

响应面法优化雪松松针中金丝桃苷的回流提取工艺

张莉霞^{1,2}, 李志^{1,2}, 刘东彦¹, 石晓峰^{1,2*}, 李琳^{1,2} (1.甘肃省医学科学研究院, 兰州 730050; 2.甘肃中医药大学, 兰州 730030)

摘要: 目的 优化雪松松针中金丝桃苷的回流提取工艺。方法 采用 HPLC 测定雪松松针中金丝桃苷的含量; 基于单因素试验结果, 以金丝桃苷含量为指标, 根据 Box-Behnken 设计对影响回流提取的 3 个因素(料液比、乙醇浓度、提取时间)进行考察; 通过响应面分析优化雪松松针中金丝桃苷的最佳回流提取工艺。结果 优化得到的最佳回流提取工艺参数为乙醇浓度 60%、料液比 1:16(g·mL⁻¹)、回流提取 1 次, 时间为 100 min; 在此工艺条件下提取得到的金丝桃苷平均含量为 0.119 6 mg·g⁻¹, 与预测值 0.119 4 mg·g⁻¹ 的相对偏差较小。结论 优选得到的雪松松针中金丝桃苷回流提取工艺合理、可行。

关键词: 雪松松针; 金丝桃苷; 回流提取工艺; Box-Behnken 设计; 响应面法

中图分类号: R284.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)06-0850-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.014

引用本文: 张莉霞, 李志, 刘东彦, 等. 响应面法优化雪松松针中金丝桃苷的回流提取工艺[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 850-854.

Optimization of Reflux Extraction Technology of Hyperin in Pine Needle of *Cedrus Deodra* by Response Surface Methodology

ZHANG Lixia^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, LIU Dongyan¹, SHI Xiaofeng^{1,2*}, LI Lin^{1,2} (1. Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China; 2. Gansu College of TCM, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the reflux extraction technology of hyperin in pine needle of *Cedrus deodra*. **METHODS** The content of hyperoside in pine needle of *Cedrus deodara* was determined by HPLC. On the basis of single factor test, the hyperoside content was used as indexes, three factors(solid-to-liquid ratio, ethanol concentration and extraction time) were studied by Box-Behnken design, the reflux extraction technology of hyperin in pine needle of *Cedrus deodra* was optimized by response surface methodology. **RESULTS** The optimal parameters of reflux extraction technology were as follows: ethanol concentration was 60%, solid-to-liquid ratio was 1:16(g·mL⁻¹), extraction time was 100 min for once. Under the above conditions, the average content of hyperin was 0.119 6 mg·g⁻¹, which was similar to the predicted value 0.119 4 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** The preferred extraction technology of hyperin in pine needle of *Cedrus deodra* is reasonable and feasible. **KEY WORDS:** pine needle of *Cedrus deodra*; hyperin; reflux extraction technology; Box-Behnken design; response surface methodology

松针为松科松属植物的针状叶, 是松属植物的主要副产物之一, 别名猪鬃松叶、松毛等, 具有祛风活血、明目、安神、抗肿瘤、抗病毒、减缓衰老等功效^[1]。雪松是松科 *Pinanaceae* 雪松属 *Cedrus Trew* 植物的统称, 包括短叶雪松 *C. brevifolia*、喜马拉雅雪松 *C. deodara*、大西洋雪松 *C. atlantica* 和黎巴嫩雪松 *C. libani*。它的针叶作药用历史悠久, 甾体类、多糖、黄酮类、有机酸类、三萜类、苯丙素类等为其主要化学成分, 具有抗菌、抗肿瘤、抗褐变、改善记忆、抗氧化等多种功效^[2]。前期笔者从雪松松针 95%乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位分离得到 12 个化合物, 其中金丝桃苷为首次从该属植物针叶中分离得到^[3]。有

关雪松松针中金丝桃苷的含量测定及其回流提取工艺研究未见报道。因此, 本实验采用 HPLC 建立雪松松针中金丝桃苷的含量测定方法, 采用 Box-Behnken 响应面法优化雪松松针中金丝桃苷的提取工艺, 为雪松松针的综合开发利用提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1220 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); AE260 分析天平(瑞士 Mettler Toled 公司); KQ2200B 型超声清洗仪器(昆山市超声仪器有限公司); 高速多功能粉碎机(上海市晟喜制药机械有限公司)。

