

响应面分析南方红豆杉黄酮微波提取工艺研究^{*}

李石清, 张春椿, 年慧慧, 熊耀康[△]

(浙江中医药大学药学院, 浙江杭州 310053)

〔摘要〕目的: 优化南方红豆杉 [*Taxus mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu] 枝叶中总黄酮的微波提取工艺。方法: 在单因素实验基础上, 采用响应面分析法对影响南方红豆杉枝叶中总黄酮提取率的主要因素(提取时间、料液比和乙醇体积分数)进行优化, 建立影响因素与响应值之间的数学模型, 确定最佳微波提取工艺条件。结果: 南方红豆杉枝叶中总黄酮最佳微波提取工艺为: 料液比 27.39 (V/W), 乙醇体积分数 61.44%, 提取时间 15.27min, 微波频率1 887MHz。结论: 采用响应面法对南方红豆杉中总黄酮的提取条件进行优化, 该方法合理可靠, 为生产工艺提供理论依据。

〔关键词〕南方红豆杉; 总黄酮; 微波提取; 响应面分析

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)03—0006—04

南方红豆杉 [*Taxus mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu] 系裸子植物亚门、松杉纲、红豆杉目、红豆杉科中红豆杉属植物, 是我国传统中药材, 为我国特有, 也是红豆杉属中分布最广、生长最快的植物^[1], 素有“植物黄金”之称。其抗癌活性成分是以紫杉醇为主的二萜类化合物, 但由于紫杉醇含量低, 水溶性差, 口服生物利用度差等特点, 限制了其临床应用的安全性和有效性^[2-3], 因此研究红豆杉中所含有的其它活性物质, 如黄酮类化合物, 有着重要的临床意义和经济价值。黄酮类化合物是一类广泛存在于植物光合作用细胞中的天然多元酚类物质, 也是一类具有独特生理活性和药理活性的天然产物^[4-5], 近年来, 大量药理试验研究表明, 黄酮类化合物有降脂、抗血栓、抗氧化、抗衰老、清除自由基、抗心律失常, 保肝等作用^[6], 因而广泛用于医药、食品等行业, 具有极广的开发应用前景。为了提高有效成分提取率, 充分利用药用植物资源, 有必要对南方红豆杉枝叶中总黄酮的最佳提取工艺条件进行深入研究。

响应面分析法 (Response surface methodology, RSM) 是利用合理的试验设计, 采用多元二次回归

方程拟合因素与响应值之间的函数关系, 通过对回归方程的分析来寻求最佳工艺参数, 解决多变量问题的一种统计方法^[7]。微波用于天然成分的提取, 具有选择性强、操作时间短、溶剂耗量小、目标组分得率高, 以及最大限度的保留分离组分的天然活性等优点^[8-9]。目前, 尚未见到有关微波提取南方红豆杉枝叶中总黄酮的文献, 因此该研究具有一定的创新性。本课题在单因素试验基础上, 采用响应面法分析优化南方红豆杉枝叶中总黄酮最佳提取工艺条件, 从而为其生产工艺提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

南方红豆杉药材购于宁波泰康红豆杉 (GAP) 种植基地, 经浙江中医药大学张水利副教授鉴定为红豆杉科红豆杉属南方红豆杉 [*Taxus mairei* (Lemee et Levl.) S. Y. Hu ex Liu]。将药材阴干, 粉碎, 过 60 目筛, 制成南方红豆杉药材粉末, 备用。芦丁标准品 (批号 100080 - 200707, 购自于浙江省食品药品检验所)、无水乙醇、亚硝酸钠、氢氧化钠、硝酸铝等所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

^{*} 基金项目: 浙江省大学生科技创新项目 (2011R410033); 浙江省中医药重点研究项目 (2011ZZ003)。

收稿日期: 2012—02—26 修回日期: 2012—05—25

作者简介: 李石清 (1988 ~), 男, 硕士研究生在读。研究方向为中药资源与品质评价。△通讯作者: 熊耀康, E-mail: xiongyaokang@tom.com.

