

薛晓丽,费 洋,杨丽娟. 响应曲面法优化金丝桃素提取工艺的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):221-223.

# 响应曲面法优化金丝桃素提取工艺的研究

薛晓丽<sup>1,2</sup>, 费 洋<sup>3</sup>, 杨丽娟<sup>4</sup>

(1. 长白山动植物利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林吉林 132101; 2. 吉林农业科技学院实验中心, 吉林吉林 132101;  
3. 吉林农业科技学院中药学院, 吉林吉林 132101; 4. 吉林农业科技学院文理学院, 吉林吉林 132101)

**摘要:**优化从贯叶连翘粗提取物中提取金丝桃素的工艺条件。在单因素试验基础上,采用响应曲面法,以金丝桃素的提取率为响应值,通过回归分析各工艺参数与响应值之间的关系,预测最佳提取工艺条件。结果表明:金丝桃素最佳提取条件为:浸提温度 80 ℃,浸提时间 105 min,液料比 75 mL:1 g,甲醇体积分数 85%,比条件下提取率为 3.72%。验证试验证明此法合理高效,预测准确,方便可行。

**关键词:**响应曲面法;金丝桃素;提取;工艺条件优化

**中图分类号:** R284.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0221-03

金丝桃素属联苯二萜酮类物质,分子式  $C_{30}H_{16}O_8$ , 广泛分布于贯叶金丝桃 (*Hypericum perforatum*)、乌腺金丝桃 (*H. attenuatum*)、长柱金丝桃 (*H. ascyron*) 等植物中。近年来,金丝桃素在抗肿瘤的光化学治疗、抗病毒(包括 HIV)、抗抑郁机制研究等方面十分活跃。已有研究表明,金丝桃素作为有效的光敏剂,通过光动力学治疗可以有效地诱导肿瘤细胞凋亡,临床上已用于治疗基体细胞癌、胰腺癌、膀胱癌甚至脑瘤等<sup>[1-4]</sup>。另外,近年来大量试验已证明,金丝桃素为广谱抗病毒的中草药活性单体,对多种畜禽传染病有良好防治效果。已有不少文献报道了用金丝桃素防治猪高热病、鸡新城疫、鸭病毒性肝炎等<sup>[5-9]</sup>的事例,使其成为继红豆杉、人参和银杏叶之后,国内外研究的又一个热点,在新药开发上具有重大意义<sup>[10]</sup>。金丝桃素具有特殊理化性质及其在光和热的作用下易分解、易氧化变质的特性,故其提取率和产品纯度都较低,制约了其深入研究和制药工艺的发展。本试验以甲醇为溶剂,采用易于工业化生产的热浸提取方法,以金丝桃素提取率为考察指标,以提取时间、液固比、提取温度、甲醇体积分数为提取工艺的主要影响因素,通过单因素试验确定影响较大的 3 个因素,采用响应曲面法(response surface methodology)进行优化,确定从贯叶连翘粗提物中提取金丝桃素的最佳工艺。响应曲面法是目前广泛应用于天然产物中有效化学成分提取工艺优化的一种数据处理方法<sup>[11-13]</sup>,具有简便、试验精度高的优点,使用该方法优化后的的金丝桃素提取率有明显的提高,为金丝桃素提取的工业化生产提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

供试材料为贯叶连翘粗粉,购于西安康培基生物科技有

限公司。材料阴干至恒重,备用。金丝桃素对照品,购于上海融禾医药科技有限公司,纯度 >98%。

试剂包括甲醇、石油醚,均购于天津永大化学试剂有限公司,去离子水由实验室自制。

### 1.2 仪器

紫外分光光度计(岛津 UV-2450);恒温水浴锅(金坛医疗仪器厂 HH-S4);分析天平(梅特勒 AL204);超纯水机(密理博-Q3)等。

### 1.3 方法

**1.3.1 金丝桃素提取** 将贯叶连翘粗粉阴干样品过 20 目筛,用石油醚在 55 ℃脱脂 3 次,干燥备用。精确称取一定量样品,加入到一定量、一定体积分数的甲醇溶液中,置于一定温度的水浴锅中,浸提一定时间后,离心,定容。将提取液稀释 10 倍后,置紫外分光光度计中 590 nm 下检测吸光度。每个试验 3 次平行,取平均值,结果以提取率( $E$ )表示。 $E = [(C \times V)/m] \times f \times 100\%$ , 式中: $C$  为金丝桃素的质量浓度( $\mu\text{g/mL}$ ); $V$  为加入溶剂的体积( $\text{mL}$ ); $m$  为样品的质量( $\text{g}$ ); $f$  为稀释倍数。

