

REFERENCES

- [1] HAN H H, MA J Y. Effect of isoflavone extract from *Cicer Arietinum* on learning memory abilities and expressions of TNF- α and IL-6 in hippocampus of Alzheimer's disease model rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 689-692.
- [2] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 2003: 299.
- [3] 冯长根, 赵军, 刘霞. 马齿苋治疗心血管疾病的研究进展[J]. *中药材*, 2004, 27(12): 955-958.
- [4] ZHAO L, HE M, WEI M J. Effects of tetramethylpyrazine on learning and memory in aluminium trichloride induced Alzheimer's disease mice [J]. *Chin J Behav Med Sci*(中国行为医学科学), 2008, 17(10): 878-880.
- [5] DAI X L, MA Y K. Effects of curcumin on Alzheimer's disease in a rat model induced by $AlCl_3$ [J]. *Food Drug*(食品与药品), 2011, 13(7): 257-259.
- [6] ZHANG H J, ZHANG H Y, WANG Y. Effects of n-butanol extracts from *Portulaca oleracea* on the learning and memory performances of senile mice induced by D-Gal [J]. *Food Sci*(食品科学), 2011, 32(3): 204-207.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 828.
- [8] YI H. Protective effects of *Panax notoginseng* extracts on Alzheimer's disease model mice [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2011, 22(39): 3667-3668.
- [9] YANG B. Effects of compound rehmannia on learning and memory abilities in senile dementia mice induced by D-galactose [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3): 195-197.
- [10] XIAO Y, WU C X, HUANG Y, et al. Effect of Nao Tong compound preparation on learning, memory and ChE activity in hippocampus tissue of vascular dementia rats [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2010, 30(8): 627-630.
- [11] 赵爽, 张胜昌, 王淑秋. 灵芝孢子粉对戊四氮慢性点燃大鼠学习记忆及胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 1(33): 354-356.

收稿日期: 2015-01-29

响应面法优化超声波提取昆仑雪菊总黄酮的工艺研究

黄涵, 曾令杰*, 莫运才, 冯鸿耀, 廖素溪, 郭玉梅, 李振桦(广东药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 优化昆仑雪菊的超声提取工艺。方法 以总黄酮提取量为指标, 在单因素试验基础上, 通过 Box-Behnken 响应面法考察乙醇体积分数、料液比、超声时间和温度对总黄酮提取效果的影响。结果 最佳超声提取工艺为乙醇体积分数 65%, 料液比 40 g·mL⁻¹, 超声时间 34 min, 超声温度 62 °C; 总黄酮提取量为 207.32 mg·g⁻¹(RSD=1.45%), 与预测值(208.81 mg·g⁻¹)的偏差较小。结论 优选的提取工艺可行, 为昆仑雪菊的开发应用提供实验依据。

关键词: 昆仑雪菊; 总黄酮; 超声波提取; 单因素试验; Box-Behnken 响应面

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0947-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.011

Optimization of Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. Using Response Surface Methodology

HUANG Han, ZENG Lingjie*, MO Yuncai, FENG Hongyao, LIAO Suxi, GUO Yumei, LI Zhenhua(Guangdong Pharmacy University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize ultrasound extraction technology of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt.. **METHODS** With the content of total flavonoids as index, effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic time and temperature on extraction technology were investigated by single factor tests and Box-Behnken response surface methodology. **RESULTS** Optimum ultrasound extraction technology was as following: ultrasonic extracted 34 min with 40 times of 65% ethanol to the herb at 62 °C. Under these conditions, the average extraction rate of flavonoids was 207.32 mg·g⁻¹(RSD=1.45%), which was very close to the predicted value of 208.81 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** This optimized technology is stable and feasible to provide a basis for development and application of total flavonoids in *Coreopsis tinctoria* Nutt..

