

响应面法同步优化藏药材白花龙胆花中两种苷类成分的超声提取工艺

杨芳¹, 张宗豪², 童丽¹, 严崑^{1*}

¹青海大学医学院; ²青海大学畜牧兽医科学院, 西宁 810001

摘要: 利用响应面法同步优化藏药材白花龙胆花中龙胆苦苷和异荛草苷的提取工艺。单因素试验筛选出乙醇浓度、超声时间、超声温度三个主要因素, 以龙胆苦苷和异荛草苷的得率(Y_1 和 Y_2) 为响应值, 利用响应面法对白花龙胆花中龙胆苦苷和异荛草苷提取工艺进行优化。采用响应面法绘制三维及等高线叠加图, 应用同步优化程序, 得两种苷类物质均为高的最佳提取工艺参数为: 乙醇浓度为 62%, 超声时间为 65 min, 超声温度为 50 °C, 在此最佳条件下实际测得龙胆苦苷含量为 0.75%, 异荛草苷含量为 0.56% 接近于模型预测值 0.76% 与 0.55%; 结果表明, 响应面法优化得到的工艺条件参数准确、可靠, 具有实用价值。

关键词: 响应面法; 白花龙胆花; 龙胆苦苷; 异荛草苷; 超声提取工艺

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0101-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.015

Optimization of ultrasonic-assisted extraction of two active components from Tibetan medicine *Gentiana algida*

YANG Fang¹, ZHANG Zong-hao², TONG Li¹, YAN Wei^{1*}

¹Qinghai University Medical College; ²Animal and Veterinary Sciences Academy of Qinghai University, Xining 810001, China

Abstract: The ultrasound-assisted extraction process parameters of two active components (gentiopicroside, homoorientin) in Tibetan medicine *Gentiana algida* flower. To obtain the maximum of extraction ratio of the components. Three main factors including ethanol concentration, extraction time, extraction temperature were selected on the basis of experimental results of single factors. The optimum extraction condition were as follow: 62% ethanol, extraction time 65 min, and extraction temperature 50 °C. Under the conditions, the optimum extraction ratio of the two active components from *G. algida* flower was 0.75%, 56%, close to the model prediction values (0.76% and 0.55%). The results showed that the parameters were accurate, reliable and practical.

Key words: response surface method; *Gentiana algida*; gentiopicroside; homoorientin; ultrasonic extraction

白花龙胆为常用藏药材, 始载于 8 世纪中期的《月王药诊》, 历部藏医学典籍及本草均有记载^[1]。汉文译音为榜间嘎保, 榜间嘎布, 邦见嘎保等, 是我国重要的常用中藏药材资源之一, 已有 2 000 年的药用历史^[2,3]。藏医普遍认为色泽为白的白花龙胆为“榜间”类药材的上品。关于白花龙胆花的基原植物, 不同文献的记载存在较大差异, 不同地区的藏医师之间用药也存在争议, 根据文献有龙胆科 (*Gentianaceae*) 龙胆属 (*Gentiana* (Tourn.) L.) 植物

麻花秦艽 (*Gentiana stamina* Maxim.), 以及常用的龙胆科 (*Gentianaceae*) 龙胆属 (*Gentiana* (Tourn.) L.) 高山龙胆 (*Gentiana algida*) 等^[4]。其中高山龙胆花是常用的植物, 并记载于相关文献典籍^[5,6], 白花龙胆花中主要的抗炎成分是龙胆苦苷及异荛草苷、齐墩果酸等, 结合白花龙胆花抗炎等临床疗效, 本文将其中的两种代表性化合物龙胆苦苷和异荛草苷作为响应面法提取的目标化合物。

目前白花龙胆花中这两种苷类成分的提取方法主要有传统的加热回流提取和冷浸提取, 传统提取方法耗时长、提取试剂消耗量大、且提取效率低。基于以上原因, 本实验利用超声提取方法提取, 超声波

可破坏植物细胞和细胞膜结构^[7],从而增强细胞内容物通过细胞膜的穿透能力,有利于各类化合物的释放与溶出。Box-Behnken 设计结合响应面法是通过采用多元线性拟合或二项式回归分析来表达因素与响应值之间函数关系的一种统计方法^[8],且可以明确任意两个因素的交互作用影响,结果直观、可靠,且实验效果好。

