

响应面法优化茜草总酚超声提取工艺^{*}

赵璠¹ 李家磐² 段逍¹ 罗瑶² 姬海月² 净易尧²

胡本祥² 杨冰月² 刘清² 白志超³ 彭亮^{2**}

(1. 榆林市第五医院, 陕西 榆林 719000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 西安 712046;

3. 中国人民解放军陆军第八十二集团军医院, 河北 保定 071000)

摘要:目的 利用响应面法优化茜草超声提取工艺。方法 以料液比、提取时间、乙醇体积分数、提取温度、提取功率和提取次数为影响因素, 总酚提取率为评价指标, 在单因素试验基础上, 运用响应面法探讨料液比、乙醇体积分数和提取时间对茜草总酚提取率的影响并进行优化。结果 茜草总酚超声提取的最佳工艺为: 料液比 1:30, 乙醇体积分数 75%, 提取时间 65 min, 提取次数 2 次, 超声功率 200 W, 茜草总酚最佳提取含量为 10.48%。**结论** 响应面法可为茜草总酚的超声提取和应用提供一定科学依据。

关键词: 茜草; 总酚; 响应面; 超声提取; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-1340(2022)05-0119-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.05.023

茜草为茜草科植物茜草 (*Rubia cordifolia* Linn.) 的干燥根及根茎, 我国常用大宗中药材, 历代药典均有收载^[1]。茜草性苦、寒, 归肝经, 生用或炒炭用, 具有凉血, 祛瘀, 止血, 通经等功效, 主产于陕西、河南等地, 系陕西省“秦药”品种的大宗道地药材之一^[2-3]。现代研究表明, 茜草中的主要化学成分有蒽醌类、总酚类、总黄酮类、多糖类、萜类及大量微量元素等, 其中酚类成分具有显著的生理活性, 药理学研究表明茜草总酚类成分茜草素在体外对大肠埃希菌, 金黄色葡萄球菌, 绿脓杆菌和变形杆菌等都具有明显的抑制作用^[4-10]。然而, 目前缺乏关于茜草总酚提取工艺的优化研究。响应曲面法 (response surface methodology, RSM) 是将实验影响因素与实验结果 (响应值) 的相互影响关系进行多项式拟合, 把因素和实验结果关系通过函数化的曲面展示出来的统计法^[11-12]。近年来, 响应曲面法已被广泛的运用于中草药相关活性成分提取工艺的优化研究, 且取得了一定的研究进展^[13-18], 遂将此法用于茜草的提取工艺中。本实验以中药材茜草为原料, 在单因素试验基础上, 结合 Box-Behnken 响应面法

进行茜草总酚的提取工艺优化, 通过多项式拟合出最佳提取工艺参数, 并对其进行试验验证, 以期获得茜草中总酚超声提取的最佳产率, 为茜草这一“秦药”资源的进一步开发利用提供支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器 UV-2450 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); KQ-200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XS-02 型多功能高速粉碎机 (上海兆申科技有限公司); FA2104 型电子分析天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药 茜草药材采集于陕西省铜川市王益区, 经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为茜草科茜草属植物茜草 *Rubia cordifolia* Linn. 的干燥根及根茎。药材样品经蒸馏水清洗干净后, 60℃烘干, 粉碎过 70 目筛, 置于真空干燥器备用。无水乙醇、氢氧化钠、无水碳酸钠、硝酸铝、亚硝酸钠 (均为分析纯, 购自于天津市天利化学试剂有限公司)、福林酚试剂 (山东西亚化学工业有限公司); 水为蒸馏水。

^{*} 基金项目: 陕西省教育厅项目 (16JK1204、19JK0225); 2018 年医疗服务与保障能力提升补助资金 (中医药事业传承与发展部分) “全国中药资源普查项目” (财社 [2018] 43 号); 陕西中医药大学“秦药”品质评价及资源开发学科创新团队项目 (2019-QN01); 保定市科技局项目 (182F169)

^{**} 通讯作者: 彭亮, 副教授。E-mail: ppengliang@126.com

2 方法

2.1 总酚含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 12.40 mg,加蒸馏水定容至 10 mL,制成浓度为 1.24 mg · mL⁻¹的没食子酸对照品溶液,4 ℃ 保存。

