

响应面设计法优化仙鹤草总多酚的超声提取工艺

徐秀泉^{1*},李峰²,汤建¹,许源¹

¹江苏大学药学院,镇江 212013;²江苏大学附属医院,镇江 212001

摘要:在单因素实验的基础上,采用响应面分析法对影响超声辅助提取仙鹤草总多酚得率的主要因素(超声温度、料液比和乙醇浓度)进行优化,建立了影响因素与总多酚之间的函数关系。获得最佳工艺条件为:71%乙醇,料液比 1:24,超声提取温度 60 ℃,提取时间 20 min。在此最佳条件下,总多酚得率为 3.56%,试验结果与模型预测值相符。

关键词:仙鹤草;总多酚;超声提取;响应面设计法

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. by Response Surface Methodology

XU Xiu-quan^{1*}, LI Feng², TANG Jian¹, XU Yuan¹

¹College of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

²Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

Abstract: Response surface methodology (RSM) was used to optimize ultrasonic-assisted extraction for total polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. based on single-factor experiment. The main factors extraction temperature, liquid-material ratio and ethanol concentration were determined. The relationship between influencing factors and response values was established. The optimum extraction conditions were as follows: the extracting solvent was 71% ethanol, solid-liquid ratio was 1:24, extracting temperature was 60 ℃, and extracting time was 20 min. Under these conditions, the maximal yield of total polyphenols reached 3.56%, which was well matched with the predicted content.

Key words: *Agrimonia pilosa* Ledeb.; total polyphenols; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology

植物多酚是植物次生代谢产物中的重要类型之一,主要由黄酮、单宁等物质构成,因其具有显著的抗氧化、抗癌、抗炎及抗突变活性而引起人们的广泛关注^[1]。仙鹤草为蔷薇科龙芽草属植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的全草,在我国具有悠久的药用历史,主要用于治疗衄血、咯血、尿血、便血、崩漏等各种出血证^[2]。其中酚类物质为仙鹤草酚 A~E,山萘酚、槲皮素及其苷类是其抗氧化、抗炎、抗肿瘤的主要有效成分^[3,4],因此研究仙鹤草多酚化合物的提取工艺对仙鹤草的深入开发利用具有重要的意义。

近年来,陈优生^[5]等采用正交设计法优化了仙鹤草总黄酮的提取工艺,赵立芳^[6]等采用单因素实验法考察了影响仙鹤草鞣质提取得率的主要因素,

为中药材仙鹤草的利用提供了实验基础,但采用超声提取仙鹤草中有效成分的工艺还未见报道。超声波具有强大的传质作用和空化作用,使溶剂分子迅速渗透到组织细胞中,与溶质充分接触,可以显著提高有效成分的提取率,广泛用于多酚等化合物的提取过程中^[7,8]。本文在单因素预试验的基础上,采用响应面设计方法优化仙鹤草总多酚超声提取工艺参数,为更好地开发该传统中药提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

仙鹤草购自江苏镇江九泰医药有限公司,干燥、粉碎过 16 目筛备用。

试验试剂:没食子酸, Folin-Ciocaltean 试剂购自 Sigma 公司,药用乙醇购自国药集团。

1.2 仪器与设备

UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);DHG-9145 鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公

收稿日期:2011-03-18 接受日期:2011-06-24

基金项目:镇江市社会发展项目(SH2010033)

*通讯作者 Tel:86-511-85038403;E-mail:xxq781026@sohu.com

司);KQ-250DB 型超声波仪(昆明市超声仪器有限公司);BS 110 S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)

1.3 实验方法

1.3.1 标准曲线的绘制

精密称取没食子酸对照品 25.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加乙醇适量溶解,定容至刻度,摇匀,取上述溶液 2.5 mL 定容至 25 mL 溶液即得 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 没食子酸标准溶液。分别精密量取该标准溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,分别加入福林酚试剂 0.5 mL,振摇 1 min,再加入 20% 碳酸钠溶液 2 mL,摇匀,加溶剂至刻度,在室温放置 2 小时。以相应的试剂溶液为空白,按分光光度法,在 750 nm 处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得 $Y = 0.0147X - 0.0017, R^2 = 0.9994$,结果表明没食子酸在浓度 $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

