

Doehlert 设计法优化紫珠中苯乙醇苷的提取工艺

巩珺, 麦锦富, 彭素萍, 苗瑞娟, 袁明杨, 廖琼峰*, 张蕾
(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究乙醇回流法提取枇杷叶紫珠中苯乙醇苷的优化工艺。方法:以料液比、提取时间、乙醇体积分数为 3 个考察因素,苯乙醇苷含量为指标,运用响应面分析法中的 Doehlert 设计法进行试验设计,并采用统计学和数学软件对试验数据进行分析,拟合出苯乙醇苷类的最优提取工艺条件。结果:优选的提取条件为以 12 倍量 90% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h。结论:应用 Doehlert 设计的响应面优化法具有使用方便、预测性好的特点,值得推广应用。

[关键词] 枇杷叶紫珠;苯乙醇苷;提取;Doehlert 设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0007-04

Optimization of Extraction Technology of Phenylethanoid Glycoside from *Callicarpa konchiana* by Doehlert Design

GONG Jun, MAI Jin-fu, PENG Su-ping, MIAO Rui-juan, YUAN Ming-yang, LIAO Qiong-feng*, ZHANG Lei
(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the process of phenylethanoid glycoside from *Callicarpa konchiana* by

[收稿日期] 20110505(007)

[基金项目] 2010年广东省大学生创新实验项目(1057210002)

[第一作者] 巩珺,本科,制药工程专业,Tel:15920585257,E-mail:yingwuchong@126.com

[通讯作者] *廖琼峰,副教授,从事中药药效物质基础与药代动力学研究,Tel:020-39358081,E-mail:liaoq2075@yahoo.com

2.2.4 验证试验 为进一步验证优选方法的可靠性,取 3 份药材,每份 1 000 g,按优选得到的工艺条件进行验证试验,测定 3 次提取澳洲茄边碱提取率分别为 0.612,0.623,0.627 mg·g⁻¹。说明该工艺稳定、可行。

3 讨论

从 80% 乙醇回流,1% 盐酸、3% 醋酸冷浸提取的结果来看,酸水冷浸提取澳洲茄边碱的转移率较低,由于在酸水中加热条件下澳洲茄边碱易发生水解,不宜采用酸水热浸或回流提取;采用乙醇回流提取,澳洲茄边碱的转移率较高,且较为稳定,后续处理简单易行,因此选择该提取方法。试验筛选得到的工艺条件,经验证重复性较好,便于工业化生产。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].1977:154.

[2] 罗文娟,王光辉,周新兰,等.螺甾皂苷类化合物的

体外抗人肝癌细胞增殖作用[J].现代肿瘤医学,2007,15(3):307.

[3] 季宇彬,王胜惠,高世勇,等.龙葵活性成分的研究[J].哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(6):637.

[4] 刘覃,陈晓青,蒋新宇,等.微波辅助提取龙葵中总生物碱的研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(1):65.

[5] 袁海建,贾晓斌,陈彦,等.正交试验优选龙葵的提取工艺[J].中成药,2009,31(1):120.

[6] 李明慧,丁岗,孟兆青,等.龙葵药材中澳洲茄碱、澳洲茄边碱的含量测定[J].中国天然药物,2007,5(5):360.

[7] 郭孝纯.计算化学[M].北京:化学工业出版社,2004:315.

[责任编辑 全燕]

reflux ethanol extraction. **Method:** Three factors were investigated by Doehlert design with the content of phenylethanoid glycoside as criterias, including the ratio of material to liquid, extracting time and the alcoholic concentration. And statistics and mathematics software were used to analyze the test data, then prepared the optimum extraction process. **Result:** The optimum extraction conditions were as follows: reflux extraction with 12-fold 90% alcohol for 2 times, 2 hours each time. **Conclusion:** The doehlert design is easy to use and has good predictability, it can be widely applied in process optimization.

