

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.008

响应面法优化杠板归总黄酮微波提取工艺

黄道明¹, 黄平², 沈丽霞^{3△}

(1. 江西省上饶市食品药品检验检测中心, 江西 上饶 334000; 2. 江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000;
3. 中国人民解放军第971医院, 山东 青岛 266072)

摘要:目的 优化杠板归总黄酮的微波提取工艺。方法 以杠板归总黄酮提取率为指标, 采用响应面法优化微波提取工艺条件, 考察提取时间、提取温度、乙醇体积分数和液料比4个因素对杠板归总黄酮得率的影响。结果 杠板归总黄酮最佳微波提取工艺为提取温度60℃, 提取时间20 min, 乙醇体积分数60%, 液料比50:1, 此条件下其得率为5.69%。结论 该方法简便、预测性良好。利用响应面分析法优化杠板归总黄酮的提取工艺参数真实、可靠, 具有实用价值。

关键词:杠板归; 总黄酮; 响应面法; 提取工艺; 微波

中图分类号: R932; TQ460.6

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)13-0031-04

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Polygonum Perfoliatum* by Response Surface Methodology

HUANG Daoming¹, HUANG Ping², SHEN Lixia³

(1. Shangrao Food and Drug Testing Center, Shangrao, Jiangxi, China 334000; 2. Jiangxi Medical College, Shangrao, Jiangxi, China 334000;
3. THE No. 971 Hospital of PLA, Qingdao, Shandong, China 266072)

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of total flavonoids from *Polygonum perfoliatum*. **Methods** The extraction rate of total flavonoids from *Polygonum perfoliatum* was used as an indicator, the effect of extracting temperature, ethanol concentration, liquid/solid ratio and extracting time on the total flavonoids extracted from *Polygonum perfoliatum* was investigated by response surface methodology. **Results** The optimum extraction conditions for total flavonoids from *Polygonum perfoliatum* was extraction temperature 60℃, 20 min, ethanol concentration 60% and liquid/solid ratio of 50:1, under which the extraction yield of total flavonoids was 5.69%. **Conclusion** This method is convenient and highly predictive. The application of response surface methodology to optimize the extraction process parameters of the total flavonoids from *Polygonum perfoliatum* is true and reliable, and has practical value.

Key words: *Polygonum perfoliatum*; total flavonoids; response surface methodology; extraction process; microwave

*基金项目: 江西省卫生计生委中医药科研计划项目[2017B077]。

第一作者: 黄道明, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为中药质量分析, (电子信箱)737259639@qq.com。

△通信作者: 沈丽霞, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为中药药效物质基础, (电子信箱)805915176@qq.com。

- 23c targeting of ELAVL1 in diabetic nephropathy[J]. Experimental Cell Research, 2017, 350(2): 327-335.
- [23] LI R, GENG HH, XIAO J, et al. miR-7a/b attenuates post-myocardial infarction remodeling and protects H9c2 cardiomyoblast against hypoxia-induced apoptosis involving Sp1 and PARP-1[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29082.
- [24] XIE XJ, FAN DM, XI K, et al. Suppression of microRNA-135b-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating JAK2/STAT3 signaling pathway in mice during sevoflurane anesthesia[J]. Bioscience Reports, 2017, 37(3): BSR20170186.
- [25] AI L, LIN S, HUANG C, et al. Simultaneous interference of SP1 and HIF1 α retarding the proliferation, migration, and invasion of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) under hypoxia[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(10): 17912-17925.
- [26] KOVACS K, VACZY A, FEKETE K, et al. PARP Inhibitor Protects Against Chronic Hypoxia/Reoxygenation-Induced Retinal Injury by Regulation of MAPKs, HIF1 α , Nrf2, and NF κ B[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2019, 60(5): 1478-1490.
- [27] SHERMAN MA, SURESH MV, DOLGACHEV VA, et al. Molecular characterization of hypoxic alveolar epithelial cells after lung contusion indicates an important role for HIF-1 α [J]. Annals of Surgery, 2018, 267(2): 382.
- [28] WANG YQ, TANG YF, YANG MK, et al. Dexmedetomidine alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(5): 7834-7844.
- [29] WEI SJ, WANG H. Ligustrazine promoted hypoxia-treated cell growth by upregulation of miR-135b in human umbilical vein endothelial cells[J]. Experimental and Molecular Pathology, 2019, 106: 102-108.

