

响应面法优化仙鹤草总黄酮的超声提取工艺

蒋志华¹, 俞力超¹, 冯子旺², 李峰¹, 徐秀泉^{3*}

(1. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212001; 2. 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212013;
3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] 目的: 优化仙鹤草总黄酮的最佳超声提取工艺。方法: 以总黄酮得率为指标, 采用响应面设计方法对影响总黄酮得率的乙醇体积分数、超声温度及料液比进行优化。结果: 各因素对总黄酮提取率的影响大小依次为料液比-超声温度-乙醇体积分数。最佳工艺条件为 72% 乙醇, 料液比 1:25, 60 °C 下超声提取 20 min。在此最佳条件下, 总黄酮得率为 9.02 mg·g⁻¹, 试验结果与模型预测值相符。结论: 利用超声提取仙鹤草总黄酮工艺稳定可靠。

[关键词] 仙鹤草; 总黄酮; 超声提取; 响应面设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0017-04

Optimization of Ultrasound Extraction Process of Total Flavonoids from *Agrimonia pilosa* by Response Surface Methodology

JIANG Zhi-hua¹, YU Li-chao¹, FENG Zi-wang², LI Feng¹, XU Xiu-quan^{3*}

(1. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; 2. School of Clinical Medical, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize optimum ultrasound extraction process of total flavonoids from *Agrimonia pilosa*. **Method:** With yield of total flavonoids as index, ethanol concentration, ultrasound temperature and material-liquid ratio were optimized by response surface methodology (RSM). **Result:** Effect factors on extraction rate of total flavonoids with the order of follows: material-liquid ratio, ultrasound temperature, ethanol concentration. The optimal extraction conditions were ethanol concentration was 72%, material-liquid ratio of 1:25, extraction temperature was 60 °C, extraction time was 20 min. Under these conditions, yield of total flavonoids reached 9.02 mg·g⁻¹, which was agreed with model prediction. **Conclusion:** This extraction process of total flavonoids from *A. pilosa* by ultrasound-assisted was stable and reliable.

[Key words] *Agrimonia pilosa*; total flavonoids; ultrasound extraction; response surface methodology

仙鹤草为蔷薇科龙芽草属植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的全草, 在我国具有悠久的药用历史, 主要用于治疗衄血、咯血、尿血、便血、崩漏等各种出血证^[1]。其主要化学成分为鞣质、间苯

三酚衍生物、异香豆素、黄酮、三萜及其苷类、有机酸等^[2]。其中黄酮类成分芦丁、槲皮素、山奈酚等具有显著的抑制乙酰胆碱酯酶、抗炎活性^[3-4], 因此研究仙鹤草黄酮化合物的提取工艺对仙鹤草的深入开发利用具有重要的意义。响应面分析法采用多元二次回归的方法, 将多因子实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, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系, 响应面分析法能够以最经济的方式对所选实验参数进行全面的分析和研究, 已越来越多地应用于各种生物化工处理过程的优化^[5-6]。本文采用响应面设

[收稿日期] 20110615(003)

[基金项目] 镇江市社会发展项目(SH2010033)

[第一作者] 蒋志华, 副主任医师, 从事心胸外科食管肿瘤的预防与治疗研究, Tel: 0511-85082201

[通讯作者] * 徐秀泉, 讲师, 从事天然产物提取分离及活性研究, Tel: 0511-85038403, E-mail: xxq781026@uj.edu.cn

计方法优化仙鹤草总黄酮超声提取工艺参数,为大批量生产提供理论依据。

1 仪器与试剂

UV-2550 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DHG-9145 型鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司),BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

仙鹤草购自江苏镇江九泰医药有限公司,经江苏大学药学院沈绛英副主任药师鉴定为蔷薇科植物仙鹤草 *A. pilosa* Ledeb. 的全草,粉碎过 16 目筛备用。芦丁对照品(中国生物制品检定所,批号 100080-200306),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准曲线的绘制 精密称取 105 °C 干燥至恒重的芦丁对照品 10.9 mg,加 70% 的乙醇溶解,定容至 50 mL 得 254 mg·L⁻¹ 芦丁对照品溶液,量取该对照品溶液 0,1,2,3,4,5,6 mL 置于 25 mL 量瓶,分别加入 5% NaNO₂ 1 mL,10% AlNO₃ 1 mL,4% NaOH 10 mL,每次滴加间隔 5 min,最后用 70% 乙醇定容至 25 mL,于 510 nm 波长处测定吸光度,以样品质量浓度对吸光度进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.0107X - 0.008$ ($R^2 = 0.9991$)。结果表明,在芦丁在 8.72 ~ 52.32 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好线性关系。

2.2 仙鹤草总黄酮的提取及含量测定 准确称取 1.0 g 仙鹤草粉末,加入不同体积分数的乙醇 20 mL,在一定温度下超声提取规定时间,4 000 rpm 离心 5 min 后按照标准曲线项下测定样品吸光度,计算总黄酮得率。