KEY WORDS: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; total flavonoids; ultrasonic extraction; single factor test; Box-Behnken response surface methodology

作者简介: 黄涵, 男, 硕士生 Tel: (020)39352176
(020)39352176 E-mail: zlj334477@aliyun.com

E-mail: huanghandd@163.com

*通信作者: 曾令杰, 男, 博士, 教授 Tel:

昆仑雪菊学名两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.), 为菊科金鸡菊属(*Coreopsis*)多年草本植物。常以雪菊泡水茶饮, 可用于治疗燥热、高血压、心慌、胃肠不适、食欲不振、痢疾及疮疖肿毒^[1]。雪菊黄酮类化合物是雪菊中有较高药效的主要成分之一。雪菊黄酮类化合物主要包括黄酮、黄酮醇、二氢黄酮、二氢黄酮醇、查尔酮和异黄酮等^[2]。在研究中发现, 雪菊黄酮类具有降血糖、降血脂、抗高血压、抗衰老等多种生物活性^[3-6]。雪菊总黄酮的提取方法常采用浸提法^[7], 该法提取时间长, 操作繁琐。超声提取技术具有省时、高效、能耗低等优点, 已得到广泛应用^[8]。响应面优化法对工艺优化是一种高效方法, 通过合理的实验设计拟合因素与响应值之间的函数关系, 以寻求最佳工艺参数^[9], 已被广泛运用于药学、食品、化学、制造等领域。关于响应面法优化雪菊总黄酮超声提取工艺笔者未见报道。本实验以总黄酮提取量为评价指标, 采用单因素试验和 Box-Behnken 响应面法优化雪菊总黄酮的提取工艺, 为该有效部位开发利用提供理论依据。

1 仪器与材料

UV-2450 型紫外分光光度计(日本岛津公司); TIM-20 全自动雪花制冰机(上海领成生物科技有限公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA(N)/JA(N)系列电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

乙醇(南京化学试剂有限公司, 分析纯); 雪菊购于广州清平药材市场, 由广东药学院中药学院曾令杰教授鉴定为菊科金鸡菊属两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 的头状花序; 芦丁对照品(中国药品生物制品研究所, 批号: 100080-200707, 纯度 $\geq 99\%$)。

2 方法

2.1 对照品溶液的配制

精密称取芦丁对照品 5.07 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加 50%乙醇溶解并定容至刻度, 摇匀即得。

2.2 检测波长的确定

精密吸取对照品溶液 1.0 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加水 5 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 放置 5 min 后, 加 5%硝酸铝溶液 1 mL, 放置 5 min, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL, 加水至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 在 400~600 nm 扫描, 结果表明在 510 nm 处有最大吸收。

2.3 标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 按“2.2”项下方法显色, 于 510 nm 处测定吸光度(*A*), 以芦丁对照品溶液浓度为横坐标, *A* 为纵坐标, 得回归方程 $Y=11.782x-0.0194$ ($r^2=0.9993$), 结果显示, 芦丁在 0.0008~0.047 mg·mL⁻¹ 内具有良好线性关系。

2.4 供试品溶液的制备

精密称取干燥雪菊药材粉末 0.5 g, 置于 100 mL 具塞三角瓶中, 粒度为 50 目, 加入一定体积分数乙醇, 于一定水浴温度下超声提取一段时间, 每次提取液过滤 3 次, 将滤液合并, 定容于 100 mL 量瓶中, 备用。

2.5 单因素试验考察

精密称取昆仑雪菊粉末 0.5 g 于 5 个 100 mL 具塞三角瓶中, 分别加入萃取液在不同条件下提取。每次提取液过滤后定容于 100 mL 量瓶中, 测定提取液中总黄酮的含量。固定超声功率 200 W, 分别考察乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度等因素对雪菊总黄酮提取量的影响。

2.6 Box-Behnken 试验

运用 Design-Expert 软件, 根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 在单因素试验的基础上, 选取乙醇体积分数、料液比、超声时间、超声温度为考察因素, 每个自变量的低、中、高水平分别以 -1, 0, 1 进行编码, 以总黄酮提取量为响应值, 因素水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Tab. 1 Factors and levels of response surface methodology