1.3.2 仙鹤草总多酚的提取及含量测定

准确称取 1.000 g 仙鹤草粉末,加入一定体积分数的乙醇溶液 20 mL,在一定温度超声提取规定时间,离心后按照标准曲线项下测定样品吸光度,计算多酚得率。

2 结果与分析

2.1 响应面实验设计

2.1.1 响应面试验安排及试验结果

根据中心组合设计原理,结合响应面分析方法,综合单因素预试验结果,固定提取时间 20 min,以料液比、乙醇浓度、超声温度三个因素为自变量,总多酚的提取得率为响应值,设计 3 因素 3 水平共 17 个实验点的响应面分析实验。对提取温度、料液比、乙醇浓度作如下变化: $X_1 = (x_1 - 50)/10, X_2 = (x_2 - 20)/50, X_3 = (x_3 - 60)/20$,因素水平分析选取见表 1。实验方案与结果见表 2,其中 12 个为析因实验,5 个为中心实验。

表 1 响应面因素水平编码表

Table 1 Factors and levels of RSM test

因素 Factor	代码 Code	编码水平 Level		
		- 1	0	1
提取温度 Temperature (°C)	x_1	40	50	60

料液比 Solid-liquid ratio (g/mL)	x_2	1:15	1:20	1:25
乙醇浓度 Concentration (%)	x_3	40	60	80

表 2 响应面分析试验结果

Table 2 Design and results of RSM test

试验号 No.	编码值 Unicode			总多酚得率 Polyphenols yield (%)
	X_1	X_2	X_3	
1	- 1	- 1	0	2.43
2	- 1	1	0	3.14
3	- 1	0	1	2.80
4	- 1	0	- 1	2.75
5	1	- 1	0	3.01
6	1	1	0	3.58
7	1	0	- 1	3.12
8	1	0	1	3.36
9	0	1	- 1	2.92
10	0	1	1	3.42
11	0	- 1	1	2.75
12	0	- 1	- 1	2.60
13	0	0	0	3.29
14	0	0	0	3.34
15	0	0	0	3.30
16	0	0	0	3.31
17	0	0	0	3.36

2.1.2 建立模型方程与显著性检验

应用 Design-Expert 7.1.6 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合,得到超声温度(X_1)、料液比(X_2)、乙醇浓度(X_3)与仙鹤草总多酚之间的二次多项回归方程:

$$Y = 3.32 + 0.24 X_1 + 0.28X_2 + 0.12X_3 - 0.035 X_1 X_2 + 0.048 X_1 X_3 + 0.088X_2 X_3 - 0.09X_1^2 - 0.18 X_2^2 - 0.21 X_3^2$$

对上述回归模型进行显著性检验,结果见表 3。

表 3 仙鹤草总多酚提取率方差分析结果

Table 3 AVONA of total polyphenols extraction rate of *Agrimonia pilosa* Ledeb.

方差来源 Source	平方和 SS	自由度 V	均方和 MS	F 值 F	显著性水平 $P > F$
X_1	0.48	1	0.48	106.90	< 0.0001 ***
X_2	0.64	1	0.64	144.86	< 0.0001 ***

X_3	0.11	1	0.11	24.84	0.0016**
X_1X_2	0.005	1	0.005	1.10	0.7328
X_1X_3	0.009	1	0.009	2.03	0.1973
X_2X_3	0.031	1	0.031	6.89	0.0342*
X_1^2	0.04	1	0.04	9.00	0.0199*
X_2^2	0.14	1	0.14	31.54	0.0008**
X_3^2	0.19	1	0.19	43.77	0.0003**
残差 Residual	0.031	7	0.004		
失拟项 Lack of Fit	0.028	3	0.009	10.87	0.0215
误差 Pure Error	0.003	4	0.0008		
总离差 Cor Total	1.72	16			
模型 Model	1.69	9	0.19	42.19	<0.0001***
模型的确定系数 0.9809			模型的调整确定系数 0.9586		

