

响应面法优化金樱子黄酮成分提取工艺

刘相文, 侯林, 崔清华, 陈智, 袁琦, 田景振*

山东中医药大学药学院, 济南 250355

摘要: 选择酶的用量、酶解温度、酶解 pH 为考察因素, 以甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素含有量的总和为指标响应值, 采用响应面法优化金樱子黄酮成分的最佳提取工艺。结果表明, 金樱子黄酮成分的最佳提取工艺为酶用量为 0.53 mg/mL, 酶解温度为 51.21 °C, PH 为 4.88, 在此条件下, 黄酮提取量预测值为 25.78 μg/5 g, 验证值为 25.55 μg/5 g, 证明该工艺稳定、可靠。

关键词: 金樱子; 黄酮; 响应面法; HPLC

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.033

Optimization of Extraction Conditions of *Rosa laevigata* Michx. Flavonoids

LIU Xiang-wen, HOU Lin, CUI Qing-hua, CHEN Zhi, YUAN Qi, TIAN Jing-zhen*

College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: To optimize flavonoids extraction condition. With the sum of licorice, quercetin, kaempferol, apigenin as an indicator, response surface methodology was adopted to optimize flavonoids extraction condition by taking enzymatic hydrolysis temperature, pH and dosage. nzymatic hydrolysis temperature 51.21 °C, pH 4.88, dosage 0.53 mg/mL, under this condition, the predicted value of flavonoids extraction was 25.78 μg/5g, and the test value was 25.55 μg/5g, the optimal extraction condition were Stable and reliable.

Key words: *Rosa laevigata* Michx; flavonoids; response surface methodology; HPLC

金樱子始载于《蜀本草》, 为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥的果实, 其性味酸、甘、涩、平, 归肾、膀胱、大肠经, 具有固精缩尿, 固崩止带, 涩肠止泻的功效, 用于遗精滑精, 遗尿尿频, 崩漏带下, 久泻久痢^[1]。现代研究表明, 金樱子黄酮成分具有抗氧化^[2-5], 抑菌^[6], 降血脂^[7], 保肝^[8], 保护脑缺血再灌注损伤^[9]等药理作用, 其黄酮成分主要为甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素等^[10], 本研究采用酶解法提取金樱子黄酮成分, 以甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素含有量的总和为指标响应值, 选取酶的用量、酶解温度、酶解 pH 为主要影响因素, 在 HPLC 基础上运用 Box-Behnken 响应面实验设计方法, 优化金樱子黄酮成分的提取工艺, 为我国丰富的金樱子资源的开发利用提供依据。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(日本日立公司, L-2000 型); 十万分之一天平(METTLER, NewClassic MF); pH 计(赛多利斯公司, PB-10); 甘草素(W22A7K13544)、槲皮素(C20J6Y1722)、山奈酚(R03F6C1)、芹菜素(Y27A6Y1)购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均 ≥ 98%; 金樱子药材(购买于济南建联中药店, 经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥果实); 纤维素酶(723B208, 索莱宝公司), 乙醇等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 指标成分的定量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 305 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(48:52); 对照品及供试品的色谱图见图 1。

收稿日期: 2016-12-06 接受日期:

基金项目: 国家重大新药创制专项, 治疗温病的中药新药研发(2014ZX09509001); 山东省高等学校中医药抗病毒协同创新中心课题, 淡竹叶、鸭跖草等 10 味中药抗病毒谱研究(XTCX2014C01-01)

* 通信作者 Tel: 86-531-89628080; E-mail: Tianjingzhen@163.com

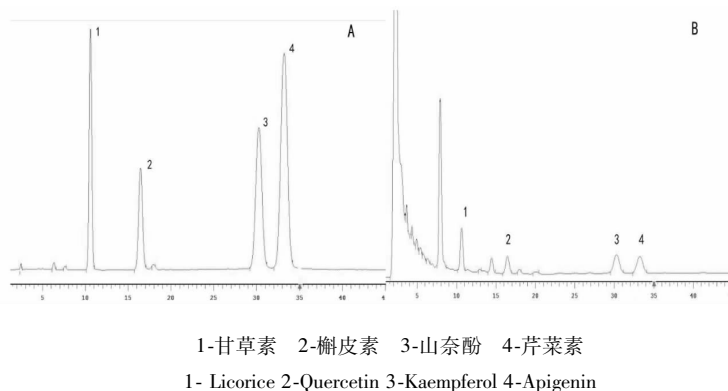


图1 混合对照品(A)和供试品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and testing sample (B)

