

姚昕利,舒文将,李 鹤,等. 响应面法优化超声波辅助提取桂北金槐米中芸香苷工艺[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):197-200.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.050

响应面法优化超声波辅助提取桂北金槐米中芸香苷工艺

姚昕利¹, 舒文将², 李 鹤¹, 张冬冬¹, 朱开梅^{1,2}, 顾生玖¹

(1. 桂林医学院, 广西桂林 541004; 2. 中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541004)

摘要:以桂北金槐(*Sophora japonica*)为原料,优选出芸香苷的提取工艺,为该药材的资源开发提供参考。选取芸香苷含量为因变量,在单因素试验基础上,选取料液比、甲醇浓度、超声功率为自变量,通过响应面法优选超声波辅助提取金槐米芸香苷的工艺并进行预测分析。采用高效液相色谱法(HPLC)测定芸香苷含量;流动相甲醇溶液(A)-0.5%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,检测波长为260 nm。最佳提取工艺条件为超声功率250 W;甲醇浓度88.87%;超声时间60 min;料液比1 g:50 mL,芸香苷在此提取预测值、验证值分别为35.32%、33.19%,两者相差不大。结果表明,优选的提取工艺稳定可行、预测性良好,能提高金槐米资源的合理利用,能为槐米芸香苷制剂开发提供参考。

关键词:金槐;超声波辅助提取;响应面法;芸香苷;提取;HPLC

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)02-0197-04

金槐(*Sophora japonica*)属槐树的栽培品种,以金黄色的槐米得名^[1];相较于其他地区的槐米,金槐含有丰富的芸香苷,其芸香苷含量可达25%~28%,远远高出普通槐米^[2]。芸香苷不仅药理性强,具有抗病毒、抗炎、抗氧化等作用,还能强化机体抵抗力、提升毛细管的弹性,因此在临床上主要被用于治疗脑出血、高血压、心血管类疾病^[3],且被广泛应用于医药卫生、保健品、功能性食品中,而金槐作为广西壮族自治区全州县特有的品种,芸香苷含量较高,具有很好的开发利用价值。目前对于金槐芸香苷的提取优化方案不是很明确,因此制定出规范高效的提取方法对现代药学研究是非常有必要的。

芸香苷的提取方法主要有碱提取酸沉淀法、热水提冷析出法、大孔树脂分离法、超声辐射法、乙醇浸提法等,多存在提取效率低、成本高、工艺流程长、提取芸香苷的纯度差等问题^[3-6]。近年来的研究表明,超声波辅助提取芸香苷的效果较好,提取率高且需时较少^[7-8]。通过优化、合理选择提取工艺可以提高芸香苷提取率,其中最常用的方法主要为(1)正交试验;(2)响应面法^[9]。响应面法试验具有设计简单、操作方便、精确度高等优点^[10-12]。本研究以芸香苷含量为评价指标,在等因素试验基础上,采用星点设计-响应面法优化芸香苷提取工艺,用高效液相色谱法(HPLC)测定其含量,为金槐槐米的开发利用提供理论依据。

收稿日期:2017-09-05

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科合14123001-22、桂科能1598025-46);广西省桂林市科学研究与技术开发计划(编号:20150102-6、20150102-7、20150102-8);广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放基金(编号:FPRU2015-5);广西科学院基本科研业务费资助项目(编号:2017YJJ23010)。

作者简介:姚昕利(1993—),女,湖北武汉人,硕士,主要从事药品检验与分析研究。E-mail:1220017571@qq.com。

通信作者:顾生玖,博士,教授,主要从事药物化学研究。E-mail:gushengjiu@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金槐槐米(广西壮族自治区全州县,经广西植物研究所蒋运生研究员鉴定为槐米)、芸香苷对照品(上海如吉生物科技有限公司,批号150706,纯度≥95%),磷酸、甲醇为色谱纯,水为超纯水。试验时间为2016年9月至2017年5月;地点为桂林医学院药学院实验室。

1.2 仪器与设备

分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司生产];四两装高速中药粉碎机(浙江省瑞安市永历制药机械有限公司生产);DL-360D智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司生产);高效液相色谱仪(岛津制作所生产)。