本研究在单因素试验的基础上选择乙醇浓度、超声时间、超声温度 3 个主要因素,对龙胆苦苷和异荛草苷的同时提取工艺进行了优化,以期为研究白花龙胆花中苷类成分的超声提取路线提供参考,为白花龙胆花的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器、试剂

白花龙胆花:实验所用材料购于青海省西宁市药材市场,即高山龙胆(*Gentiana algida*)。龙胆苦苷、异荛草苷标准品购自中国生物制品检定所(批号分别为:120426、121208);甲醇为色谱纯;水为超纯水;其它试剂均为分析纯。Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),UV 检测器,四元梯度泵。KQ-250DB 型数控超声波仪(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 色谱条件

色谱条件:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相:甲醇-水(0.5% 乙酸)体系,在 0~40 min 内由 10% → 90% 甲醇梯度洗

脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30 °C,选检测波长 220 nm,进样量 5 μL。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备

称取白花龙胆花 5.000 g,粉碎、过 60 目筛,将样品低温烘干,精确称取白花龙胆花 3.000 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,按照一定的液料比、乙醇浓度、超声时间和超声温度进行超声提取,提取完成后过滤并用 60% 乙醇定容至 100 mL 容量瓶中,即为样品溶液待测。

1.3.2 标准曲线的制备

对照品溶液制备:精密称取标准品龙胆苦苷 1.2 mg、异荛草苷 1.4 mg,加甲醇分别定容于 5 mL 容量瓶中,再分别移取各标准溶液 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中,定容并混匀,制成混合标准溶液,两物质浓度依次为 0.024、0.028 mg/mL;将制好的标准品溶液在“1.2”项色谱条件下进样分析,龙胆苦苷进样量依次为 0.0015、0.003、0.006、0.012、0.024 mg/mL,得到龙胆苦苷标准曲线 $Y = 2\,669.79X + 150.70$,线性范围 0.001 5 ~ 0.024 0 mg/mL, R 为 0.999 7;异荛草苷进样量依次为 0.001 75、0.003 5、0.007、0.014、0.028 mg/mL 异荛草苷标准曲线 $Y = 2\,869.31X + 1\,632.7$,线性范围 0.001 75 ~ 0.028 mg/mL, R 为 0.999 4,色谱图见图 1。

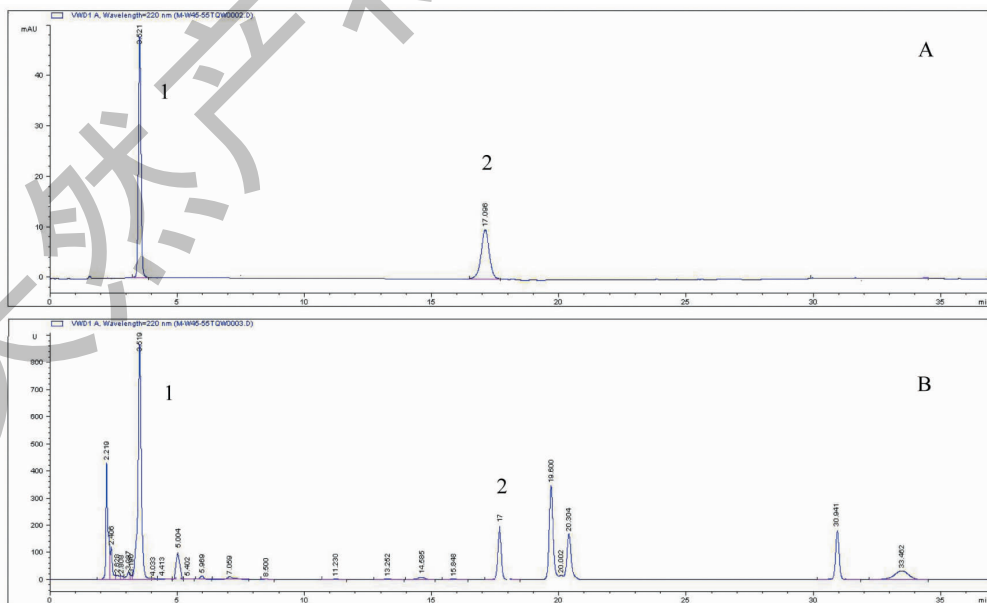


图 1 对照品及样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance and sample

注:A:对照品;B:样品。1:龙胆苦苷;2:异荛草苷。Note:A:Reference substance;B:Sample. 1:Gentiopicroside;2:Homoorientin.

