

响应面法优化雪松松针中总木脂素的提取工艺^Δ

雷艳萍^{1,2*}, 石晓峰^{2#}, 刘东彦², 王斌利^{1,2} (1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730030; 2. 甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0939-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.23

摘要 目的: 优化雪松松针中总木脂素的提取工艺。方法: 以乙醇体积分数、液料比、提取时间为响应因子, 总木脂素含量为响应值, 采用基于 Box-Behnken 设计的响应面法优化雪松松针中总木脂素的提取工艺。结果: 优化的提取工艺为乙醇体积分数 78%、液料比 25:1、提取时间 1.75 h。在此工艺条件下提取得到的总木脂素含量为 99.2 mg/g, 与理论预测值 100.49 mg/g 接近, 相对偏差为 0.65%。结论: 利用响应面法优化得到的雪松松针中总木脂素的提取工艺稳定可行, 且具有较好的预测性。
关键词 雪松松针; 总木脂素; 提取工艺; Box-Behnken 设计; 响应面法

Optimization of the Extraction Technology of Total Lignans from Pine Needles of *Cedrus deodara* by Response Surface Methodology
LEI Yanping^{1,2}, SHI Xiaofeng², LIU Dongyan², WANG Binli^{1,2} (1. School of Pharmacy, Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Provincial Academy for Medical Science Research, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the extraction technology of total lignans from pine needles of *Cedrus deodara*. **METHODS:** Using ethanol volume fraction, ratio of liquid to solid and extraction time as response factor, the content of total lignans as response value, the response surface methodology test was conducted based on Box-Behnken design to optimize the extraction technology of total lignans from pine needles of *C. deodara*. **RESULTS:** The optimal extraction technology was as follows as ethanol volume fraction of 78%, ratio of liquid to solid 25:1, extraction time 1.75 h. The content of total lignans from pine needles of *C. deodara* was 99.2 mg/g, which was close to predicted value 100.49 mg/g, with relative deviation of 0.65%. **CONCLUSIONS:** Optimized extraction technology of pine needles of *C. deodara* by response surface methodology is feasible and stable, and has good predictability.
KEYWORDS Pine needles of *Cedrus deodara*; Total lignans; Extraction technology; Box-Behnken design; Response surface methodology

雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don. 是松科 *Pinaceae* 植物雪松属 *Cedrus* Trew 树种的统称, 包括雪松 *C. deodara* Loud、黎巴嫩雪松 *C. libani* Loud、短叶雪松 *C. brevifolia* Manetti 和北非雪松 *C. atlantica* Henry。其针叶药用历史悠久, 主要化学成分为黄酮类、苯丙素类、有机酸类、三萜类、甾体类、多糖及针叶胶等, 具有抗肿瘤、抗氧化、改善记忆、抗菌及抗病毒、毒杀蚊虫等多种功效^[1]。笔者前期从雪松松针二氯甲烷提取物中分离鉴定出蛇床子素、丹皮酚、厚朴酚、和厚朴酚等 10 余个化合物^[2-3], 建立了同时测定雪松松针中丹皮酚、蛇床子素、和厚朴酚、厚朴酚 4 个有效成分含量的反相高效液相色谱法^[4], 并发现雪松松针中的木脂素类化合物含量较高, 是值得进一步研究和开发利用的一类活性成分。为此, 本试验采用紫外-可见分光光度法, 以厚朴酚为对照品, 磷钼酸显色, 测定总木脂素的含量, 并以其为考察指标, 在单因素试验的基础上, 通过 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验设计响应面法, 对雪松松针中总木脂素提取工艺的主要影响因素 (乙醇体积分数、液料比、提取时间) 进行考察并建立了相应的数学模型, 优化了雪松松针

中总木脂素的提取工艺, 以期雪松松针中木脂素类物质的综合开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-240 型紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); AE260 型万分之一分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); CP225D 型十万分之一电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); KQ2200B 型超声清洗仪器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

