

# 响应面法优化盐酸水解提取荷叶槲皮素工艺

方新华<sup>1\*</sup>, 魏星鑫<sup>2</sup>, 任小凤<sup>2</sup>, 钱克藏<sup>3</sup>, 岳显可<sup>3#</sup>(1.杭州市中医院, 杭州 310006; 2.重庆三峡医药高等专科学校药理学系2012级毕业生, 重庆 404100; 3.浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 杭州 311400)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1397-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.31

**摘要** 目的:优化荷叶中槲皮素提取工艺条件。方法:在单因素试验的基础上,以槲皮素提取量为响应值,选择盐酸体积分数、加热温度和加热时间为因素,采用Box-Behnken响应面法设计优化提取工艺。结果:最优提取工艺为11.0%盐酸、加热时间120 min、加热温度79.0℃。在此工艺下荷叶中槲皮素提取量为12.049 6 mg/g,接近预测值11.794 2 mg/g。结论:优化工艺稳定、可行,可为进一步开发应用荷叶槲皮素提供科学依据。

**关键词** 荷叶;槲皮素;提取工艺;盐酸水解;响应面法;优化

## Optimization of Hydrochloric Acid Hydrolysis Extraction Process of Quercetin from Folium Nelumbinis by Response Surface Method

FANG Xin-hua<sup>1</sup>, WEI Xing-xin<sup>2</sup>, REN Xiao-feng<sup>2</sup>, QIAN Ke-zang<sup>3</sup>, YUE Xian-ke<sup>3</sup>(1.Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China; 2.The 2012's Grade, Dept. of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404100, China; 3.Research Center of TCM Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction process of quercetin from Folium nelumbinis. METHODS: Based on single-factor experiment, with the extraction amount of quercetin as the response value, and the volume fraction of hydrochloric acid, heating temperature and heating time as the factors, Box-Behnken response surface design was adopted to optimize the extraction process. RESULTS: The optimal extraction process was as follows as the volume fraction of hydrochloric acid of 11.0%, heating time of 120 min, and heating temperature of 79.0℃. By the above process, the extraction amount of quercetin from Folium nelumbinis was 12.049 6 mg/g, close to the predicted value of 11.794 2 mg/g. CONCLUSIONS: The optimized process is stable and feasible, and can provide a scientific basis for further application of quercetin from Folium nelumbinis.

**KEYWORDS** Folium nelumbinis; Quercetin; Extraction process; Hydrochloric acid hydrolysis; Response surface method; Optimization

荷叶系睡莲科莲属植物莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的干燥叶<sup>[1]</sup>。传统医学认为荷叶性味苦寒,具有清暑利湿、生发清阳、清心去热、止血利水的活性<sup>[1]</sup>。研究表明荷叶具有抗氧化<sup>[2]</sup>、降血脂<sup>[3]</sup>、抑菌<sup>[4-5]</sup>、抗病毒、抗衰老<sup>[6]</sup>等药理作用。槲皮素作为荷叶中一种重要的黄酮类成分,具有抗肿瘤<sup>[7-8]</sup>、抗炎<sup>[9-10]</sup>、抗病毒<sup>[11]</sup>、抗血小板聚集<sup>[12]</sup>等药理活性。

经文献分析,前期对荷叶总黄酮类成分的提取研究主要以醇为溶剂,进行热浸或超声提取,采用盐酸水解提取银杏叶总黄酮类成分也有相关的报道<sup>[13]</sup>;而盐酸水解用于荷叶总黄酮类成分的提取却报道较少。为此,笔者采用响应面法优化荷叶中黄酮类成分槲皮素的盐酸水解提取工艺,以期为进一步开发荷叶黄酮提取物的医疗、保健产品提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱(HPLC)仪(美国戴安公司);Eclipse XDB-C<sub>18</sub>色谱柱(美国Agilent公司);XS-105型电子分析天平(瑞士Mettler toledo公司,精度:0.01 mg);R-201