1.3.3 龙胆苦苷和异荭草苷得率的计算

利用 HPLC 法测定所制备样品溶液中目标成分的含量,将其峰面积代入制作的标准曲线中,得到样品中龙胆苦苷和异荭草苷含量 C_1 和 C_2 ,再代入下式得到两种物质的得率。

$$\text{苷类物质的得率} = (C_1/C_2 \times V/M) \times 100\%$$

式中: V 为定容体积 (mL); M 为称取的白花龙胆花的质量 (g); C 为样品溶液中龙胆苦苷和异荭草苷的含量 (mg/mL)。

1.3.4 提取条件的优化设计

为确定响应面设计的实验因素,首先进行单因素试验,选取乙醇浓度、料液比、超声时间、超声温度四个因素考察各个因素单独对响应值的影响;通过单因素试验结果,选择乙醇浓度、超声时间、超声温度三个因素,应用 Design-expert 8.0 软件,设计 3 因素 3 水平的响应面试验,利用响应面试验结果,确定白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草苷超声提取的最佳提取条件。试验因素与水平设计见表 1。

表 1 试验因素与水平设计

Table 1 Factors and levels

水平 Level	因素 Factor		
	X_1 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	X_2 超声时间 Ultrasonic time (min)	X_3 超声温度 Ultrasonic temperature (°C)
-1	55	40	30
0	65	60	40
1	75	80	50

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 料液比对白花龙胆花苷类成分提取率的影响

固定其它条件不变(乙醇浓度 75%,时间 60 min,温度 40 °C)考察液料比(5、10、15、20、25 mL/g)对白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草苷提取得率的影响,结果如图 2 所示,在 5~15 液料比范围内,龙

胆苦苷和异荭草苷提取得率随液料比的增加而呈上升趋势,这是因为溶剂用量越大对成分的溶解能力越强,苷类化合物在大剂量的溶剂中始终成稀溶液状态,利于扩散的进行,在液料比为 15 mL/g 时,苷类物质提取得率达到最大,说明一定比例的溶剂已将有效成分基本溶出完全;因此,从成本和能耗方面考虑,液料比选择在 15 mL/g 为宜。

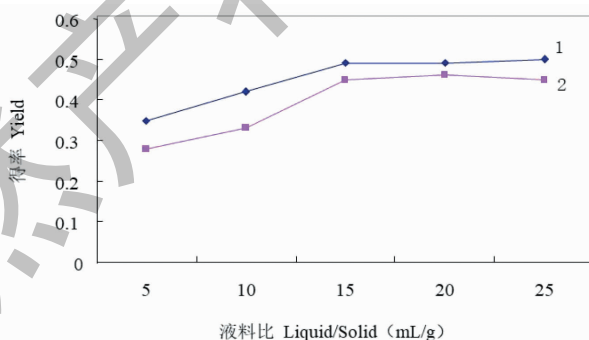


图 2 不同液料比对白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草苷提取得率的影响

Fig. 2 Effect of different Liquid/Solid ratio on the extraction ratio of the gentiopicoside and homoorientin

注:1:龙胆苦苷得率;2:异荭草苷得率,下同。Note:1:Gentiopicoside yield;2:Homoorientin yield, the same below.