雪松松针于 2016 年 4 月在兰州市区采集, 经甘肃省医学科学研究院何福江研究员和石长拴副

基金项目: 甘肃省科技支撑计划(1204FKCA152); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2015-02); 兰州市人才创新创业项目(2014-RC-62)

作者简介: 张莉霞, 女, 硕士生 Tel: (0931)2302664 E-mail: 736663549@qq.com *通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师, 教授 Tel: (0931)2302664 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

研究员鉴定为雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* 的针叶。将雪松松针阴干, 粉碎, 过 40 目筛, 作为样品粉末, 备用。

金丝桃苷对照品(中国科学院成都生物研究所, 批号: MUST-16032113; 纯度: 98.36%); 乙醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Pursuit XR_s C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~15 min, 13%→15%B; 15~45 min, 15%→18%B); 检测波长: 360 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取金丝桃苷对照品 1.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相定容, 配制成浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的金丝桃苷对照品储备液。精密吸取上述储备液 0.65 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 用流动相定容, 即得浓度为 12.93 μg·mL⁻¹ 的金丝桃苷对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取雪松松针样品粉末 2.0 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 按料液比 1:15(g·mL⁻¹) 加入 60%乙醇, 于 90 °C 回流提取 1.5 h, 过滤, 转移至 50 mL 量瓶中, 用流动相定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 续滤液作为供试品溶液, 备用。

2.1.4 专属性试验 精密吸取上述金丝桃苷对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 测得对照品和供试品中金丝桃苷色谱峰的保留时间均为 35.107 min, 理论板数以金丝桃苷计>10 000, 分离度>1.5。色谱图见图 1。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取浓度为 12.93 μg·mL⁻¹ 的金丝桃苷对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mL, 分别置于 1 mL 量瓶中, 用流动相定容, 配制成浓度依次为 1.29, 2.59, 3.88, 5.17, 6.47, 7.76, 9.05 μg·mL⁻¹ 的系列金丝桃苷对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样 20 μL, 测定金丝桃苷的峰面积, 以峰面积(Y)对金丝桃苷的浓度(X, μg·mL⁻¹) 进行线性回归。得到金丝桃苷的回归方程为 $Y=530\ 318X-19\ 182.2$, $R^2=0.999\ 0$; 结果表明金丝桃苷在 1.29~9.05 μg·mL⁻¹ 与其峰面积线性关系良好。

2.1.6 仪器精密度试验 精密吸取 20 μL 对照品溶液, 依“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次,

测得金丝桃苷峰面积的 RSD(n=6)为 1.32%, 表明该仪器精密度良好。

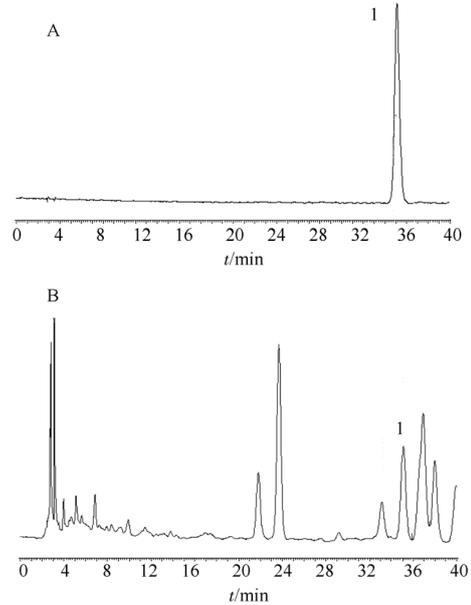


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-金丝桃苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference standard; B-test samples; 1-hyperin.

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批雪松松针样品粉末(40 目)2.0 g, 6 份, 按“2.1.3”项下方法操作制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件分别进样 20 μL, 测得金丝桃苷的平均含量为 0.120 0 mg·g⁻¹(n=6), RSD 值为 0.96%, 说明本方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 精密称取同一批雪松松针样品粉末(40 目)2.0 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 分别进样 20 μL, 测定峰面积, 结果金丝桃苷峰面积的 RSD 为 1.97%, 表明样品 24 h 内的稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取已知金丝桃苷含量的雪松松针粉末(40 目)1.0 g, 6 份, 加入金丝桃苷对照品溶液适量, 按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定金丝桃苷的含量, 计算回收率, 测得金丝桃苷的平均回收率和其 RSD 分别为 96.5%和 1.28%(n=6), 结果见表 1。