水平	因素			
	A 乙醇体积 分数/%	B 料液比/ g·mL ⁻¹	C 超声 时间/min	D 超声 温度/℃
-1	45	1:30	20	50
0	60	1:40	30	60
1	75	1:50	40	70

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果

3.1.1 乙醇体积分数的影响 控制反应条件为料液比 1:40、超声温度 60 ℃、超声时间 30 min, 考察乙醇体积分数为 30%~90%时总黄酮的提取量, 结果见图 1。由图 1 可知, 黄酮化合物提取量随着乙醇体积分数的增加呈先升后降的趋势, 当乙醇体积分数达到 60%时, 提取量达到最大值,

乙醇体积分数过高时, 导致溶剂挥发增大, 同时一些醇溶性杂质溶出增加, 干扰黄酮类化合物浸出。

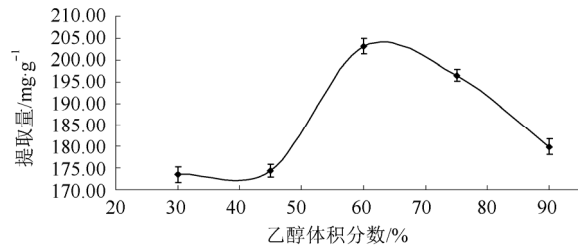


图1 乙醇体积分数对雪菊总黄酮提取量的影响
Fig. 1 Effect of volume fraction of ethanol on the extraction rate of flavonoids

3.1.2 料液比的影响 控制反应条件为乙醇体积分数 60%、超声温度 60 ℃、超声时间 30 min, 考察料液比在 1:10~1:50 时总黄酮的提取量, 结果见图 2。由图 2 可知, 随着溶剂量的增大, 黄酮类化合物的提取量逐渐升高, 到 1:40 时, 达到最高。提取量增加大到一定值后呈略微下降趋势, 这可能是随着溶剂体积的增大, 其他一些非黄酮类可溶性杂质的溶解度也逐渐增大, 进而导致提取量的减少。

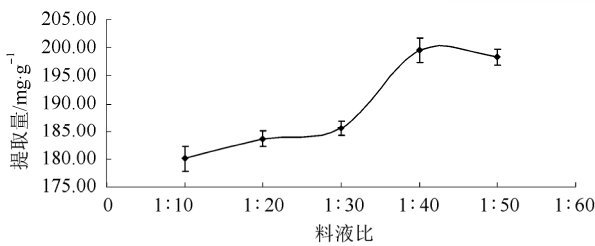


图2 料液比对雪菊总黄酮提取量的影响
Fig. 2 Effect of ratio of material to liquid on the extraction rate of flavonoids

3.1.3 提取温度的影响 控制反应条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、超声时间 30 min, 考察超声温度为 30~70 ℃时总黄酮的提取量, 结果见图 3。由图 3 可知, 在 30~60 ℃内, 提取量呈上升趋势, 在 60 ℃时提取量达到最高, 温度升高有助于传质过程, 加快溶剂的渗透。

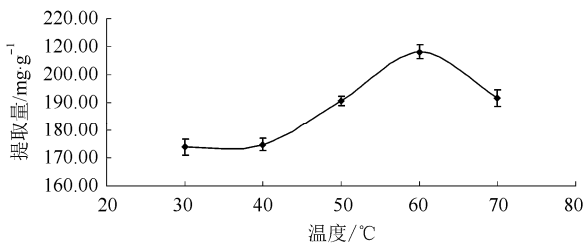


图3 温度对雪菊总黄酮提取量的影响
Fig. 3 Effect of extraction temperature on the extraction rate of flavonoids

3.1.4 提取时间的影响 控制反应条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:40、超声温度 60 ℃, 考察超声时间为 20~60 min 时总黄酮的提取量, 结果见图 4。由图 4 可知, 当超声时间达到 30 min, 总黄酮提取量达到最大值, 但随着时间的延长, 提取量缓慢下降, 可能是超声时间过久会对某些黄酮类物质造成破坏所致。