2.1.2 乙醇浓度对白花龙胆花苷类成分提取得率的影响

固定其它条件不变(液料比 15 mL/g,温度 60 °C,时间 60 min 时),考察乙醇浓度(30%、40%、50%、60%、70%)对白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草

苷提取得率的影响;结果如图 3 所示,在乙醇浓度为 40%~60% 的范围内,苷类物质提取得率随着乙醇浓度的增加而增加,但当乙醇浓度大于 60% 时,苷类提取得率随着乙醇浓度的增加而减小,因而,结合得率和成本考虑,应选择浓度为 60% 的乙醇提取白

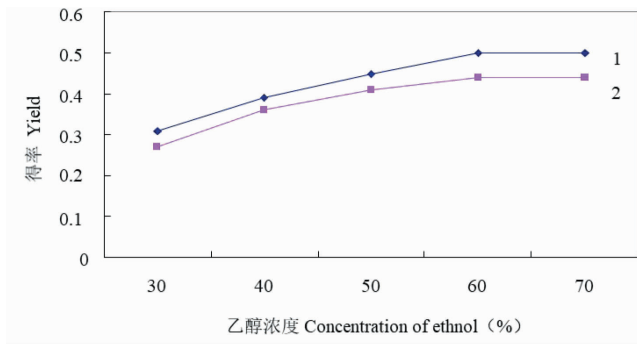


图3 乙醇浓度对白花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷提取得率的影响

Fig. 3 Effect of different ethanol concentration on the extraction ratio of the gentiopicroside and homoorientin

花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷。

2.1.3 超声时间对白花龙胆花苷类成分提取得率的影响

固定其它条件不变(液料比 15 mL/g, 乙醇浓度 65%, 温度 60 °C), 考察超声时间(20、40、60、80、

100 min)对白花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷提取得率的影响, 结果如图4所示, 苷类物质提取得率随着时间的增长呈上升趋势, 60 min 附近达到最大, 之后趋于平缓, 说明提取液内有效成分浓度已达到平衡, 为减少能耗, 节约时间, 超声时间选择 60 min 左右为宜。

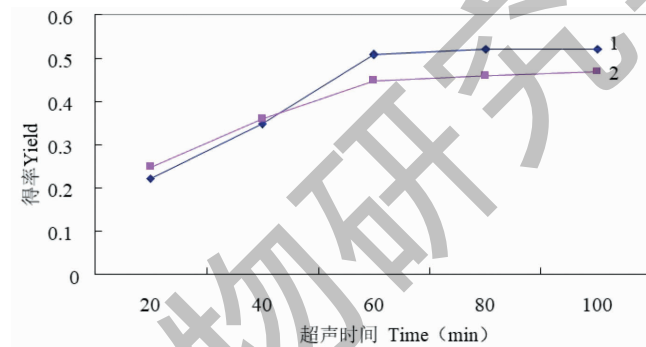


图4 不同超声时间对白花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷提取得率的影响

Fig. 4 Effect of different extraction time on the extraction ratio of the gentiopicroside and homoorientin

2.1.4 超声温度对白花龙胆花苷类成分提取得率的影响

固定其它条件不变(液料比 15 mL/g, 乙醇浓度

65%, 时间 60 min), 考察超声温度(20、30、40、50、60 °C)对白花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷提取得率的影响; 结果如图5所示, 在 40 °C 之前, 随着温度的

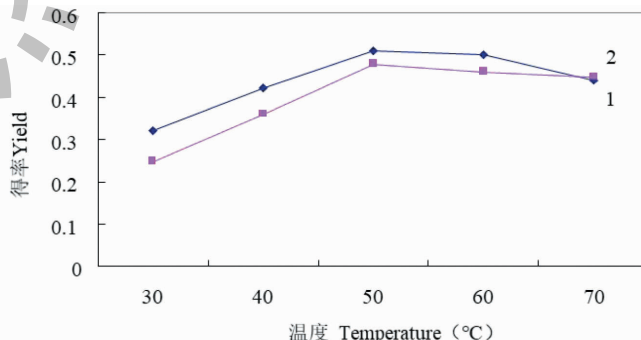


图5 不同超声温度对白花龙胆花龙胆苦苷和异葑草苷提取得率的影响

Fig. 5 Effect of different extraction temperature on the extraction ratio of the gentiopicroside and homoorientin

升高,总黄酮提取得率逐渐增加,且增幅明显,40 ℃ 时达到最大,之后略显下降,这一趋势可能是由于温度过高,苷类物质分解,使其得率下降,且在工业生产中,过高的超声温度耗能较大而不易操作,因此选择温度为 40 ℃ 左右为宜。