2.1.2 标准曲线的绘制 分别精密吸取没食子酸对照品溶液 0,100,200,300,400,500,600,700,800 μL 置于带有刻度的 10 mL 透明离心管中,依次加入蒸馏水稀释至 4 mL,再加入 1 mL 的福林酚试剂,最后加蒸馏水使成 8 mL,摇匀,在 754 nm 测吸光度。以浓度(mg · mL⁻¹)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。没食子酸浓度 0 ~ 0.124 mg · mL⁻¹浓度范围内,线性良好,回归方程为 $Y = 14.447X + 0.0212$, $r = 0.9992$ 。

2.1.3 供试溶液的制备及样品测定 精密称取茜草药材粉末 0.2000 g,置于 50 mL 规格锥形瓶内,按照单因素试验及响应面试验设计方案进行提取,制备供试溶液,重复三次。精密吸取储备液 1 mL,同 2.1.2 项下的方法操作,测定吸光度,代入工作曲线,计算得率(mg · g⁻¹)。

2.2 单因素实验 料液比考察了 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35,提取时间考察了 30,40,50,60,70,80 min,乙醇体积分数考察了 40%、50%、60%、70%、80%、90%,提取温度考察了 30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃,提取功率考察了 100 W、125 W、150 W、175 W、200 W、225 W,提取次数考察了 1,2,3,4,5,6 次。

2.3 响应面优化工艺条件 在单因素实验研究的基础上,确定提取次数 2 次,提取功率 200 W 的前提下,采用统计分析软件 Design-Expert 12,根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,选择乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)3 个因素作为考察因素,以茜草总酚得率(Y)为评价指标,设计 3 因素 3 水平试验,因素水平及编码见表 1。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	A 乙醇体积分数(%)	B 料液比	C 提取时间(min)
-1	50	1:30	30
0	60	1:40	40
1	70	1:50	50

3 结果

3.1 单因素试验 由图 1 可知,茜草总酚提取得率随着超声次数到达 2 次后趋于平缓;乙醇体积分数对茜草总酚得率影响较大,当体积分数为 80% 时得率最高(10.20 mg · g⁻¹);随着料液比的增加,茜草总酚提取得率升高,在料液比为 1:30 时得率最高(9.58 mg · g⁻¹),随后料液比增加但得率下降;茜草总酚提取得率随提取时间先增加后降低,在提取时间为 60 min 时得率最高(10.15 mg · g⁻¹);茜草总酚提取得率随提取温度的升高先增加后降低,当温度达到 70 ℃ 时,得率最高(10.07 mg · g⁻¹);在 100 W ~ 225 W 范围内,茜草总酚提取得率呈缓慢上升趋势,当超声功率为 200 W 时得率最高(9.78 mg · g⁻¹),达到 225 W 时,得率反而降低。

