

响应面法优化泡桐叶中熊果酸的超声波提取工艺

邢雅丽¹, 毕良武^{1,2*}, 赵振东^{1,2}, 夏田娟¹

¹中国林业科学研究院林产化学工业研究所 生物质化学利用国家工程实验室 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 南京 210042; ²中国林业科学研究院林业新技术研究所, 北京 100091

摘要:为探讨泡桐叶中熊果酸的超声波提取工艺,通过中心复合设计-响应面法研究乙醇浓度(X_1)、液固比(X_2)、超声波提取时间(X_3)对泡桐叶中熊果酸提取得率的影响。结果表明,各因素对熊果酸得率的影响顺序为乙醇浓度(X_1) > 超声波提取时间(X_3) > 液固比(X_2);超声波辅助提取泡桐叶中熊果酸的最优工艺条件为:乙醇浓度 89%,液固比 31 mL/g,超声时间 37 min;在此条件下,熊果酸得率为 14.80 mg/g,与预测值相近,二次回归模型预测性良好。

关键词:中心复合设计;泡桐叶;超声波提取;熊果酸

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.02.022

Optimization of Ultrasonic Extraction of Ursolic Acid from *Paulownia elongata* Leaves by Response Surface Methodology

XING Ya-li¹, BI Liang-wu^{1,2*}, ZHAO Zhen-dong^{1,2}, XIA Tian-juan¹

¹Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Laboratory for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Laboratory on Forest Chemical Engineering, SFA; Key Laboratory of Biomass Energy and Material, Jiangsu Province, Nanjing 210042, China; ²Research Institute of Forestry New Technology, CAF, Beijing 100091, China

Abstract: In order to investigate ultrasonic extraction technology of ursolic acid from *Paulownia elongata* leaves, central composite design coupled with response surface analysis was adopted to study the effects of ethanol concentration (X_1), ratio of liquid to solid (X_2) and ultrasonic time (X_3) on the extraction yield of ursolic acid. The results showed that the effects of ultrasonic factors on the extraction yield of ursolic acid from *P. elongata* leaves were in the following order: ethanol concentration (X_1) > ultrasonic time (X_3) > ratio of liquid to solid (X_2), and the optimal extraction conditions were as follows: 89% ethanol solution as extraction solution, 30 mL/g as the ratio of liquid to solid, 37 min as ultrasonic time. Under the optimal conditions, the extraction yield of ursolic acid reached 14.80 mg/g, which was close to the predicted response value. Hence, the quadratic regression model can be used to predict the ultrasonic extraction conditions of ursolic acid from *P. elongata* leaves.

Key words: central composite design; *Paulownia elongata* leaves; ultrasonic extraction; ursolic acid

泡桐 (*Paulownia elongata* S. Y. Hu) 为玄参科 (*Scrophulariaceae*) 泡桐属 (*Paulownia*) 多年生落叶乔木,生长迅速,材质优良,具有抑菌、消炎、抗病毒、抗氧化等药用价值^[1,2]。随着现代波谱技术在天然资源研究中的应用,泡桐因其所含黄酮、三萜等多种生物活性成分而受到学术界的广泛关注。熊果酸 (ursolic acid), 又称乌索酸或乌苏酸,是分布于植物界的 α -香树脂烷 (α -amyrane) 型五环三萜类化合物,

具有保肝、抗炎、抑菌、抗溃疡、降血糖血脂等多种生物活性^[3-5]。近年来,发现它具有抗致癌、抗促癌、诱导 F9 畸胎瘤细胞分化作用,极有可能成为低毒高效的新型抗癌药物^[6,7]。此外,熊果酸明显的抗氧化功能也被广泛用作医药和化妆品原料^[8,9]。熊果酸新功能的发现,其需求量明显增加,预示着熊果酸广阔的应用前景。

目前,国内对泡桐叶中熊果酸的提取主要采用溶剂回流和索氏提取法^[10,11],刘名权等^[12]将超声波提取与此两种提取方法进行对比,结果表明,超声波提取无需加热,在较短的提取时间内,获得较高的提取率。但采用正交试验法优化超声波提取工艺,各

收稿日期:2013-11-13 接受日期:2014-03-07

基金项目:引进国际先进林业科学技术项目(2011-4-01)

