称取藤茶粉末 5 份,每份 5 g,固定液料比 20 mL·g⁻¹,提取时间 60 min,提取 1 次,分别选取体积分数 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇溶液,按 2.1.4 项下方法进行试验,二氢杨梅素提取率分别 5.39%, 6.12%, 6.92%, 6.49%, 5.71%。结果表明提取率先随乙醇体积分数的增加而升高,80% 乙醇时最高,之后提取率开始下降。

2.2.2 液料比考察 准确称取藤茶粉末 5 份,每份 5 g,固定乙醇体积分数 80%,提取时间 60 min,提取 1 次,分别加入 5, 10, 15, 20, 25 倍量乙醇,按 2.1.4 项下方法进行试验,二氢杨梅素提取率分别为 4.43%, 6.14%, 6.84%, 6.22%, 5.83%。结果表明当液料比 15 mL·g⁻¹ 时,二氢杨梅素的提取率最高。

2.2.3 提取时间考察 准确称取藤茶粉末 5 份,每份 5 g,固定乙醇体积分数 80%,液料比 15 mL·g⁻¹,提取 1 次,提取时间分别为 30, 60, 90, 120, 150 min,按 2.1.4 项下方法进行试验,二氢杨梅素提取率分别为 5.83%, 6.92%, 8.12%, 7.42%, 7.12%。结果表明当提取时间为 90 min 时,二氢杨梅素的提取率最高。

2.2.4 提取次数选择 精密称取藤茶粉末 5 份,每份 5 g,固定乙醇体积分数 80%,液料比 15 mL·g⁻¹,提取 90 min,分别提取 1, 2, 3, 4, 5 次,按 2.1.4 项下方法进行试验,二氢杨梅素提取率分别为 6.03%, 7.88%, 7.94%, 7.89%, 7.86%。结果表明当提取次数 > 2 次时,二氢杨梅素的提取率趋于平稳,几乎不再增加。故本工艺确定最佳提取次数为 2 次,不再进行优化。

2.3 响应面优化试验

2.3.1 试验设计 根据中心组合设计原理,综合单因素考察结果,选取乙醇体积分数、液料比、提取时间三因素为自变量,二氢杨梅素提取率为响应值,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,并根据单因素试验结果确定零水平和波动区,因素水平见表 1。

表 1 藤茶中二氢杨梅素提取工艺优选响应面分析法因素水平

水平	X_1 乙醇体积 分数/%	X_2 液料比 /mL·g ⁻¹	X_3 提取时间 /min
-1	70	10	60
0	80	15	90
1	90	20	120

对乙醇体积分数、提取时间、液料比作如下变换 $X_1 = (n - 80)/10$, $X_2 = (z - 15)/5$, $X_3 = (t - 90)/30$, 以 3 次试验所得二氢杨梅素提取率的平均值为响应值(Y),试验设计与结果见表 2,方差分析见表 3。

将表 2 中数据用软件 Design-Expert Version 8.0.5 进行多元回归分析,由于各因素对响应值的影响并不是简单的线性关系,故试验因素对响应值影响的回归方程为 $Y = 9.35 + 0.25X_1 + 0.045X_2 + 0.11X_3 - 0.097X_1X_2 + 0.17X_1X_3 + 0.062X_2X_3 - 0.25X_1^2 - 0.27X_2^2 - 0.43X_3^2$ 。

回归方程中各因素对指标(响应值)影响的显著性,可通过 F 检验来判定,即 P 越小,相应因素的显著程度越高。由表 3 结果可知,各因素中一次项乙醇体积分数 X_1 对二氢杨梅素提取率影响高度显著,而二次项中 X_1^2, X_2^2, X_3^2 对二氢杨梅素提取率影响高度显著,回归方程也是高度显著,相关系数 $R^2 = 2.275/2.363 = 0.9628$,即说明响应值(二氢杨梅素提取率)的变化有 96.28% 是来源于所选的因素,即乙醇体积分数、提取时间和液料比。相关系数 R^2 同时说明模型的拟合度较好。此外,本试验的回归方程失拟项检测 $P = 0.1503 > 0.05$,说明影响不显著;回归方程显著性检测 $P = 0.0003 < 0.01$,说明影响高度显著。综上所述,应用响应曲面法优化藤茶中二氢杨梅素的提取工艺是可行的,故可利用回归方程确定最佳提取工艺条件。