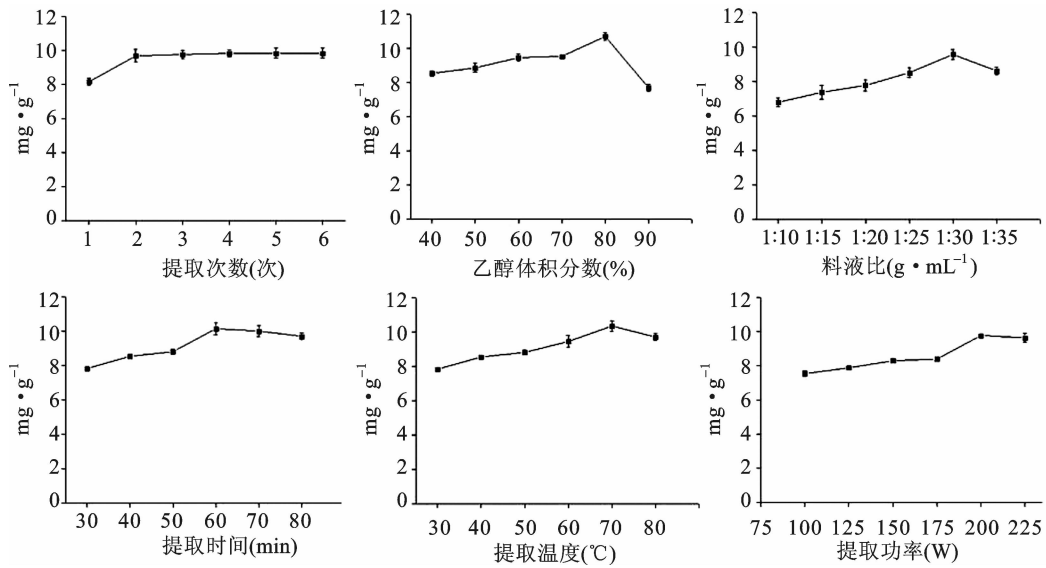


图 1 不同提取因素对茜草总酚提取率的影响

3.2 Box-Behnken 响应面法

3.2.1 建立模型方程 应用 Design-Expert 12 软件对表 2 数据进行多元回归拟合,得到茜草中总酚得率(Y)的回归方程为:

$$Y=9.42+0.36A-1.00B+0.17C-0.067AB+0.079AC+0.058BC-0.25A^2-0.31B^2-0.06C^2$$

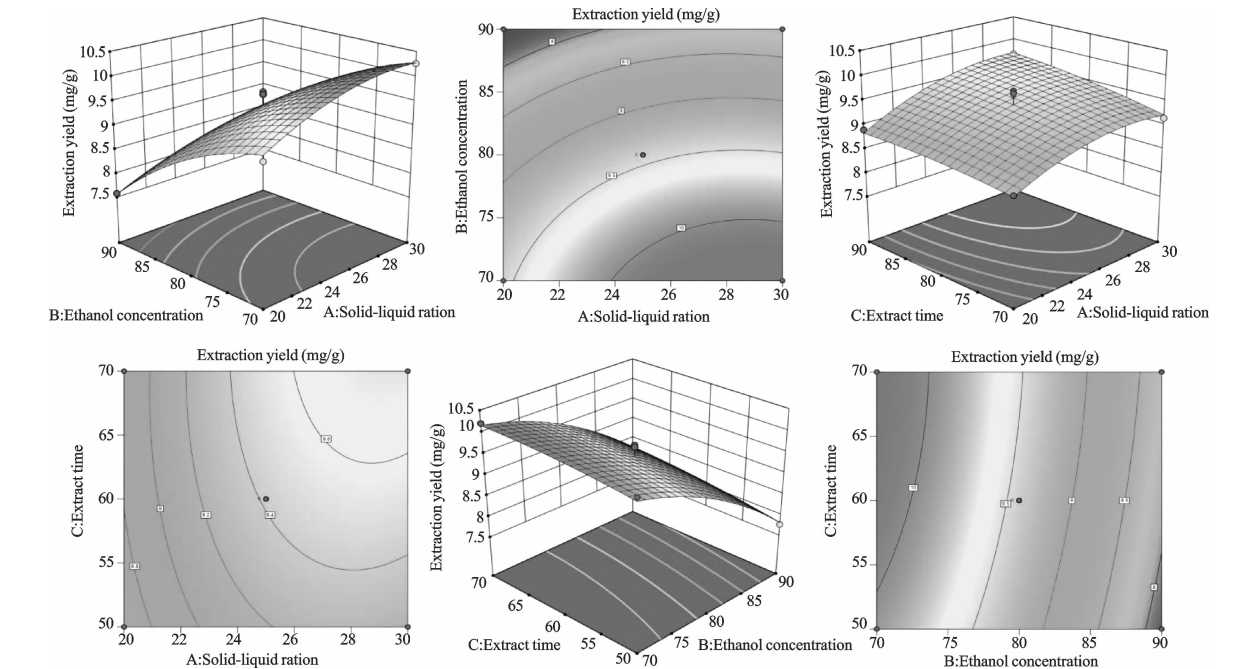
表 2 响应面法设计与结果

编号	因素			总酚得率 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
	A	B	C	
1	1	0	1	9.68
2	1	-1	0	10.26
3	0	0	0	9.65
4	-1	1	0	7.58
5	0	1	1	8.18
6	0	0	0	8.78
7	-1	-1	0	9.32
8	0	-1	-1	10.02
9	-1	0	1	8.90
10	1	0	-1	9.14
11	-1	0	-1	8.69
12	0	1	-1	7.77
13	0	0	0	9.70
14	0	-1	1	10.21
15	0	0	0	9.64
16	0	0	0	9.32
17	1	1	0	8.25