2.2 单因素试验

对回流提取雪松松针中金丝桃苷的 4 个影响因素(料液比、提取时间、乙醇浓度、提取次数)进行逐一考察。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery experiment(n=6)

称样量/ g	样品含量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1.000 4	0.114 4	0.120 0	0.229 3	95.6	96.5	1.28
1.000 3	0.115 5	0.120 0	0.231 1	96.3		
1.000 9	0.118 4	0.120 0	0.237 0	98.8		
1.000 3	0.114 4	0.120 0	0.228 8	95.3		
1.000 0	0.115 5	0.120 0	0.231 0	96.3		
1.000 0	0.115 9	0.120 0	0.231 8	96.6		

2.2.1 乙醇浓度对金丝桃苷含量的影响 精密称取样品粉末 2.0 g, 按料液比 1 : 10(g·mL⁻¹)分别加入水和 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%乙醇, 回流提取 1 h, 然后按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液, 依“2.1.1”项下色谱条件测定金丝桃苷的含量。当乙醇浓度为 0~60%时, 样品提取液中金丝桃苷的含量随乙醇浓度的增加而增加; 当乙醇浓度为 60%时, 金丝桃苷的含量达峰值; 之后样品提取液中金丝桃苷的含量随乙醇浓度的增加而下降, 可能是因为高浓度乙醇对脂溶性成分的提取量增加, 而对金丝桃苷的提取量降低。因此选择提取溶剂为 60%乙醇。结果见图 2。

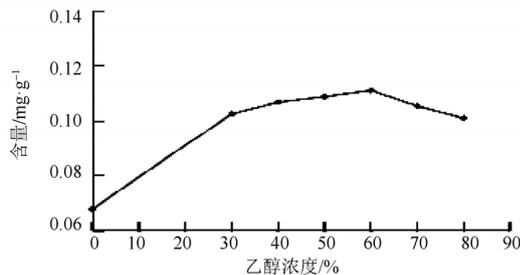


图 2 乙醇浓度对金丝桃苷含量的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on the content of hyperin

2.2.2 料液比对金丝桃苷含量的影响 精密称取干燥的雪松松针粉末 2.0 g, 按料液比 1 : 8, 1 : 10, 1 : 12, 1 : 15, 1 : 17, 1 : 20(g·mL⁻¹)加入 60%乙醇溶液, 回流提取 1 h, 然后按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液, 依“2.1.1”项下色谱条件测定金丝桃苷的含量。随着料液比的增加, 金丝桃苷的含量随之呈增长趋势, 当料液比为 1 : 15(g·mL⁻¹)时, 金丝桃苷的含量达最大值; 之后随着料液比的增加, 金丝桃苷的含量略微下降, 故选择料液比为 1 : 15(g·mL⁻¹)。结果见图 3。

2.2.3 提取时间对金丝桃苷含量的影响 精密称取干燥雪松松针粉末 2.0 g, 按料液比 1 : 15(g·mL⁻¹)加入 60%乙醇溶液, 分别回流提取 30,

60, 90, 120, 150 min, 然后按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液, 依“2.1.1”项下色谱条件测定金丝桃苷的含量。样品提取液中金丝桃苷的含量随提取时间的延长呈上升趋势, 当提取时间为 90 min 时, 金丝桃苷的含量达最大值; 之后随着提取时间的延长, 金丝桃苷的含量呈下降趋势, 为此选择提取时间为 90 min。结果见图 4。