* 通讯作者 Tel:86-25-85482534; E-mail: biliangwu@126.com

因素的水平设计有限,优化精确度低,不能有效阐明各因素交互作用对提取率的影响。中心复合设计(Central composite design,简称 CCD),又称二次回归旋转设计,由全因子设计、轴点设计与零水平的中心点重复实验3部分构成,可根据设计所建立的数学模型描绘响应面,从其较优区域直接读取最优化工艺条件,能有效研究多变量系统。该方法设计简单,实验次数少,精密度高,能够正确认识变量之间的相互作用,得到较准确的描述研究对象的关联式,具有良好的预测性^[13]。本研究采用中心复合设计-响应面法对泡桐叶中熊果酸的超声波提取工艺进行优化,以使熊果酸得率最大化,为进一步开发利用废弃的泡桐叶资源提供参考。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪,配 SIL-20A 自动进样器、LC-20AT 泵、CTO-20A 柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器;FZ102 型植物细胞粉碎机,天津泰斯特仪器有限公司;JY99-II DN 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝科技股份有限公司;KQ5200 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

熊果酸(98.79%)对照品均购于成都普瑞科技开发有限公司;甲醇(色谱纯)购于南京化学试剂有限公司;磷酸(色谱纯)购于美国 Aladdin 公司。泡桐叶采自中国林科院林产化学工业研究所,经河南农业大学退休教授李荣幸老师鉴定,为兰考泡桐。

2 方法与结果

2.1 泡桐叶中熊果酸的超声波提取

阴干的泡桐叶用粉碎机破碎至一定粒度,40℃烘箱干燥至恒重。准确称取一定量泡桐叶粉末,按一定液固比加入一定浓度的乙醇溶液,限定提取温度为 50℃,恒定超声频率和超声功率,超声波提取一定时间。过滤,并用相应浓度的乙醇溶液洗涤滤渣,合并滤液,旋蒸浓缩,用无水乙醇定容于 100 mL 容量瓶中,摇匀,得样品试液。HPLC 分析前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2 HPLC 色谱分析方法

2.2.1 熊果酸标准样品的配制

准确称取 9.3 mg 熊果酸对照品,用甲醇溶解,并定容于 10 mL 的容量瓶中,配成熊果酸标准试液,并用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2.2 HPLC 色谱条件

岛津色谱柱:Shim-pack ODS-CLC(M)(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.05% 磷酸水溶液(91.7:8.3,v/v);流速:0.6 mL/min;柱温:30℃;检测波长:210 nm。

2.2.3 标准曲线的绘制

精密吸取标准试液 1、2、5、10、15、20(L,按色谱条件进样测定,以进样量(X,μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得线性回归方程为: $Y = 502791 X - 294016$ ($R = 0.9993$)。熊果酸在 0.92 ~ 18.37 μg 进样范围内与峰面积有良好的线性关系。

2.2.4 精密度实验

精密吸取熊果酸标准试液 10 μL,重复进样 5 次,峰面积的相对标准偏差(RSD)为 0.10%,仪器精密度良好。

2.2.5 重复性实验

准确称取同批泡桐叶粉末 6 份,按相同方法制得提取液,测得熊果酸平均含量为 13.61 mg/g,峰面积的 RSD 为 0.96%。

2.2.6 稳定性实验

分别测定同一熊果酸提取液在 0、3、6、9、12、18、24 h 的熊果酸峰面积,其 RSD 为 0.79%,熊果酸提取液在 24 h 内稳定。

2.2.7 回收率实验

精密称取已知含量的泡桐叶粉末,精密测定后,分别加入 50%、100%、150% 样品含量的熊果酸标准品,按“2.1”方法制得加样提取液,HPLC 测定熊果酸含量,得熊果酸的平均回收率分别为 93.69%、95.44%、93.21%。

2.2.8 样品含量测定

精密吸取提取液 20 μL,用高效液相色谱仪测定,按外标法计算熊果酸的含量。

2.3 提取工艺的中心复合设计

采用中心复合设计对泡桐叶中熊果酸的超声波提取工艺进行优化。选取影响熊果酸提取率的主要因素:乙醇浓度(X_1 ,%,v/v)、液固比(X_2 ,mL/g)、提取时间(X_3 ,min)为考察变量,以熊果酸的得率[Y (UA),mg/g]为评价指标,根据中心复合设计原理,其因素水平设计见表 1,设计实验结果见表 2。