1.3 方法

1.3.1 超声辅助提取芸香苷工艺 将槐米去杂,用高速中药粉碎机粉碎成末后过60目筛,精确称取1.00 g置于具塞锥形瓶中,分别加入不同浓度的甲醇溶液,在不同的料液比下于不同的超声时间、超声功率下提取,放冷后过滤。用相应浓度的甲醇溶液定容至50 mL容量瓶中,取0.1 mL至100 mL容量瓶中,再次定容至刻度线,备用。

1.3.2 单因素分析 参考相关文献^[13],以超声时间(40 min)、料液比(1 g:25 mL)、甲醇浓度(60%)、超声功率(400 W)为参考依据,为进一步剖析各因素与芸香苷提取率的关系,确定试验各单因素水平。

1.3.3 响应面优化试验 确定自变量,具体依据单因素试验结果,主要包括超声功率、甲醇浓度、料液比;其中芸香苷提取率为响应值。结合Box-Behnken法,设计分析试验,表1为各因素水平情况。

1.3.4 芸香苷含量测定

1.3.4.1 色谱条件的选择 采用C₁₈柱,设定30℃柱温,流速选取1 mL/min,进样量为10 μL,检测波长设定为260 nm,

表 1 响应面试验因素与水平

水平	因素		
	甲醇浓度 (%)	料液比 (g : mL)	超声功率 (W)
-1	70	1 : 30	250
0	80	1 : 40	300
1	90	1 : 50	350

流动相采用甲醇溶液(A) - 0.5% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱, 试验洗脱条件见表 2。

表 2 梯度洗脱条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A: 甲醇溶液浓度 (%)	B: 0.5% 磷酸水溶液浓度 (%)
0	1	10	90
12	1	75	25
24	1	88	12
35	1	95	5

1.3.4.2 芸香苷含量标准曲线绘制 取 50 mL 容量瓶, 精确加入芸香苷对照品 4 mg, 用甲醇溶液定容至刻度线后摇匀, 备用。精密吸取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。按“1.3.4.1”节中的色谱条件进样并测定其峰面积。试验结果: 在 0.8 ~ 7.2 μg 范围内, 芸香苷的峰面积与浓度呈线性关系。回归方程为 $y = 63\,663x - 4\,754.5$, $R^2 = 0.999\,8$ 。

1.3.4.3 精密度试验 取“1.3.4.2”节中的对照品溶液, 并结合“1.3.4.1”节中的色谱条件连续重复进样 5 次。每次进样量为 10 μL , 分别记录峰面积值, 结果表明, 芸香苷峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.032%, 精密度高。

1.3.4.4 重复性试验 取适量金槐槐米样品细粉, 配制供试品溶液(5 份), 按照“1.3.4.1”节中的色谱条件分别测定峰面积。金槐槐米样品芸香苷提取率平均值为 22.62%, RSD 值为 0.942%, 表明该方法重复性良好。