2.2 响应面法优化白花龙胆花龙胆苦苷和异荜草苷提取工艺

2.2.1 响应面分析方案与结果

通过上述的单因素分析,我们筛选出了乙醇浓度、超声时间、超声温度三个主要因素,采用 Box-Behnken 设计结合响应面法,以苷类成分提取得率为响应值,对影响超声提取白花龙胆花龙胆苦苷和异荜草苷工艺进行优化,试验结果见表 2。

表 2 试验设计与结果($n=3$)
Table 2 Design and results of experiment ($n=3$)

试验号 No.	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	-1	0	-1	0.31	0.21
2	1	1	0	0.45	0.32
3	1	0	-1	0.35	0.28
4	0	-1	1	0.53	0.43
5	1	0	1	0.45	0.35
6	0	-1	-1	0.37	0.29
7	-1	0	1	0.37	0.26
8	1	-1	0	0.36	0.25
9	0	1	-1	0.43	0.28
10	-1	1	0	0.45	0.27
11	-1	-1	0	0.34	0.28
12	0	1	1	0.59	0.41
13	0	0	0	0.68	0.44
14	0	0	0	0.67	0.42
15	0	0	0	0.65	0.45
16	0	0	0	0.66	0.40
17	0	0	0	0.68	0.43

显然,通过数据可知,实验所选用的三个因素,不仅影响到龙胆苦苷的提取率,还影响了异荜草苷的提取率。分别以 Y_1 和 Y_2 为响应值,以 X_1 、 X_2 、 X_3 为因变量,采用 Design-expert 8.0 软件对各因素进行回归拟合,得模型 1 和 2,见表 3,根据表 3 中回归模型的方差分析可知, R^2 值分别为 0.98 和 0.99,符合度达到 98% 和 99%,表明,两种苷类物质的得率与实际拟合较好,回归整体模型为极显著,说明使用该方程模拟实际的三因素三水平的分析是可行的。

X_1 、 X_2 和 X_3 对于 Y_1 的影响均为显著,且其线性和平方项的影响也为显著或极显著($P < 0.001$)。同时,由 F 值的大小可以推断,3 个因素对 Y_1 影响的排序为:超声温度(X_3) > 超声时间(X_2) > 乙醇浓度(X_1)。同样模型 2 的方差分析结果表明方程中的 3 个因素(X_1 、 X_2 、 X_3),以及 3 个因素的线性和平方项的影响均为极显著($P < 0.001$) (见表 4)。由 F 值的大小可以推断,3 个因素对 Y_2 影响的排序为:超声温度(X_3) > 超声时间(X_2) > 乙醇浓度(X_1)。

对模型 1 和 2 分别进行方差分析得表 4,可知

表 3 龙胆苦苷和异荜草苷得率模型拟合结果

Table 3 Fitted models for extraction ratio of the gentiopicroside and homoorientin

模型 Mode	拟合方程 Fitted equation	R^2	F	P
1	$Y_1 = 10.08350 + 0.24495X_1 + 0.027325X_2 + 0.086700X_3 - 2.50000E-005X_1X_2 + 1.00000E-004X_1X_3 + 0.000000X_2X_3 - 1.89000E-003X_1^2 - 1.97500E-004X_2^2 - 1.09000E-003X_3^2$	0.98	38.48	<0.0001
2	$Y_2 = -5.15944 + 0.14082X_1 + 4.76250E-003X_2 + 0.034575X_3 + 1.00000E-004X_1X_2 + 5.00000E-005X_1X_3 - 1.25000E-005X_2X_3 - 1.12750E-003X_1^2 - 8.81250E-005X_2^2 - 4.02500E-004X_3^2$	0.99	9.85	<0.0001

表 4 白花龙胆花龙胆苦苷和异荜草苷得率模型方差分析结果

Table 4 ANOVA analysis of variance for extraction ratio of the gentiopicroside and homoorientin