根据中心组合设计原理,结合响应面分析方法,综合单因素预试验结果,以超声提取温度、料液比、乙醇体积分数 3 个因素为自变量,总黄酮的提取得率为响应值,设计 3 因素 3 水平共 17 个试验点的响应面分析试验。对提取温度、料液比、乙醇体积分数作如下变化: $X_1 = (x_1 - 50)/10$, $X_2 = (x_2 - 20)/5$, $X_3 = (x_3 - 60)/20$,因素水平分析选取见表 1。试验

表 1 仙鹤草总黄酮超声提取工艺响应面因素水平编码

编码水平	x_1 提取 温度/°C	x_2 料液比 /g·mL ⁻¹	x_3 乙醇体积 分数/%
-1	40	1:15	40
0	50	1:20	60
1	60	1:25	80

表 2 仙鹤草总黄酮超声提取工艺响应面分析试验安排及结果

No.	X_1	X_2	X_3	总黄酮得率 /mg·g ⁻¹
1	-1	-1	0	6.22
2	-1	1	0	8.05
3	-1	0	1	7.09
4	-1	0	-1	6.60
5	1	-1	0	7.48
6	1	1	0	8.90
7	1	0	-1	7.61
8	1	0	1	8.49
9	0	1	-1	7.20
10	0	1	1	8.79
11	0	-1	1	6.92
12	0	-1	-1	6.32
13	0	0	0	8.26
14	0	0	0	8.30
15	0	0	0	8.41
16	0	0	0	8.34
17	0	0	0	8.45

方案与结果见表 2,其中 12 个为析因试验,5 个为中心试验。

2.3 建立模型方程与显著性检验 应用 Design-Expert 7.1.6 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,得到超声温度(X_1)、料液比(X_2)、乙醇体积分数(X_3)与仙鹤草总黄酮之间的二次多项回归方程:

$$Y = 8.35 + 0.57X_1 + 0.75X_2 + 0.44X_3 - 0.10X_1X_2 + 0.097X_1X_3 + 0.25X_2X_3 - 0.27X_1^2 - 0.41X_2^2 - 0.63X_3^2$$

对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

由表 3 回归方差显著性检验表明,一次项中超声提取温度、料液比及乙醇体积分数对总黄酮得率的线性效应极显著;二次项中料液比、乙醇体积分数对总黄酮提取率的曲面效应极显著;比较各因子间,料液比和乙醇体积分数之间交互作用较显著。在本实验设计范围内,回归方程显著性检测极显著,模型的确定系数为 0.9875,说明该模型能解释 98.75% 响应值的变化,即该模型与实际实验拟合良好,试验误差小,证明应用响应曲面法优化的提取工艺提取仙鹤草总黄酮是可行的。

2.4 响应曲面分析 根据回归方程,做出响应面和等高线,考察拟合响应面的形状,分析乙醇体积分数、料液比、超声温度对仙鹤草总黄酮提取率的影

表3 方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
X_1	2.55	1	2.55	118.52	<0.000 1
X_2	4.50	1	4.50	208.84	<0.000 1
X_3	1.58	1	1.58	73.52	<0.000 1
X_1X_2	0.042	1	0.042	1.95	0.250 2
X_1X_3	0.038	1	0.038	1.36	0.225 7
X_2X_3	0.25	1	0.25	11.37	0.011 9
X_1^2	0.32	1	0.32	14.75	0.006 4
X_2^2	0.72	1	0.72	33.61	0.000 7
X_3^2	1.67	1	1.67	77.50	<0.000 1
残差	0.15	7	0.022		
失拟项	0.13	3	0.042	6.95	0.045 9
误差	0.024	4	0.006		
总离差	12.10	16			
模型	11.95	9	1.33	61.62	<0.000 1

注:模型的确系数0.987 5,模型的调整确定系数0.971 5。

响。从图1~3中可以看出极值条件应在圆心周围,

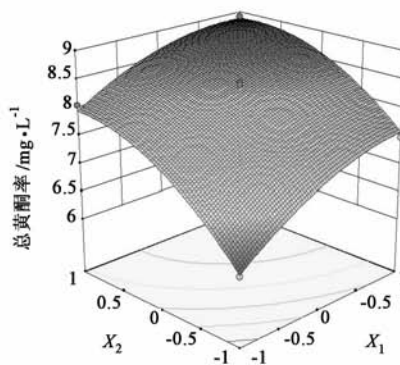
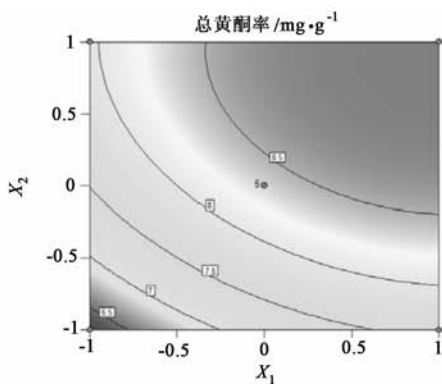