2.3.2 响应曲面分析 提取过程中,各因素对二氢杨梅素提取率影响的二维等高线和三维响应曲面见图 1~3。

由图 1 可知,随液料比增大,二氢杨梅素提取率增加后减小;在提取时间确定的情况下,二氢杨梅素

表 2 藤茶中二氢杨梅素提取工艺优选响应面分析法安排

No.	X_1	X_2	X_3	$Y/\%$
1	1	0	-1	8.57
2	-1	-1	0	8.32
3	-1	0	1	8.44
4	-1	1	0	8.69
5	0	0	0	9.22
6	0	1	-1	8.47
7	0	1	1	8.84
8	0	0	0	9.42
9	1	-1	0	9.16
10	0	0	0	9.41
11	0	0	0	9.38
12	0	-1	1	8.71
13	0	-1	-1	8.59
14	0	0	0	9.34
15	1	1	0	9.14
16	1	0	1	9.11
17	-1	0	-1	8.56

表 3 二氢杨梅素提取率方差分析

方差来源	f	SS	MS	F	P
X_1	1	0.485	0.485	38.635	0.0004
X_2	1	0.016	0.016	1.290	0.2934
X_3	1	0.104	0.103513	8.244	0.0240
X_1X_2	1	0.038	0.038	3.029	0.1254
X_1X_3	1	0.109	0.109	8.673	0.0216
X_2X_3	1	0.016	0.016	1.244	0.3015
X_1^2	1	0.273	0.273	21.719	0.0023
X_2^2	1	0.312	0.312	24.809	0.0016
X_3^2	1	0.777	0.777	61.858	0.0001
模型	9	2.275	0.253	20.134	0.0003
残差	7	0.088	0.013		
失拟项	3	0.062	0.021	3.119	0.1503
总离差	16	2.363			

注: $P < 0.05$ 表示影响显著; $P < 0.01$ 表示影响高度显著。

在乙醇体积分数 82% 左右,液料比 16 mL·g⁻¹左右的区域内提取率较高。由图 2 可知,提取时间的影响相对于乙醇体积分数更为显著。随乙醇体积分数增大,二氢杨梅素提取率增加;随着提取时间增加,二氢杨梅素提取率是先增后减,提取时间增长,二氢杨梅素提取率反而降低,可能由于提取时间过长,对二氢杨梅素的结构有所破坏。当液料比确定时,提