模型 1 Model 1	龙胆苦苷得率 Gentiopicrosid yield				模型 2 Model 2	异荜草苷得率 Homoorientin yield			
	平方和 Sum of squares	自由度 df	F	P		平方和 Sum of squares	自由度 df	F	P
X_1	2.45×10^{-3}	1	2.089	0.023 8 *	X_1	4.05×10^{-3}	1	3.66	0.017 5 *
X_2	0.013	1	15.11	0.006 0 **	X_2	1.125×10^{-4}	1	0.10	0.049 3 *
X_3	0.029	1	34	0.000 6 **	X_3	0.019	1	17.16	0.004 3 **
X_1^2	0.15	1	177.54	<0.000 1 **	X_1^2	0.054	1	48.32	0.000 2 **
X_2^2	0.026	1	31.02	0.000 8 **	X_2^2	5.232×10^{-3}	1	4.72	0.006 3 **
X_3^2	0.050	1	59.05	0.000 1 **	X_3^2	6.821×10^{-3}	1	6.16	0.042 1 *

注: * $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著。

Note: * $P < 0.05$, difference is significant; ** $P < 0.01$, difference is very significant.

2.2.2 因素间的交互影响

根据拟合模型绘制苷类物质提取得率响应面的三维图与等高线,可直观地看出响应面的最高点,即参数范围内的极值以及因素间的相互作用对响应值

的影响,依次可以确定最佳工艺参数范围,Design-expert 8.0 软件处理后三维响应面和等高线图见图 6、7。

分析 6 组图可知,超声时间、超声温度对苷类物

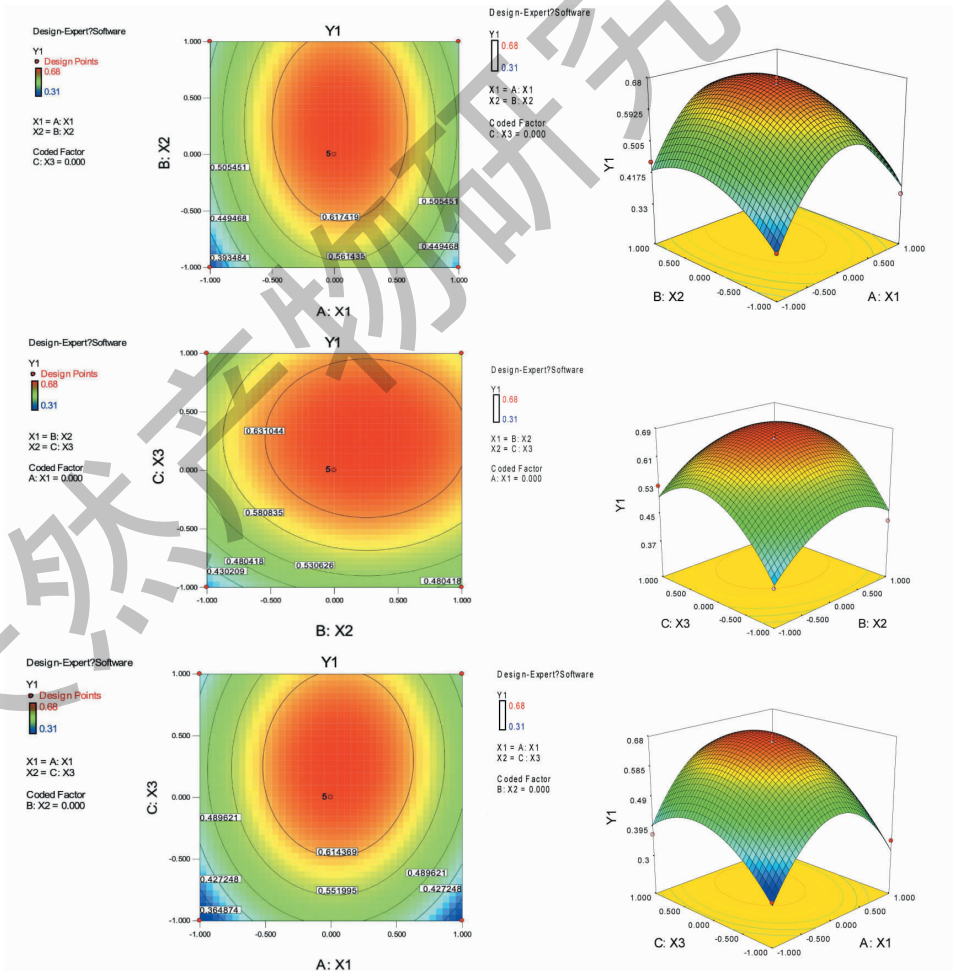


图 6 白花龙胆花龙胆苦苷提取工艺优化模型的等高线及响应面图

Fig. 6 Contour plots and response surfaces of the optimization models for extraction of gentiopicroside