\* 主管中药师。研究方向:药品质量与控制。E-mail:fangxin-hua123456@163.com

# 通信作者:主管中药师,硕士。研究方向:中药新药研究与开发。E-mail:492975018@qq.com

型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

荷叶(购自浙江中医药大学中药饮片有限公司,产地:湖北,批号:HY140401);槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100081-200907,纯度:96.5%);盐酸、甲醇、磷酸均为分析纯,甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC法测定荷叶槲皮素的含量

2.1.1 色谱条件<sup>[1]</sup> 色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(50:50, V/V),流速为1 ml/min,检测波长为360 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。该色谱条件下,荷叶样品液(试验2号提取液)中槲皮素与其他相邻峰分离良好,其色谱图见图1。

2.1.2 线性溶液的制备及线性关系考察 精密称取槲皮素对照品5.24 mg,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解,摇匀,为线性贮备液;再将其依次稀释为225.28、101.13、50.57、33.71、25.28、20.23 μg/ml溶液,各进样10 μl。以槲皮素峰面积(y)对质量浓度(x, μg/ml)进行线性回归,得回归方程: $y=0.897 8x-4.537 6$  ( $R^2=0.999 7$ ),结果显示槲皮素检测质量浓度线性范围为20.23~225.28 μg/ml。

2.1.3 精密度考察 以50.57 μg/ml槲皮素对照品溶液为测试

溶液,重复进样6次,测定峰面积。结果RSD为0.38% ( $n=6$ ),表明此方法精密度好。

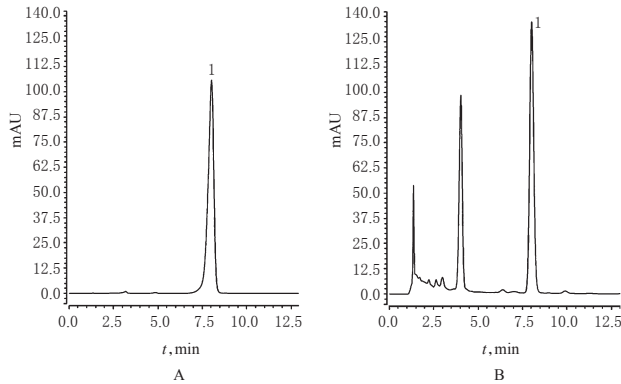


图1 高效液相色谱图

A. 槲皮素对照品; B. 荷叶样品; 1. 槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. quercetin control; B. sample of Folium nelumbinis; 1. quercetin

2.1.4 回收率考察 精密称取已知含量荷叶粉末6份,每份约0.1 g,加入槲皮素对照品适量,按优选出的方法进行提取制备,进样10  $\mu$ l,测得峰面积积分值并计算含量与回收率。结果平均回收率为98.29%, RSD=0.69% ( $n=6$ )。

2.1.5 稳定性考察 精密称取荷叶粉末约0.1 g,按优选出的方法进行提取制备,分别在0、3、6、12、24 h时进样,测定槲皮素峰面积。结果在24 h内峰面积的RSD=2.45% ( $n=5$ ),表明样品溶液在24 h内稳定。

2.1.6 重复性考察 精密称取荷叶粉末6份,每份约0.1 g,按优选出的方法进行提取制备,进样10  $\mu$ l,测定峰面积并计算含量。结果平均含量为12.007 2 mg/g (RSD=0.48%,  $n=6$ )。

## 2.2 荷叶中槲皮素提取单因素试验

本试验主要研究盐酸在水解提取荷叶槲皮素过程中的作用,故盐酸体积分数是试验首要考察的因素;而在盐酸水解过程中,影响最大的是加热温度和加热时间。故本试验先对此3个因素进行单因素试验,再根据单因素的水平差异,设计响应面试验。

2.2.1 荷叶槲皮素提取量的计算公式 提取量(mg/g)=[样品峰面积 $\times$ 对照品质量浓度(mg/ml) $\times$ 对照品进样量 $\times$ 稀释体积(ml)]/[对照品峰面积 $\times$ 样品进样量 $\times$ 样品质量(g)]。

2.2.2 盐酸体积分数对荷叶槲皮素提取量的影响 称取荷叶粉末约0.1 g,分别加入体积分数为2%、4%、6%、8%、10%、12%的盐酸甲醇溶液20 ml,在80  $^{\circ}$ C水浴锅中加热水解90 min后测定,结果见图2A。