**1.3.2 标准曲线绘制** 精确称取金丝桃素对照品 5.1 mg,加入到甲醇定容至 25 mL 的容量瓶中,摇匀,配成质量浓度为 0.204 mg/mL 的对照品溶液,将此溶液稀释 10 倍后做为标准母液。准确量取适量标准母液,定容至 10 mL 容量瓶中,配成浓度为 1.280~20.40  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液。置紫外分光光度计中 590 nm 下检测吸光度,绘制标准曲线,得回归曲线  $y = 0.5992x + 0.2487$ ,  $r^2 = 0.9999$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

**2.1.1 液固比对金丝桃素提取率的影响** 在温度 80 ℃、甲醇体积分数 85%、提取时间 110 min 的条件下,考察液固比 25:1~125:1( $\text{mL/g}$ )对提取率的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,液固比从 25 mL:1 g 到 75 mL:1 g 递增时,金丝桃素提取率显著增加,液固比从 75 mL:1 g 增加到 125 mL:1 g 时,提取率微弱下降,说明液固比在 75 mL:1 g~125 mL:1 g 区间对金丝桃素的提取率影响不大,因此,在做

收稿日期:2013-08-27

基金项目:长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室 2012 年一般基金(编号:吉农院合字[2012]第 706 号)。

作者简介:薛晓丽(1970—),女,吉林永吉人,硕士,高级实验师,主要从事天然产物化学的教学与科研工作。E-mail: hilyxue4222@hotmail.com。

响应面分析时排除该因素的影响。

2.1.2 提取温度对金丝桃素提取率影响 在液固比 75 mL : 1 g、甲醇体积分数 85%、提取时间 110 min 的条件下,考察提取温度 60、70、75、80、85 ℃对金丝桃素提取率的影响,结果见图 2。由图 2 可以看出,在 80 ℃之前,随温度的升高,金丝桃素提取率不断增加,在 80 ℃时提取率达到最大;80 ℃后提取率迅速下降。主要是由于温度过高,金丝桃素迅速分解,使提取率大大下降,因此选择提取温度为 80 ℃。

2.1.3 提取时间对金丝桃素提取率的影响 在液固比

75 mL : 1 g、提取温度 80 ℃、甲醇体积分数 85% 的条件下,考察提取时间 50、70、90、110、130 min 对金丝桃素提取率的影响,结果见图 3。由图 3 可以看出,金丝桃素提取率随提取时间延长而逐渐增加,在提取 110 min 时达到最大值,随后减小。这可能是由于提取时间过长,金丝桃素有部分分解,另外一些糖类和蛋白质杂质慢慢溶出,使得溶液黏度增大,金丝桃素被吸附在固体基质上而不易被提取出来。因此应选择 110 min 作为最佳的提取时间。

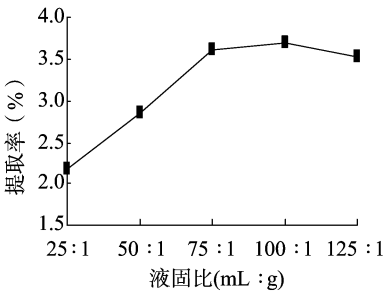


图1 液固比对金丝桃素提取率的影响

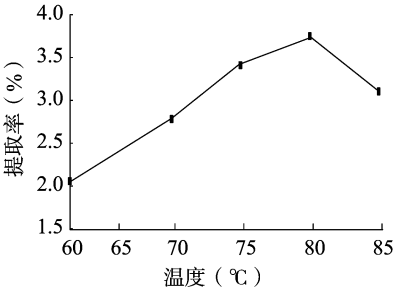


图2 提取温度对金丝桃素提取率影响

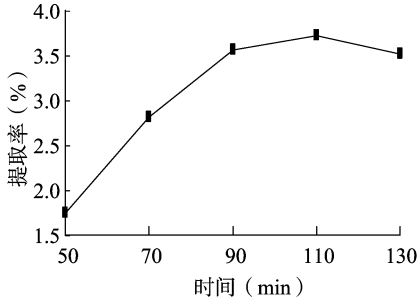


图3 提取时间对金丝桃素提取率的影响

2.1.4 甲醇体积分数对金丝桃素提取率的影响 在液固比 75 mL : 1 g、提取时间 110 min、提取温度 80 ℃的条件下,考察甲醇体积分数 70%、75%、80%、85%、90%、95%对提取率的影响,结果见图 4。由图 4 可知,金丝桃素在甲醇体积分数 85%时提取率最高。主要与样品中有很多极性不同的化合物有关,不同化合物最适合的溶剂极性各不相同。因此,金丝桃素提取率会随着甲醇体积分数的增加先增大后减小,因此,甲醇体积分数以 85% 为最佳。