(收稿日期: 2019-12-20)

杠板归又称贯叶蓼、犁头藤等,是蓼科植物杠板归 *Polygonum perfoliatum* L. 的干燥地上部分,夏季开花时采收,晒干而成,在全国各地均有分布。杠板归具有清热解毒、利水消肿、止咳的功效,主治咽喉肿痛、肺热咳嗽、小儿顿咳、水肿尿少、湿热泻痢、湿疹、疖肿、蛇虫咬伤等^[1-2]。黄酮类化合物是杠板归的有效成分之一,具有抗肿瘤、抗氧化、抗心律失常等作用^[3-5]。目前,杠板归中总黄酮的提取工艺主要通过正交试验优化,尚未见通过响应面法优化的研究报道。响应面法是应用合理的试验设计,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,可通过回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[6-7]。本研究中采用响应面法对微波提取杠板归总黄酮的工艺参数进行了优化,旨在为杠板归药材的进一步开发和利用奠定理论基础。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-2100 型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);CW-2008 型微波提取仪器(上海松野仪器有限公司);SB-2000 型旋转蒸发器(上海亚龙仪器有限公司);101AB-2 型真空泵(上海神光仪器有限公司)。

1.2 试剂

杠板归干燥药材,购自江西新东港中药饮片有限公司,经江西上饶市食品药品检验所中药室付彩群药师鉴定为正品,干燥,粉碎,过 60 目筛,备用;芦丁对照品(纯度为 98.9%,中国食品药品检定研究院);其余试剂均为分析纯;试验用水均为去离子水。

2 方法与结果

2.1 杠板归总黄酮提取工艺流程

取干燥后的杠板归粉末样品 10 g,精密称定,在 100 mL 圆底烧瓶中加入一定体积分数的乙醇,在拟订试验条件下(提取时间、提取功率、液料比和乙醇浓度等),采用间歇微波辅助提取法(30 s,放置 1 min)提取杠板归中总黄酮。样品在一定微波功率下提取设定的时间后,经过滤分离,低速离心 10 min,取上清液,置旋转蒸发器 50 ℃ 减压浓缩,再定容于 10 mL 容量瓶,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,备用。精密吸取各供试品溶液 10 μL,按上述拟订条件测定峰面积,以回归方程计算含量。

2.2 标准曲线的制作与黄酮得率计算

取经干燥至恒重的芦丁对照品 10.0 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加入乙醇溶液定容,即得芦丁对照品溶液。分别精密吸取 1,2,3,4,5,6,7 mL,置 25 mL 容量瓶中,各加 1 mL 5% 亚硝酸钠溶液,摇匀,静置 6 min 后分别加入 1 mL 10% 硝酸铝溶液,摇匀,静置 6 min 后分

别加入 10 mL 4% 氢氧化钠溶液,摇匀,最后用 65% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 15 min;以空白试剂为参比液,在 500 nm 波长处测定吸光度。以芦丁对照品溶液质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、吸光度(Y)为纵坐标制作标准曲线,得回归方程 $Y = 7.9561X + 0.0068$, $r = 0.9995$ ($n = 7$)。根据回归方程计算总黄酮浓度,并计算总黄酮得率。

2.3 响应面法优化试验设计

单因素考察:通过单因素法,对不同提取时间(10, 15, 20, 25, 30 min),不同乙醇体积分数(40%, 50%, 60%, 70%, 80%),不同提取温度(40, 50, 60, 70, 80 ℃),不同液料比(40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1)进行考察。结果见图 1。

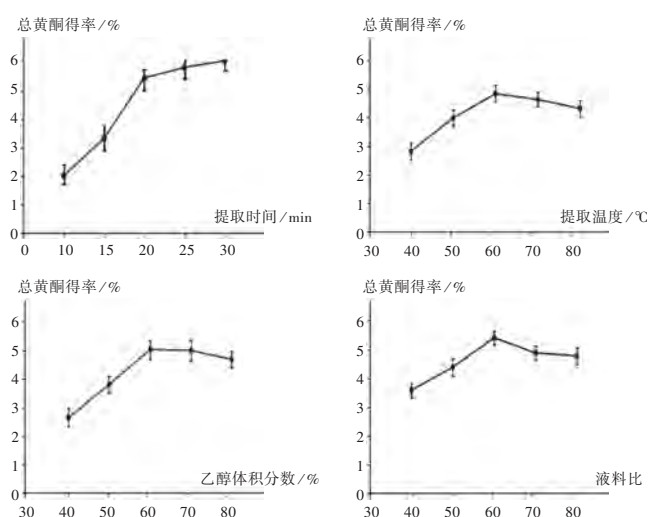


图 1 不同提取时间、温度、乙醇体积分数和液料比对杠板归总黄酮得率的影响

试验设计与结果:根据单因素试验结果,采用星点设计法,以提取温度(A)、提取时间(B)、乙醇体积分数(C)和液料比(D)4个因素为自变量,每个因素取3个水平,以杠板归总黄酮得率为响应值进行试验分析。因素水平见表1,结果见表2。