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取各种对照品适量,加甲醇溶解,制成每1 mL含甘草素28.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、槲皮素13.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、山奈酚21.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芹菜素24.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取金樱子粉末(过60目筛)5 g若干份,分别加入不同量的纤维素酶,在不同的时间、温度、pH的条件下进行酶解,然后进行10倍量75%乙醇回流提取2次,过滤,得滤液,浓缩,干燥,取干燥产物适量置25 mL容量瓶中,用甲醇溶解定容,作为供试品。

2.1.4 线性关系考察

取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,按2、4、6、8、10、12、14 μL 进样,在高效液相色谱仪上分析。结果表明,甘草素线性方程为 $Y = 20938x - 1358.1$, $r = 0.9999$,线性范围为0.05768 ~ 0.40376 μg ;槲皮素线性方程为 $Y = 13626x - 1708.4$, $r = 0.9997$,线性范围为0.02736 ~ 0.19152 μg ;山奈酚线性方程为 $Y = 31649x - 8177.3$, $r = 0.9993$,线性范围为0.04384 ~ 0.30688 μg ;芹菜素线性方程为 $Y = 52757x - 13779$, $r = 0.9996$,线性范围为0.04912 ~ 0.34384 μg 。

2.1.5 精密度假实验

精密吸取混合对照品溶液10 μL ,连续进样6次,记录各标准品的色谱峰面积。甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素的色谱峰面积RSD均小于1.2%,表明仪器精密度假良好。

2.1.6 重复性实验

制备6份供试品溶液,进行测定,记录各标准品的色谱峰面积。甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素的色谱峰面积RSD均小于1.6%,表明重复性良好。

2.1.7 稳定性试验

供试品溶液分别在0、2、4、6、8、10、12、24 h进行HPLC测定,记录各标准品的色谱峰面积。甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素的色谱峰面积RSD均小于1.5%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.8 加样回收率实验

取供试品1 g,精密加入混合对照品1 mL,制成供试品溶液,平行操作6份,进样测定,甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素的平均回收率分别为97.75%、99.83%、98.77%、99.92%,RSD均小于1.9%。

2.2 单因素实验

2.2.1 酶用量

按照“2.1.3”的操作,固定酶解温度50 $^{\circ}\text{C}$ 、酶解pH为5,酶解时间为120 min,设置酶的浓度为0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/mL,按照“2.1.1”色谱条件测定,结果表明酶用量在0.4 ~ 0.6 mg/mL时最佳,故选择0.5 mg/mL为中心点。

2.2.2 酶解温度

按照“2.1.3”的操作,固定酶用量为0.45 mg/mL,酶解pH为5,酶解时间为120 min,设置酶解温度为40、45、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$,按照“2.1.1”色谱条件测定,结果表明45 ~ 55 $^{\circ}\text{C}$ 时最佳,故选择50 $^{\circ}\text{C}$ 为中心点。

2.2.3 酶解pH

按照“2.1.3”的操作,固定酶用量为0.45 mg/mL,酶解温度为50 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间为120 min,设置酶解pH为3、4、5、6、7,按照“2.1.1”色谱条件测定,结果表明4 ~ 6时最佳,故选择5为中心点。

2.3 响应面优化实验

根据Box-Beknken实验设计原理,以单因素考查结果为基础,选取酶用量(A)、酶解温度(B)、酶

解 pH(C)为考察对象,以四个黄酮成分含有量总和(Y)为响应值,利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行三因素三水平的响应面实验设计(见表 1)。

采用 Design-Expert 8.0 软件对表 2 的结果进行响应面回归分析,得到拟合方程: $Y = 25.68 + 1.11A + 0.33B - 0.19C - 0.19AB - 0.44AC - 0.045BC - 3.75A^2 - 0.26B^2 - 1.30C^2$ 。根据新模型方程得到响应面三维图,结果见图 2。各因素的二阶方差分析结果见表 3。二次回归模型方程的相关系数 $R^2 = 99.05\%$, 回归方程拟合度较好,此模型达到极显著 ($P < 0.01$),失拟项不显著 ($P = 0.0760 > 0.05$),因此,此模型成立。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface method