1.3.4.5 稳定性试验 在室温下放置一供试品溶液, 并分别

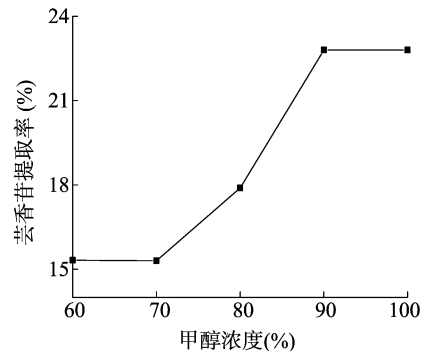


图1 甲醇浓度对芸香苷提取率的影响

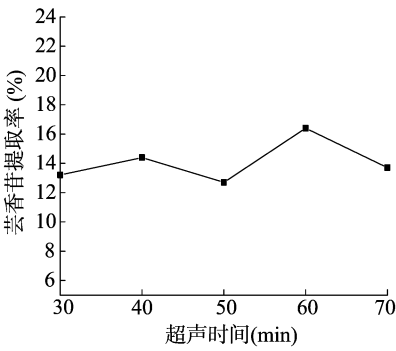


图2 超声时间对芸香苷提取率的影响

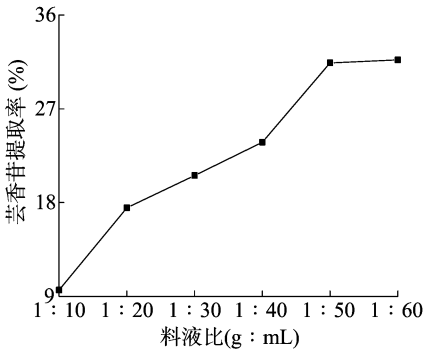


图3 料液比对芸香苷提取率的影响

2.1.4 不同超声功率对芸香苷提取率的影响 在固定甲醇溶液浓度为 80%、料液比为 1 g : 10 mL、超声时间为 60 min 条件下, 考察超声功率 200、250、300、350 W 时芸香苷提取率的变化。由图 4 可知, 芸香苷提取率在 250 ~ 350 W 范围内呈上升趋势, 且在 350 W 时达到最大, 即本试验选取 350 W 为最佳超声功率。

2.2 响应面结果与分析

2.2.1 回归方程的建立与分析 依据单因素试验结果, 以料

在 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 h 内进样, 分别记录相应的峰面积值。结果芸香苷峰面积的 RSD 值为 1.201%, 表明供试样品溶液在 18 h 内稳定性良好。

1.3.4.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的金槐样品粉末 5 份, 并向其中分别加入芸香苷对照品, 按供试品测定方法测定, 算得平均加样回收率为 99.45%, RSD 值为 1.54%。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 不同甲醇浓度对芸香苷提取率的影响 在固定料液比为 1 g : 10 mL、超声时间为 60 min、超声功率为 350 W 的条件下, 考察甲醇浓度为 60%、70%、80%、90%、100% 时芸香苷提取率的变化。由图 1 可知, 甲醇浓度为 70% ~ 90% 时, 随甲醇浓度增大, 芸香苷提取率增加, 当浓度达到 90% 后提取率不再增加, 说明此时芸香苷能溶于甲醇溶液中的含量达到最大。这可能是因为甲醇溶液浓度过高时, 会增加甲醇溶液的挥发, 使得一些脂溶性物质溶出, 影响了芸香苷的提取, 致使芸香苷提取率下降。所以确定最佳的甲醇浓度为 90%。

2.1.2 不同超声时间对芸香苷提取率的影响 在甲醇溶液浓度为 80%、料液比为 1 g : 10 mL、超声功率为 350 W 条件下, 考察超声时间为 30、40、50、60、70 min 时芸香苷提取率的变化。由图 2 可知, 随着超声时间的延长, 芸香苷提取率呈现小幅度波动, 但整体变化不大, 其中提取率最大值出现在超声时间为 60 min 时。因此本试验固定超声时间为 60 min。

2.1.3 不同料液比对芸香苷提取率的影响 在固定甲醇溶液浓度为 80%、超声时间为 60 min、超声功率为 350 W 条件下, 分别考察料液比为 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50、1 : 60 (g : mL) 时芸香苷提取率的变化。由图 3 可知, 芸香苷提取率随溶剂体积的增加而增加, 这是因为溶剂和芸香苷的接触面积增大使芸香苷更易溶出; 但当料液比达到 1 g : 50 mL 之后, 随着料液比继续增加提取率趋于稳定。因此确定最佳料液比为 1 g : 50 mL。

液比、甲醇溶液浓度、超声功率为主要因素, 根据 Box - Behnken Design 试验设计原理, 对考察因素和其水平进行设计, 其中分析因子 12 个、零点 5 个, 共 17 个试验点, 零点试验进行 5 次, 以估计误差, 结果见表 3。

多元拟合分析, 主要运用 Design - Expert 8.0 软件及表 3 获得的相关数据, 得出如下拟合方程: $Y = 22.62 + 4.62A + 0.57B - 1.03C + 0.75AB - 2.91AC - 1.20BC - 4.68A^2 - 0.58B^2 + 0.80C^2$; Y 表示提取率。由表 4 可知, 试验模型显著