雪松松针于 2012 年 6 月采自甘肃省兰州市, 经甘肃省医学科学研究院何福江研究员、石长栓副研究员鉴定为松科雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don. 的针叶; 厚朴酚对照品 (成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-1105061, 纯度: >98%, 供含量测定用); 磷钼酸、甲醇、无水乙醇均为分析纯, 水为自制纯水。

2 方法与结果

2.1 雪松松针中总木脂素的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取厚朴酚对照品 1.1 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得到质量浓度为 0.11 mg/ml 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取雪松松针干燥粉末 (20~40 目) 1.0 g, 按规定体积分数的乙醇、液料比, 在一定温度下回流一定时间后, 回收乙醇得到浸膏。浸膏用甲醇超声

Δ 基金项目: 甘肃省科技支撑计划项目 (No.1204FKCA152); 兰州市人才创新创业项目 (No.2014-RC-62)
* 硕士研究生。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。E-mail: 495306892@qq.com
通信作者: 主任药师, 教授, 硕士生导师。研究方向: 中药化学及中药制剂质量标准。电话: 0931-2302644。E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

溶解后定容至25 ml,从中吸取1 ml,再用甲醇定容至10 ml,摇匀,3 000 r/min离心(离心半径8 cm)25 min,取上清液为供试品溶液。

2.1.3 标准曲线建立^[5] 分别吸取对照品溶液0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 ml,置于10 ml试管中,分别加入3倍体积5%的磷酸乙醇溶液(g/ml),在80℃水浴中蒸去溶剂,并将各试管移入沸水浴中加热15 min,然后流水冷却10 min,用蒸馏水定容至10 ml,超声至完全溶解。以空白试剂为参比液,在740 nm波长处测定吸光度。以质量浓度(x)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标,计算得到标准曲线方程 $y=12.416x-0.1777$ ($r=0.9983$),厚朴酚检测质量浓度线性范围为0.002 2~0.009 9 mg/ml。

2.1.4 精密度、重复性、稳定性、准确度试验 按相关方法操作,结果精密度试验中吸光度的RSD=0.11% ($n=6$);重复性试验中含量的RSD=1.41% ($n=6$);稳定性试验中含量的RSD=0.74% ($n=6$),供试品溶液在1 h内稳定;准确度试验中平均方法回收率为96.81% (RSD=1.31%, $n=6$)。

2.1.5 样品含量的测定 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下方法测定,按标准曲线方程计算总木脂素含量[供试品溶液中总木脂素质量(mg)/雪松松针粉末质量(g)×100%]。

2.2 单因素试验

2.2.1 乙醇体积分数对雪松松针总木脂素含量的影响 准确称取雪松松针1.0 g,6份,固定温度为80℃、液料比为20:1、提取时间为2 h、提取次数为2次,分别加入40%、50%、60%、70%、80%、90%乙醇回流提取,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。按“2.1.3”项下方法测定吸光度,计算总木脂素含量,结果见图1a。由图1a可知,乙醇体积分数为70%时提取效果最好,故选择60%~80%乙醇进行后续试验。

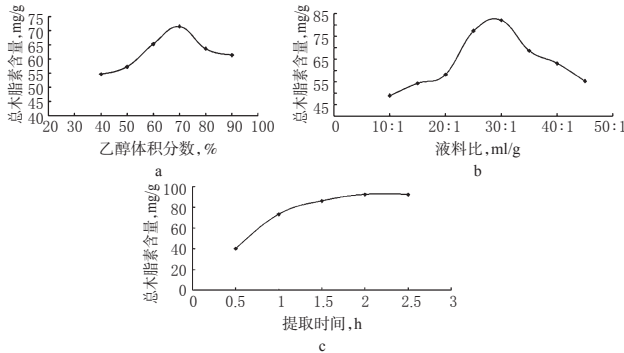


图1 各因素对雪松松针中总木脂素含量的影响
a.乙醇体积分数;b.液料比;c.提取时间

Fig 1 Effect of each factor on the content of total lignans from pine needles of *C. deodara*