水平 Levels	因素 Factors A (mg/mL)	B (°C)	C
-1	0.4	45	4
0	0.5	50	5
1	0.6	55	6

表 2 响应面法实验设计方案及结果

Table 2 Design and results of response surface method

试验号 No.	A (mg/mL)	B (°C)	C	含量 Content (μg/5 g)				
				甘草素 Licorice	槲皮素 Quercetin	山奈酚 Kaempferol	芹菜素 Apigenin	黄酮总量 Total flavonoids
1	1	0	1	7.11	5.69	5.22	3.16	21.18
2	-1	1	0	7.03	5.72	5.13	3.08	20.96
3	-1	-1	0	6.99	5.51	5.32	2.05	19.87
4	0	0	0	8.32	6.33	6.13	4.98	25.76
5	1	1	0	7.44	5.96	5.88	3.82	23.10
6	0	0	0	8.44	6.37	6.19	4.77	25.77
7	0	0	0	8.49	6.41	6.21	4.44	25.55
8	0	-1	-1	7.68	6.08	5.99	4.43	24.18
9	0	-1	1	7.45	5.99	6.14	3.89	23.47
10	-1	0	-1	6.97	5.21	5.22	1.82	19.22
11	-1	0	1	7.03	5.44	5.37	2.30	20.14
12	1	0	-1	7.15	5.38	5.13	4.35	22.01
13	1	-1	0	7.05	5.65	5.55	4.52	22.77
14	0	0	0	8.37	6.49	6.33	4.80	25.99
15	0	0	0	8.22	6.43	6.55	4.15	25.35
16	0	1	1	7.86	5.98	5.91	4.24	23.99
17	0	1	-1	7.75	6.22	6.25	4.66	24.88

A、B、C、AC、A²、C² 对响应值的影响都是显著的 ($P < 0.05$),说明所选因素之间存在着显著的交互作用。同时由 F 值大小可推断,在所选择的试验范围内,3 个因素对综合评分的影响为 $A > B > C$,因素 A 与 B 的交互作用为主要交互作用。

通过软件设计分析,金樱子黄酮提取的最佳工艺条件为:酶用量为 0.53 mg/mL,酶解温度为 51.21 °C,pH 为 4.88,黄酮提取量为 25.78 μg/5g。为方便操作,将条件修改为酶用量为 0.53 mg/mL,酶解温度为 51 °C,pH 为 4.9。

表3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Means square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	81.79	9	9.09	81.41	<0.0001
A	9.83	1	9.83	88.11	<0.0001
B	0.87	1	0.87	7.81	0.0268
C	0.29	1	0.29	2.55	0.1541
AB	0.14	1	0.14	1.29	0.2928
AC	0.77	1	0.77	6.86	0.0345
BC	8.100E-003	1	8.100E-003	0.073	0.7954
A ²	59.23	1	59.23	530.67	<0.0001
B ²	0.28	1	0.28	2.52	0.1567
C ²	7.07	1	7.07	63.33	<0.0001
残差 Residual	0.78	7	0.11		
失拟项 Lack of fit	0.55	3	0.18	3.08	0.1531
净误差 Pure Error	0.24	4	0.059		
总误差 Cor Total	82.57	16			

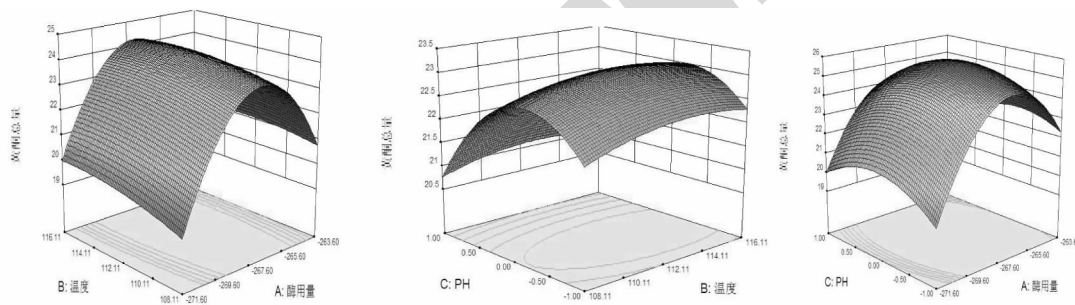


图2 三维效应面图
Fig. 2 3D response surface plots

2.4 验证实验

精密平行称定5份金樱子粉末各5g,设置酶用量为0.53 mg/mL,酶解温度为51℃,pH为4.9,按照“2.1.3”的操作进行HPLC检测,黄酮总量分别为:25.64、25.35、25.69、25.48、25.57 μg/5g,平均值为25.55与预测值25.78 μg/5g相对误差为0.908%,证明了回归模型较为准确可靠,优化出的工艺具有重复性和可操作性。

3 讨论

响应面优化法是一种实验条件的优化方法,囊括了实验设计、建模、检验模型的合适性、寻求最佳实验条件等实验技术,通过对方程的回归拟合和响

应曲面、等高线的绘制,可方便的求出各因素水平的响应值,预测最优实验条件和最优值。近年来,金樱子黄酮的提取优化研究多用正交实验法,响应面法相比正交实验法,其优势是:可以连续的对实验各个水平进行分析,克服了正交试验只能对一个个孤立的点进行分析的缺点,另外,响应面法考虑了实验的随机误差,将复杂的未知函数关系多项式模型来拟合,较为简便。

