

文章编号:1001-6880(2018)Suppl-0051-06

响应面法优化金银花中环烯醚萜苷的提取工艺及其产地差异

邹惠亮*,陈敏,陈柯

湖州市食品药品检验研究院,湖州 313000

摘要:为优化金银花中环烯醚萜苷的超声提取工艺,以马钱苷酸、马钱苷与当药苷的提取率为指标,运用单因素试验结合 Box-Behnken 中心组合设计的方法进行提取工艺的优化研究。金银花中环烯醚萜苷的最佳提取工艺:液料比 117 mL/g、乙醇浓度 34%、超声时间 45 min,在此条件下环烯醚萜苷的实际提取率为 3.26 mg/g,与理论值 3.28 mg/g 的相对偏差为 0.31%。同时发现金银花中环烯醚萜苷的含量在不同产地间存在明显差异。Box-Behnken 响应面优化所得的金银花提取工艺稳定、可行,可较好的预测实验结果。

关键词:金银花;响应面法;环烯醚萜苷;Box-Behnken

中图分类号:R284;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.S.009

Optimization of Extraction for Iridoid Glycosides from *Lonicerae Flos* by Box-Behnken Response Surface Methodology and Differences in Iridoid Glycosides Content among Different Areas

ZOU Hui-liang*, CHEN Min, CHEN Ke

Huzhou Institute for Food and Drug Control, Huzhou, 313000, China

Abstract: To optimize process conditions of ultrasonic extraction of iridoid glycosides from *Lonicerae Flos*, with the extraction rates of loganic acid, loganin, sweroside as evaluation indexes, the single factor experiment combined with Box-Behnken design was used to optimize the extracting technology. The optimal extraction conditions were as follows: the liquid-to-solid ratio was 117 mL/g, and the ethanol concentration was 34%, the ultrasonic extraction time was 45 min, the predicted value of extraction rates was 3.28 mg/g. Under the extraction conditions after optimization, the value of extraction rates was 3.26 mg/g, and the relative deviation between the predicted and measured value was 0.31%. Meanwhile, there was great variation in iridoid glycosides content among different areas. The ultrasonic extraction technology process conditions of iridoid glycosides from *Lonicerae Flos* optimized by the response surface method, which was suitable and feasible.

Key words: *Lonicerae Flos*; response surface methodology; iridoid glycoside; Box-Behnken

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花,又叫忍冬花、双花等。金银花味甘,性寒,具有清热解毒、凉散风热之功效^[1,2]。金银花应用历史悠久,首载于《名医别录》,列其为上品。临床广泛用于外科感染性疾病及急性热病。其化学成分多样,主含黄酮类、环烯醚萜类、有机酸类、挥发油类和多糖类^[3]。其中环烯醚萜类具有显著的抗病毒、抗炎、降糖调脂、增强免疫及抑制肿瘤细胞等生物活性,并对消化系统、

心血管系统、神经系统都具有药理作用^[4,5]。

目前,对金银花的开发利用的研究主要集中在有机酸、黄酮、多糖和挥发油类成分^[6,7]。对金银花中环烯醚萜类物质的开发利用的研究却未见报道。因此对金银花中环烯醚萜类成分进行提取工艺研究对更好地开发和利用金银花资源具有重要意义。

响应面法(Response Surface Methodology, RSM)是将传统数学方法与统计学相结合,对多个变量的影响进行建模与分析来优化响应值的一种手段,具有周期短、试验次数少、精度高等优点。本实验以马钱苷酸、马钱苷与当药苷这三种在金银花中含量最

为丰富的环烯醚萜苷的总提取率为指标,运用 Design-Expert 8.0 软件进行 Box-Behnken 设计进行响应面实验,得到金银花中环烯醚萜苷类成分的最佳提取工艺。同时比较了不同产地的 10 批金银花的环烯醚萜苷含量的差异,以期为更好地开发利用金银花中环烯醚萜苷类成分提供参考依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;BP211D 型万分之一电子天平,德国 Sartorius 公司;KQ-500DB 超声仪,昆山市超声仪器有限公司。对照品马钱苷酸(批号 111865-201102)、当药苷(批号 111742-200501)、马钱苷(批号 111640-201606)中国食品药品检定研究院,上述对照品均供含量测定用;乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯。