表 1 响应面优化试验因素水平表

水平	因素 A(°C)	因素 B(min)	因素 C(%)	因素 D
-1	50	10	50	40:1
0	60	20	60	50:1
1	70	30	70	60:1

数据分析:采用统计软件 Design-Expert 对表 2 中的数据进行多元回归拟合,得总黄酮得率对编码自变量 A, B, C, D 的回归方程: $Y = 5.65 + 0.31A - 8.333E - 0.003B - 0.048C + 0.060D - 0.013AB + 0.065AC - 0.045AD - 0.042BC - 0.030BD + 0.03CD - 0.52A^2 - 0.30B^2 - 0.25C^2 - 0.32D^2$ 。该模型回归显著($P < 0.0001$),模型的复相关系数(r) = 0.9982,表明该回归方程回归效果较好,试验误差较小。模型的校正决定系数(R^2_{adj}) =

表2 响应面分析试验设计方案与结果

序号	因素 A (°C)	因素 B (min)	因素 C (%)	因素 D	总黄酮得率 (%)	序号	因素 A (°C)	因素 B (min)	因素 C (%)	因素 D	总黄酮得率 (%)
1	-1	1	0	0	4.51	16	-1	0	0	-1	4.37
2	0	1	0	1	5.04	17	-1	0	-1	0	4.74
3	0	0	-1	1	5.07	18	-1	-1	0	0	4.45
4	0	0	-1	-1	5.05	19	0	-1	0	-1	4.98
5	1	0	1	0	5.18	20	0	0	0	0	5.47
6	0	0	0	0	5.50	21	-1	0	0	1	4.62
7	-1	0	1	0	4.45	22	0	1	1	0	4.97
8	0	0	1	-1	4.98	23	0	-1	-1	0	5.11
9	0	-1	1	0	5.08	24	1	0	-1	0	5.21
10	0	0	0	0	5.49	25	0	0	1	1	5.12
11	0	0	0	0	5.53	26	1	1	0	0	5.14
12	0	1	0	-1	4.98	27	1	0	0	1	5.13
13	0	0	0	0	5.52	28	1	0	0	-1	5.06
14	1	-1	0	0	5.13	29	0	1	-1	0	5.17
15	0	-1	0	1	5.16						

0.995 3,表明该模型可信度较高。失拟项 $P > 0.05$,表明该模型失拟不显著,说明该回归方程能较好地拟合真实的效应面,证实应用星点设计-效应面法优化杠板归总黄酮提取率可行。

响应面分析:通过多元回归方程作响应面图(见图2至图7),可较直观地反映各因素间的交互作用。

最佳提取条件确定:通过软件 Design-Expert 分析得出杠板归总黄酮最佳提取工艺为提取温度 62.91 °C,提取时间 18.96 min,乙醇体积分数 59.49% 和液料比 50.36。考虑到实际操作因素,将测定条件修正为提取温度 60 °C,提取时间 20 min,乙醇体积分数 60% 和液料比 50:1。

验证试验:为检验效应面法所得结果的可靠性,采用上述修正条件进行杠板归总黄酮的微波提取试验,得到杠板归总黄酮平均得率为 5.69% ($n = 3$),与理论预测值 5.67% 非常接近。因此,利用响应面分析法优化杠板归总黄酮的提取工艺参数真实、可靠,具有实用价值。

3 讨论

3.1 提取方法选择

杠板归的主要有效成分为黄酮类化合物,传统回流提取法存在溶剂消耗量大、提取效率低、提取时间长及污染环境等缺点,本研究中选择微波提取法提取杠板归总黄酮,并对提取工艺进行改进优化,以更大程度地利用该药材^[8]。