a. ethanol volume fraction; b. ratio of liquid to solid; c. extraction time

2.2.2 液料比对雪松松针总木脂素含量的影响 准确称取雪松松针粉末1.0 g,7份,固定温度为80℃、乙醇体积分数为70%、提取时间为2 h、提取次数为2次,选择不同液料比(10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1, ml/g),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。按“2.1.3”项下方法测定吸光度,计算总木脂含量,结果见图1b。由图1b可知,随着液料比的增加,总木脂素含量也逐渐增加,但到达30:1时,总木脂素含量呈下降趋势,故液料比选择25:1~30:1(ml/g)进行后续试验。

2.2.3 提取时间对雪松松针总木脂素含量的影响 准确称取

雪松松针1.0 g,5份,固定温度为80℃、乙醇体积分数为70%、液料比为30:1、提取次数为2次,提取时间分别在0.5、1、1.5、2、2.5 h的条件下,按“2.1.2”项下方法操作制备供试品溶液。按“2.1.3”项下方法测定吸光度,计算总木脂素含量,结果见图1c。由图1c可知,随着提取时间的延长,总木脂素含量增加;从1.5 h后总木脂素含量增加变缓,2 h时含量达到最大值,2.5 h后含量基本不再增加。考虑到提取效率、能量损耗等因素,选择提取时间为1~2 h进行后续试验。

2.3 响应面法优化试验

2.3.1 响应面法方案及结果 通过单因素试验,选择乙醇体积分数(A)、液料比(B)、提取时间(C)3个因素,应用Design-Expert 8.0.6软件,Box-Behnken设计3因素3水平的响应面试验。因素与水平见表1;试验设计及结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平编码	因素		
	A, %	B, ml/g	C, h
-1	60	25:1	1
0	70	30:1	1.5
1	80	35:1	2

表2 Box-Behnken设计及结果

Tab 2 Box-Behnken design and results

试验号	A	B	C	总木脂素含量,mg/g
1	0	-1	1	85.94
2	1	0	-1	58.96
3	-1	1	0	67.12
4	0	1	1	83.13
5	0	0	0	87.06
6	0	0	0	91.69
7	1	0	1	94.38
8	0	0	0	91.77
9	0	0	0	91.87
10	0	-1	-1	76.87
11	1	-1	0	96.51
12	-1	-1	0	56.85
13	-1	0	1	65.43
14	0	0	0	91.99
15	0	1	-1	60.88
16	1	1	0	69.42
17	-1	0	-1	50.31

2.3.2 模型方程的建立与方差分析 利用Design-Expert 8.0.6软件对表2中的数据进行回归分析,以总木脂素含量为响应值(Y)分别对各因素(自变量)进行多元线性回归和二项式方程拟合,回归方程为: $Y=-1139.67850+24.56120A+20.96770B+26.13100C-0.18680AB+1.01500AC+1.31800BC-0.13918A^2-0.17932B^2-38.75200C^2$ ($R^2=0.9821$)。方差分析结果见表3。

从表3可以看出,以雪松松针中总木脂素含量为响应值时,模型 $P<0.0001$,表明响应面法优化的提取工艺对雪松松针中的总木脂素的提取是可行的。同时回归方程失拟项的 $P=0.1248>0.05$,表明未知因素对试验结果干扰很小。其模型的确定系数为98.21%,表明响应值的变化有98.21%来源于响应因子^[6-7],即液料比、乙醇体积分数和提取时间。模型的调整确定系数为95.92%,说明模型拟合程度较好。由表3还可知,3个因素中一次项A、C,二次项 A^2 、 C^2 ,交互项AB为极其显著,一次项B为高度显著。因此,所得回归方程能够很好地预测总木脂素含量随各响应因子的变化。