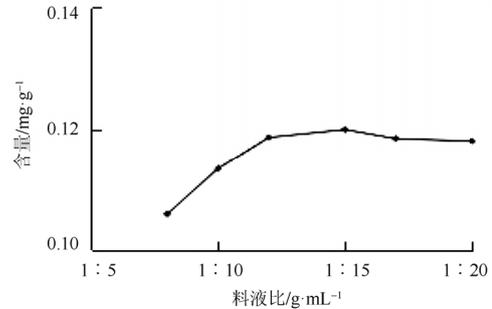


图 3 料液比对金丝桃苷含量的影响

Fig. 3 Effects of solid-to-liquid ratio on the content of hyperin

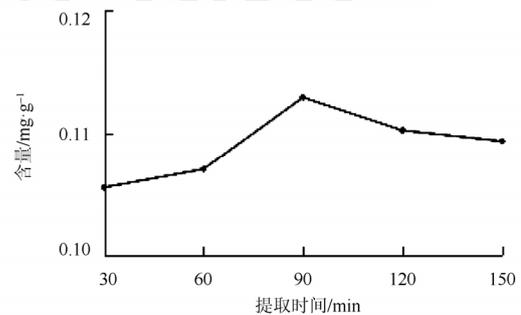


图 4 提取时间对金丝桃苷含量的影响

Fig. 4 Effects of extraction time on the content of hyperin

2.2.4 提取次数对金丝桃苷含量的影响 精密称取干燥的雪松松针粉末 2.0 g, 按料液比 1 : 15(g·mL⁻¹)加入 60%乙醇溶液, 回流提取 3 次(各 1.5 h), 分别收集滤液, 然后按“2.1.3”项下方法制得供试品溶液, 依“2.1.1”项下色谱条件测定金丝桃苷含量。计算每次回流提取金丝桃苷的提取率, 结果表明回流提取第一次的提取率即达 91.98%, 故将提取次数确定为 1 次。结果见图 5。

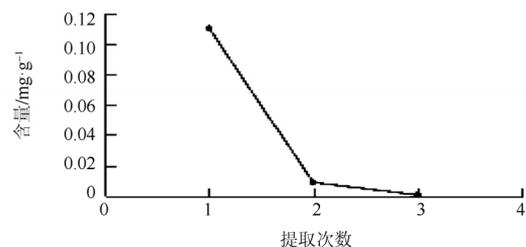


图 5 提取次数对金丝桃苷含量的影响

Fig. 5 Effects of extraction times on the content of hyperin

2.3 响应面法优化回流提取工艺

2.3.1 试验设计及结果 基于单因素试验筛选出的最佳提取条件：乙醇浓度 60%、料液比 1 : 15(g·mL⁻¹)、回流提取 90 min，提取次数为 1 次。固定提取次数，选择影响回流提取工艺的因素乙醇浓度(A, %)、料液比(B, g·mL⁻¹)、提取时间(C, min)，以金丝桃苷的含量(Y, mg·g⁻¹)为响应值，根据 Box-benhnken 试验设计原理，设计 3 因素 3 水平试验，因素与水平见表 2，然后按上述设计进行试验，结果见表 3。

表 2 水平与因素

Tab. 2 Levels and factors

水平	因素		
	A/%	B/g·mL ⁻¹	C/min
-1	40	1 : 10	60
0	60	1 : 15	90
1	80	1 : 20	120

表 3 Box-Behnken 试验设计与结果

Tab. 3 Design and results of Box-Behnken design

试验编号	A	B	C	金丝桃苷含量/mg·g ⁻¹
1	0	0	0	0.111 0
2	0	1	-1	0.101 3
3	0	0	0	0.121 6
4	1	0	-1	0.090 4
5	-1	0	1	0.104 5
6	1	-1	0	0.085 3
7	0	0	0	0.118 5
8	-1	0	-1	0.084 5
9	-1	-1	0	0.088 2
10	0	0	0	0.119 7
11	0	1	1	0.108 8
12	-1	1	0	0.098 8
13	1	0	1	0.086 8
14	0	0	0	0.121 2
15	0	-1	1	0.103 8
16	0	-1	-1	0.100 2
17	1	1	0	0.087 8

2.3.2 模型的建立及显著性检验 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行回归分析，得到金丝桃苷含量(Y)对乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)的二元多项回归模型为 $Y=0.12-3.212 \times 10^{-3}A+2.400 \times 10^{-3}B+3.438 \times 10^{-3}C-2.025 \times 10^{-3}AB-5.900 \times 10^{-3}AC+9.750 \times 10^{-4}BC-0.020A^2-8.200 \times 10^{-3}B^2-6.675 \times 10^{-3}C^2$ ， $R^2=0.970 1$ 。方差分析结果见表 4。

如表 4 所示，模型达到了极显著水平($P=0.000 2$)；试验所选模型的决定系数 $R^2=0.970 1$ ，试验模型的校正系数 $R^2_{Adj}=0.931 6$ ，说明试验结果有 93.16%受试验因素的影响。失拟项 $P=0.903 3>0.05$ ，说明试验没有失拟因素存在，