金银花药材全部来源于抽样,见表 5。经湖州

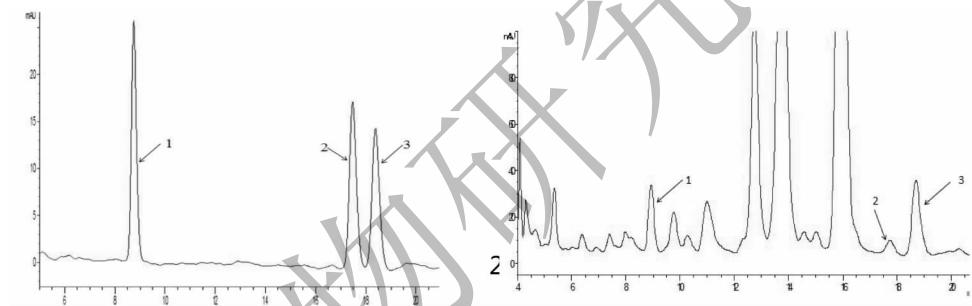


图 1 混合对照品 (a)、金银花提取物 (b) 高效液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (a) and sample (b)

注:1 马钱苷酸;2 马钱苷;3 当药苷

Note: 1 loganic acid; 2 loganin; 3 sweroside

2.1.2 对照品溶液制备

分别精密称取马钱苷酸、马钱苷、当药苷对照品适量置 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 392.2、370.8、317.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合储备液。再按一定比例稀释制成标准溶液(具体稀释倍数分别为 5、10、20、50、100、200),待用。

2.1.3 供试品溶液的制备

取金银花药材粉末(过 3 号筛)约 5 克,精密称定,置平底烧瓶中,加入相应浓度的乙醇,密筛,称定重量,超声提取(40 kHz,150 W),取出放冷至室温,称定重量,用相应浓度的乙醇补足减失的重量,经 0.45 μm 微孔过滤膜过滤即得。

市食品药品检验研究院中药室陈敏主任鉴定为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。并选其中山东产地一样品作为提取工艺研究。

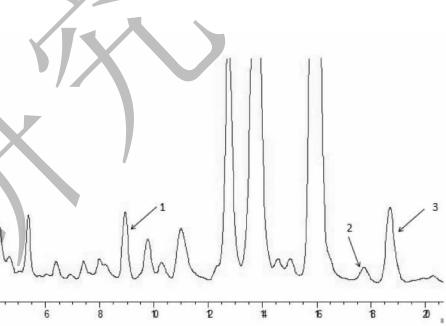
2 方法与结果

2.1 HPLC 定量测定方法

本实验采用的 HPLC 定量测定方法是在文献报道^[8]基础上,稍作改进得到。

2.1.1 色谱条件

Agilent C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.4% 甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱程序:0 ~ 15 min, 10% ~ 14% 乙腈;15 ~ 25 min, 14% ~ 20% 乙腈;检测波长 240 nm;体积流量 0.8 mL/min;进样量 10 μL ;柱温 25 °C。在本研究优化的色谱条件下混合对照品与金银花样品的 HPLC 色谱图如图 1 所示。



2.1.4 线性关系的考察

按“2.1.1”色谱条件进样分析,测定各不同质量浓度的混合对照品溶液中各化合物的峰面积,以各化合物质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,并求得回归方程。马钱苷酸回归方程 $Y = 59.357X + 6.2881, R^2 = 0.9998$,线性范围 1.96 ~ 78.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$;马钱苷回归方程 $Y = 64.882X + 3.3575, R^2 = 0.9990$,线性范围 1.85 ~ 74.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$;当药苷回归方程 $Y = 66.478X + 3.096, R^2 = 0.9991$,线性范围 1.59 ~ 63.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.5 精密度试验

取同一混合对照品溶液按“2.1.1”色谱条件连续进样 6 次,马钱苷酸、马钱苷、当药苷的峰面积的 RSD 依次为 0.34%、0.45%、0.41%,均小于 2%,说

明该方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验

取同一份供试品溶液,按“2.1.1”色谱条件分别于0、4、8、12、16、24 h进样,测定峰面积,计算马钱苷酸、马钱苷、当药苷峰面积的RSD值分别为0.47%、0.20%、0.27%,结果显示供试品溶液24 h内稳定。

2.1.7 重现性试验

取同一批次的金银花药材,按“2.1.3”的供试品溶液制备方法制备供试品溶液6份,依法测定,计算马钱苷酸、马钱苷、当药苷峰面积的RSD值分别为0.98%、0.43%、0.87%,重现性良好。

2.1.8 加样回收试验

取已知含量的金银花药材粉末(过3号筛)5克,精密称定,置平底烧瓶中,再分别加入对照品马钱苷酸3 mg、马钱苷5 mg、当药苷7 mg,按“2.1.3”的供试品溶液制备方法制备供试品溶液,平行3份,依法测定,计算回收率,结果马钱苷酸、马钱苷、当药苷的平均回收率分别为97.57%、102.38%、98.44%,RSD值分别为1.08%、1.13%、1.09%,说明本法具有良好的回收率。