表3 回归方程方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	3 699.15	9	411.02	42.75	<0.000 1	***
A	791.22	1	791.22	82.30	<0.000 1	***
B	158.60	1	158.60	16.50	0.004 8	**
C	837.63	1	837.63	87.13	<0.000 1	***
AB	348.94	1	348.94	36.30	0.000 5	***
AC	103.02	1	103.02	10.72	0.013 6	*
BC	43.43	1	43.43	4.52	0.071 2	*
A ²	815.62	1	815.62	84.84	<0.000 1	***
B ²	84.62	1	84.62	8.80	0.020 9	*
C ²	395.19	1	395.19	41.11	0.000 4	***
残差	67.30	7	9.61			
失拟项	49.04	3	16.35	3.58	0.124 8	
纯误差	18.25	4	4.56			
总和	3 766.45	16				

注:“***”表示极显著,“**”表示高度显著,“*”表示显著

Note: “***” means extremely significant, “**” means highly significant, “*” means significant

2.3.3 响应面分析 通过Design-Expert 8.0.6软件绘制出能够反映影响总木脂素含量的3个因素交互作用的二维等高线图和三维响应面图。从等高线图可以反映其中任意2个因素的交互作用的显著程度,其中圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形表示两因素交互作用显著^[8-9],详见图2~图4。

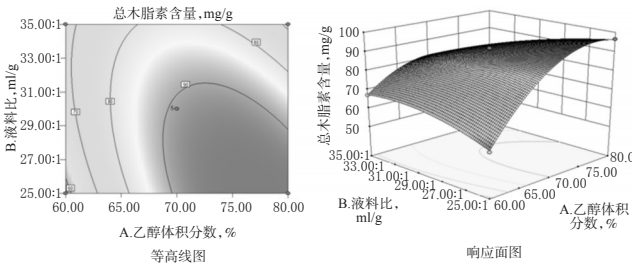


图2 A、B因素对总木脂素含量影响的等高线和响应面图
Fig 2 Contour line and response surface plot of factor A and B on the content of total lignans

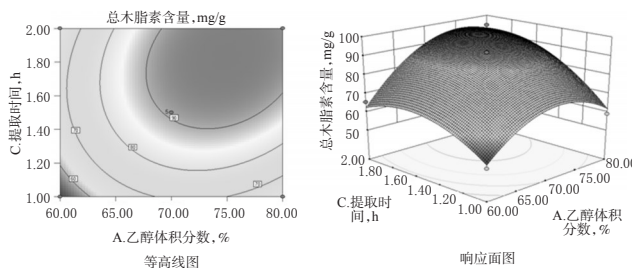


图3 A、C因素对总木脂素含量影响的等高线和响应面图
Fig 3 Contour line and response surface plot of factor A and C on the content of total lignans

2.4 工艺验证

通过响应面法对雪松松针中总木脂素的提取工艺进行优化,得到最优工艺条件:乙醇体积分数为77.96%、液料比为25:1,提取时间为1.78 h。但考虑到实际情况,将乙醇体积分数调整为78%、提取时间调整为1.75 h,在此修正条件下重复试验3次。结果,实际得到的总木脂素的含量为99.2 mg/g,与理论预测值100.49 mg/g的相对偏差为0.65%。

3 讨论

经查阅文献,发现木脂素的含量测定方法主要有磷钼酸

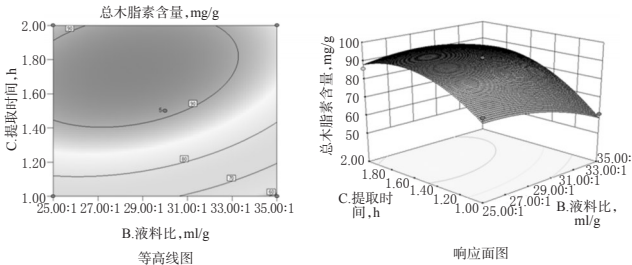


图4 B、C因素对总木脂素含量影响的等高线和响应面图
Fig 4 Contour line and response surface plot of factor B and C on the content of total lignans

