

响应面法优化闪式提取牛蒡苷的工艺优化

谢捷, 李红娟, 朱兴一, 杨凡, 王平*

(浙江工业大学药学院, 制药工程省部共建教育部重点实验室, 浙江 杭州 310014)

摘要: 采用响应面分析法优化牛蒡苷闪式提取的工艺条件。以牛蒡苷得率为指标, 在单因素试验基础上, 应用 Box-Behnken 中心组合设计试验, 对提取工艺影响较大的乙醇体积分数、提取时间和液料比 3 个工艺参数进行优化。最佳工艺条件为: 乙醇体积分数 83%、提取时间 93s、液料比 17:1(mL:g)、牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$, 在此工艺条件下, 牛蒡苷得率为 31.62mg/g, 与预测值 31.72mg/g 基本相符。闪式提取法是一种快速有效的提取牛蒡苷的方法。

关键词: 闪式提取; 牛蒡苷; 响应面分析法

Optimization of Homogenate Extraction for Arctiin from *Arctium lappa* L. by Response Surface Methodology

XIE Jie, LI Hong-juan, ZHU Xing-yi, YANG Fan, WANG Ping*

(Key Laboratory of Pharmaceutical Engineering of Ministry of Education, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Response surface analysis (RSA) methodology was used for optimizing homogenate extraction processing of arctiin from *Arctium lappa* L. Based on single-factor experiments, the effects of ethanol concentration, extraction time and liquid-material ratio on extraction rate of arctiin were explored by Box-Behnken central composite design method. The optimal extraction conditions were ethanol concentration of 83%, extraction time of 93 s, liquid-material ratio of 17:1 (mL/g) and particle size of less than 1.0 mm. Under these optimal extraction conditions, the actual yield of total arctiin was 31.62 mg/g, which was consistent with the predicted yield of 31.72 mg/g. Results indicated that homogenate extraction was an effective method to extract arctiin from *Arctium lappa* L.

Key words: homogenate extraction; arctiin; response surface analysis (RSA)

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)24-0033-04

牛蒡子为菊科植物牛蒡(*Arctium lappa* L.)的干燥成熟果实。牛蒡子性寒, 味辛、苦, 为常用中药^[1]。牛蒡子的化学成分较多, 主要药效成分为牛蒡苷与牛蒡苷元^[2], 具有抗癌^[3]、抗菌^[4]及疏散风热、解毒透疹、利咽消肿等功效^[5-6]。目前, 牛蒡苷的提取有乙醇加热回流法^[7-8]、超声-微波辅助提取法^[9]和水煮法^[10], 但以乙醇加热回流法应用最广, 提取过程通常需要 2h 以上。闪式提取法是一种快速、有效的提取方法, 能在常温下, 利用高速机械剪切力、搅拌力以及高速旋转的刀刃之间产生的涡流负压, 迅速破坏植物组织细胞, 使细胞内部的化学成分(或有效成分)与溶剂充分接触, 溶解转移, 并在很短时间内达到溶解平衡, 实现高效提取的目的^[11-12]。本研究将闪式提取器应用于牛蒡苷的提

取, 采用响应面分析法, 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 对闪式提取工艺条件进行优化。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

牛蒡子 浙江天一堂药业有限公司; 牛蒡苷对照品(纯度 99%) 中国药品生物制品检定所; 乙醇(化学纯); 甲醇(色谱纯)。

FSH-22 可调闪式提取器 郑州金星科技有限公司; HX-200 高速中药粉碎机 浙江省永康市溪岸五金药具厂; DZF 真空干燥箱 上海精宏实验设备有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 液相色谱仪 安捷伦科技有限公司。

收稿日期: 2010-02-05

基金项目: 浙江省国际合作项目(2007C14004)

作者简介: 谢捷(1978—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: xiejie97@sohu.com

* 通信作者: 王平(1969—), 女, 教授, 博士, 主要从事天然药物化学研究。E-mail: pharmlab@zjut.edu.cn

1.2 牛蒡苷检测方法的建立

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XTeert C₁₈ 柱(4.6mm × 150mm, 5 μm); 检测波长: 230nm; 流动相: 甲醇-水(45:55, V/V); 流速: 1 mL/min; 柱温: 35℃。

1.2.2 标准曲线的绘制

精确称取牛蒡苷标准品 28.4mg, 用甲醇溶解, 定容至 100mL。分别精密吸取 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0mL 至 10mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 分别进样 10 μL。以进样质量浓度 X 为横坐标、峰面积积分值 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=1663.5X-174.79(R^2=0.9982)$, 表明牛蒡苷质量浓度在 0.0568~0.284g/L 范围内与峰面积具有很好的线性关系。