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

由表3回归方差显著性检验表明,一次项超声提取时间、温度对总多酚得率的线性效应极显著,乙醇浓度对多酚得率的线性效应显著;二次项料液比、乙醇浓度对总多酚提取率的曲面效应极显著;比较各因子间交互作用不显著。在本实验设计范围内回归方程显著性检测 $P = 0.0001$,极显著,模型的确定系数为0.9809,说明该模型能解释98.09%响应值的变化,即该模型与实际实验拟合良好,试验误差小,证明应用响应曲面法优化的提取工艺提取仙鹤草总多酚是可行的。

2.1.3 响应曲面分析

根据回归方程,做出响应面和等高线,考察拟合响应面的形状,分析超声温度、料液比和乙醇浓度对仙鹤草总多酚提取率的影响,如图1~3所示。等高线的形状可反应交互效应的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反。从图1~3中

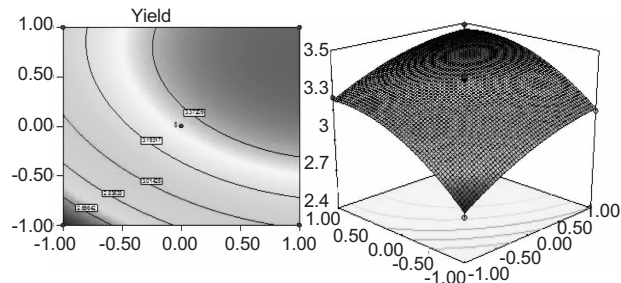


图1 超声温度和料液比对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 1 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of extraction temperature and material-liquid ratio on extraction rate

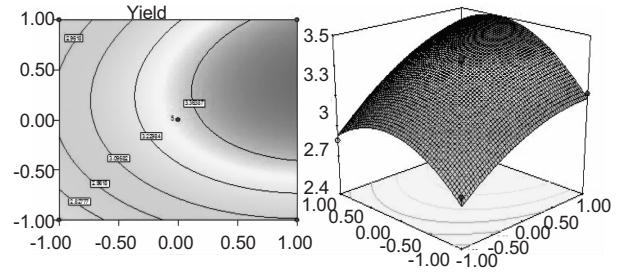


图2 超声温度和乙醇浓度对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 2 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of extraction temperature and ethanol concentration on extraction rate

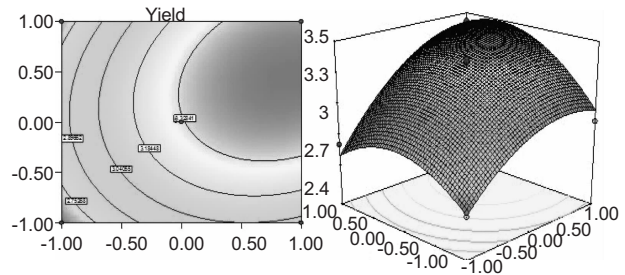


图3 料液比和乙醇浓度对总多酚提取得率影响的等高线和响应面图

Fig. 3 Response surface plots and contour plots of mutual-influence of material-liquid ratio and ethanol concentration on extraction rate

可以看出,各因素间的交互作用不显著。从等高线图可以看出极值条件应在圆心处,三因素对仙鹤草总多酚的提取都有显著的影响,超声提取温度的影响最为显著,随温度提高,总多酚得率随之增大,表现为等高线更为陡峭;料液比和乙醇浓度次之,表现为等高线曲线较平滑。

