

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.012

Box – Behnken 响应面法优选山蜡梅叶总香豆素提取工艺*

徐焱丹¹, 金贤武², 毛坤军^{3△}

(1. 江西省上饶市第三人民医院, 江西 上饶 334000; 2. 江西省上饶市食品药品检验检测中心, 江西 上饶 334000; 3. 江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000)

摘要:目的 优选山蜡梅叶总香豆素提取工艺。方法 单因素试验考察超声功率、超声时间、乙醇体积分数、液料比,在此基础上,以总香豆素得率为评价指标,采用4因素3水平的Box – Behnken响应面法优选提取工艺,并进行验证。结果 最优提取工艺为,在230 W功率下,以62%乙醇、18:1液料比超声提取50 min。3次验证试验中,山蜡梅叶总香豆素得率平均为0.916%,与理论预测值基本一致。结论 优选的提取工艺操作简便、稳定可行,可用于山蜡梅叶总香豆素的提取。

关键词:响应面法;单因素试验;山蜡梅叶;总香豆素;提取工艺;优选

中图分类号:R932;TQ460.6

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)10-0048-04

Optimization of Extraction Process of Total Coumarines from *Chimonanthus Nitens* Leaves by Box – Behnken Response Surface Methodology

XU Yandan¹, JIN Xianwu², MAO Kunjun³

(1. Shangrao Third People's Hospital, Shangrao, Jiangxi, China 334000; 2. Shangrao Food and Drug Testing Center, Shangrao, Jiangxi, China 334000; 3. Jiangxi Medical College, Shangrao, Jiangxi, China 334000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of total coumarines from *Chimonanthus nitens* leaves. Methods The ultrasonic power, ultrasonic time, ethanol volume fraction and liquid – solid ratio were investigated by single factor test. On this basis, the extract yield of total coumarines was taken as the evaluation index, the extraction process was optimized by Box – Behnken response surface methodology with 4 factors and 3 levels, and the verification test was carried out. Results The optimal extraction process was as follows: under the 230 W of ultrasonic power, ultrasonic extraction was carried out with 62% of ethanol volume fraction and 18:1 of liquid – solid ratio for 50 min. The average yield of total coumarines from *Chimonanthus nitens* leaves was 0.916%, which was consistent with the theoretical prediction. Conclusion The optimized extraction process is simple, stable and feasible, which can be used for the extraction of total coumarines from *Chimonanthus nitens* leaves.

Key words: response surface methodology; single factor test; *Chimonanthus nitens* leaves; total coumarines; extraction process; optimization

山蜡梅叶为蜡梅科蜡梅属植物山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv. 的干燥叶,生于山地疏林中或石灰岩山地,主产于安徽、浙江、江西等地,是江西的道地药材^[1]。其味辛、微苦,性凉,有清热解毒、祛风解表之功效,临床常用于治疗中暑、咳嗽痰喘、胸闷、蚊叮咬等,民间常用山蜡梅叶泡茶防治感冒^[2]。化学成分研究表明,山蜡梅叶主要含香豆素、黄酮及生物碱等成分^[3-5]。本研究中以山蜡梅叶总香豆素得率为评价指标,采用单因素试验和响应面法优选其总香豆素的提取工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UV-2600型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); FA2004B 型电子天平(万分之一,上海佑科仪器仪表公司)。

1.2 试药

6,7-二甲氧基香豆素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111740-200702,含量为99.30%);山蜡梅叶(江西佑美制药有限公司,批号为20170905)。

2 方法与结果

2.1 总香豆素含量测定

溶液制备:称取6,7-二甲氧基香豆素对照品5.0 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得质量浓度为0.2 mg/mL的对照品溶液。取药材样品粉末5.0 g,精密称定,超声(功率200 W,频率40 kHz)提取50 min,取提取液1 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,即得供试品溶液。

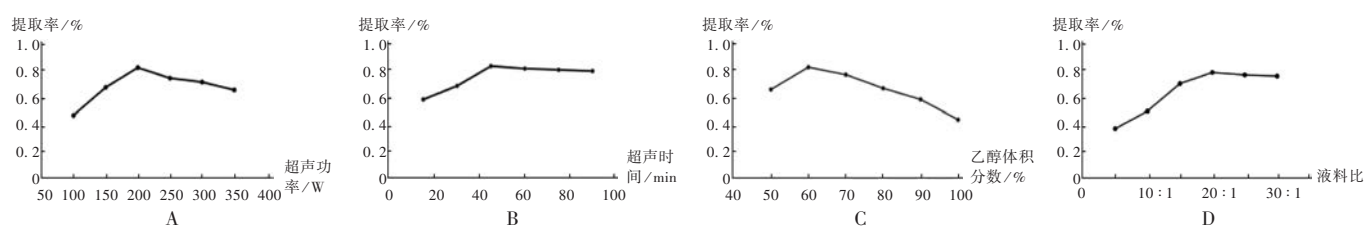
检测波长设定:取对照品溶液适量,进行全波长扫描。结果对照品溶液在340 nm波长处有明显吸收。