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
Model	2.747×10^{-3}	9	3.052×10^{-4}	25.22	0.000 2
A	8.256×10^{-5}	1	8.256×10^{-5}	6.82	0.034 8
B	4.608×10^{-5}	1	4.608×10^{-5}	3.81	0.092 0
C	9.453×10^{-5}	1	9.453×10^{-5}	7.81	0.026 7
AB	1.640×10^{-5}	1	1.640×10^{-5}	1.36	0.282 5
AC	1.392×10^{-4}	1	1.392×10^{-4}	11.50	0.011 6
BC	3.802×10^{-6}	1	3.802×10^{-6}	0.31	0.592 6
A ²	1.714×10^{-3}	1	1.714×10^{-3}	141.59	<0.000 1
B ²	2.831×10^{-4}	1	2.831×10^{-4}	23.39	0.001 9
C ²	1.876×10^{-4}	1	1.876×10^{-4}	15.50	0.005 6
残差	8.473×10^{-5}	7	1.210×10^{-5}		
失拟项	1.019×10^{-5}	3	3.396×10^{-6}	0.18	0.903 3
误差	7.454×10^{-5}	4	1.863×10^{-5}		
总和	2.832×10^{-3}	16			
校正系数			$R^2=0.970 1$	$R^2_{Adj}=0.931 6$	

数据没有异常点；因此可用该回归方程分析和预测雪松松针中金丝桃苷的最佳回流提取工艺条件。由回归方程和方差分析还可看出，模型中二次项 B^2 、 C^2 对金丝桃苷含量的影响达到非常显著水平($P<0.01$)，一次项 A、C，交互项 AC 对金丝桃苷含量的影响达到显著水平($P<0.05$)，模型中二次项 A^2 对金丝桃苷含量的影响达到极显著水平($P<0.001$)，说明所得回归方程能够很好地预测金丝桃苷含量随各响应因子的变化。

2.3.3 响应面分析 根据回归模型作出相应的响应面图和等高线图，考察响应面的形状，分析回流提取各因素对金丝桃苷含量的影响，结果见图 6。

交互作用的大小可由等高线的形状来反映，若呈椭圆形，说明两因素的交互作用显著，若呈圆形则相反，而响应面曲线较陡也说明两因素交互作用显著。如图 6 所示，AC 交互作用显著，表现为响应曲线较陡；交互项 AB、BC 的响应曲线较平缓，说明其交互作用不显著。

2.3.4 验证试验 上述回归方程通过软件 Design-Expert 8.0.6 进行求解，得到雪松松针中金丝桃苷的最优回流提取工艺参数为：乙醇浓度 57.26%，料液比 1 : 15.92(g·mL⁻¹)，提取时间 99.97 min，回流提取 1 次。考虑到试验实际操作的可行性，调整工艺参数：乙醇浓度 60%，料液比 1 : 16(g·mL⁻¹)，提取时间 100 min，回流提取 1 次。在此工艺条件下，进行 3 次平行验证试验，计算得金丝桃苷的平均含量为 0.119 6 mg·g⁻¹(得率为 0.012%)，与预测值 0.119 4 mg·g⁻¹ 的相对误差为 0.17%，表明本实验设计工艺条件准确可靠、合理。

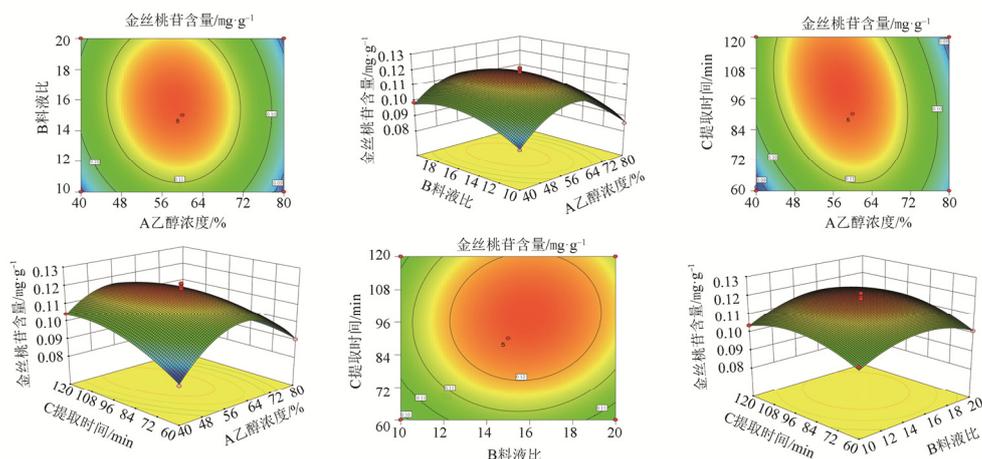


图6 各因素对金丝桃苷含量影响的等高线和响应面图

Fig. 6 Contour line and response surface plot of factors on the content of hyperin