3.2.2 回归方差分析 对拟和回归方程进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,模型的 F 值为 11.9300, $P=0.0018<0.05$,差异显著,建立的回归模型准确。失拟项 F 值为 0.1235, $P=0.9415>0.05$,误差小,方程拟合度较好,建立的模型可用于试验结果的分析预测。对茜草总酚提取得率影响显著的因素是 A,极显著的因素是 B。基于 F 值的大小,影响总酚提取得率因素排序为:料液比 > 乙醇体积分数 > 提取时间;交互作用中乙醇体积分数和提取时间影响最大,料液比和提取时间则最小,见图 2。

表 3 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	10.1000	9	1.1200	11.9300	0.0018
A	1.0100	1	1.0100	10.7400	0.0135
B	8.0600	1	8.0600	85.6400	<0.0001
C	0.2281	1	0.2281	2.4300	0.1633
AB	0.0180	1	0.0180	0.1913	0.6750
AC	0.0248	1	0.0248	0.2637	0.6234
BC	0.0134	1	0.0134	0.1426	0.7169
A^2	0.2702	1	0.2702	2.8700	0.1332
B^2	0.4070	1	0.4070	4.3300	0.0761
C^2	0.0155	1	0.0155	0.1646	0.6969
残差	0.6584	7	0.0941	-	-
失拟项	0.0558	3	0.0186	0.1235	0.9415
纯误差	0.6026	4	0.1507	-	-
总离差	10.7600	16	-	-	-



A. 乙醇体积分数;B. 料液比;C. 提取时间

图 2 茜草总酚提取得率的响应面

3.2.3 最佳提取工艺及验证 基于模型分析,得到茜草总酚最佳提取工艺为:料液比为1:30.63,乙醇体积分数73.53%,提取时间为63.91 min,提取温度为68.94 ℃,总酚得率预测值为10.54 mg·g⁻¹。结合实践,将工艺修正为:料液比为1:30,乙醇体积分数75%,提取时间为65 min。基于上述条件进行5次平行验证,茜草总酚得率平均值为(10.48±0.16)mg·g⁻¹,接近预测值,表明建立的模型可靠,基于响应面法辅助超声可用于茜草总酚提取工艺优化。

4 讨论

茜草主要含有蒽醌类、黄酮类、酚酸类和多糖等多种化学成分,具有调节血脂和胆固醇、降血压、利尿等多种药理作用^[19-20]。目前,茜草的活性成分研究多集中于蒽醌类成分的化学、质量评价及药理活性等方面,关于总酚的报道较少^[21-22]。料液比、提取溶剂体积分数、提取时间、温度、次数、功率均能够影响中药材中活性部位的得率^[23-24]。对于茜草中总酚而言,只有在合适的提取工艺下才能增加得率。因此,本实验在单因素考察的基础上,采用响应曲面法考察了料液比,乙醇体积分数和提取时间对茜草总酚得率的影响,结果证实三个因素的综合作用可显著影响总酚得率。通过对所有数据模型和实验结果进行分析,获得了茜草总酚的最佳超声提取工艺为,料液比1:30,乙醇体积分数75%,提取时间65 min,提取次数2次,超声功率200 W。

响应曲面进行工艺参数优化具有显著的优势,在多因素综合分析、数据处理的基础上,可获得模型及回归方程,已成功应用于多种中药材的有效成分、有效部位等提取工艺的优化^[25]。经工艺验证实验表明,本研究构建的茜草总酚最佳提取工艺切实可行,操作简单,提取得率高,可为茜草总酚的开发利用提供基础支持。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:245.
[2] 彭亮,黄涛,张岗,等. 基于 SCoT 标记的陕产茜草野生居群遗传多样性分析[J]. 药学学报,2017,52(10):1621-1628.