[**Key words**] *Callicarpa konchiana*; phenylethanoid glycoside; extract; doehlert design

枇杷叶紫珠 *Callicarpa konchiana* Makino, 又名劳莱紫珠 *Callicarpa loureiri*, 该植物在岭南地区为“紫珠”的主要药用品种之一, 其干燥茎叶入药, 具有散瘀消肿、止血镇痛、祛痰止咳的功效, 常用来治疗咳血、吐血、鼻出血、创伤出血等出血症, 此外还用于治疗风湿痛、扭挫伤、喉炎、结膜炎等^[1]。紫珠中所含主要成分为苯乙醇苷类化合物。苯乙醇苷类化合物(phenylethanoid glycosides)是一类含有(羟基、甲氧基)取代苯乙基和(羟基、甲氧基)取代肉桂酰基, 通常以 β -葡萄糖为母核的含有酯键及氧苷键的天然糖苷^[2]; 具有壮阳、抗衰老、提高免疫功能、增强记忆力、降血脂和通便等作用^[3], 这类化合物生物活性强, 受到植物化学及药学工作者的高度重视。

本试验欲采用 Doehlert 设计法对紫珠中苯乙醇苷类化合物的提取分离试验条件进行工艺优化。Doehlert 设计法包括试验、建模、数据分析和最优化几个过程, 把自变量和应变量的关系扩展到曲面, 优选条件预测性好。其所需的试验次数相对较少, 效率更高。此外, Doehlert 设计点的空间排布更趋合理^[4]。本试验对影响紫珠中苯乙醇苷类化合物乙醇回流提取效果的因素进行了考察, 并通过 Doehlert 设计法确定了最佳提取工艺条件。

1 仪器与试剂

WFZ UV-2100 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

毛蕊花糖苷对照品(纯度 98.5%, 芜湖贰尔塔医药科技有限公司, 批号 090411)。枇杷叶紫珠采自广东省从化流溪河, 经广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授鉴定学名为马鞭草科植物枇杷叶紫珠 *C. kochiana* Makino, 凭证标本现保存于广州中医药大学中药学院药物分析研究室。

甲醇为色谱纯, 乙醇为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 溶液的配制 称取毛蕊花糖苷对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液, 质量浓度为 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 测定波长的选择 精密移取对照品液和样品液各 0.8 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀。以甲醇为空白对照溶液, 在波长 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描。结果显示在 331 nm 处有最大吸收。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密移取对照品储备液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀。以甲醇作空白对照, 在 331 nm 波长测定吸光度(A)。以毛蕊花糖苷质量浓度(C)为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为 $A = 0.0241C - 0.0266$ ($r = 0.9994$), 毛蕊花糖苷对照品在 $8 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度线性关系良好。

2.2 提取工艺的优化

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 提取温度的考察 取本品粗粉约 1 g, 3 份, 精密称定, 加入 70% 乙醇 10 mL, 浸泡 10 min, 于 50, 70, 90 °C 恒温水浴加热提取 90 min, 滤过, 精密量取 1 mL 滤液置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 以乙醇为空白对照, 各供试品溶液于 331 nm 处测定吸光度。结果表明 90 °C 时提取效果最佳。

2.2.1.2 提取次数的考察 同 2.2.1.1 方法, 于 90 °C 提取 1 次 90 min, 药渣再同法提取第 2, 3 次, 测定吸光度。将 3 次提取液所测得的苯乙醇苷含量总和视为 100%, 分别计算各次提取苯乙醇苷的提取率。结果显示: 提取 2 次的苯乙醇苷提取率为 87%, 从节约生产成本的考虑, 将提取次数定为 2 次。

2.2.2 Doehlert 设计响应面法

2.2.2.1 考察因素及 Doehlert 设计 Doehlert 设计是由所考察的因子-水平数目及其设计矩阵编码值来定义的。编码值与真实值的关系可用下式表示:

$$C_i = [(X_i - X_i^0) / \Delta X_i] \cdot \alpha \quad (1)$$

其中, C_i —因子 i 不同水平的编码值, X_i —真实值, X_i^0 —因子水平区域的中间值, ΔX_i —每个因子不同水平中的最大值(或者最小值)与中间值的跨距, α —每个因子编码值的极值。该试验按照上述方程考察溶剂倍数(8~12)、提取时间(30~120 min)、乙醇体积分数(50%~90%)3个因素。见表1。

表1 紫珠中苯乙醇苷 Doehlert 设计

No.	X_1 料液比	X_2 提取时间	X_3 乙醇 体积分数	得率 /%
1	1(12)	0(75)	0(70)	2.073 0
2	-1(8)	0(75)	0(70)	2.351 0
3	0.5(11)	0.866(120)	0(70)	3.214 1
4	-0.5(9)	-0.866(30)	0(70)	3.214 1
5	0.5(11)	-0.866(30)	0(70)	1.844 8
6	-0.5(9)	0.866(120)	0(70)	4.712 0
7	0.5(11)	0.288(90)	0.816(90)	3.687 1
8	-0.5(9)	-0.288(60)	-0.816(50)	2.164 3
9	0.5(11)	-0.288(60)	-0.816(50)	2.118 7
10	0(10)	0.577(105)	-0.816(50)	2.409 1
11	-0.5(9)	0.288(90)	0.816(90)	2.359 3
12	0(10)	-0.577(45)	0.816(90)	2.006 6
13	0(10)	0(75)	0(70)	2.388 4