3 讨论

金丝桃苷又名槲皮素-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷, 属于黄酮醇苷类化合物, 广泛存在于多种植物体内, 如桃金娘科、菊科、夹竹桃科、松科、金丝桃科、蔷薇科、葵科、藤黄科等的果实及全草中^[4], 是一种重要的天然产物, 具有解痉镇痛、抗肿瘤、保护胃黏膜、增强免疫力、抗抑郁等作用^[5]。杜永杰等^[6]采用正交试验法优选山楂中金丝桃苷的最佳回流提取工艺: 8 倍量体积分数 50%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 实验所测得金丝桃苷的平均含量为 1.91%。蔡恩博等^[7]采用复合酶辅助提取法优化短梗五加叶中金丝桃苷的提取工艺, 其最佳工艺参数: 纤维素酶加酶量为 2%, 中性蛋白酶加酶量为 0.5%, α-淀粉酶加酶量为 3%, 温度 30 ℃, 时间 10 min。测得短梗五加叶中金丝桃苷的提取率为 0.52%。柯仲成等^[8]采用 Box-Behnken 响应面法优化贯叶金丝桃中金丝桃苷的提取工艺, 最终确定其最佳提取工艺为 11 倍量 77.6%乙醇, 提取 2 次, 每次 2.7 h, 该实验测得金丝桃苷的含量为 7.04 mg·g⁻¹。本实验优化得到的金丝桃苷的最佳回流提取工艺: 乙醇浓度 60%, 料液比 1 : 16(g·mL⁻¹), 提取时间 100 min, 回流提取 1 次, 测得金丝桃苷的含量为 0.119 6 mg·g⁻¹。优选得到的雪松松针中金丝桃苷的回流提取工艺省时、简便、合理、可行。金丝桃苷为首次从雪松属植物针叶中分离得到^[3], 尽管其含量较低, 但可通过大孔吸附树脂等手段富集纯化得到。且雪松松针一年四季均可采收, 天然蓄积量大, 是一种再生速度快、可持续利用的天然资源, 本研究结果提示可对松针进行综合开发利用, 变废为宝。

传统中药的提取工艺研究大多采用正交试验设计, 但正交试验的优化试验次数较响应面试验少, 只能得到离散型的优化数据, 具有精度不高、预测性不佳的特点, 最佳工艺条件只能从试验中每个因素的各水平中选择一个; 而响应面设计本质上是正交试验与回归分析相结合, 使各因素与响应值之间进行二元多项回归, 既可以分析各因素的变化对响应值的影响规律, 也可以得到相对精确的优化条件, 提高实验的预测性和准确性, 因而认为利用该法得到的提取工艺具有实用价值。

REFERENCES

- [1] ZHANG Z Q, XIAO P Y, LIU G M. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological action of pine needle [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2011, 26(4): 278-281.
- [2] 白朝辉, 石晓峰, 刘东彦, 等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究概述[J]. *中国药师*, 2012, 15(12): 1791-1793.
- [3] LIU D Y, SHI X F, LI C, et al. Chemical constituents of ethyl acetate fraction from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2011, 42(10): 1921-1924.
- [4] LI J S, CHEN J H, MENG M J. Progress on the pharmacological effects and mechanism of hyperoside [J]. *J Guangdong Pharm Univ(广东药学院学报)*, 2015, 31(2): 269-272.
- [5] 李敏芳, 李慧, 王学美. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15(4): 102-104.
- [6] DU Y J, WANG Y M, WU H B, et al. Studies on optimal extraction technology of hyperoside from hawthorn through orthogonal experiments [J]. *China J Chin Med(中医学报)*, 2015, 30(4): 565-567.
- [7] CAI E B, XU J, ZHEN X M, et al. Study on composite enzyme assisted extraction of hyperoside from *Acanthopanax sessiflorus* [J]. *Herald Med(医药导报)*, 2016, 35(6): 636-639.
- [8] 柯仲成, 程子洋, 陈龙. Box-Behnken 响应面法优化贯叶金丝桃中金丝桃苷的提取工艺[J]. *中成药*, 2012, 34(10): 2023-2025.

收稿日期: 2017-06-21

(本文责编: 李艳芳)