2.4 响应面优化预测与验证

2.4.1 二次多项回归模型的建立及显著性分析

应用“STATGRAPHICS Plus”实验设计与分析软件,对表 2 中心复合设计实验数据进行回归拟合分

表1 熊果酸超声波提取工艺中心复合设计因素和水平

Table 1 Factors and levels of ultrasonic extraction of ursolic acid in central composite design

水平 Level	乙醇浓度 X_1 Ethanol concentration(%)	液固比 X_2 Ratio of liquid to solid(mL/g)	超声时间 X_3 Ultrasonic time(min)
-1.682	60	10	10
-1	68	18	18
0	80	30	30
1	92	42	42
1.682	100	50	50

表2 熊果酸超声波提取工艺中心复合设计实验结果

Table 2 Central composite design arrangement and the experimental data of the ultrasonic extraction of ursolic acid

No.	X_1	X_2	X_3	Y(UA)(mg/g)
1	0	-1.682	0	12.33
2	0	0	0	13.55
3	0	0	0	13.48
4	1	-1	1	13.13
5	0	0	0	13.65
6	-1.682	0	0	9.76
7	0	0	1.682	13.61
8	0	0	0	13.48
9	1	1	1	13.94
10	0	0	0	13.75
11	-1	1	1	10.61
12	1	-1	-1	13.20
13	1	1	-1	11.01
14	0	1.682	0	12.94
15	1.682	0	0	13.32
16	-1	-1	1	11.34
17	-1	-1	-1	9.24
18	-1	1	-1	8.37
19	0	0	-1.682	9.35

析,得熊果酸得率与各考察变量的二次回归模型为:

$$Y(\text{UA}) = 13.60 + 1.30X_1 + 0.143X_2 + 1.05X_3 - 0.813X_1^2 + 0.028X_1X_2 - 0.185X_1X_3 - 0.426X_2^2 + 0.393X_2X_3 - 0.834X_3^2 (R^2 = 0.9392) \quad (1)$$

由拟合回归方程(1)的相关系数可知模型拟合程度良好,可以用此模型对泡桐叶中熊果酸的超声波提取工艺进行分析和预测。从表3回归方程系数显著性检验可知,各因素对熊果酸得率的影响顺序为: $X_1 > X_3 > X_2$,即乙醇浓度 > 提取时间 > 液固比。统计分析结果表明:因素 X_1 (乙醇浓度)、因素 X_3 (提取时间)的 P 值均小于显著性水平 $\alpha(0.01)$,说

明这两个因素有非常显著影响; X_2 (液固比)的 P 值大于显著性水平 $\alpha(0.1)$,说明该因素无显著影响;交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 的 P 值均大于显著性水平 $\alpha(0.1)$,说明该交互项无显著影响;二次项 X_1^2 、 X_3^2 的 P 值均小于显著性水平 $\alpha(0.01)$,说明这些二次项有非常显著影响;二次项 X_2^2 的 P 值小于显著性水平 $\alpha(0.05)$,说明该二次项有显著影响。

根据以上分析结果,删除没有显著影响的因素,拟合方程变为:

$$Y(\text{UA}) = 13.60 + 1.30X_1 + 1.05X_3 - 0.813X_1^2 - 0.426X_2^2 - 0.834X_3^2 \quad (2)$$

表3 回归方程中系数的显著性检验

Table 3 Significance test of coefficient in regression equation

参数 Parameters	回归方程的各项系数和 P 值 The coefficients and P-values in regression equation		
独立变量 Independent variables	X ₁	X ₂	X ₃
交互项 Interaction terms	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃
二次项 Quadratic terms	X ₁ ²	X ₂ ²	X ₃ ²
	1.30 (<0.0001)	0.143 (0.4290)	1.05 (0.0002)
	0.028 (0.9057)	-0.185 (0.4336)	0.393 (0.1161)
	-0.813 (0.0011)	-0.426 (0.0359)	-0.834 (0.0009)