质提取得率的影响较为显著,表现为曲线较陡,即随着超声时间、超声温度的增加或减少,响应值变化较大;乙醇浓度对总黄酮提取得率的影响较小,表现为曲线较为平滑,即随乙醇浓度增加或减少,响应值变

化较小,图 6 和图 7 的等高线图呈明显的椭圆形,说明超声时间和乙醇浓度的交互作用以及超声时间和超声温度的交互作用显著。

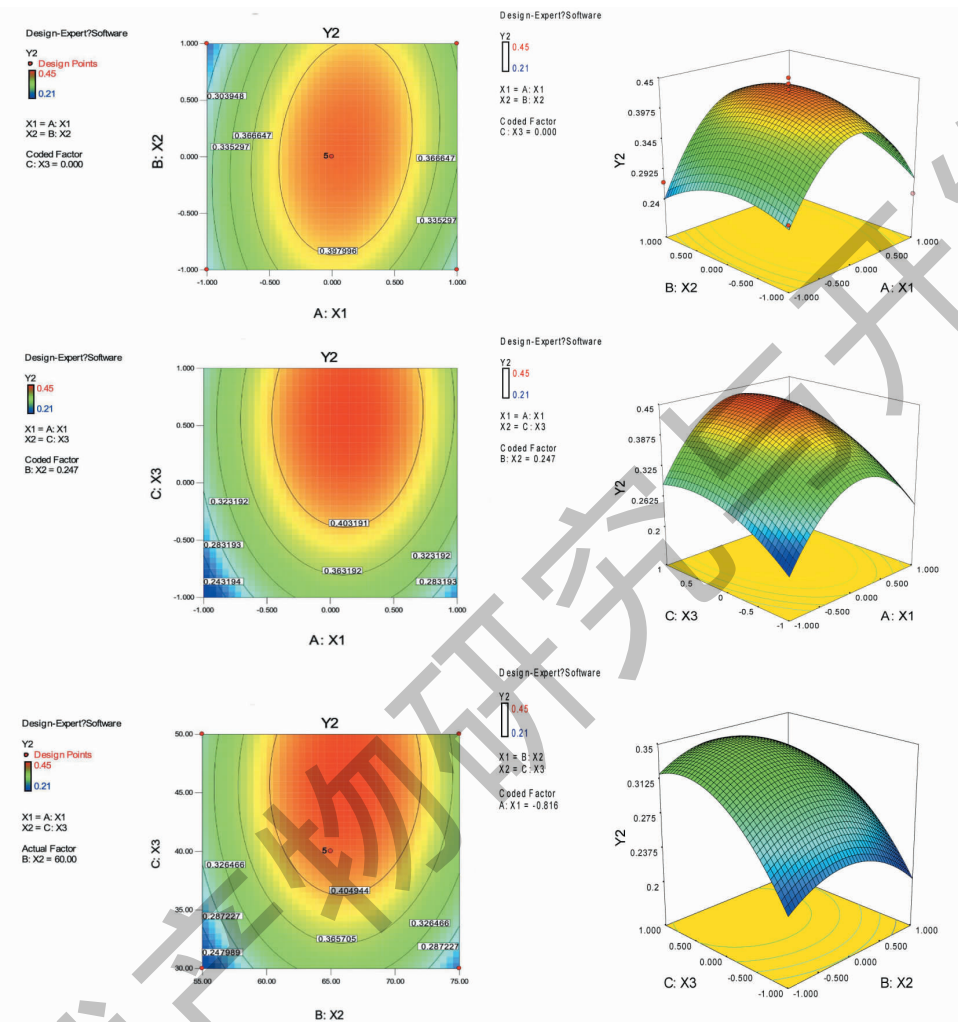


图 7 白花龙胆花异荭草苷提取工艺优化模型的等高线及响应面图

Fig. 7 Contour plots and response surfaces of the optimization models for extraction of homoorientin