由图2A可知,盐酸体积分数从2%升至10%,荷叶槲皮素提取量由7.36 mg/g上升至12.17 mg/g;当盐酸体积分数高于10%时,槲皮素提取量反而略有下降。水解提取过程中盐酸有助于黄酮类成分槲皮素的溶出,但达到一定的体积分数时,会破坏植物组织的结构,导致其他杂质释放出来,槲皮素提取量不再上升。因此盐酸体积分数为10%时比较适合荷叶槲皮素的水解提取。

2.2.3 加热时间对荷叶槲皮素提取量的影响 称取荷叶粉末约0.1 g,加入10%盐酸甲醇溶液20 ml,在80  $^{\circ}$ C条件下,分别水解15、30、60、90、120、150 min后测定,结果见图2B。

由图2B可知,开始提取时,槲皮素的提取量随着加热时间

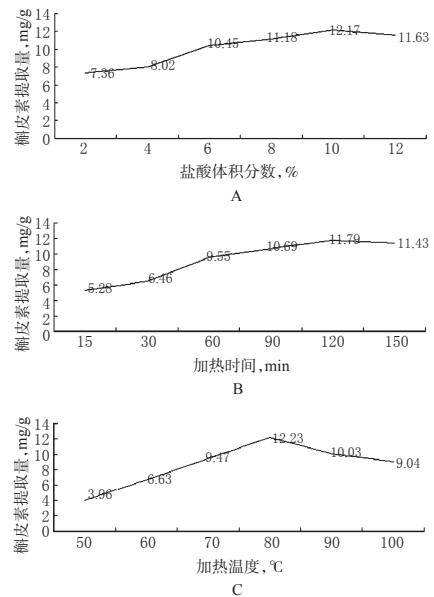


图2 各因素对荷叶槲皮素提取量的影响

A. 盐酸体积分数; B. 加热时间; C. 加热温度

Fig 2 Effects of factors on the extraction amount of quercetin from Folium nelumbinis

A. volume fraction of hydrochloric acid; B. heating time; C. heating time 的延长而增加;槲皮素提取量由提取时间为15 min时的5.28 mg/g上升至120 min时的11.79 mg/g,到提取150 min时略有下降。因此加热时间以120 min比较合适。

2.2.4 加热温度对荷叶槲皮素提取量的影响 称取荷叶粉末约0.1 g,加入10%盐酸甲醇溶液20 ml,分别在50、60、70、80、90、100  $^{\circ}$ C条件下水解120 min后测定,结果见图2C。

由图2C可知,在50  $^{\circ}$ C条件下,盐酸的水解效果不佳;随着温度的上升,槲皮素提取量也相应增加;在80  $^{\circ}$ C条件下,槲皮素提取量达到12.23 mg/g;而随着温度继续升高,槲皮素提取量又随之下降。因此加热温度为80  $^{\circ}$ C时,最利于盐酸水解。

## 2.3 响应面法优化试验设计方案及结果

在单因素试验基础上,根据中心组合设计原理,结合响应面法,以盐酸体积分数( $X_1$ )、加热时间( $X_2$ )和加热温度( $X_3$ )3个因素为自变量,以槲皮素提取量( $Y$ )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。通过拟合二次方程,计算最优工艺组合以及槲皮素提取量最大理论值。利用Design-Expert 8.0.5b软件进行响应面分析。因素与水平见表1, Box-Behnken试验设计以及响应值结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平编码	因素		
	$X_1$ , %	$X_2$ , min	$X_3$ , $^{\circ}$ C
-1	8	90	70
0	10	120	80
1	12	150	90

响应值与各因素进行回归拟合后,得到回归方程如下:

$$Y = 12.168 + 0.262 5X_1 - 0.041 25X_2 + 0.001 25X_3 + 0.105X_1X_2 - 0.2X_1X_3 - 0.252 5X_2X_3 - 1.195 25X_1^2 - 0.972 75X_2^2 - 0.682 75X_3^2$$