AR2140 电子天平 (上海奥豪斯国际有限公司); RE-52AA 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); PJ21C-BF 微波炉 (美的集团); UV-1800 紫外可见分光光度计 (日本岛津); HN101-2 电热恒温鼓风干燥箱 (南通沪南科学仪器有限公司); SHB-3T 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司)。

2 实验方法与结果

2.1 总黄酮含量的测定

2.1.1 对照品溶液的制备

精密称取 105℃ 干燥恒重的芦丁对照品 19.90mg, 加 60% 乙醇溶解定容于 50mL 容量瓶, 摇匀, 得浓度为 0.398mg · mL⁻¹ 对照品溶液, 备用。

2.1.2 标准曲线的绘制

精密移取 0.1mL, 0.2mL, 0.4mL, 0.6mL, 0.8mL, 1.0mL, 1.2mL, 1.4mL 芦丁标准溶液, 分别加入去离子水补足体积到 2.0mL; 加入 5% NaNO₂ 溶液 0.5mL, 摇匀, 放置 6min; 加入 10% Al (NO₃)₃ 溶液 0.5mL, 摇匀, 放置 6min; 加入 5mL 1.0mol/L NaOH 溶液, 摇匀, 室温下放置 10min, 在波长 510nm 处测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标, 以芦丁浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 见图 1。

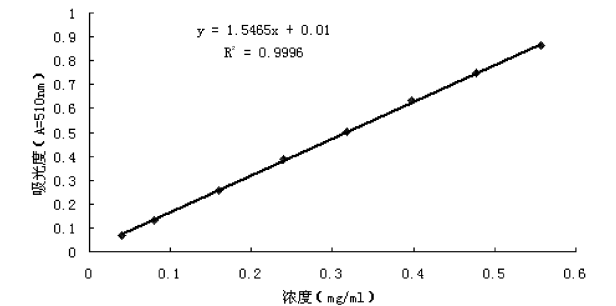


图1 芦丁标准曲线

由图 1 可以看出, 芦丁浓度与吸光度的线性回归方程为: $y = 1.5465x + 0.01$, 相关性达到了 0.9996, 表明芦丁在 0.0398 ~ 0.5572mg 范围内呈良好的线性关系。式中: y 表示波长 510nm 处的吸光度; x 表示芦丁的浓度。

2.1.3 精密度测定

精密量取 “2.1” 项下芦丁标准溶液 1.0mL, 依 “2.1.2” 中显色方法操作, 在波长 510nm 处连

续测定 5 次吸光度值。结果 RSD = 0.10%, 精密度实验符合要求 (<3%), 表明仪器的精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液 0.5mL, 按供试品溶液制备方法制备, 依 “2.1.2” 中显色方法操作, 在波长 510nm 处分别测定在 15, 30, 45, 60, 75min 的吸光度值。结果 RSD = 2.65%, 表明该方法重现性良好。

2.1.5 加样回收率实验

取已知总黄酮含量的南方红豆杉样品 6 份, 分别精密添加已知浓度的芦丁对照品适量。按供试品溶液制备方法制备, 按 “2.1.2” 项操作, 测定总黄酮含量, 计算回收率, 结果平均回收率为 99.82%, RSD 为 2.49%, 表明方法的准确性良好, 方法可行。

2.2 微波提取工艺研究

分别称取干燥至恒重的南方红豆杉药材粉末 10.0g, 根据 Box-Benhnken 中心组合设计原理, 结合单因素实验结果, 选取料液比 (x_1), 乙醇体积分数 (x_2), 提取时间 (x_3) 3 个因素, 每个自变量的低、中、高水平分别以 -1、0、1 进行编码, 采用 Design expert 7.1.6 软件进行设计, 并对实验数据进行响应分析。以南方红豆杉枝叶中总黄酮提取率作为响应值 (y)。方案及试验结果见表 1、表 2, 按其选择的因素和水平进行微波提取, 合并提取液, 过滤, 定容于 100mL 容量瓶, 作为供试品溶液。取供试品溶液适量, 其余操作同 “2.1.2” 项, 测定总黄酮含量。结果见表 2。

表1 响应面分析法的因素与水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A	20	25	30
B	50	60	70
C/min	14	15	16

利用 Design expert 7.1.6 软件对表 2 的结果进行多元线性回归拟合, 得到总黄酮提取率 (Y) 对料液比 (A)、乙醇体积分数 (B)、提取时间 (C) 的二次多项回归方程:

$$Y = 81.68 + 11.23A + 1.81B + 1.18C + 0.13AB - 0.66AC - 7.50BC - 11.57A^2 - 6.50B^2 - 1.57C^2。$$

为了说明回归方程的有效性及各因素对提取率的影响程度，对上述回归模型进行方差分析，结果见表 3。

表 2 响应面实验结果

实验编号	A	B	C	Y/mg · g ⁻¹
1	-1	-1	0	49.59
2	1	-1	0	73.16
3	-1	1	0	53.83
4	1	1	0	77.90
5	-1	0	-1	55.71
6	1	0	-1	78.12
7	-1	0	1	60.28
8	1	0	1	80.06
9	0	1	-1	71.51
10	0	-1	-1	74.20
11	0	1	1	72.97
12	0	0	1	75.70
13	0	0	0	82.73
14	0	0	0	81.14
15	0	0	0	81.10