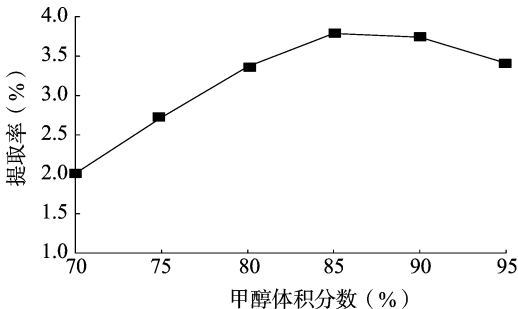


图4 甲醇体积分数对金丝桃素提取率的影响

2.2 响应曲面法优化金丝桃素的提取工艺

2.2.1 响应曲面试验设计及结果 为优化金丝桃素的提取工艺条件,采用经典的 3 因素 3 水平 Box - Behnken Design (BBD) 试验设计。在单因素试验基础上,精确称取 0.200 g 贯叶连翘粗提物于具塞塑料管中,选取对金丝桃素提取率有较大影响的提取时间(A)、提取温度(B)、甲醇体积分数(C)3 因素进行优化。具体方案及结果见表 1、表 2。

表 1 金丝桃素提取响应曲面试验因素水平

水平	A:提取时间 (min)	B:提取温度 (℃)	D:甲醇体积分数 (%)
-1	90	75	80
0	110	80	85
1	130	85	90

表 2 金丝桃素提取响应曲面试验方案及结果

试验号	A:提取时间	B:提取温度	C:甲醇体积 分数	提取率 (%)
1	-1	-1	0	2.80
2	0	0	0	3.72
3	0	0	0	3.76
4	-1	0	-1	2.88
5	0	-1	-1	2.85
6	1	-1	0	3.41
7	0	1	1	3.87
8	0	-1	1	3.42
9	1	0	1	3.68
10	0	1	-1	3.35
11	-1	1	0	3.45
12	1	1	0	3.69
13	0	0	0	3.73
14	1	0	-1	3.57
15	-1	0	1	3.30
16	0	0	0	3.75
17	0	0	0	3.72

2.2.2 模型评价 利用 Design Expert 7.0 软件对表 2 试验数据进行二次多项式逐步回归拟合,得到的数学模型为:

$$Y = 3.72 + 0.23A + 0.21B + 0.19C - 0.093AB - 0.065AC - 0.063BC - 0.19A^2 - 0.20B^2 - 0.20C^2$$

其中二次多项式的确定系数  $R^2 = 99.01\%$ ,  $R^2_{Adj} = 97.73\%$ , 模型的矫正确定系数  $R^2_{Pred} = 84.14\%$ , 表明方程拟合程度较好。 $R^2_{Pred}$  的值与  $R^2_{Adj}$  的值在一致性上是合理的。此模型可以被用来指导设计响应面。对回归模型进行方差分析,分析结果和各项系数显著性检验结果见表 3。

从表 3 可以看出,模型拟合度达到了极显著水平 ( $P < 0.001$ ),而误差项差异不显著,说明回归方程与实际情况比较吻合,试验误差比较小。因此可以用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。方差分析还表明,一次项、二次项都有较显著影响,回归模型中有极显著作用的项有 A、B、

表 3 回归模型各项方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.67	9	0.19	77.64	<0.000 1
A	0.44	1	0.44	182.40	<0.000 1
B	0.35	1	0.35	147.22	<0.000 1
C	0.29	1	0.29	118.93	<0.000 1
AB	0.034	1	0.034	14.28	0.006 9
AC	0.017	1	0.017	7.05	0.032 7
BC	0.016	1	0.016	6.52	0.037 9
AA	0.14	1	0.14	60.13	0.000 1
BB	0.16	1	0.16	68.53	<0.000 1
CC	0.17	1	0.17	70.28	<0.000 1
残差	0.017	7	0.002 39		
缺失项	0.017	3	0.005 59	0.74	
纯误差	0.001	4	0.000 1		
总和	1.69	16			