( $R^2=0.956 5$ )。

回归决定系数 $R^2=0.956 5$ , 回归模型 $P<0.000 1$ ,表明响应值拟合程度良好;失拟项不显著( $P>0.005$ ),可认为无失拟

因素存在,回归模型显著,由此说明试验结果可信。Box-Behnken 试验结果方差分析见表3。

表2 Box-Behnken 试验设计以及响应值

Tab 2 Design and response values of Box-Behnken experiments

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y
1	12	120	70	10.82
2	10	120	80	12.38
3	10	150	90	10.36
4	10	150	70	10.85
5	8	150	80	9.52
6	10	90	70	10.16
7	10	120	80	12.03
8	8	120	70	9.77
9	8	90	80	10.08
10	10	120	80	12.19
11	10	120	80	11.99
12	12	150	80	10.13
13	12	120	90	10.41
14	10	120	80	12.25
15	12	90	80	10.27
16	10	90	90	10.68
17	8	120	90	10.16

表3 Box-Behnken 试验结果方差分析

Tab 3 Variance analysis result of Box-Behnken experiments

来源	自由度	均方	离均差平方和	F	P
模型	9	1.588 914 804	14.300 233 24	40.072 791 440	<0.000 1
$X_1$	1	0.551 25	0.551 25	13.902 649 930	0.007 4
$X_2$	1	0.013 612 5	0.013 612 5	0.343 310 335	0.576 3
$X_3$	1	0.000 012 5	0.000 012 5	0.000 315 253	0.986 3
$X_1X_2$	1	0.044 1	0.044 1	1.112 211 994	0.326 6
$X_1X_3$	1	0.16	0.16	4.035 236 259	0.084 5
$X_2X_3$	1	0.255 025	0.255 025	6.431 788 294	0.038 9
$X_1X_1$	1	6.015 252 895	6.015 252 895	151.706 041 200	<0.000 1
$X_2X_2$	1	3.984 179 211	3.984 179 211	100.481 902 600	<0.000 1
$X_3X_3$	1	1.962 726 579	1.962 726 579	49.500 409 120	0.000 2
残差	7	0.039 650 714	0.277 555		
失拟项	3	0.058 225	0.174 675	2.263 802 488	0.223 2
纯误差	4	0.025 72	0.102 88		
总和	16		14.577 788 24		

从表3中各个P值结果可以看出盐酸体积分数对荷叶槲皮素提取具有较高的显著性( $P < 0.01$ ),而盐酸体积分数、加热时间的二次效应(即 $X_1X_1$ 、 $X_2X_2$ )对荷叶槲皮素的提取具有极其显著的影响( $P < 0.000 1$ )。

响应面图是响应值对各试验因素所构成的响应面图形,从响应分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用。本试验根据回归方程进行不同因素的响应面分析,结果见图3、图4。

等高线的形状可反映交互效应的强弱:圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形则表示两因素交互作用显著。由图中可看出,各因素间的交互作用不显著,极值条件在等高线圆心处,3个因素对荷叶槲皮素提取都有影响;其中盐酸体积分数的影响最为显著,加热时间和加热温度次之。

#### 2.4 最优提取工艺及验证

使用Design-Expert 8.0.5b软件得到最优提取工艺为盐酸甲醇溶液中盐酸体积分数为11.37%,加热时间为120.9 min,加热温度为78.95℃,荷叶槲皮素提取量预测值为11.794 2