注：共有 15 个实验，其中 12 个为析因实验，3 个为中心实验以估计误差。

表 3 响应面法对黄酮提取量的 ANOVA 分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	1658.53	9	184.28	108.05	<0.0001
A	1008.68	1	1008.68	591.42	<0.0001
B	26.17	1	26.17	15.35	0.0112
C	11.04	1	11.04	6.48	0.0516
AB	0.063	1	0.063	0.037	0.8557
AC	1.73	1	1.73	1.01	0.3602
BC	2.25E-04	1	2.25E-04	1.32E-04	9.91E-01
A ²	493.84	1	493.84	289.56	<0.0001
B ²	155.76	1	155.76	91.33	0.0002
C ²	9.13	1	9.13	5.35	0.0686
残差	8.53	5	1.71		
失拟项	6.87	3	2.29	2.77	0.2764
纯误差	1.65	2	0.83		
总计	1667.06	14			

由表 3 可知，模型 $P<0.0001$ ，回归方程具有显著性，可用于替代实验点对实验结果进行分析，并进一步对回归方程各项作显著性检验。其中，料

液比 (A)、料液比的二次项 (A^2)、乙醇体积分数的二次项 (B^2) 3 个因子的 P 值均小于 0.01，表明对黄酮的提取率影响极显著；乙醇体积分数 (B) 的 P 值大于 0.01 小于 0.05，对黄酮提取率影响显著；提取时间 (C)、提取时间的二次项 (C^2) 以及交互项的 P 均大于 0.05，说明该提取时间对提取率的影响不显著，该拟合方程的二次项系数均为负数，所以开口向下，相应的响应图 (见图 2 - 4)。利用 Design expert 7.1.6 软件绘制出回归模型的理想响应图，具有极大值点 (见图 5)，失拟向检验的 $P=0.2764$ (不显著)，表明模型充分拟合实验数据，受其他因素的影响不显著，测量的信噪比为 29.047，一般信噪比大于 4 为合理，这表明该模型有很强的信号，说明该模型可靠，是南方红豆杉枝叶中黄酮提取率与提取工艺参数的合适数学模型。