2.2 单因素试验

经查阅文献^[7]和预试验确定乙醇浓度、液料比、超声提取时间作为影响金银花环烯醚萜超声提取工艺的三个主要因素,并选取马钱苷酸、马钱苷、当药苷的总提取率为评价指标。

2.2.1 乙醇浓度对提取效果的影响

固定液料比为50 mL/g,超声时间为15 min,选择10%、20%、30%、40%、50%、60%乙醇浓度对金银花进行提取试验,结果见图2。当乙醇浓度为30%时,共有峰的总峰面积达到峰值。之后随着乙醇浓度的增大,提取效果反而减弱,故选择30%为最优乙醇浓度。

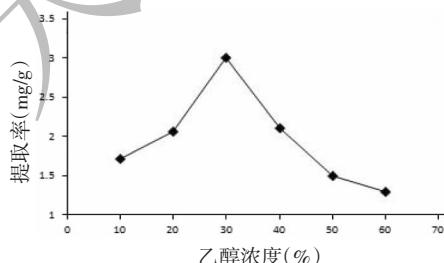


图2 乙醇浓度对环烯醚萜苷提取率的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on iridoid glycosides yield

2.2.2 超声提取时间对提取效果的影响

液料比为50 mL/g,乙醇浓度为30%,选择超声20、40、60、80、100、120 min进行试验,结果见图3。随着超声时间的延长,环烯醚萜苷类化合物的提取率逐渐增大,在40 min时达到最大值。超声40 min后,提取率随着超声时间的延长又慢慢下降。为防止超声时间过长,导致提取温度升高,金银花内有效成分发生降解,故选择40 min为最优超声时间。

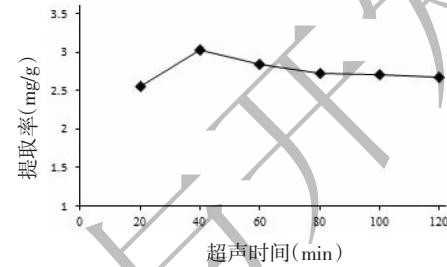


图3 超声时间对环烯醚萜苷提取率的影响

Fig. 3 Effects of extraction time on iridoid glycosides yield

2.2.3 液料比对提取效果的影响

固定超声时间为40 min,乙醇浓度为30%,选择液料比25,50,100,150,200 mL/g进行试验,结果见图4。随着液料比的增加,环烯醚萜苷类化合物的提取率逐渐增加,因为提取溶剂体积不断增大,药材粉末与溶剂分子的接触面亦不断增大,导致提取量不断增多。当液料比大于100 mL/g,环烯醚萜苷类化合物的提取趋于完全。当液料比的继续大幅增加时可能导致金银花中其它亲水性成分的大量溶出,反而影响了环烯醚萜苷类化合物的提取。故选择100 mL/g为较优液料比。

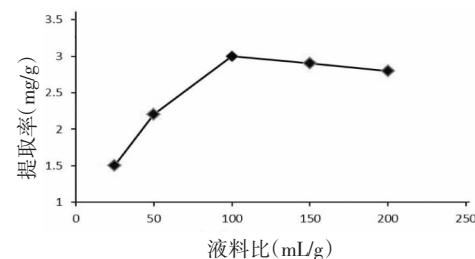


图4 液料比对环烯醚萜苷提取率的影响

Fig. 4 Effects of liquid-to-solid ratio on iridoid glycosides yield

2.3 响应面法优化金银花超声提取工艺试验

在单因素试验基础上,确定超声时间、乙醇浓度和液料比3个因素的水平值,运用Design-Expert 8.0软件进行Box-Behnken响应面设计和数据分析。具体实验因素与各水平值见表1。

表 2 为响应面分析方案及实验结果,试验号 1 ~ 12 是析因试验,试验号 13 ~ 17 是中心试验。17 个试验点分为零点和析因点,其中零点试验重复 5

次,用以估计试验误差。析因点为自变量取值在 A、B、C 所构成的三维顶点。

表 1 响应面试验因素及水平

Table 1 Variables and levels of response surface design

水平 Level	实验因素 Experimental factor		
	A 超声时间 Ultrasonic time (min)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 液料比 Liquid-to-solid ratio (mL/g)
-1	20	20	50
0	40	30	100
1	60	40	150

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Arrangement and experimental results of response surface Box-Behnken design