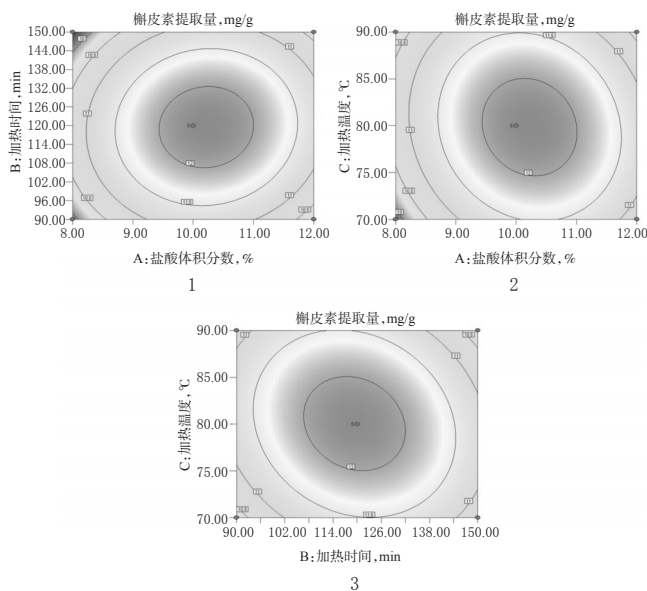


图3 各因素对槲皮素提取量的响应面等高线图

1. 盐酸体积分数与加热时间; 2. 盐酸体积分数与加热温度; 3. 加热时间与加热温度

Fig 3 Response surface contour plot of the effects of factors on the extraction amount of quercetin

1. volume fraction of hydrochloric acid and heating time; 2. volume fraction of hydrochloric acid and heating temperature; 3. heating time and heating temperature

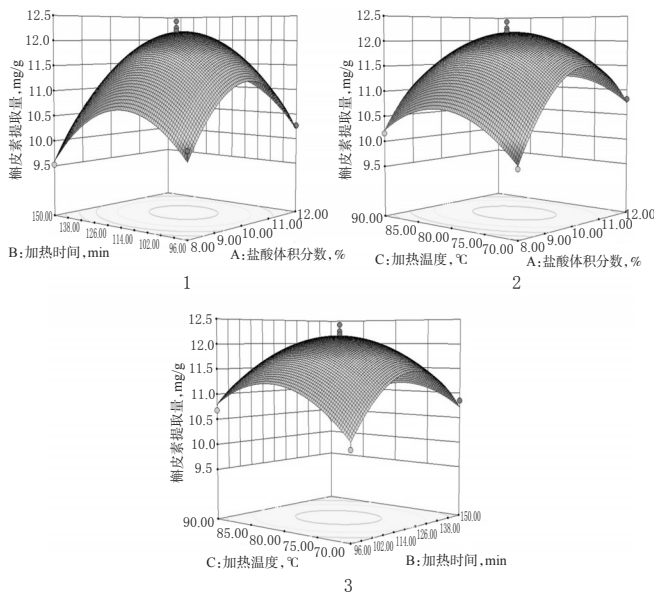


图4 各因素对槲皮素提取量的响应面3D图

1. 盐酸体积分数与加热时间; 2. 盐酸体积分数与加热温度; 3. 加热时间与加热温度

Fig 4 3D response surface plot of the effects of factors on the extraction amount of quercetin

1. volume fraction of hydrochloric acid and heating time; 2. volume fraction of hydrochloric acid and heating temperature; 3. heating time and heating temperature

mg/g。为试验方便,调整试验方案,即盐酸体积分数为11.00%,加热时间为120 min,加热温度为79.0℃,在此条件下进行试验,槲皮素实测值为12.049 6 mg/g( $n=6$ ),接近预测值,

# 几种血管紧张素 II 受体拮抗药抗动脉粥样硬化的效应特点

黄春艳\*,李荣亨\*(重庆医科大学附属第一医院,重庆 400016)

中图分类号 R972.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1400-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.32

**摘要** 目的:对比几种血管紧张素 II 受体拮抗药(ARB)在抗动脉粥样硬化(AS)过程中的抗炎、调脂及稳定斑块作用,为 ARB 在抗 AS 方面的临床多效性提供参考依据。方法:以“厄贝沙坦”“氯沙坦”“替米沙坦”“缬沙坦”“动脉粥样硬化”“Angiotensin receptor blocker”“Irbesartan”“Losartan”“Telmisartan”“Valsartan”“Atherosclerosis”等为关键词,采用单独或组合的方式检索中国知网、PubMed 与 Elsevier 等数据库中的相关文献,归纳、总结各种 ARB 对 AS 的抗炎、调脂、稳定斑块作用。结果:共查询到相关文献 62 篇,其中有效文献 24 篇。厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦及缬沙坦均能在一定程度上起到抗 AS 作用。虽然在不同研究中厄贝沙坦所显示出的降低血脂水平功能有所差异,但是其在抗炎和稳定斑块方面作用明显;氯沙坦的抗 AS 作用主要体现在稳定斑块方面,目前尚未发现其具有降低血脂水平的作用;替米沙坦有显著的降低血脂水平作用,同时具有抗炎作用,其稳定斑块作用机制尚不明确;缬沙坦的抗炎作用明显,且在稳定斑块方面起着重要作用。结论:通过归纳总结厄贝沙坦、替米沙坦、氯沙坦、缬沙坦抗 AS 的特点,可进一步认识其在抗 AS 过程中的多方面作用。