1.2.3 药材中牛蒡苷含量的测定

根据《中国药典》(2005 版)牛蒡苷含量测定的方法, 取本批药材粉末(过三号筛)0.5g, 精密称定, 置于 50mL 量瓶中, 加甲醇约 45mL, 超声处理(功率 150W、频率 20kHz)20min, 加甲醇至刻度, 摇匀、滤过, 得待测溶液。精密吸取待测溶液 10 μL, 进行 HPLC 分析。经标准曲线方程计算得该批药材牛蒡苷的含量为 33.5mg/g。

1.3 牛蒡苷提取工艺的优化

1.3.1 单因素试验

精确称取牛蒡子 10.0g(粒径 3.3~0.2mm), 加入不同体积分数的乙醇溶液, 闪式提取一定的时间, 过滤, 取上清液, 浓缩, 得浸膏。以牛蒡苷得率为指标, 选取乙醇体积分数、闪式提取时间、液料比和牛蒡子粒径进行单因素试验。

1.3.2 响应面分析试验

综合单因素试验结果, 利用响应面分析法对工艺参数进行优化。选取对牛蒡苷得率影响较大的乙醇体积分数、提取时间和液料比 3 个因素。通过 Design Expert 7.0 软件, 根据 Box-Behnken 试验设计原理, 对提取工艺进行响应面分析, 求出数学模型, 得到最佳工艺参数。分析因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面分析试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface experiments

水平	A 乙醇体积分数/%	B 提取时间/s	C 液料比(mL/g)
-1	60	60	10:1
0	80	100	15:1
1	100	140	20:1

1.4 牛蒡苷得率的计算

将浸膏用甲醇溶解, 定容至 100mL, 再吸取 1mL 于 25mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 进样 10 μL。

根据标准曲线方程计算牛蒡苷质量浓度, 计算牛蒡苷得率。

$$\text{牛蒡苷得率}/\% = \frac{C \times N \times 100}{m}$$

式中: C 为牛蒡苷质量浓度/(g/L); N 为稀释倍数; m 为牛蒡子质量/g。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对牛蒡苷得率的影响

固定闪式提取时间 100s、液料比 15:1(mL/g), 牛蒡子粒径 ≤ 1.0mm, 考察乙醇体积分数(20%、40%、60%、80%、100%)对牛蒡苷得率的影响。由图 1 可知, 牛蒡苷得率随乙醇体积分数的升高而增加, 乙醇体积分数为 80% 时, 牛蒡苷的得率最高。牛蒡苷易溶于乙醇, 不溶于水, 随乙醇体积分数的提高, 溶解度相应增大, 得率随之提高。因此, 中心组合试验选取乙醇体积分数范围为 60%~100%。

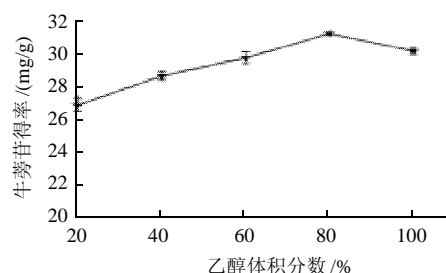


图 1 乙醇体积分数对牛蒡苷得率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on extraction rate of arctiin from *Arctium lappa* L.

2.1.2 提取时间对牛蒡苷得率的影响

固定乙醇体积分数 80%、液料比 15:1、牛蒡子粒径 ≤ 1.0mm, 考察闪式提取时间(20、60、100、140、180s)对牛蒡苷得率的影响。由图 2 可知, 当提取时间达到 100s 时, 牛蒡苷得率最高, 再延长提取时间, 容易引起部分内酯键的破坏, 从而导致牛蒡苷得率的下降。因此, 中心组合试验选择提取时间的范围为 60~140s。

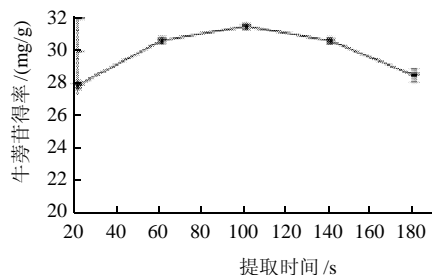


图 2 提取时间对牛蒡苷得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on extraction rate of arctiin from *Arctium lappa* L.

2.1.3 液料比对牛蒡苷得率的影响

固定乙醇体积分数80%、闪式提取时间100s、牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$ ，考察液料比(5:1、10:1、15:1、20:1、25:1)对牛蒡苷得率的影响。由图3可知，当液料比由从5:1增加至15:1时，牛蒡苷得率随之增大，并达到最大值，继续增加液料比，牛蒡苷得率几乎不变。液料比的增加加速了溶媒的传质过程，有助于牛蒡苷的溶出。因此中心组合试验选择液料比的范围为10:1~20:1。

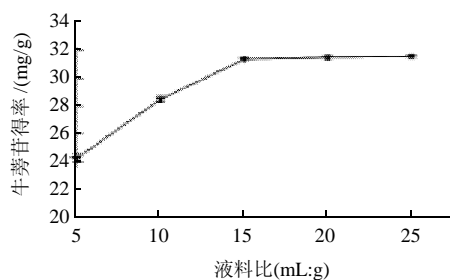


图3 液料比对牛蒡苷得率的影响

Fig.3 Effect of liquid-material ratio on extraction rate of arctiin from *Arctium lappa* L.