C、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>。

2.2.3 响应曲面分析 由图 5 可以看出,提取率随提取温度

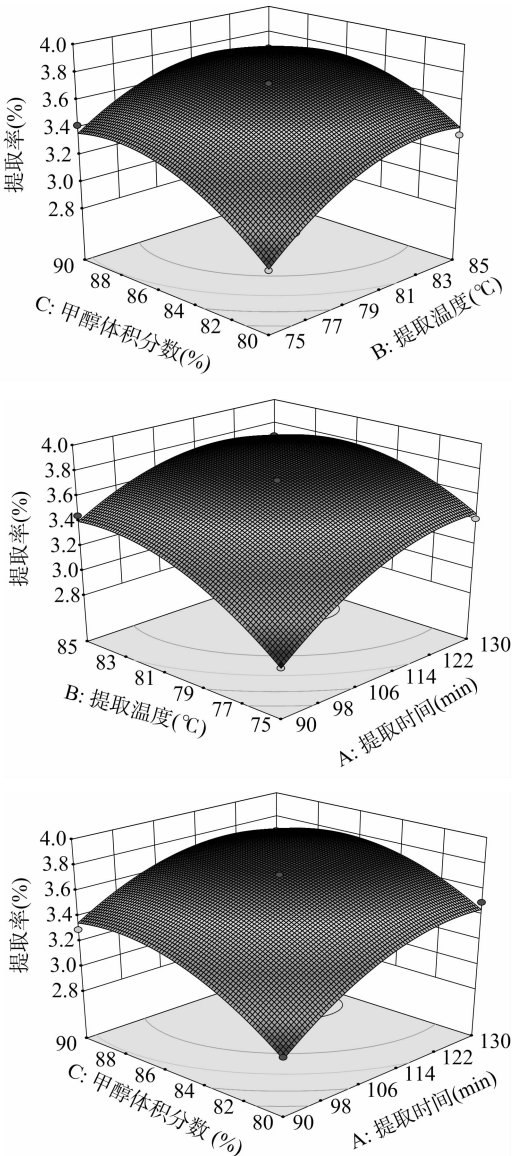


图5 金丝桃素提取工艺的响应曲面分析

的变化幅度较大,其次是提取时间变化对提取率的影响,而甲醇体积分数的变化对提取率的影响幅度较平缓。可见,提取温度对提取率的影响最为显著。通过优化分析,最佳的提取条件为:提取温度 78.8 ℃,甲醇体积分数 87.5%,提取时间 103.78 min,液固比 75 mL : 1 g,预测金丝桃素提取率为 3.72%。但考虑到实际操作的限制性,将金丝桃素的提取工艺修正为:提取温度 80 ℃,甲醇体积分数 90%,提取时间 105 min,液固比 75 mL : 1 g。在此条件下提取 3 次,金丝桃素的平均提取率为 3.714%,与预测值基本相符,证实了该方程的准确性和实用性。

3 结论

采用单因素试验及响应曲面法对金丝桃素提取工艺条件进行优化,通过回归分析建立相关性良好的方程,得到的最佳的提取工艺为:提取温度 80 ℃,甲醇体积分数 90%,提取时间 105 min,液固比 75 mL : 1 g。试验值与预测值相符,证实该方程的准确性和实用性。

需要注意的是,在配制金丝桃素标准溶液时应注意其不易溶及见光易分解的问题,操作时要求操作者能熟练掌握仪器的使用及药品的配制。

参考文献:

[1] 高丽芳,孟 艳,赵雪俭,等. 光活化的金丝桃素对人前列腺癌细胞 PC3M 的生长抑制作用[J]. 吉林大学学报:医学版,2004,30 (1):97-99.

[2] 王晓利,刘金钊,张俊松,等. 光源对金丝桃素光动力体外抗肿瘤作用的影响[J]. 华西药杂志,2008,23(1):47-49.

[3] 王晓利,王彩虹,郭 懿,等. 光诱导金丝桃素对人鼻咽癌细胞 CNE-2 的毒作用和凋亡研究[J]. 中成药,2010,32(8):1296-1300.

[4] 王晓利,张俊松,刘金钊,等. 贯叶金丝桃中金丝桃素提取物对人肺癌细胞 A549 的体外杀伤效应[J]. 中成药,2007,29(7):1058-1061.

[5] 王 玲,索朗斯珠,马俊英. 金丝桃素的提取分离及其药理活性研究现状[J]. 动物医学进展,2005,26(5):32-35.

[6] 胡冬华,高 颖,邵 琛,等. 贯叶连翘有效成分金丝桃素与 HIV 逆转录酶相互作用的研究[J]. 分子科学学报,2008,24(4):280-283.

[7] 曲晓波,苏忠民,胡冬华,等. 金丝桃素分子结构及其与 HIV 病毒蛋白酶作用的分子动力学研究[J]. 高等学校化学学报,2009,30 (7):1402-1405.

[8] 周广生. 中药金丝桃素口服液防治鸡新城疫的试验[J]. 上海畜牧兽医通讯,2008(6):65.

[9] 周广生. 中药金丝桃素口服液治疗鸭病毒性肝炎的试验研究[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(12):128-129.

[10] 汤国祥. 使用金丝桃素联合用药治疗猪高热病[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2009,10(增刊1):129-130.

[11] 孔 涛,范杰平,胡小芳,等. 响应面法优化超声辅助提取车前草中的熊果酸[J]. 食品科学,2011(6):80-84.

[12] 肖卫华,韩鲁佳,杨增玲,等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报,2007,12(5):52-56.

[13] 胡成旭,侯欣彤,冯永宁,等. 响应面法优化云芝多糖提取条件的研究[J]. 食品工业科技,2007,7(7):124-126,130.