2.2.2.2 响应曲面优化 响应面法是通过建立响应值(应变变量)与被考察因素(自变量)的函数关系(响应曲面),从响应面上选择最佳的响应值,从而回推出自变量取值范围即最佳试验条件的方法^[5]。本次试验响应曲面待拟合的方程如下:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_1^2 + b_5 X_2^2 + b_6 X_3^2 + b_7 X_1 X_2 + b_8 X_1 X_3 + b_9 X_2 X_3 \quad (2)$$

其中, Y 表示因变量(响应值), $X_1 \sim X_3$ 表示自变量, $b_1 \sim b_9$ 为相关系数, $b_1 \sim b_3, b_4 \sim b_6, b_7 \sim b_9$ 分别表示自变量的线性效应、二次效应和交互效应。运用统计分析软件对试验数据进行多元回归和方差分析,得回归方程,再根据回归方程,绘制出响应曲面图及其等高线图^[6]。

分别保持料液比(X_1)、提取时间(X_2)、乙醇体积分数(X_3)这3个变量中的1项为常量,绘制其他2项与苯乙醇苷得率(Y)的三维响应面及等高线图。

①采用统计分析软件 SPSS 13.0 对试验数据进行非线性多元回归和方差分析,得拟合方程如下:
 $Y = 14.668 187 5 - 0.437 462 5 X_1 - 0.1 X_2 - 0.19 X_3 - 0.044$

$$1 X_1 X_1 + 0.000 445 4 X_2 X_2 - 0.001 X_1 X_2 + 0.000 799 1 X_2 X_3 + 0.017 703 3 X_3 X_1 \quad (3)$$

方差分析结果显示,本试验所选用模型显著,拟合度好,预测值和实测值之间具有高度的相关性。由于相关系数 $r = 0.853 2$,表示仅有约 14.6% 的变异不能由该模型解释。因此模型的拟合数据良好。

②响应曲面图及其等值线图

应用 Sigma Plot 10.0 软件编程,分别绘制出响应值 Y 与 $(X_1, X_2), (X_1, X_3), (X_2, X_3)$ 的响应曲面图及其等高线图^[7],见图1~6。

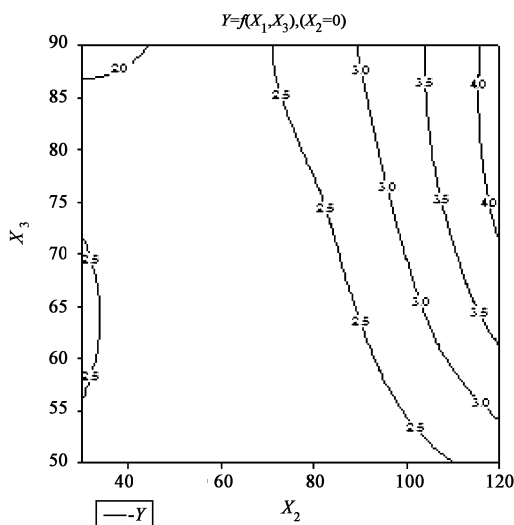


图1 $Y = f(X_2, X_3), (X_1 = 0)$ 的等值线

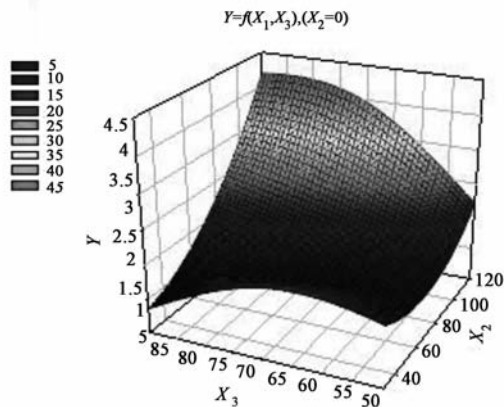


图2 $Y = f(X_2, X_3), (X_1 = 0)$ 的响应面

经综合分析可知,各响应曲面图均有明显的极值。继而应用 LINGO 9.0 软件对拟合方程(3)进行极值的求取,分析计算后可知在加醇倍量(X_1)为 11.74,提取时间(X_2)为 120 min,乙醇体积分数(X_3)为 90% 的最佳提取条件下,苯乙醇总苷的提