线性关系考察:分别精密吸取6,7-二甲氧基香豆

*基金项目:江西省上饶市科技支撑计划项目[20181CKJ09]。

第一作者:徐焱丹,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)xuyandan2020@163.com。

△通信作者:毛坤军,男,硕士,讲师,研究方向为中药药效物质基础,(电子信箱)737259639@qq.com。



A. 超声功率 B. 超声时间 C. 乙醇体积分数 D. 液料比

图1 单因素试验结果

A. Ultrasonic power B. Ultrasonic time C. Ethanol volume fraction D. Liquid - material ratio

Fig. 1 Results of the single factor test

素对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容。以甲醇为空白对照, 在 340 nm 波长处测定吸光度。以吸光度 (A) 为纵坐标、6, 7-二甲氧基香豆素对照品质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 0.126C + 0.072$ ($r = 0.9997$, $n = 6$)。结果表明, 6, 7-二甲氧基香豆素质量浓度在 0.002 ~ 0.020 mg/mL 范围内与吸光度线性关系良好。

样品含量测定: 取药材样品, 同法制备供试品溶液, 以甲醇为空白对照, 在 340 nm 波长处测定吸光度, 根据回归方程计算总香豆素含量, 并计算提取率。

2.2 单因素试验

超声功率: 取药材样品粉末, 精密称定, 每份 5.0 g, 共 3 份, 在不同超声功率下, 以 60% 乙醇、液料比 20:1, 超声提取 45 min, 同 2.1 项下方法测定总香豆素含量, 并计算提取率。结果表明, 超声功率为 200 W 时最佳。结果见图 1 A。

超声时间: 取药材样品粉末, 精密称定, 每份 5.0 g, 共 3 份, 以 60% 乙醇、液料比 20:1, 超声功率 200 W, 取不同超声提取时间, 按 2.1 项下方法测定含量并计算提取率。结果见图 1 B, 表明超声提取为 45 min 时最佳。

乙醇体积分数: 取药材样品粉末, 精密称定, 每份 5.0 g, 共 3 份, 在不同乙醇体积分数下, 以液料比 20:1, 超声功率 200 W, 超声提取 45 min, 按 2.1 项下方法测定含量并计算提取率。结果见图 1 C, 表明乙醇体积分数为 60% 时最佳。

液料比: 取药材样品粉末, 精密称定, 每份 5.0 g, 共 3 份, 在不同液料比下, 以 60% 乙醇、超声功率 200 W, 提取 45 min, 同 2.1 项下方法测定含量并计算提取率。结果见图 1 D, 表明液料比为 20:1 时最佳。

2.3 提取工艺优化

响应面试验: 根据单因素试验结果, 以超声功率 (A)、超声时间 (B)、乙醇体积分数 (C)、液料比 (D) 为 4 个因素, 以总香豆素得率为评价指标, 采用 4 因素 3 水平的 Box - Behnken 响应面法进行试验设计, 因素与水平见表 1, 响应面试验设计与结果见表 2。

响应面分析: 采用 Design - Expert 8.0 软件对表 2

表1 因素水平表

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素 A(W)	因素 B(min)	因素 C(%)	因素 D
-1	150	30	50	15:1
0	200	45	60	20:1
1	250	60	70	25:1

表2 响应面试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of the response surface methodology

序号	A(W)	B(min)	C(%)	D	总香豆素得率 (Y , %)
1	-1	1	0	0	0.68
2	0	0	0	0	0.83
3	0	0	-1	-1	0.47
4	0	1	1	0	0.81
5	1	1	0	0	0.87
6	0	0	1	1	0.91
7	1	0	0	-1	0.92
8	-1	0	-1	0	0.53
9	1	0	0	1	0.88
10	0	0	0	0	0.94
11	0	0	-1	1	0.82
12	-1	0	1	0	0.76
13	1	0	-1	0	0.69
14	-1	-1	0	0	0.67
15	-1	0	0	-1	0.57
16	0	0	1	-1	0.79
17	0	-1	0	-1	0.69
18	0	0	0	0	0.94
19	0	-1	-1	0	0.57
20	1	-1	0	0	0.82
21	0	1	0	-1	0.86
22	0	1	0	1	0.73
23	0	-1	0	1	0.67
24	0	0	0	0	0.93
25	-1	0	0	1	0.83
26	0	-1	1	0	0.72
27	1	0	1	0	0.75
28	0	0	0	0	0.85
29	0	1	-1	0	0.74