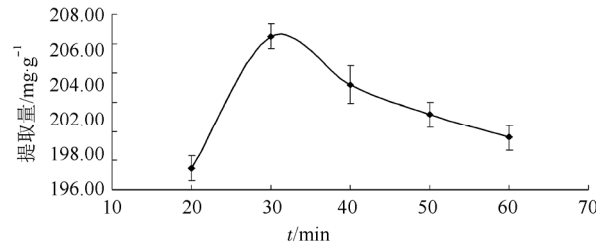


图4 时间对雪菊总黄酮提取量的影响
Fig. 4 Effect of extraction time on the extraction rate of flavonoids

3.2 响应面分析法优化试验

3.2.1 回归模型的建立及方差分析 根据单因素实验设计响应面试验, 结果见表 2。

表2 响应面试验设计及结果

Tab. 2 The experimental scheme and results of central composite design

试验号	A 乙醇 体积分数/%	B 料液比/ g·mL ⁻¹	C 提取 时间/min	D 提取 温度/℃	提取量/ mg·g ⁻¹
1	1	0	-1	0	182.39
2	0	0	-1	-1	175.93
3	-1	-1	0	0	178.31
4	1	0	1	0	198.11
5	0	0	0	0	203.70
6	0	-1	0	-1	177.20
7	1	0	0	1	192.82
8	0	-1	0	1	179.92
9	1	-1	0	0	186.72
10	-1	1	0	0	184.31
11	0	1	1	0	191.43
12	0	0	0	0	207.83
13	-1	0	-1	0	186.64
14	1	1	0	0	190.35
15	0	-1	-1	0	174.45
16	0	0	0	0	205.37
17	-1	0	1	0	183.18
18	-1	0	0	-1	181.10
19	0	0	0	0	208.76
20	1	0	0	-1	194.81
21	0	0	0	0	208.91
22	0	0	1	1	200.92
23	0	0	-1	1	178.40
24	0	1	0	1	185.83
25	0	0	1	-1	171.52
26	0	1	-1	0	178.82
27	-1	0	0	1	185.83
28	0	-1	1	0	186.33
29	0	1	0	-1	178.17

利用 ANOVA 分析响应面的回归参数, 采用 Design Expert 8.0.5 软件对表 2 数据进行多元线性回归拟合, 得到二次多项回归模型方程 $Y=206.91+3.82A+2.17B+4.57C+3.75D-0.59AB+4.80AC-1.68AD+0.18BC+1.24BD+6.73CD-7.2A^2-13.79B^2-11.75C^2-12.46D^2$ ($R^2=0.9441$), 说明该模型拟合度好, 可用此模型对雪菊总黄酮提取工艺进行分析和预测, 方差分析见表 3。

表 3 回归模型及方差分析结果

Tab. 3 The regression models and results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3 253.48	14	232.39	16.90	<0.000 1
A	175.19	1	175.19	12.74	0.003 1
B	56.25	1	56.25	4.09	0.062 6
C	250.80	1	250.8	18.24	0.000 8
D	168.53	1	168.53	12.26	0.003 5
AB	1.40	1	1.40	0.10	0.754 0
AC	91.97	1	91.97	6.69	0.021 5
AD	11.22	1	11.22	0.82	0.381 5
BC	0.13	1	0.13	9.691×10^{-3}	0.923 0
BD	6.10	1	6.10	0.44	0.516 1
CD	181.31	1	181.31	13.19	0.002 7
A ²	336.21	1	336.21	24.46	0.000 2
B ²	1 233.18	1	1 233.18	89.71	<0.000 1
C ²	896.04	1	896.04	65.18	<0.000 1
D ²	1 007.76	1	1 007.76	73.31	<0.000 1
残差	192.46	14	13.75		
失拟项	171.51	10	17.15	3.28	0.132 0
误差项	20.94	4	5.24		
总和	3 445.89	28			

由表 3 可知, 一次项(A、C、D)、交叉项(AC、CD)、各平方项均对响应值有显著性影响; 整体模型达到显著水平, 回归方程失拟检验不显著, 说明未知因素对实验结果干扰较小。该模型变异系数为 1.97%, 在可接受范围内, 其值越小, 重复性越好。