显色法^[5]和变色酸显色法^[10],后者多用于测定含亚甲二氧基的木脂素。在前期试验中笔者通过比较上述两种方法的分析效果,发现磷钼酸显色法更稳定、更准确。同时,在采用紫外-可见分光光度法测定总木脂素含量时,比较了两种不同的提取方法(超声、回流)的提取效果,结果显示回流提取测得的总木脂素含量高于超声提取法,故选用回流提取的方法进行木脂素的提取。

响应面法是集数学、统计学和计算机科学为一体,采用多元二次回归方程来拟合各因素与响应值之间函数关系的一种统计方法,该方法具有试验次数相对较少、试验精度高的优点^[11]。本试验采用Box-Behnken设计的响应面法,优选得到的工艺条件下测得的雪松松针中总木脂素的含量与理论预测值基本吻合,因而确认利用该法得到的提取工艺具有实用价值,从而为雪松松针中总木脂素的开发利用提供了参考。

雪松松针含有的木脂素类成分具有诸多药理活性,如蛇床子素具有抗变态、抗炎、抗诱变、抗癌、扩张血管降血压等作用^[12-13],厚朴酚具有抗菌、抑制胃溃疡、降血压及抑制癌细胞增殖等功效^[14]。因此,对雪松松针中木脂素类成分进行开发利用,具有很高的药用价值和广阔的前景。

参考文献

- [1] 白朝辉,石晓峰,刘东彦.雪松松针的化学成分及药理作用研究进展[J].中国药师,2012,15(12):1 791.
- [2] 石晓峰,白朝辉,刘东彦.雪松松针二氯甲烷提取物化学成分研究[J].中药材,2012,35(3):404.
- [3] 白朝辉,石晓峰,刘东彦,等.雪松松针二氯甲烷提取物化学成分研究(Ⅱ)[J].中药材,2013,36(4):61.
- [4] 石晓峰,李师,刘东彦,等.RP-HPLC法同时测定雪松松针中4种有效成分的含量[J].药物分析杂志,2014,34(2):243.
- [5] 张文斌,许时婴.亚麻木酚素的微波辅助提取工艺研究[J].天然产物研究与开发,2006,18(6):286.
- [6] 刘军海,任惠兰,官波,等.响应面分析法优化白术多糖提取工艺[J].中成药,2008,30(5):667.
- [7] 徐金龙,张红梅,徐秀泉.响应面分析法优化牡丹皮中总黄酮的提取工艺[J].中国药房,2011,22(27):2 536.
- [8] 林建原,季丽红.响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J].中国食品学报,2013,13(2):83.
- [9] 杨文鸽,谢果凰,颜伟华,等.响应面分析法优化海鳗的湿腌工艺[J].中国食品学报,2010,10(1):133.
- [10] 刘旭,林森,赵余庆.北五味子不同部位总木脂素的含量测定[J].中国现代中药,2009,11(5):39.
- [11] 许海燕,郑伶俐,多本加,等.响应面法优化秦岭龙胆有效成分的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志,2014,20

星点设计-响应面法优化大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺^Δ

柳庆龙^{1*},李 煌¹,林珠灿¹,徐 伟^{1#},沙 玫¹,陈阿虹¹,周厚荣²(1.福建中医药大学药学院,福州 350122;2.福建西岸生物科技有限公司,福州 350002)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0942-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.24

摘要 目的:优化大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺。方法:以载药量、解吸率、回收率、纯化率等为指标对纯化藤茶总黄酮的4种大孔树脂进行筛选;采用单因素试验和星点设计-响应面法优化纯化工艺中洗脱剂的质量分数、吸附时间、洗脱剂流量及其pH等因素的水平,并进行验证试验。结果:确定以D-101大孔树脂为纯化树脂;最优纯化工艺为上样液质量浓度2 mg(以浸膏质量计)/ml、上样液体积1.1倍柱体积(BV)、洗脱剂乙醇质量分数86.0%、吸附时间36.7 min、洗脱剂流量3.81 BV/h、洗脱剂pH 7;总黄酮的质量分数从66.83%提高至验证试验中的85.00%(RSD=0.15%, $n=3$),且与预测值(85.08%)接近。结论:采用星点设计-响应面法优化的大孔树脂纯化藤茶总黄酮的工艺条件可行,且稳定性较好。
关键词 D-101树脂;纯化;藤茶;总黄酮;星点设计-响应面法