[3] 陈毅,王海丽,薛露,等. 茜草的研究进展[J]. 中草药,2017,48(13):2771-2779.
[4] He DB, Bai X, Ma YH, et al. One new nucleoside and three furanpentanone derivatives from the aerial part of *Rubia cordifolia* L [J]. *Phytochemistry Letters*, 2021, 41: 125-128.
[5] Wang AK, Geng T, Jiang W, et al. Simultaneous determination of twelve quinones from *Rubiae Radix et Rhizoma* before and after carbonization processing by UPLC-MS/MS and their antithrombotic effect on zebrafish[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 191:113638.
[6] Nile SH, Nile AS, Keum YS. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(1):76.
[7] 崔丽丽,梁振华,高莉,等. 茜草炮制前后红外图谱分析[J]. 河南大学学报(医学版),2020,39(4):240-243.
[8] 王阔予,何民友,李国卫,等. 不同产地茜草药材 UPLC 指纹图谱研究及化学计量学分析[J]. 广东药科大学学报,2020,36(5):609-614.
[9] 彭亮,王媛媛,黄涛,等. ICP-MS 法测定陕西不同产地野生茜草中9种重金属元素[J]. 中草药,2018,49(6):1418-1423.
[10] 廖铁松,闵建新,潘玲玲,等. 茜草科植物环烯醚萜类化合物的研究进展[J]. 中草药,2018,49(6):1437-1450.
[11] 李莉,张赛,何强,等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
[12] 黄仕其,郭琳,李玉泽,等. 响应面法优化捆仙绳总生物碱提取工艺[J]. 陕西中医药大学学报,2021,44(5):69-73.
[13] 袁荣刚,吴立军,王立波,等. 响应曲面法优化延胡索中延胡索乙素的提取工艺[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(1):84-89.
[14] 曾海蓉,李婷娜,冉倩,等. 基于熵权法结合 Box-Behnken 响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J]. 中草药,2020,51(1):84-90.
[15] 王玄源,时庆欣,刘梦君,等. 响应曲面法优化苦丁茶总皂苷的提取工艺[J]. 湖南中医杂志,2018,34(3):167-170.
[16] 金鹏程,吴丽华,吴昕怡,等. Box-Behnken 响应面法优化滇黄精产地加工炮制一体化工艺对黄精多糖的影

响[J]. 中国现代中药,2021,23(4):674-678,690.

[17]侯敏娜,侯少平,吴满芳,等. 响应面法优化百合多糖的超声辅助提取工艺[J]. 化学与生物工程,2020,37(9):38-43,54.

[18]赵滢,刘利娥,韩萍,等. 响应面法优化超声辅助提取蔓菁多糖工艺及其体外抗氧化性研究[J]. 食品工业科技,2020,41(7):139-145.

[19]肖林焱,王海丽,陈毅,等. 茜草炭不同极性部位化学成分组成及保护氧化损伤活性比较[J]. 中国中药杂志,2017,42(23):4604-4610.

[20]彭亮,张岗,颜永刚,等. 茜草转录组分析及其蒽醌类化合物合成相关基因的挖掘[J]. 中草药,2018,49(8):1890-1896.

[21]Natarajan S, Mishra P, Vadivel M, et al. ISSR characterization and quantification of purpurin and alizarin in *Rubia cordifolia* L. populations from India[J]. Biochemical Genetics,2019,57(1):56-72.

[22]Mariadoss A, Satdive R, Fulzele DP, et al. Enhanced production of anthraquinones by gamma-irradiated cell cultures of *Rubia cordifolia* in a bioreactor[J]. Industrial Crops and Products,2020,145:111987.

[23]李占君,祖元刚,杨逢建. 响应面优化紫苏籽油微波提取参数的研究[J]. 林业科技,2019,44(3):29-32.

[24]王吉宇,李成文,徐彦靖,等. 响应面法优化藏红花素碱水解制备反式藏红花酸工艺[J]. 食品工业科技,2021,42(23):176-183.

[25]朱登辉,张靖柯,李孟,等. Box-Behnken 设计-响应面法优化山茱萸叶总三萜提取工艺[J]. 中国药房,2021,32(1):46-50.

(修回日期:2021-12-29 编辑:崔春利)