注:括号中数值为 P 值,此值越小,说明该因素对评价指标影响越显著

Note: The numerical values in parentheses are P-values. The smaller the value is, the more significant effect the factor is on the evaluation index

2.4.2 响应面优化与预测

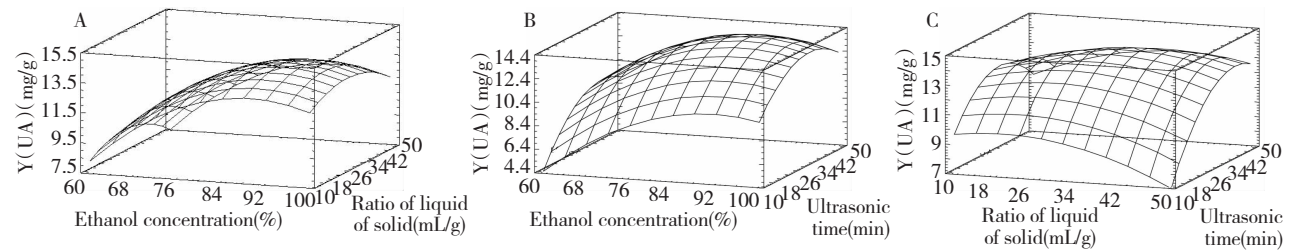


图1 各因素交互作用对熊果酸的得率影响的响应面图

Fig. 1 Response surface plots of mutual influences of extraction conditions on the extraction yields of ursolic acid

图1中(A)、(B)、(C)分别是熊果酸得率与乙醇浓度和液固比、熊果酸的得率与乙醇浓度和超声时间、熊果酸得率与液固比和超声时间的响应面图。由图可知,乙醇浓度和超声时间对熊果酸得率影响

显著,表现为响应面陡峭;而液固比的变化对熊果酸得率的影响相对较小,响应面较平滑。同时,由图1中(A)明显看出,随着液固比的增大,熊果酸得率呈现先增大后减小的趋势,液固比存在最佳值。

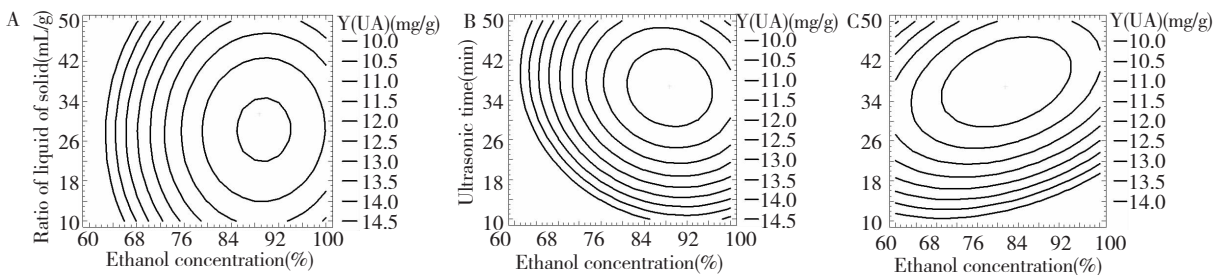


图2 各因素交互作用对熊果酸的得率影响的等高线图

Fig. 2 Contour plots of mutual influences of extraction conditions on the extraction yields of ursolic acid

等高线图能直观地反映出各因素交互作用对响应值的影响,圆形表示两因素无交互作用,椭圆形表示两因素交互作用显著。由图2等高线图可知,乙醇浓度、液固比和超声时间三个因素两两之间不存在显著交互作用;且乙醇浓度为85%~94%(v/v),液固比为22~34 mL/g,超声时间为29~44 min时,熊果酸得率较高。

模型使用快速上升法对工艺进行优化,得泡桐叶中熊果酸的超声波提取的优化工艺条件为:乙醇浓度88.73%(v/v),液固比31.45 mL/g,超声时间36.87 min,在此优化工艺条件下熊果酸的得率14.37 mg/g(预测值)。

2.4.3 响应面优化验证

将上述优化提取工艺参数修正为:乙醇浓度

89% (v/v), 液固比 31 mL/g, 超声时间 37 min。在此条件下对泡桐叶中熊果酸进行超声波提取, 结果如表 4 所示, 熊果酸的平均得率为 14.80 mg/g, 与预测值偏差 0.43 mg/g, 说明二次多项回归模型预测