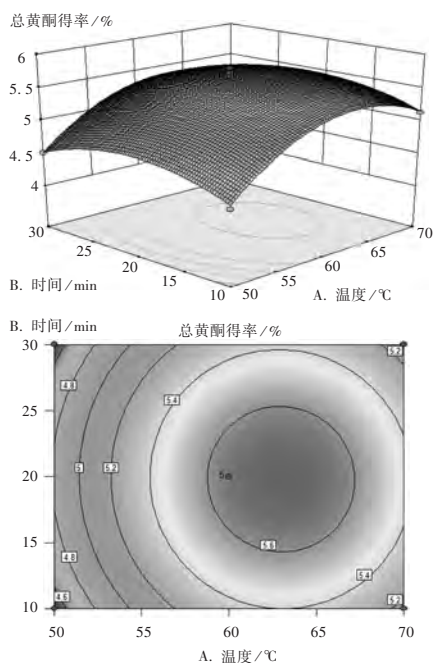


图2 提取温度与提取时间对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

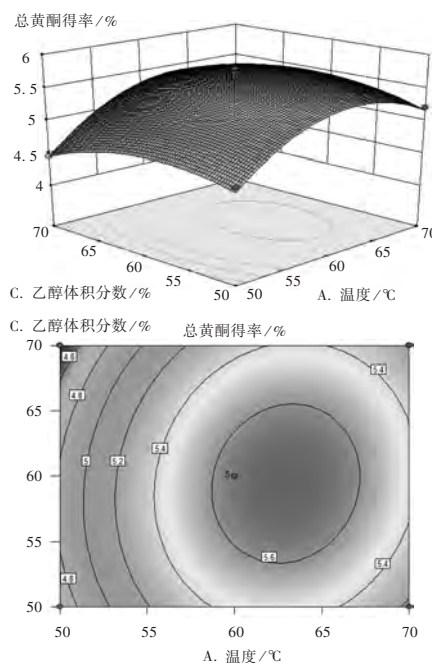


图3 提取温度与乙醇体积分数对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

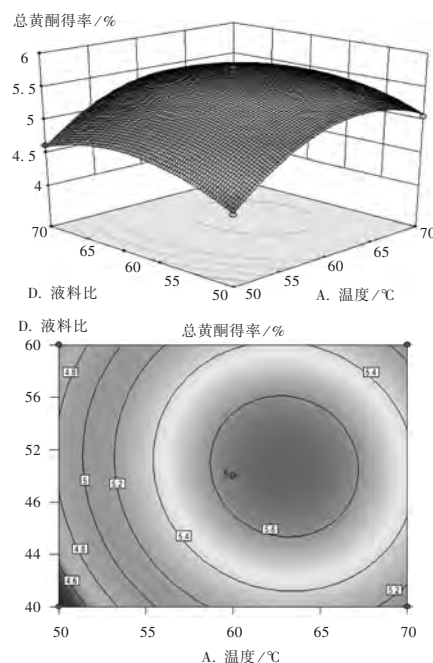


图4 提取温度与液料比对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

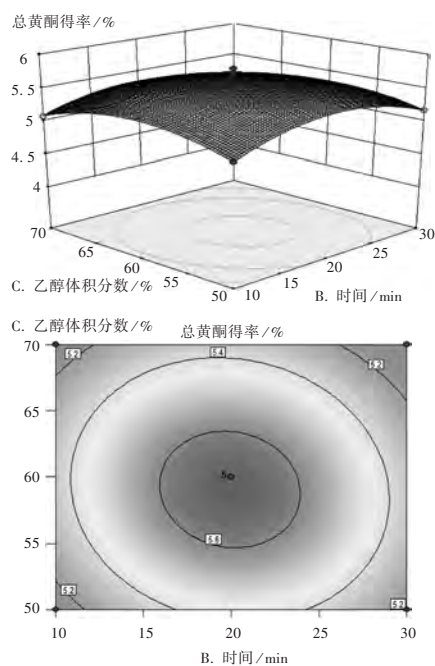


图5 乙醇体积分数与提取时间对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

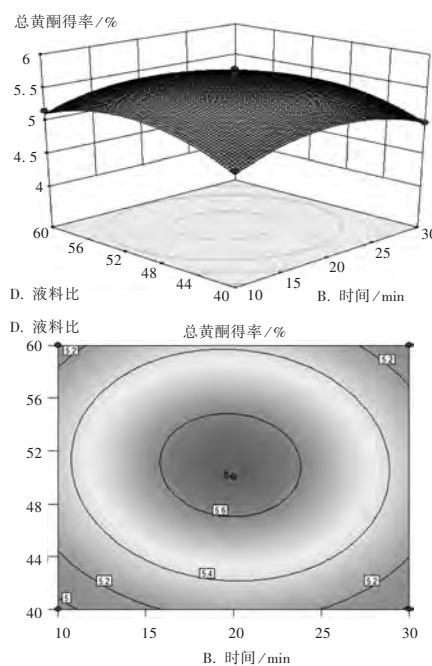


图6 提取时间与液料比对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

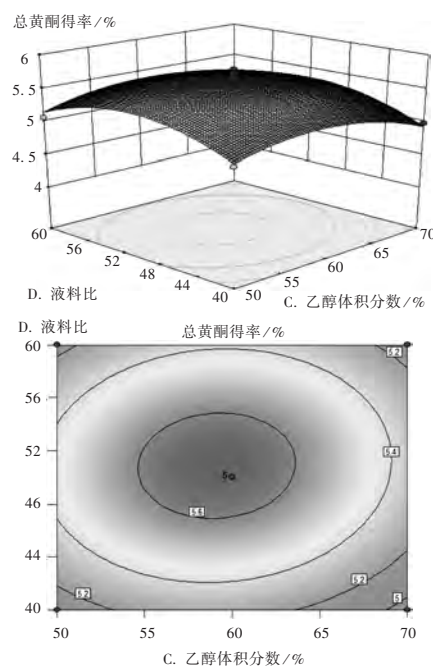


图7 乙醇体积分数与液料比对提取物中总黄酮得率的响应曲面及等高线图

3.2 考察因素选择

通过正交试验法对不同提取工艺进行比较,结果表明,提取时间、乙醇体积分数、液料比、提取温度等因素对杠板归总黄酮的提取均有影响,且乙醇体积分数和提取时间影响最显著。故本研究中选择提取时间、乙醇体积分数、液料比、提取温度4个因素为考察因素^[9]。

3.3 优化方法选择

当前,药材有效成分的提取工艺研究多为正交试验,其结果直观易分析,但得到的优选值只是试验所用水平的某一种组合,具有局限性。与其相比,响应面法能更好地解释多因素与响应值之间的关系,特别是因素之间存在的交互作用。响应面法是将一系列的试验数据用多项式进行拟合,得出回归方程,然后将函数以图形的方式表现出来,更能直观地分析出各个因素与响应面之间的关系及因素之间的交互关系。故本试验中选择响应面法优化杠板归总黄酮的提取工艺^[10-11]。

3.4 方法评价

在单因素试验基础上,本研究中首次采用星点设计-效应面试验设计法,对微波提取杠板归总黄酮的工艺进行了优化,并建立了回归模型。此模型极显著,模型的 $r = 0.9982$, $R^2_{adj} = 0.9953$,失拟项不显著,可用于杠板归总黄酮提取工艺分析和预测。优化后确定的杠板归总黄酮最佳提取工艺条件为提取温度 60°C ,提取时间 20 min ,乙醇体积分数 60% 和液料比 $50:1$ 。该方法工艺简单,提取率较高,且省时、节能、提取效率高,可为杠板归资源的综合利用奠定基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 166-167.