3.2.2 响应面分析 由方差分析表 3 可知, 在本试验所建立的数学回归模型中, AC、CD 两项之间存在显著的交互作用。根据回归方程分析, 得到 AC、CD 的响应面图, 见图 5。图中响应曲面陡峭, 表明验证交互作用显著。

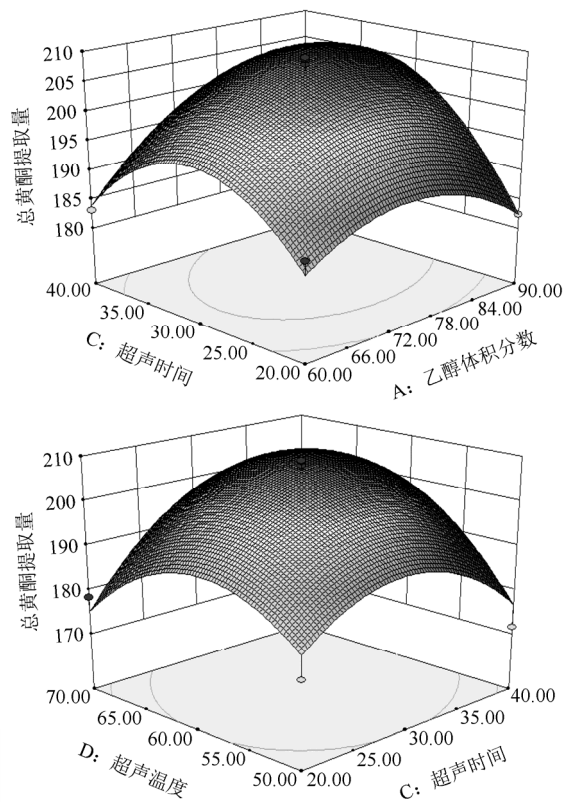


图 5 A-C、C-D 对总黄酮提取量影响的响应面图

Fig. 5 The response surface plots for the effect of A-C, C-D on the extraction rate of total flavonoids

从图 5 中的响应面图中可以看出, 当乙醇体积分数一定时, 雪菊总黄酮提取量随着超声时间的升高先增大后减小; 当乙醇体积分数由低到高增加时, 提取量相对不明显, 只是略有一个先上升后下降的趋势。当超声温度在 62 °C 附近、超声时间在 30 min 附近, 提取量达到了最大值, 说明最佳超声时间和超声温度在实验选取的范围内。

3.3 条件优化、预测与验证

通过软件求解回归方程, 得出最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数 65.21%, 料液比为 40.82 g·mL⁻¹, 超声时间为 33.30 min, 超声温度为 62.21 °C。考虑到实际的可操作性, 将优化工艺条件修正为: 乙醇体积分数为 65%, 料液比为 40 g·mL⁻¹, 超声时间为 34 min, 超声温度为 62 °C, 在此条件下进行 3 次平行实验, 所得雪菊总黄酮提取量的平均值为 207.32 mg·g⁻¹ ($n=3$, $RSD=1.45\%$) 与预测值 208.81 mg·g⁻¹ 非常接近, 表明建立的模型具有良好的预测性, 优选的工艺条件重复性良好。

4 结论

本实验建立了以总黄酮提取量为响应值的超声波辅助提取昆仑雪菊的二次回归方程, 各因素

影响主次顺序为：超声时间>乙醇体积分数>超声温度>料液比。通过提取工艺响应面分析，确定了超声波辅助提取昆仑雪菊中总黄酮的最佳提取工艺为：乙醇体积分数 65%，料液比 40 g·mL⁻¹，超声时间 34 min，超声温度 62 ℃，在此条件下昆仑雪菊总黄酮的提取量为 207.32 mg·g⁻¹，明显高于传统回流提取法^[10]。