2.2.3 白花龙胆花苷类物质提取工艺条件

确定通过软件 Design-expert 8.0 求解方程,得出了龙胆苦苷最优提取工艺条件为:乙醇浓度为 62.7%,超声时间为 65.3 min,超声温度为 51.2 ℃,异荭草苷最优提取率为:乙醇浓度为 62.4%,超声时间为 64.8 min,超声温度为 49.8 ℃,在此工艺条件下龙胆苦苷和异荭草苷得率可分别达到 0.76% 和 0.55%。

2.2.4 工艺验证

综合考虑时间、成本等因素,对工艺参数进行了一定的修正,确定适宜的提取工艺条件为:乙醇浓度

为 62%,超声时间为 65 min,超声温度为 50 ℃,在此条件下,进行了 6 次重复试验,白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草苷平均提取得率为 0.75% 和 0.56%,与预测值基本吻合。

3 结论

通过 Box-Behnken 中心组合试验设计得到超声提取白花龙胆花苷类物质的优化工艺条件:乙醇浓度为 62%,超声时间为 65 min,超声温度为 50 ℃,白花龙胆花龙胆苦苷和异荭草苷平均提取得率为 0.75% 和 0.56%。结果表明,采用响应面法优化白花龙胆花苷类物质的提取工艺条件具有实际应用价

值,为藏药材白花龙胆花的进一步开发利用提供了理论依据。

参考文献

- 1 Yang YC. Tibetan Medicine Records(藏药志)[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991:9-10.
- 2 Editorial board of flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China(Vol 62)(中国植物:第62卷)[M]. Beijing: Science Press, 1988:14.
- 3 Wu PS. Shen Nong Herbal Classic(神农本草经)[M]. Beijing: Commercial Press, 1955:67.
- 4 Zhong SH, Gu R, Ma L, et al. Varieties textual research and usage investigation of white Flos Gentianae, a Tibetan medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志) 2014, 29:2450-2455.
- 5 Health Bureau of the Revolutionary Committee of Tibet Autonomous Region, Logistics and Health Department of Tibet Military Region. Common Chinese Herbal Medicines in Tibet(西藏常用中草药)[M]. Lasha: Tibet People's Publishing House, 1973:153.
- 6 Yang YC. Tibetan Medicine Records(藏药志)[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991:186.
- 7 Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants[J]. Food Sci Tech, 2006, 17:300-312.
- 8 Wang ZZ, Wu WJ. The optimal extracting conditions for *Chrysanthemum indicum* L. by response surface design (RSD)[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18:648-650.
- 12 Chang J, Tao J, Zhu ZC, et al. Arachidonic acid promotes the growth of colorectal cancer by oxidative inactivation of PTEN through COX-2 enzyme metabolism[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2020, 20:4001-4006.
- 13 Li XY, Zheng MM, Guo Y, et al. Protection of plant sterol ester of α -linolenic acid from non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting oxidative stress[J]. Acta Nutr Sin(营养学报), 2020, 42:575-580.
- 14 Li SR, Zhang C, Zhang LQ, et al. Effect of docosapentaenoic acid on lymphocyte cell viability and monoamine neurotransmitter content[J]. J Guangdong Ocean Univ(广东海洋大学学报), 2020, 40(2):77-82.
- 15 Leikin-Frenkel A, Liraz-Zaltsman S, Hollander KS, et al. Dietary alpha linolenic acid in pregnant mice and during weaning increases brain docosahexaenoic acid and improves recognition memory in the offspring[J]. J Nutr Biochem, 2021, 91:108597.
- 16 Ortega L, Lobos-González L, Reyna-Jeldes M, et al. The Ω -3 fatty acid docosahexaenoic acid selectively induces apoptosis in tumor-derived cells and suppress tumor growth in gastric cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 896:173910.
- 17 Ghaffari-Makhmalbaf P, Sayyad M, Pakravan K, et al. Docosahexaenoic acid reverses the promoting effects of breast tumor cell-derived exosomes on endothelial cell migration and angiogenesis[J]. Life Sci, 2021, 264:118719.