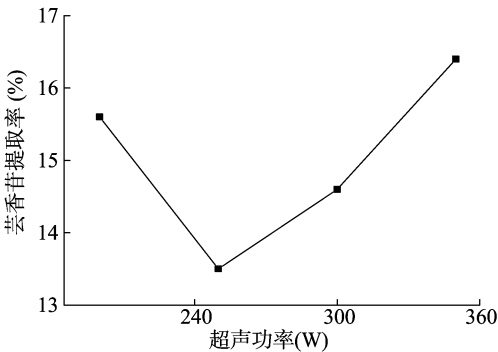


图4 超声功率对芸香苷提取率的影响

表 3 响应面试验设计和试验结果

试验次数	A: 甲醇溶液浓度	B: 料液比	C: 超声功率	提取率 (%)
1	1	0	1	19.21
2	-1	1	0	12.68
3	0	0	0	22.55
4	0	0	0	23.00
5	-1	-1	0	12.60
6	1	0	-1	27.30
7	0	1	-1	25.33
8	0	-1	1	22.75
9	-1	0	1	16.00
10	0	0	0	22.52
11	0	-1	-1	22.21
12	1	1	0	23.63
13	1	-1	0	20.54
14	-1	0	-1	12.45
15	0	1	1	21.05
16	0	0	0	22.50
17	0	0	0	22.53

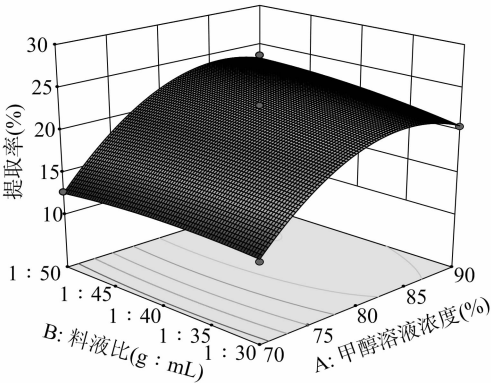


图5 甲醇溶液浓度和料液比对提取率交互影响的三维曲面图和等高线

图 6 为甲醇溶液浓度和超声功率的交互作用与芸香苷提取率间关系的等高线图 and 三维曲面图, 固定料液比为 1 g : 40 mL。芸香苷提取率在甲醇溶液浓度、超声功率较小时变化较大; 当超声功率处于低水平, 而甲醇溶液浓度处于高水平时, 芸香苷提取率达到最高; 当超声功率一定时, 随着甲醇浓度的增加, 芸香苷提取率的变化较大, 说明这 2 个因素间的交互作用明显。

图 7 为料液比和超声功率的交互作用与芸香苷提取率间关系的等高线图 and 三维曲面图, 固定甲醇浓度为 80%。由图

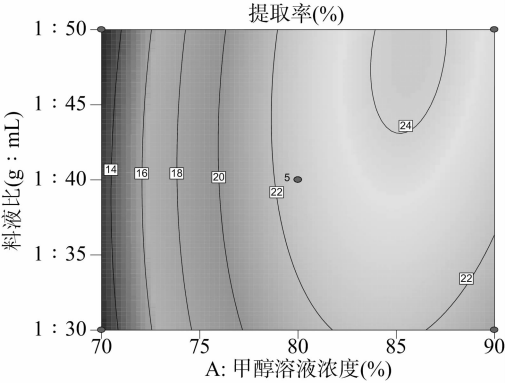
性值小于 0.01, 说明试验模型中的二项式方程较符合实际提取情况, 较好地反映了料液比、甲醇溶液浓度和超声功率与芸香苷提取率间的关系, 并且表明甲醇溶液浓度和料液比间、甲醇溶液浓度和超声功率间以及料液比和超声功率间的交互作用对芸香苷提取率的影响极显著。