图1 超声温度和料液比的等高线和响应面

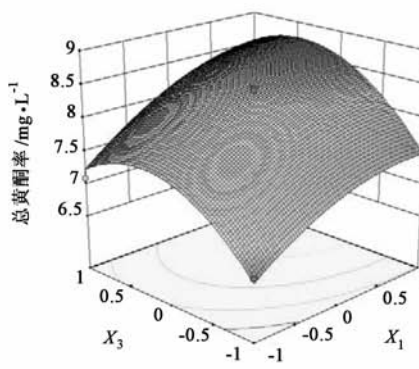
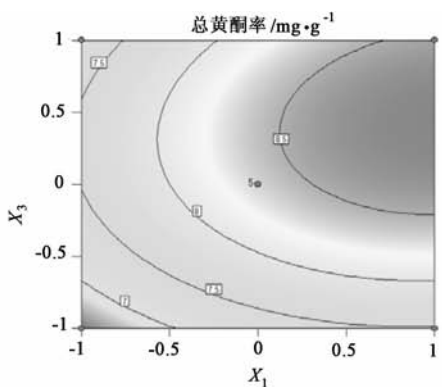


图2 超声温度和乙醇体积分数等高线和响应面

3 讨论

方桂珍等^[7]采用正交设计方法优化了仙鹤草总

3个因素对仙鹤草总黄酮的提取都有显著的影响。料液比的影响最为显著,固定其他因素在一定水平,随料液比的增加,总黄酮得率随之增大,表现为等高线变化最为陡峭;超声提取温度和乙醇体积分数次之,表现为等高线曲线较平滑。

2.5 提取工艺条件的确定 为验证仙鹤草总黄酮超声提取模型方程的适用性,对回归方程求导,并令其等于零,可以得到曲面的最大点,即3个主要因素的最佳水平值,分别为 $X_1 = 0.96$, $X_2 = 0.97$, $X_3 = 0.62$,转换后得到提取的最佳条件为超声提取温度 $59.6\text{ }^\circ\text{C}$,料液比 $1:24.85$,乙醇体积分数 72.4% 、预测仙鹤草总黄酮得率为 $9.12\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。调整试验方案,超声提取温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$,料液比 $1:25$,乙醇体积分数 72% ,重复试验3次,计算仙鹤草总黄酮得率,求其平均值为 $9.02\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,实际与预测的黄酮得率较为接近,充分验证了所建模型的正确性,说明响应面分析方法适用于仙鹤草总黄酮的超声提取工艺的优化。

黄酮的回流提取工艺,但采用超声提取方法提取仙鹤草总黄酮的工艺鲜有报道。本文将单因素试验和

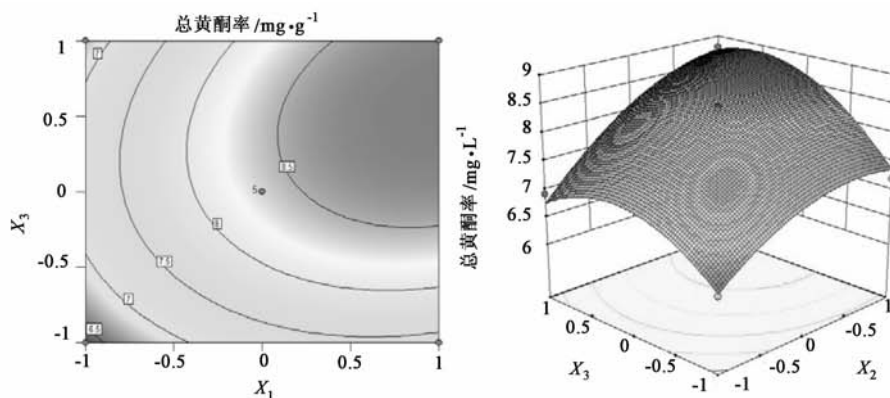


图 3 料液比和乙醇体积分数的等高线和响应面

响应面分析法结合对超声辅助提取仙鹤草总黄酮的工艺条件进行优化,获得最佳提取工艺条件。超声波辅助提取技术可以节省大量时间、提高效率,从而降低生产成本、提高经济效益,是一种较理想的提取仙鹤草总黄酮的方法。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:94.
[2] 潘娅,刘红霞,庄玉磊,等.仙鹤草中黄酮类化学成分研究[J].中国中药杂志,2008,33(24):2925.
[3] Mankil J, Moonsoo P. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa* [J]. *Molecules*, 2007

(12):2130.

[4] Junsei T, Hitoshi N, Katsuhiko U. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb. on LPS-induced RAW264.7 macrophages[J]. *Food Chem*, 2009, 115:1221.
[5] 徐蓉,陈钧,徐骅,等.响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):26.
[6] 李玄,沙跃,张宇燕,等.响应面分析法优化脑络安胶囊提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):11.
[7] 方桂珍,王洪江,孙晓铁.正交试验法优选仙鹤草中总黄酮的提取工艺[J].林产化学与工业,2002,22(3):62.

[责任编辑 全燕]