2.1.4 提取工艺条件的确定

为验证仙鹤草总多酚超声提取模型方程的适用性,对回归方程求导,并令其等于零,可以得到曲面的最大点,即三个主要因素的最佳水平值,分别为: $X_1 = 1$ 、 $X_2 = 0.81$ 、 $X_3 = 0.55$,转换后得到提取的最佳条件为:71%乙醇,料液比1:24,超声提取温度60℃,提取时间20 min,预测仙鹤草总多酚得率为3.61%。按照最佳试验条件重复试验3次,计算多酚得率,求其平均值为3.56%,实际与预测的多酚得率较为接近,充分验证了所建模型的正确性,说明响应面分析方法适用于仙鹤草总多酚的超声提取工艺的优化。

3 结论

采用响应面分析法对超声辅助提取仙鹤草总多酚的工艺条件进行优化,获得最佳提取工艺条件:71%乙醇,料液比1:24,超声提取温度60℃,提取时间20min,在此条件下仙鹤草总多酚得率为3.56%。超声提取方法简单,具有提取效率高、时间短、无需加热等优点,是一种较理想的提取仙鹤草多酚的方法。

参考文献

- 1 Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products; antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99: 191-203.
- 2 Pan Y(潘娅), Liu HX(刘红霞), Zhuang YL(庄玉磊), et al. Studies on isolation and identification of flavonoids in herbs of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 2925-2928.

- 3 Chun HH, Xiao WJ, Ying MP, et al. Antioxidant activity of alcoholic extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Med Chem Res*, 2010, 19: 448-461.
- 4 Taira J, Nanbu H, Ueda K. Nitric oxide-scavenging compounds in *Agrimonia pilosa* Ledeb. on LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Food Chem*, 2009, 115: 1221-1227.
- 5 Chen YS(陈永生), Zhang K(张焜), Wang X(王希). Optimization of extract technology of flavonoids in *Agrimonia pilosa* by orthogonal design test. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 14: 1389-1390.
- 6 Zhao LF(赵立芳), Zhang XL(张新利). Extracting tannin from *Herba Agrimoniae*. *J Baoji Coll Arts Sci* (宝鸡文理学院学报), 2000, 20: 196-197.
- 7 Ma YQ, Chen JC, Liu DH. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts; Effect of ultrasound. *Ultrason Sonochem*, 2009, 16: 57-62.
- 8 Wang J, Sun BG, Cao YP. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*, 2008, 106: 804-810.

(上接第131页)

- 40 Džubák P, et al. New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 3793-3810.
- 41 Li SS(李绍顺), et al. Total synthesis of 2R,3R(+)-silybin as an antihepatotoxic natural product. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1997, 7: 107-111.
- 42 She XG, et al. Total synthesis of (+)-Sinaiticin. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 4567-4570.
- 43 Gu WX, et al. First asymmetric synthesis of chiral 1,4-benzodioxane lignans. *Tetrahedron Lett*, 2000, 41: 6079-6082.
- 44 Stermitz FR, et al. Synergy in a medicinal plant; antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrocarpin, a multidrug pump inhibitor. *P Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1433-1437.
- 45 Stermitz FR, et al. 5'-Methoxyhydrocarpin-D and pheophorbide A; berberis species components that potentiate berberine growth inhibition of resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1146-1149.
- 46 Stermitz FR, et al. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump

- inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia* (sensu strictu) species. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 793-798.
- 47 Guz NR, Stermitz FR. Synthesis and structures of regioisomeric hydrocarpin-type flavonolignans. *J Nat Prod*, 2000, 63: 1140-1145.
- 48 Guz NR, et al. Flavonolignan and flavone Inhibitors of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance pump; structure-activity relationships. *J Med Chem*, 2001, 44: 261-268.
- 49 Yang LX, et al. Synthesis and antioxidant evaluation of novel silybin analogues. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2006, 21: 399-404.
- 50 Gong JX, et al. Synthesis and antioxidant properties of novel silybin analogues. *Chin Chem Lett*, 2006, 17: 465-468.
- 51 Saller R, et al. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 2001, 61: 2035-2063.
- 52 Jacobs BP, et al. Milk thistle for the treatment of liver disease; a systematic review and meta-analysis. *Am J Med*, 2002, 113: 506-515.
- 53 Gazak R, et al. Silybin and silymarin-new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 315-338.