2.1.4 粒径对牛蒡苷得率的影响

将牛蒡子预粉碎后过筛，分别得到粒径为 ≤ 3.3 、1.6、1.0、0.6、0.2mm的粗粉。固定乙醇体积分数80%、闪式提取时间100s和液料比15:1，考察不同粒径对牛蒡苷得率的影响。由图4可知，当牛蒡子粗粉的粒径小于1.0mm时，牛蒡苷的得率基本稳定在31.5mg/g左右。考虑到闪式提取过程中，高速的机械剪切作用和搅拌力能在短时间内将植物组织充分粉碎。因此，选择牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$ ，并在响应面优化试验中不再作为考察因素。

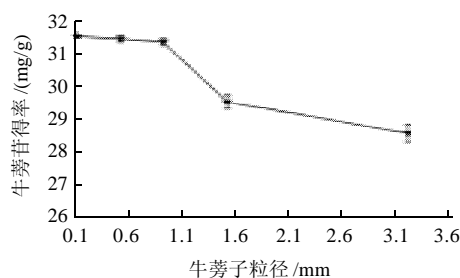


图4 粒径对牛蒡苷得率的影响

Fig.4 Effect of particle size on extraction rate of arctiin from *Arctium lappa* L.

2.2 工艺条件优化的响应面分析试验

Box-Benhnken 试验结果如表2所示，试验1~12为析因试验，13~15为中心试验。其中： X_1 =(乙醇体积分数-80)/20， X_2 =(提取时间-100)/40， X_3 =(液料比-15)/5。以牛蒡苷得率(Y)为响应值，各因素经回归拟合后，得二次多项回归方程为：

$$Y=31.62+0.13X_1-0.21X_2+0.51X_3+0.12X_1X_2+0.53X_1X_3-0.15X_2X_3-0.84X_1^2-0.66X_2^2-1.11X_3^2$$

表2 Box-Benhnken 试验设计方案及结果

Table 2 Design and results of Box-Benhnken experiments

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 牛蒡苷得率/(mg/g)
1	-1	-1	0	30.4
2	-1	1	0	29.4
3	1	-1	0	30.6
4	1	1	0	30.1
5	0	1	-1	29.5
6	0	-1	1	30.5
7	0	1	1	30.1
8	0	-1	-1	29.3
9	-1	0	-1	29.6
10	1	0	-1	28.6
11	-1	0	1	29.7
12	1	0	1	30.8
13	0	0	0	31.6
14	0	0	0	31.5
15	0	0	0	31.7

表3为回归方差分析结果。该模型回归显著($P=0.0001$)， $R^2=0.9732$ ，失拟项不显著，说明该模型与实际试验拟合较好，可以用于闪式提取牛蒡苷试验的理论预测。从F值的分析结果 $X_1(F=2.13)$ 、 $X_2(F=6.16)$ 、 $X_3(F=35.83)$ 可以看出，在所选的各因素水平范围内，对牛蒡苷得率的影响顺序为：液料比>提取时间>乙醇体积分数。

表3 回归模型方差分析结果

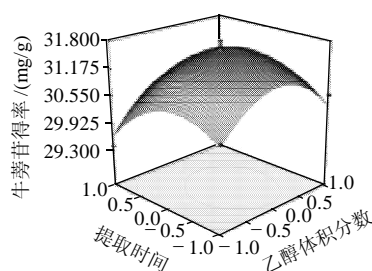
Table 3 Variance analysis of regression model

来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	14.90	1.66	28.23	0.0001**
X_1	1	0.13	0.13	2.13	0.1877
X_2	1	0.36	0.36	6.16	0.0421*
X_3	1	2.10	2.10	35.83	0.0005**
X_1X_2	1	0.063	0.063	1.07	0.3362
X_1X_3	1	1.10	1.10	18.80	0.0034**
X_2X_3	1	0.090	0.090	1.53	0.2553
X_1^2	1	2.94	2.94	50.06	0.0002**
X_2^2	1	1.83	1.83	31.28	0.0008**
X_3^2	1	5.19	5.19	88.46	< 0.0001**
残差	7	0.41	0.059		
失拟项	3	0.32	0.11	4.89	0.0797
净误差	4	0.088	0.022		
总误差	16	15.31			$R^2=0.9732$