性良好, 响应面法得到的工艺参数可靠, 有一定实用价值。将泡桐叶超声波提取残渣以相同条件进行二次提取, 总熊果酸含量几乎不变, 说明超声波提取一次即可实现泡桐叶中熊果酸的完全提取。

表 4 优化工艺熊果酸得率的预测值与观测值

Table 4 The observed and predicted response values for the optimized formulation

No.	超声波提取泡桐叶中熊果酸的得率 Ultrasonic extraction yield of ursolic acid from <i>P. elongate</i> leaves (mg/g)			
	实验值 Experimental values	平均值 Average value	预测值 Predicted value	偏差 Deviation
1	14.77			
2	14.86	14.80	14.37	0.43
3	14.76			

3 结论

在超声波提取泡桐叶中熊果酸的工艺过程中, 各因素的影响顺序为: 乙醇浓度 (X_1) > 提取时间 (X_3) > 液固比 (X_2)。泡桐叶中熊果酸的超声波提取最佳工艺为: 乙醇浓度 89% (v/v), 液固比 31 mL/g, 超声时间 37 min, 在此工艺条件下, 熊果酸的平均得率为 14.80 mg/g。超声波提取泡桐叶中熊果酸得率的拟合方程为: $Y(UA) = 13.60 + 1.30X_1 + 1.05X_3 - 0.813X_1^2 - 0.426X_2^2 - 0.834X_3^2$ 。实验验证, 该方程具有良好的预测性。

参考文献

- Li ZR(李宗然), Wang BP(王保平), Li FD(李芳东). *Paulownia* development strategy research. *Forest Science & Technology Management*(林业科技管理), 1996, 3:44-46.
- The *Paulownia* group of Chinese Academy of Forestry(中国林业科学研究院泡桐组). *Paulownia* Research(泡桐研究). Beijing: China Agriculture Press, 1980. 1-2, 257-263.
- Cunha LCS, Silva MLAE, Furtado NAJC, et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 2007, 62:668-672.
- Li HY(李宏杨), Liu GM(刘国民), Liu F(刘飞), et al. Research of ursolic acid and similar pentacyclic triterpenoid. *J Hunan Univ Tech*(湖南工业大学学报), 2009, 23(5):18-21.
- Meng YQ(孟艳秋), Chen Y(陈瑜), Wang Z(王赧), et al.

- Research advance of ursolic acid. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2007, 16:25-28.
- Wang J(王静). Research advance of ursolic acid on anti-tumor effect. *Chin J Clinical Rational Drug Use*(临床合理用药), 2010, 3:120-121.
- Zhou L(周蕾), Liu ZG(刘卓刚). The anti-tumor mechanisms research progress of ursolic acid. *Herald of Medicine*(医药导报), 2011, 30:490-494.
- Ali MS, Ibrahim SA, Jalil S, et al. Ursolic acid: a potent inhibitor of superoxides produced in the cellular system. *Phytotherapy Res*, 2007, 21:558-561.
- Lu J(卢静), Zhang BC(张博超), Jiang W(姜玮), et al. Study on the antioxidant activity of the ursolic acid. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2009, (4):126-127.
- Li Y(李阳), Chen LY(陈旅翼), Yu XH(余晓晖), et al. Experimental study on purifying ursolic acid in leaves of *Paulownia fortunei*(Seem.) Hemsl. by acid-alkali method. *J Anhui Agri Sci*(安徽农业科学), 2013, 41:3371-3373.
- Han J(韩晶). Study on the process of extracting, isolating & purifying ursolic acid from *Paulownia tomentosa*(Thumb.) Steud. Shanxi: Northwest University(西北大学), MSc. 2002.
- Liu MQ(刘名权), Zou SQ(邹盛勤), Chen W(陈武), et al. Optimum extraction of ursolic acid in *Paulownia tomentosa*(Thumb.) Steud by orthogonal test. *J Yichun Univ*(宜春学院学报), 2007, 29(2):1-3.
- Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments, 7th Edition. New York: John Wiley & Sons, 2008.