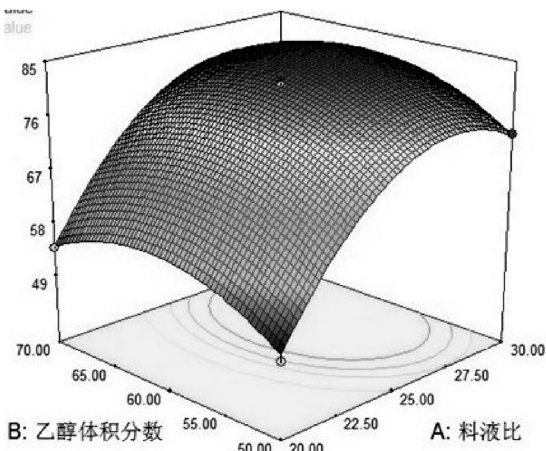


图 2 乙醇体积分数与料液比响应图

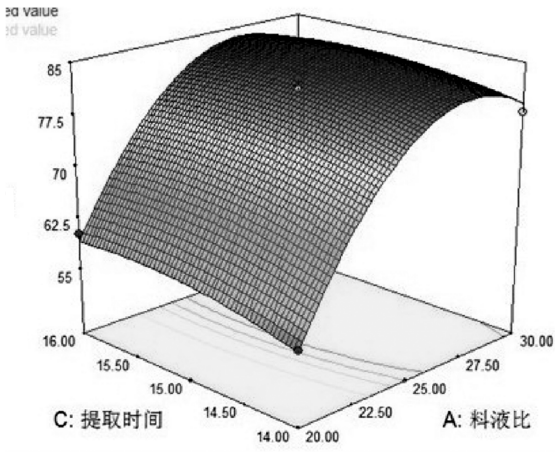


图 3 提取时间与料液比响应图

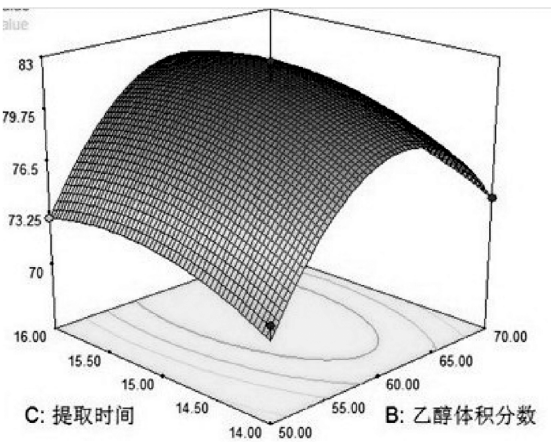


图4 提取时间与乙醇体积分数响应图

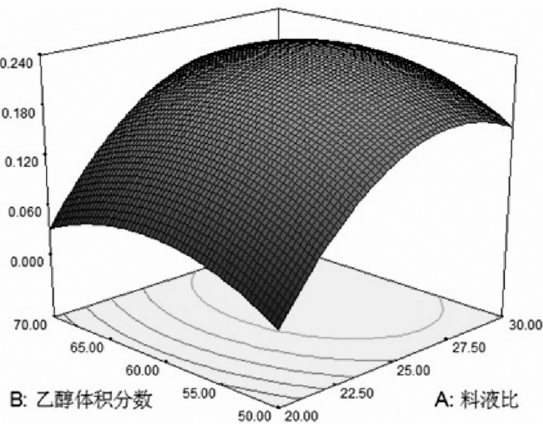


图5 料液比与乙醇体积分数理想响应图
(提取时间 C=15.27min)

对实验模型进一步分析,得理论最佳微波提取条件为:料液比 27.39 (V/W),乙醇体积分数 61.44%,提取时间 15.27min。并在料液比为 27.4 (V/W)、乙醇体积分数为 61.5%、提取时间为 916s 时,进行验证试验,结果见表 4。测得总黄酮提取平均值为 81.16 mg·g⁻¹,RSD=1.12%。结果与响应预测值相近,证明该工艺稳定,重现性好。

表4 验证性试验

编号	总黄酮含量/mg·g ⁻¹	平均含量/mg·g ⁻¹	RSD/%
1	81.72	81.16	1.12
2	80.11		
3	81.64		

3 结论与讨论

本文通过响应面分析法对南方红豆杉枝叶总黄

酮微波提取工艺进行了优化,并得到回归方程。结果表明,提取料液比、乙醇体积分数对总黄酮提取率影响显著,而提取时间的影响相对较小。同时,通过单因素实验表明,微波频率在1 887 MHz 时,提取率最高,频率过高或过低均不利于总黄酮的提取。因此确定南方红豆杉枝叶总黄酮的最佳提取工艺条件为:料液比 27.39 (V/W),乙醇体积分数 61.44%,提取时间 15.27min,微波频率 1 887 MHz。

本实验方法简单,工艺路线清晰,提取率较高。微波可以强化乙醇浸提法,达到省时、高效的目的。可以作为中药提取的新工艺,具有良好的应用前景^[10]。但微波过程中会产生热量,在操作过程中应避免液体溅出。

传统的数理统计方法一般采用正交设计或均匀设计,同时考虑几种因素,寻求最佳因素、水平组合,却不能在给出的整个区域上找到因素与响应值之间的明确的数学模型^[11],从而无法找到因素水平网格状的最佳组合和响应值的最优值。响应面分析方法通过中心组合实验设计,研究各实验因素间交互作用的一种回归分析方法,具有实验设计简单,操作方便,精确度高等优点,具有较好的应用价值。

[参考文献]

[1] 张薇,熊耀康. 南方红豆杉多糖的测定 [J]. 浙江中医杂志, 2009, 44 (9): 686-687.

[2] 李立华,张国升. 安徽皖南红豆杉中紫杉醇和多糖的提取与含量测定 [J]. 中医药临床杂志, 2010, 22 (5): 465-466.

[3] 张姝梅. 天然抗癌药物紫杉醇制剂的探究 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27 (4): 550-551.

[4] Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency [J]. Biochemical pharmacology, 1983, 32 (7): 1141-1148.

[5] 谭瑞璞,刘海周,邓义德,等. 千针万线草中总黄酮提取工艺的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32 (1): 9-11.

[6] DUBEY S K, BATRAL A. Hepatoprotective activity from ethanol fraction of Thuja occidentalis Linn. [J]. Asian J Research Chem, 2008, 1 (1): 32-35.

[7] 杨红玲,吴鸣建,张宏韬,等. 射干黄酮提取工艺的响应面设计优化 [J]. 食品科技, 2009, 34 (3): 188-192.