本实验先用纤维素酶酶解金樱子,然后用75%乙醇回流提取金樱子黄酮成分,建立了HPLC法测定四种成分甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素的含量的方法,并且以金樱子黄酮中的主要的四种成分甘草素、槲皮素、山奈酚、芹菜素为主要指标,评价影响

金樱子黄酮提取量的因素,采用响应面优化法进行实验设计,对金樱子黄酮的提取进行了优化,最终确定了最佳实验条件,并进行了验证,证明了工艺的重复性和可操作性。

纤维素酶可以破坏植物细胞壁,有利于成分的浸出,可以提高金樱子黄酮成分的提取率,本实验以酶的用量、酶解温度、酶解 pH 为优化条件,发现酶的用量为影响黄酮提取量的主要因素,酶的用量过少则不能与底物充分反应;温度会影响酶的活性,温度过高会使酶失活,过低则使酶不能发挥活性;pH 过高或过低都会使酶失活。经过二次多项回归模型,得到最佳工艺,其黄酮成分的实测值与预测值相吻合,证明了响应面法能较好的对金樱子黄酮成分的提取工艺进行优化,为我国丰富的金樱子资源的开发利用提供依据。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 221-222.
- Yan NJ, Liu J, Zhang S, et al. Total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit attenuates hydrogen peroxide induced injury in human umbilical vein endothelial cells. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50:3133-3141.
- Liu Y (刘焱), Zhang YL (张延鲁), Tan KF (覃克凤). Analysis of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx. and antioxidant activities. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2016, 55:1256-1263.
- Cao YC (曹运长), Wen HB (文红波), Wu YL (吴玉兰), et al. Protective effect of *Rosa laevigata* Michx total flavonoids on vascular endothelial cells injury induced by Hydrogen Peroxide. *Lishizhen Med Mater Res* (时珍国医国药) 2013, 24:1159-1161.
- Su SG (苏上贵), Wei YL (韦玉兰), Huang YJ (黄燕军), et al. Study on antioxidation and free radical scavenging effects of total flavonoids from *Rosa laevigata*. *J Guangxi Univ Chin Med* (广西中医药大学学报), 2015, 18(1):47-48.
- Peng C (彭成), Wang SL (汪世龙), Fang SY (方士英), et al. Study on the antibacterial effect of refined total flavonoids of *Rosa laevigata*. *J West Anhui Univ* (皖西学院学报), 2015, 31(2):76-77.
- Wang Q (王奇), Lu BZ (芦柏震), Zhang HY (章红燕), et al. Effects of flavonoids of *Rosa laevigata* L. on blood lipid in hyperlipidemic rats. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2013, 31:2042-2043.
- Zhang S, Lu BN, Han X, et al. Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55:60-69.
- Zhang S, Qi Y, Xu YW, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochem Int*, 2013, 7(3449):1-11.
- Wang HZ (王慧竹), Wang WC (王万超), Chen S (陈帅). Research progress of extraction and purification and determination of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx. *Jilin Chem Technol* (吉林化工学院学报), 2016, 33(3):21-24.
- from leaves of *Dendrocalamus semiscandens*. *J West China Forestry Sci* (西部林业科学), 2013, 42:110-112.
- Zhang J (张镜), Liao FL (廖富林), Chen ZY (陈梓云), et al. Antioxidant activity of anthocyanins from *Cinnamoum burmanii* fruits *in vitro*. *Food Sci* (食品科学), 2011, 32:128-132.
- Zhu F, Cai YZ, Sun M, et al. Comparison of major phenolic constituents and *in vitro* antioxidant activity of diverse Kudingcha genotypes from *Ilex kudingcha*, *Ilex cornuta*, and *Ligustrum robustum*. *J Agric Food Chem*, 2009, 57:6082-6089.
- Wang ZW (王振伟), Shen S (申森), Hu XB (胡晓冰). Extracting total flavonoids from *Rosa roxburghii* with ultrasonic wave and determination by HPLC. *Hubei Agric Sci* (湖北农业科学), 2014, 53:4684-4687.
- Yu XC (余小翠), Liu GF (刘高峰). Application of response surface methodology on the extraction and preparation process of traditional Chinese medicine. *J Chin Med Mat* (中药材), 2010, 33:1651-1655.
- Liang Q (梁倩), Zheng YL (郑艳玲), Liu Y (刘云), et al. Flavonoid contents and antioxidant activities of extracts

(上接第 165 页)