试验号 No.	A	B	C	提取率 Yeild (mg/g)
1	-1	-1	0	1.98
2	1	-1	0	2.01
3	-1	1	0	2.54
4	1	1	0	3.02
5	-1	0	-1	2.06
6	1	0	-1	2.50
7	-1	0	1	2.61
8	1	0	1	3.01
9	0	-1	-1	1.86
10	0	1	-1	3.03
11	0	-1	1	2.93
12	0	1	1	2.81
13	0	0	0	3.09
14	0	0	0	3.17
15	0	0	0	3.08
16	0	0	0	3.25
17	0	0	0	3.19

用 RSM 软件对所得数据进行回归分析,结果见表 3。对各因素经过回归拟合后,得到回归方程: $Y = 3.16 + 0.17A + 0.33B + 0.24C + 0.11AB - 1.00 \times 10^{-2}AC - 0.32BC - 0.44A^2 - 0.33B^2 - 0.17C^2$ 。

表 3 方差分析表

Table 3 Variance analysis for yield of iridoid glycosides with various extraction conditions

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	3.54	9	0.39	37.58	< 0.0001	* *
A-时间 Time	0.23	1	0.23	21.77	0.0023	*

续表3(Continued Tab. 3)

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 Significant
B-浓度 Concentration	0.86	1	0.86	82.00	<0.0001	* *
C-液料比 Liquid to solid ratio	0.46	1	0.46	43.58	0.0003	*
AB	0.051	1	0.051	4.84	0.0638	
AC	4.000×10^{-4}	1	4.000×10^{-4}	0.038	0.8505	
BC	0.42	1	0.42	39.76	0.0004	
A ²	0.82	1	0.82	78.08	<0.0001	
B ²	0.45	1	0.45	43.29	0.0003	
C ²	0.12	1	0.12	11.70	0.0111	
残差	0.073	7	0.010			
失拟项	0.053	3	0.018	3.47	0.1302	
误差项	0.020	4	5.080×10^{-3}			
总和	3.61	16				
$R^2 = 0.9806$		$R^2_{Adj} = 0.9537$				

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$ 。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$.

从表3可以看出,用上述回归方程描述各因素与响应值之间的关系时,模型的相关系数 $R^2 = 0.9806$,模型的显著水平(Prob > F)远远小于0.05。此时二次回归方程模型是高度显著的,说明该实验方法是可靠的;方程的失拟项 P 值为 0.1302,不显著,可用该回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析预测,未知因素对试验结果干扰很小。从表3可知 A、B、C、BC、A²、B²、C² 为作用显著的影响因素,各实验因子对响应值的影响不是简单的线性关

系。在各因素中,对提取率影响的大小依次为乙醇浓度、液料比、超声时间,即乙醇浓度对环烯醚萜类化合物提取率的影响最为显著。

RSM 的图形是特定的响应面 Y 对应于因素 A、B、C 值(A 为超声时间,B 为乙醇浓度,C 为液料比)构成的一个三维空间在二维平面上的等高图,可以直观地反映各因素对响应值的影响,从所得响应面分析图上可以分析出它们之间的相互作用。从响应面分析图 5 中可以看出响应值与影响因素的关系。

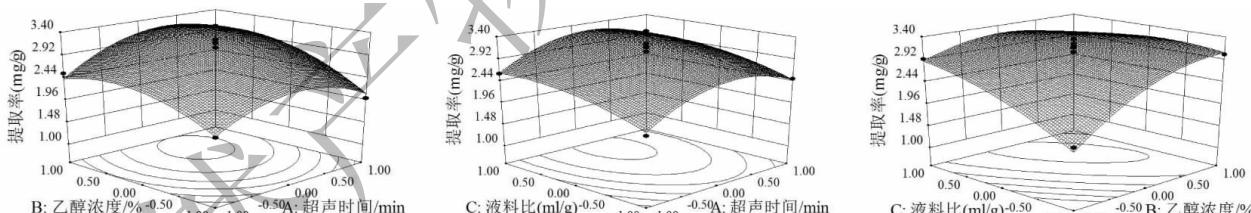


图 5 各因素交互作用对环烯醚萜苷提取率的响应面图

Fig. 5 Response surface plot for the effects of different factors on the extraction rate of iridoid glycosides

对模型方程求一阶偏导,可以求出模型的极值点: $A = 0.23$ 、 $B = 0.37$ 、 $C = 0.34$ 。经过转换得出金银花的超声提取最佳工艺为:液料比 117 mL/g、乙醇浓度 33.7%、超声时间 44.8 min,在此条件下环烯醚萜类化合物的提取率的预测值为 3.28 mg/g。