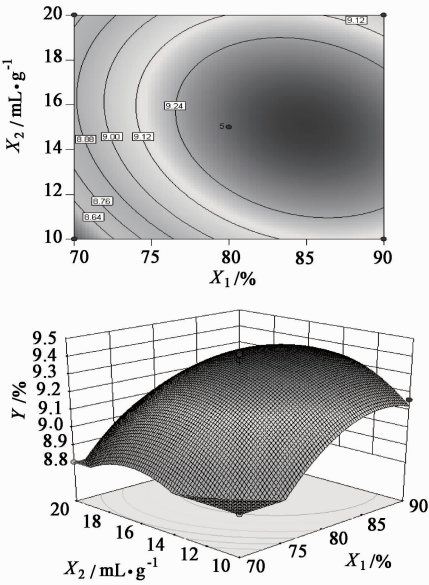


图1 液料比和乙醇体积分数对二氢杨梅素提取率的影响

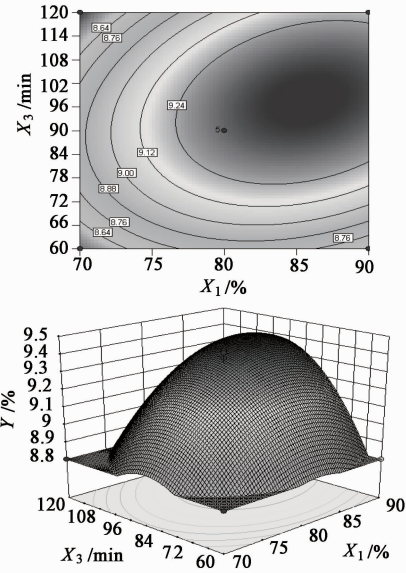


图2 提取时间和乙醇体积分数对二氢杨梅素提取率的影响

取时间 90 min 左右和乙醇体积分数 80% 左右的区域内二氢杨梅素较高。由图 3 可知,当液料比为 15 mL·g⁻¹ 左右,提取时间为 90 min 附近时,二氢杨梅素提取率达到最高。

2.3.3 提取工艺条件优化 为确定二氢杨梅素的最佳提取工艺条件。对回归方程取一阶偏导数且令其 $Y=0$,通过解方程得到 3 个因素最佳水平值分别为 $X_1=0.044$, $X_2=0.3105$, $X_3=0.1172$,通过变换公式的转换可得提取工艺的最佳条件为乙醇体积分数 80.5%,液料比 16.5 mL·g⁻¹,提取时间 93.6 min,为方便工业的生产,将 3 个因素调整为乙醇体积分数 81%,液料比 17 mL·g⁻¹,提取时间 95 min,

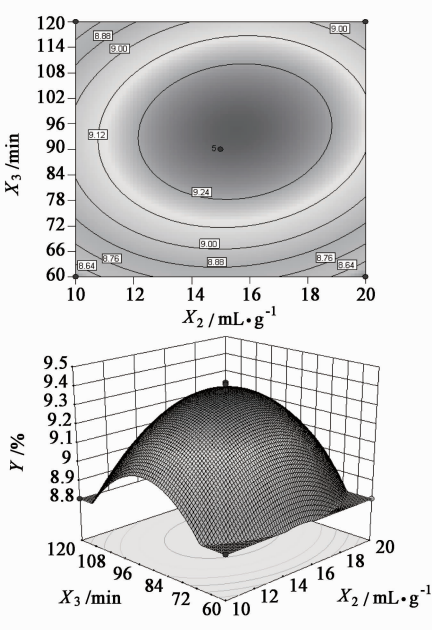


图3 提取时间和液料比对二氢杨梅素提取率的影响

在此修正条件下,二氢杨梅素的理论提取率 9.72%。根据修正的试验条件重复试验 3 次,得二氢杨梅素实际平均提取率 9.58%,即比理论提取率少 0.14%,说明方程可较好的预测二氢杨梅素的理论提取率。

3 讨论

本研究通过单因素实验和 3 因素 3 水平响应面法试验,建立了二氢杨梅素提取率与各影响因素之间的二次多项式模型,通过该模型不仅可以预测二氢杨梅素理论提取率,还能确定二氢杨梅素的最佳提取工艺参数,在优选的工艺条件下二氢杨梅素提取率较高,其实际提取率可达到 9.58%。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴补编. 第 2 册[M]. 北京:科学出版社,1983:355.

[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:789.

[3] 李瑛琦,于治国,陆文超. HPLC 法测定藤茶中双氢杨梅黄素和杨梅黄素的含量[J]. 中草药, 2003, 34 (12):1098.

[4] 阎莉,卫智权,郑作文,等. 广西藤茶双氢杨梅树皮素对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(16):102.

[5] 李翠苹,曹树稳,余燕影. 二氢杨梅素的研究进展[J]. 化学试剂,2010,32(7):608.

[6] 何桂霞,裴刚,杨伟丽,等. HPLC 测定藤茶不同采收季节时期及不同部位的二氢杨梅素含量[J]. 中成药, 2004,26(3):210.

[责任编辑 全燕]