- [2] 徐丽丽, 徐一, 郭秋言, 等. 杠板归的研究进展[J]. 中医药导报, 2017, 23(24): 119-121.
- [3] HAYASHI K, IINUMA M, SASAKI K. In vitro and in vivo evaluation of anovel antiherpetic flavonoid and its synergistic actions with acyclovir [J]. Arch Virol, 2012, 157: 1489-1498.
- [4] 成焕波. 杠板归化学成分的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.
- [5] DAFFODIL ED, MOHAN VR. Total phenolics flavonoids and in vitro antioxidant activity of Nymphaea Pubescens wild rhizome[J]. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2013, 2(5): 3710-3722.
- [6] 孙协军, 刘森, 李秀霞, 等. 盐藻油微波辅助提取工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(1): 70-75.
- [7] MAO KJ, HUANG P, ZHANG L, et al. Optimisation of extraction conditions for total saponins from Cynanchum wallichii using response surface methodology and its anti-tumour effects[J]. Nat Prod Res, 2017, 62(3): 112-118.
- [8] 胡碧君. 黄芪多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国药业, 2018, 27(24): 11-14.
- [9] 朱良荣, 陶锋. 杠板归总黄酮不同提取工艺的比较研究[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(3): 296-298.
- [10] 张道英, 孙湘婷, 钟亮, 等. 超声辅助酶解法提取杠板归中总黄酮[J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(6): 552-557.
- [11] 郭伊霖, 宗时宇, 浦益琼, 等. 响应面法优化徐长卿中丹皮酚提取工艺研究[J]. 中国药业, 2017, 26(20): 9-12.

(收稿日期: 2019-08-21; 修回日期: 2019-12-20)