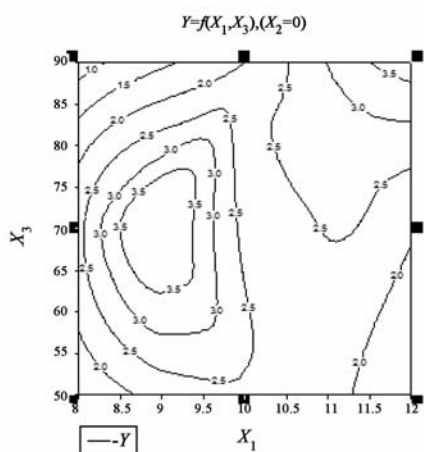


图 3 $Y=f(X_1, X_3), (X_2=0)$ 的等值线

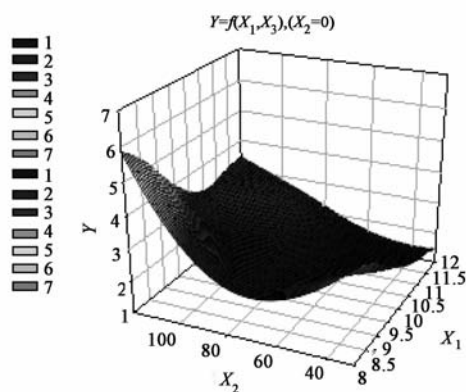


图 6 $Y=f(X_1, X_2), (X_3=0)$ 的响应面

取得率理论值最大, 数值为 6.69%。

3 讨论

苯乙醇苷类化合物具有提高免疫功能、增强记忆力、降血脂和通便等作用, 为枇杷叶紫珠的主要药效成分, 故以该类化合物作为提取工艺的评价指标。分析得出以 11.74 倍量 90% 乙醇回流提取 2 次, 每次 120 min, 该工艺条件合理、可行, 可为工业中提取紫珠苯乙醇苷类化合物提供生产依据。

[参考文献]

- [1] 林朝展. 枇杷叶紫珠中苯乙醇苷类成分研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(3): 276.
- [2] 靖会, 佐建锋, 李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展[J]. 时珍国医报, 2006, 17(3): 440.
- [3] 王丽楠, 陈君, 杨美华, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(2): 67.
- [4] 汪冬庚, 刘文英. Doehlert 设计法优化虎杖中白藜芦醇的提取工艺[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(15): 1138.
- [5] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 90.
- [6] 潘丽军, 陈锦权. 试验设计与数据处理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008. 10.
- [7] 汪冬庚, 刘文英. Doehlert 设计法优化虎杖中白藜芦醇的提取工艺[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(15): 1138.

[责任编辑 全燕]

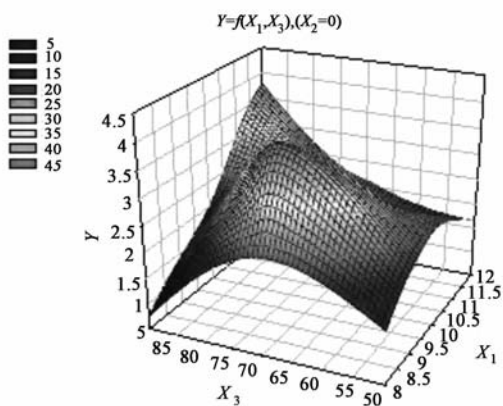


图 4 $Y=f(X_1, X_3), (X_2=0)$ 的响应面

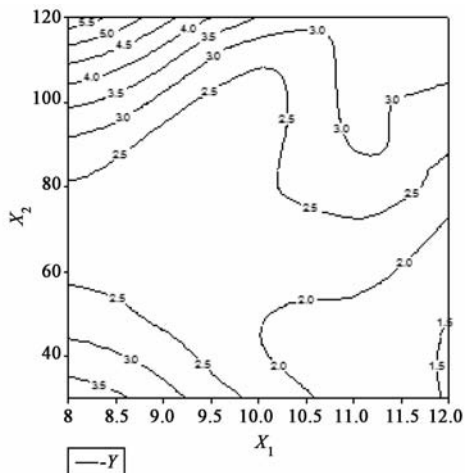


图 5 $Y=f(X_1, X_2), (X_3=0)$ 的等值线