中数据进行拟合分析,得总香豆素得率对因素 A,B,C,D 的回归方程, $Y=0.90+0.074A+0.046B+0.077C+0.045D+0.001AB-0.042AC-0.075AD-0.020BC-0.028BD-0.057CD-0.067A^2-0.085B^2-0.12C^2-0.046D^2$ 。选用的模型有统计学意义 ($P<0.01$);失拟项无统计学意义 ($P=0.1735>0.05$);模型的 $R^2=0.8009$, $R_{Adj}^2=0.6018$,模型拟合度良好。结果显示,超声功率(A)和乙醇体积分数(C)对总香豆素得率有显著影响 ($P<0.05$);二次项 B^2 、 C^2 有显著影响 ($P<0.05$),详见表 3。交互作用对山蜡梅叶总香豆素得率的影响见图 2。

2.4 验证试验

采用 Design-Expert 8.0 软件对上述结果进行分析,得最佳超声提取工艺为超声功率 233.47 W,超声时间 49.96 min,乙醇体积分数 62.50%,液料比 18.44:1,总香豆素得率为 0.933%。结合实际操作可行性,将条件修正为超声功率 230 W,超声时间 50 min,乙醇体积分数 62%,液料比 18:1,进行验证试验,结果总香豆素得率为 0.916%,与预测值的相对偏差为 1.31%,与理论预测值基本一致。

3 讨论

香豆素类成分广泛分布于中药植物中,是很多中药的主要活性成分。影响香豆素类成分提取的主要因素是

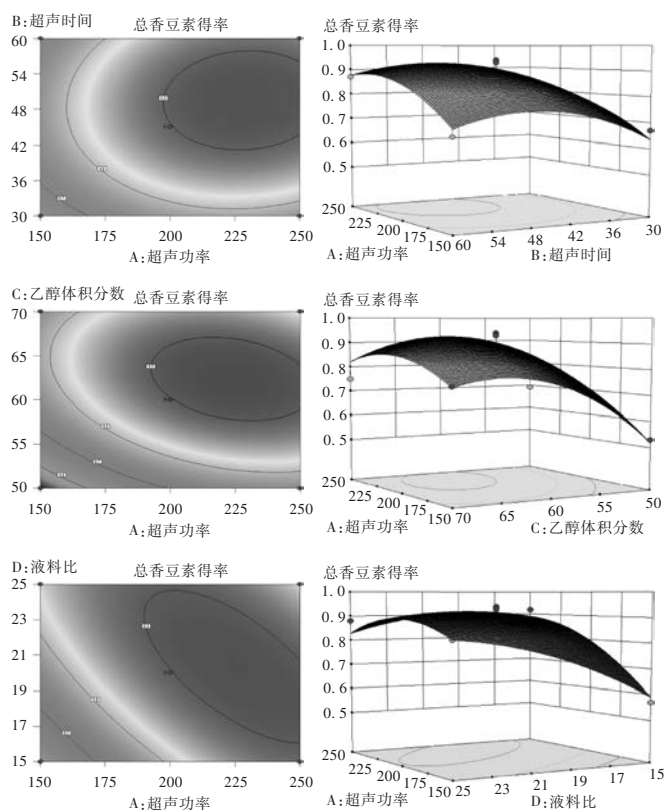


图2 不同因素交互作用对山蜡梅叶总香豆素提取率影响的等高线图和响应面图

Fig.2 Contour plot and response surface plot of the interaction effects of various factors on the extraction rate of total coumarins from *Chimonanthus nitens* leaves

表3 模型各项方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	P 值
模型	0.360	14	0.026	4.02	0.006 8
A	0.066	1	0.066	10.32	0.006 3
B	0.025	1	0.025	3.94	0.067 1
C	0.071	1	0.071	11.02	0.005 1
D	0.024	1	0.024	3.80	0.071 7
AB	0.004 0	1	0.004 0	0.063	0.806 2
AC	0.007 2	1	0.007 2	1.130	0.306 0
AD	0.022 0	1	0.022 0	3.520	0.081 8
BC	10.001 6	1	0.001 6	0.250	0.624 8
BD	0.003 0	1	0.003 0	0.470	0.503 0
CD	0.013 0	1	0.013 0	2.070	0.172 5
A ²	0.029	1	0.029	4.60	0.050 1
B ²	0.047	1	0.047	7.29	0.017 2
C ²	0.091	1	0.091	14.25	0.002 0
D ²	0.014	1	0.014	2.15	0.164 4
残差	0.090	14	0.006 4		
失拟项	0.078	10	0.007 8	2.72	0.173 5
纯误差	0.011	4	20.002 9		
总离差	0.450	28			

提取时间、乙醇体积分数、液料比及提取温度。因此,本试验中选择这 4 个因素为考察因素^[6-8]。得最佳提取工艺为,超声功率 230 W,提取 50 min,乙醇体积分数