REFERENCES

- [1] LIANG Q L. Research of *Coreopsis tinctoria* nuff [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2014, 42(8): 2305-2306.
- [2] ZHENG D C, MOURBOUL A, AYNUR T, et al. Preparation and preliminary analysis of water-soluble flavonoids of *Coreopsis tinctoria* flower from the Kunlun Mountain [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2010, 6(10): 18-20.
- [3] DIAS T, LIU B, JONES P, et al. Cytoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* extracts and flavonoids on tBHP and cytokine-induced cell injury in pancreatic MIN6 cell [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 139(2): 485-492.
- [4] 梁淑红, 庞市宾, 刘晓燕, 等. 金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 234-235.
- [5] SUN Y H, ZHAO J, JIN H T, et al. Vasorelaxant effects of the extracts and some flavonoids from the buds of *Coreopsis tinctoria* [J]. Pharm Biol, 2013, 51(9): 1158-1164.
- [6] 沙爱龙, 吴瑛, 盛海燕, 等. 昆仑雪菊黄酮对衰老模型小鼠脑及脏器指数的影响[J]. 动物医学进展, 2013, 2013(7): 66-68.
- [7] GUO L M, ZHANG P, ZHANG Q, et al. Recent advances in the analysis, extraction, characterization and biological activities of chemical substances of Kunlun Chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria*) [J]. Food Sci(食品科学), 2014, 35(7): 298-304.
- [8] 薛峰, 李春娜, 李鹏收, 等. 超声提取在中药化学成分提取中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 18(20): 231-234.
- [9] ZONG S C, YU Z C, ZHAO D Y, et al. Optimization of extraction technology for polysaccharides in *Inonotus obliquus* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 167-172.
- [10] 热阳古·阿布拉, 夏娜, 木尼热·阿不都克里木, 等. 昆仑雪菊总黄酮的提取及含量测定[J]. 喀什师范学院报, 2013, 34(3): 45-47.

收稿日期: 2015-03-04

乳酶生菌种的安全性研究

甘永琦, 庞皓元, 朱斌* (广西壮族自治区食品药品检验所, 南宁 530021)

摘要: 目的 对乳酶生菌种进行安全性研究。方法 采用 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统检测菌种药物敏感性, 提取质粒进行电泳, 并对小鼠灌胃进行毒性试验。结果 粪肠球菌 140623 对克林霉素和大环内酯类抗菌药物具有天然耐药性, 对青霉素类、高浓度氨基糖苷类、喹诺酮类、四环素类、糖肽类、链阳霉素类、唑烷酮类及呋喃妥因均敏感, 含有质粒; 粪肠球菌 CGMCC1.595 对上述抗菌药物均敏感, 不含质粒。毒性试验结果符合中国药典 2010 版的要求。结论 乳酶生菌种具有一定的安全性, 但需加强生产菌株的管理并规范其来源。

关键词: 乳酶生; 药敏性; 毒性

中图分类号: R975

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)08-0951-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.012

Study on the Safety of the Strains of Lactasin

GAN Yongqi, PANG Haoyuan, ZHU Bin* (Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the safety of the strains of lactasin. **METHODS** VITEK2 compact automatic microbiological analysis system was used to test drug sensitivity of strains. The plasmid were electrophoresed. The toxicities of strains were tested in mice. **RESULTS** *Enterococcus faecalis* 140623 with plasmid had natural drug-resistance to clindamycin and macrolide and was sensitive to penicillin, high concentration of aminoglycoside, quinolones, tetracyclines, glycopeptides, streptogramins, oxazo-lidione and nitrofurantoin. *Enterococcus faecalis* CGMCC 1.595 without plasmid was sensitive to the above antibiotics. The results of toxicity test met the requirement of Ch.P 2010. **CONCLUSION** The strain of lactasin is safe to use, but its source should be supervised and standardized.

KEY WORDS: lactasin; drug sensitivity; toxicity

基金项目: 广西食品药品检验所科研项目(KY201401)

作者简介: 甘永琦, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0771)5827958
任药师 Tel: (0771)5827968 E-mail: zhubin1226@sina.com.cn

E-mail: jackygan_413@163.com

*通信作者: 朱斌, 女, 硕士, 主