2.4 验证试验

为验证所得结果的准确性,对模型优化的工艺条件进行验证。实际选择工艺参数:液料比 117 mL/g、乙醇浓度 34%、超声时间 45 min,平行实验 3 次,结果见表 4,稍低于预测值,与理论值 3.28 mg/g

的相对偏差为 0.31%,充分验证了模型的正确性,说明方程与真实试验情况拟合良好,优化的工艺可靠、可行。

表 4 验证试验

Table 4 Verification test

序号 No.	提取率 Extraction rate (mg/g)	均值 Average value (mg/g)
1	3.24	3.26
2	3.28	
3	3.26	

2.5 金银花中环烯醚萜苷含量的产地间差异

采用上述优化后的最佳方案,选择工艺参数:液料比 117 mL/g、乙醇浓度 34%、超声时间 45 min,对不同产地的 10 个金银花供试品进行环烯醚萜苷的含量测定,测得结果如表 5 所示。

由表 5 可知,金银花中环烯醚萜苷的含量在不

同产地间存在较大差异,变异幅度为 1.46~3.28 mg/g。在 3 个不同产地中,山东地区含量最高,河南产地的含量与山东比较接近,而安徽产地则比较低,这与金银花的道地产区相一致。说明金银花道地产区的划分是有其科学依据的。

表 5 不同产地金银花中环烯醚萜苷的含量

Table 5 Iridoid glycosides content of *Lonicerae Flos* of different areas

序号	产地	马前苷酸含量 (mg/g)	马前苷含量 (mg/g)	当药苷含量 (mg/g)	环烯醚萜苷含量 (mg/g)
1	安徽	0.73	0.09	0.64	1.46
2	安徽	1.01	0.12	0.99	2.12
3	安徽	0.89	0.08	0.81	1.78
4	山东	1.68	0.21	1.23	3.12
5	山东	1.51	0.41	1.34	3.26
6	山东	1.68	0.34	1.26	3.28
7	山东	1.31	0.51	1.42	3.24
8	山东	1.50	0.29	1.48	3.27
9	河南	1.46	0.40	1.37	3.23
10	河南	1.01	0.29	0.97	2.27

3 讨论

本研究采用 HPLC 法同时测定金银花中多种环烯醚萜苷的含量,以总环烯醚萜苷的含量为评测指标,通过 Box-Behnken 设计试验方案,进行提取工艺优化,得到了环烯醚萜苷高效提取的最佳工艺条件:液料比 117 mL/g、乙醇浓度 34%、超声时间 45 min。在此条件下环烯醚萜苷类化合物的提取率的预测值为 3.28 mg/g。其含量测定方法简便、准确,优选出的最佳工艺条件经验证试验结果证明与模型预测值相符。金银花中环烯醚萜苷的含量在不同产地间存在较大差异,山东与河南地区含量相对比较高。说明不同的生长环境对金银花中环烯醚萜苷的含量有很大的影响。因此,在今后金银花的 GAP 基地生产中,我们还需深入研究忍冬科植物中各类化学成分与生长环境的关系。本研究为金银花中环烯醚萜类化合物在各领域的开发利用提供了一定的参考依据。

参考文献

1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the people's republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:221.

- Zhang ZY(张重义), Li P(李萍), Li HJ(李会军), et al. Comparative study on quality of *Flos Lonicerae* between geo-authentic and non-authentic producing areas[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2007, 32:786-788.
- Xia Y(夏远), Li DZ(李弟灶), Pei ZZ(裴振昭), et al. Review on the chemical constituents of the flower buds of *Lonicera japonica*[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药), 2012, 14(4):26-32.
- Lee S, Shin E, Son K, et al. Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*[J]. *Arch Pharm Res*, 1995, 18:133-135.
- Wu M, Wu P, Liu M F, et al. Iridoids from *Gentiana lutea*[J]. *Phytochem*, 2009, 70:746-750.
- Wang YD(王亚丹), Yang JB(杨建波), Dai Z(戴忠), et al. Research progress on *Lonicerae japonicae Flos*. [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2014, 34:1928-1935.
- Zhao P(赵鹏), Li WH(李稳宏), Zhu ZH(朱驥海), et al. Optimization of ultrasonic extraction for polysaccharides from *Lonicera japonica*[J]. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30:151-154.
- Chen JX(陈静娟), Zhang MM(张敏敏), Cui L(崔莉), et al. Determination of iridoid glycosides in *Lonicerae Japonicae Flos* and its patent medicine Lianhua Qingwen Capsule by dispersive solid phase extraction-HPLC [J]. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47:2850-2856.