表 4 响应面方差分析二次模型方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
模型	319.85	9	35.540	340.45	<0.000 1 **
A	170.66	1	170.660	1 634.87	<0.000 1 **
B	2.63	1	2.630	25.23	0.001 5 **
C	8.57	1	8.570	82.09	<0.000 1 **
AB	2.27	1	2.270	21.70	0.002 3 **
AC	33.87	1	33.870	324.48	<0.000 1 **
BC	5.81	1	5.810	55.64	0.000 1 **
A ²	92.07	1	92.070	882.01	<0.000 1 **
B ²	1.42	1	1.420	13.63	0.007 7 **
C ²	2.67	1	2.670	25.57	0.001 5 **
残差	0.73	7	0.100		
失拟性	0.55	3	0.180	4.03	0.105 9
纯误差	0.18	4	0.045		
总和	320.58	16			

注: ** 表示在 0.01 水平上差异显著。

2.2.2 响应面分析因素之间的交互作用 图 5 为超声功率 300 W 条件下, 甲醇溶液浓度和料液比的交互作用与芸香苷提取率间关系的等高线图和三维曲面图。由图 5 可知, 当甲醇溶液浓度和料液比较小时, 提取率变化较大; 且甲醇浓度和料液比逐渐增大到较大值时, 提取率也逐渐增大; 当增大到一定水平时, 提取率却逐渐下降, 说明甲醇溶液浓度和料液比 2 个因素交互作用明显。当料液比一定时, 增加甲醇溶液浓度不一定会提高提取率, 可能是因为甲醇浓度增大使得金槐中的脂溶性物质溶解量增多, 从而抑制了芸香苷的溶解。



7 可知, 当料液比较大时, 芸香苷提取率随着超声功率的增大逐渐减小; 而当超声功率一定时, 芸香苷提取率随着料液比的增大却不一定增加, 说明 2 个因素间的交互作用明显, 且当料液比处于高水平, 超声功率处于低水平时达到最大值。

2.2.3 最佳提取条件的确定和验证 结合 Design - Expert 8.0, 综合分析 with 试验可操作性、芸香苷提取率有关的各个因素, 得出最优超声工艺为甲醇浓度 88.87%, 料液比 1 g : 50 mL, 超声功率 250 W, 此时芸香苷提取率的预测值为 35.32%。采用上述最优工艺进行验证, 重复试验 3 次, 得到