Optimization of the Purification Technology of Total Flavones in *Ampelopsis grossedentata* with Macroporous Resins by Central Composite Design-Response Surface Methodology
LIU Qinglong¹, LI Huang¹, LIN Zhucan¹, XU Wei¹, SHA Mei¹, CHEN Ahong¹, ZHOU Hourong²(1.College of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 2.Fujian West Coast Biotechnology Co., Ltd., Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the purification technology of total flavones from *Ampelopsis grossedentata* with macroporous resins. METHODS: 4 kinds of macroporous resins for the purification of total flavones from *A. grossedentata* were screened by using drug-loading amount, desorption rate, recovery and purification rate as indicators. Single factor test and central composite design-response surface methodology were used to optimized eluant mass fraction, adsorption time, flow rate of eluant, eluant pH and other factors of purification technology, and validation test was also conducted. RESULTS: D-101 macroporous resin was the best. The optimal condition was as follows as the concentration of sample solution 2 mg (by extract weight)/ml, the volume of sample solution 1.1 BV, ethanol 86.0%, adsorption time 36.7 min, flow rate of eluant 3.81 BV/h, pH 7. In validation test, mass fraction of total flavones increased from 66.83% to 85.00% in validation test (RSD=0.15%, $n=3$), and were close to predicted value (85.08%). CONCLUSIONS: Central composite design-response surface methodology is feasible and stable for the optimization of purification technology of total flavones from *A. grossedentata* with macroporous resins.
KEYWORDS D-101 macroporous resin; Purification; *Ampelopsis grossedentata*; Total flavonoids; Central composite design-response surface methodology

藤茶,又名显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W T Wang,在福建、广东、广西、贵州、云南等均有分布^[1-2]。其味甘、淡,性凉,有效成分主要为黄酮类物质及多糖等^[3]。现代药理研究表明藤茶中总黄酮具有降血糖、抗氧化、抗炎、抗菌、增强免疫、调节免疫等作用^[4-6]。本试验拟采用大孔树脂对藤茶总黄酮进行纯化以得到较高纯度的总黄酮,主要内容包括对不同的大孔树脂进行筛选,然后再采用优选出的树脂进行纯化工艺优化。

1 材料

1.1 仪器

UV-9600 紫外分光光度计[北京瑞利分析仪器(集团)公司];XS105 万分之一电子分析天平(上海奕宇电子科技有限公司)。

1.2 药材、对照品与试剂

藤茶(桂林平乐瑶乡永康汉方茶业开发有限公司,批号:20130819;经福建中医药大学药学院杨成梓副教授鉴定为广

(15):31.

Δ 基金项目:福建省科技计划项目(No.2015Y0060);福建省中青年教育科研基金项目(No.JA15254);福建中医药大学重点学科项目(No.X2014139)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物成分与活性。E-mail: 1036800805@qq.com

通信作者:副教授。研究方向:天然药物成分与活性。E-mail: xwfjtc@sina.com

[12] 毛佳蕾,钱晓萍,刘宝瑞.蛇床子素的提取及其体外抗肿瘤活性的研究进展[J].现代肿瘤医学,2014,22(3):726.

[13] 阴旗俊,孙海峰.蛇床子素的药理作用和作为生物农药的研究[J].中医药信息,2009,26(2):13.

[14] 保志娟,戴琳,苗兆涛,等.紫外分光光度法测定厚朴酚及厚朴酚的解离常数[J].云南大学学报,2004,26(1):66.

(收稿日期:2015-07-21 修回日期:2015-10-15)

(编辑:刘 萍)