**关键词** 血管紧张素 II 受体拮抗药;动脉粥样硬化;厄贝沙坦;氯沙坦;替米沙坦;缬沙坦

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)所导致的心、脑、肾等血管疾病,是严重危害人类健康的常见疾病。其中,炎症反应

和脂质反应在 AS 的发生、发展过程中起着重要作用<sup>[1-3]</sup>。各种炎症性细胞因子、黏附分子等相互促进、共同影响,导致体内的

表明该工艺稳定、可行。

### 3 讨论

本文在单因素试验的基础上,合理筛选出盐酸体积分数、加热时间及加热温度 3 个因素的水平,将响应面法应用于荷叶黄酮类成分槲皮素的提取。同时,本试验所用荷叶槲皮素的含量测定方法经方法学考察,精密性、稳定性及准确度均符合规定,可作为荷叶槲皮素含量的测定方法。

荷叶作为一种传统中药材,其药源广、药效高,可广泛地运用于生活及临床中。但相对于荷叶的丰富来源,目前仅有少部分荷叶用于医疗、食品及保健等,大多数则烂在田塘江湖。基于槲皮素在临床有显著的效果,本试验在前期众多研究的基础上,采用响应面法进行设计,通过盐酸加热水解提取荷叶中槲皮素,筛选出最优提取工艺,对今后进一步开发利用荷叶槲皮素具有一定的指导意义。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:258,296.

[2] 刘莉华,宛晓春,李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展[J]. 安徽农业大学学报,2002,29(3):265.

[3] 涂长春,李晓宇,杨军平,等. 荷叶生物总碱对肥胖高血脂血症大鼠减肥作用的实验研究[J]. 江西中医学院学报,2001,13(3):121.

[4] 陈健芬,何卫华,钱伏刚. 荷叶提取物口腔抑菌有效成分的定量分析[J]. 日用化学工业,2003,33(1):49.

[5] 张赟彬,李彩侠. 荷叶乙醇提取物的抗氧化与抑菌作用研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(31):23.

[6] 朱秀萍,徐翔. 荷叶生物碱研究进展[J]. 中国药房,2008,19(6):459.

[7] Akira Murakami. Mutitargeted cancer prevention by quercetin[J]. *Cancer Lett*,2008,269(2):315.

[8] 翟莺莺,周蕾. 槲皮素抗肿瘤作用研究[J]. 现代临床医学生物工程专业杂志,2005,11(1):18.

[9] 黄敬群,孙文娟,王四旺,等. 槲皮素对大鼠痛性关节炎抗炎抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):169.

[10] Mamani-Matsuda M, Kauss T, Al-Kharrat A, et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(10):1304.

[11] 徐培平,符林春,张奉学,等. 槲皮素抗流感病毒作用研究[J]. 热带病与寄生虫学,2010,8(2):66.

[12] Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, et al. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans[J]. *J Thromb Haemost*, 2004, 2(12):2138.

[13] 鞠兴荣,汪海峰. 银杏叶提取物中黄酮类化合物的高效液相色谱测定[J]. 食品科学,2001,22(12):66.

(收稿日期:2014-09-25 修回日期:2014-12-02)

(编辑:刘 萍)

## 本栏目协办

北京康众时代医学研究发展有限公司

地址:北京丰台区西三环南路201号融达国际中心715室  
电话:010-83624052 邮编:100070

\* 硕士研究生。研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:314768640@qq.com

# 通信作者:教授,博士生导师。研究方向:风湿免疫与老年病。电话:023-89012864。E-mail:lrongheng1231@163.com