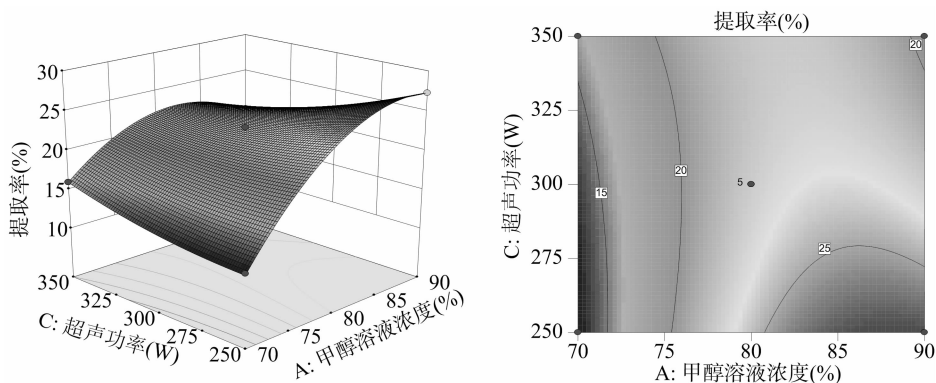


图6 甲醇溶液浓度和超声功率对提取率交互影响的三维曲面图和等高线

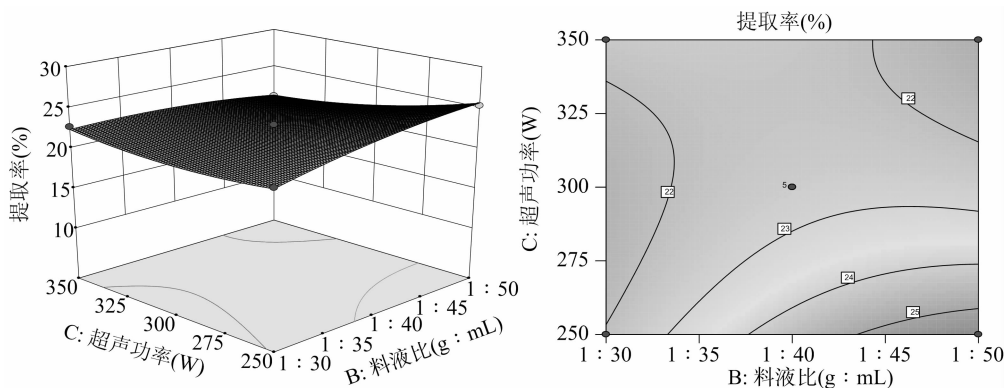


图7 料液比和超声功率对提取率交互作用影响的三维曲面图和等高线

芸香苷提取率为 33.19%，与预测值相差无几，说明该超声辅助工艺准确性和可靠性高。

3 讨论

选择全面试验中最具代表性的部分，结合试验、极差分析，并获得最优因素组合的方法即为正交试验法，此法具有简单易行的特点，但不能对各个因素效应、交互作用进行分析^[9]。而响应面法则针对具体范围利用爬坡试验得出可代表各因素交互关系的条件组合，此法更具直观性、精确性^[10-11]。

本研究以广西壮族自治区桂北金槐糯米为试验对象，甲醇超声为提取方法优选出金槐糯米中芸香苷的最佳提取方法。超声提取具有操作简单、提取效率高的优势，且超声提取为物理方法，在提取过程中能有效避免成分被破坏。同时采用 Design-Expert 8.0 软件，对超声波辅助提取法提取芸香苷工艺进行优化，与传统的优化方法——正交试验法或均匀设计法相比，能通过直观的图形、精确度较高的数学模型对最佳工艺进行优化，具有信息量大、直观、数据处理能力较高且能反映各个因素之间交互作用的优点。本研究得到响应面法优化超声波辅助法提取糯米的最佳工艺为料液比 1 g : 50 mL、超声功率 250 W、甲醇浓度 88.87%。择优选取的提取工艺不仅操作简单而且提取效率更高，有利于缩短提取时间，为进一步开发金槐中的芸香苷提供了科学合理的理论和试验依据。

参考文献:

- [1] 蒋运生. 金槐规范化种植技术(一)[J]. 广西林业, 2013(5): 48-49.
- [2] 李 锋, 唐 辉, 韦 霄, 等. 广西全州县金槐生产存在的问题及发展对策[J]. 广西科学院学报, 2009, 25(2): 130-134.
- [3] 谢 锋. 金槐糯米品质及规范化种植关键技术研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [4] 胡斌杰, 陈金锋, 王宫南. 超声波法与传统热水法提取灵芝多糖的比较研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 190-192.
- [5] Zhao C J, Lu Z C, Li C, et al. Optimization of ionic liquid based simultaneous ultrasonic - and microwave - assisted extraction of rutin and quercetin from leaves of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) by response surface methodology[J]. Scientific World Journal, 2014, 28: 3024-3025.
- [6] 刘金玉, 吴秀华, 商雪娇, 等. 不同大孔吸附树脂对苦荞芦丁分离纯化效果的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 22-24.
- [7] 王 筠, 李全良, 刘 芳. 超声辅助提取红枣中芦丁的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2013(1): 115-117.
- [8] 王胜利, 孙金香, 席改卿, 等. 槐花中芦丁超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 306-308.
- [9] 黄 菊, 翟淑敏. 正交设计和响应面法优化荞麦中芦丁提取工艺的比较[J]. 粮食与油脂, 2014(9): 45-48.
- [10] 王振强, 李孝坤, 王 浩. 响应面法优化超声辅助提取番茄皮渣中番茄红素工艺及其 HPLC-MS 测定[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 70-75.
- [11] 夏 季, 郑 炯, 陈光静, 等. 响应面法优化超声辅助提取野木瓜多酚工艺[J]. 食品工业科技, 2014, 35(21): 253-258.
- [12] Liao J Q, Qu B D, Liu D, et al. New method to enhance the extraction yield of rutin from *Sophora japonica*, using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 27: 110-116.
- [13] 王省超, 孙 颖, 王瑞英, 等. 超声提取-高效液相色谱法同时测定新疆罗布麻茶中绿原酸和芦丁的含量[J]. 分析科学学报, 2016, 32(3): 431-434.