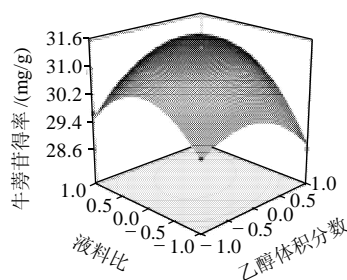
注：*. $P < 0.05$ ，差异显著；**. $P < 0.01$ ，差异极显著。

图5直观反映了各因素交互作用对响应值的影响。从图5A可以看出，不同的提取时间对乙醇体积分数的响应抛物线最高点位置的影响较小，不同的乙醇体积

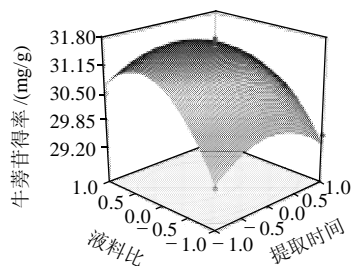
分数对提取时间响应抛物曲线最高点位置的影响也较小, 等高线几乎呈圆形, 说明乙醇体积分数和提取时间两个因素的交互作用很小。从图 5B 可以看出, 不同的液料比对乙醇体积分数的响应抛物曲线最高点位置的影响较大, 不同的乙醇体积分数对液料比响应抛物曲线最高点位置的影响也较大, 等高线呈椭圆形, 说明乙醇体积分数和液料比两个因素存在的交互作用显著。从图 5C 可以看出, 不同的液料比对提取时间的响应抛物曲线最高点位置的影响较大, 不同的提取时间对液料比的响应抛物曲线最高点位置的影响较小, 说明提取时间和液料比两个因素存在一定的交互作用, 但不显著。



A. 乙醇体积分数与提取时间



B. 液料比与乙醇体积分数



C. 液料比与提取时间

图 5 各两因素交互作用对牛蒡苷得率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plots for the effects of cross-interactions among two factors on extraction rate

2.3 提取工艺条件的确定

结合回归模型的数学分析可知, 牛蒡苷闪式提取的最佳工艺条件为乙醇体积分数 83.04%、提取时间 92.93s、液料比 16.38:1、牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$ 。考虑到试验操作的可行性, 将最优提取条件调整为乙醇体积分数 83%、提取时间 93s、液料比 17:1、牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$ 。实验重复 3 次, 在此条件下牛蒡苷的理论得率为 31.72mg/g, 实际得率为 31.62mg/g。因此, 响应面法优化所得的闪式提取工艺参数准确可靠, 具有一定的实用价值。

3 结 论

将响应面分析法应用于牛蒡苷闪式提取工艺的研究, 采用合理的试验设计, 对提取工艺进行全面分析和评测, 并依据回归分析得到牛蒡苷闪式提取的最佳工艺条件: 乙醇体积分数 83%, 提取时间 93s, 液料比 17:1(mL:g), 牛蒡子粒径 $\leq 1.0\text{mm}$ 。此时, 牛蒡苷的实际得率为 31.62mg/g, 与理论值 31.72mg/g 基本相符, 说明模型预测可靠。将闪式提取法应用于牛蒡苷的提取, 能显著缩短提取时间, 且无需加热, 是一种高效的提取方法。

参考文献:

- [1] 龚义明, 刘利根, 宋科峰, 等. 牛蒡子的研究进展[J]. 海峡药学, 2005, 17(4): 1-4.
- [2] 王海燕, 杨峻山. 牛蒡子化学成分的研究[J]. 药学报, 1993, 28 (12): 911-917.
- [3] HIROSE M, YAMAGUCHI T, LIN C, et al. Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats [J]. Cancer Lett, 2000, 155(1): 79-88.
- [4] RYU S Y, AHN J W, KANG Y H, et al. Antiproliferative effect of arctigenin and arctiin[J]. Arch Pharm Res, 1995, 18(6): 462-463.
- [5] 蒋淑敏. 牛蒡化学成分和药理作用的研究现状[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 941-942.
- [6] 阴键. 中药现代研究与临床应用: 第 2 分册[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1995: 66.
- [7] 王小琳, 张玉杰, 石任兵. 正交实验设计优选牛蒡子的提取工艺[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(4): 64-65.
- [8] 王劲, 史辑, 康廷国, 等. 均匀设计法优化牛蒡子中牛蒡苷的提取工艺[J]. 中药材, 2004, 27(2): 127-129.
- [9] LOU Zaixiang, WANG Hongxin, ZHU Song, et al. Improved extraction and identification by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of phenolic compounds in burdock leaves[J]. J Chromat A, 2010, 1217(16): 2441-2446.
- [10] 李大亮, 宋杨, 周傲华, 等. 牛蒡子水煎液及牛蒡苷、牛蒡苷元体外抗菌实验研究[J]. 黑龙江医药, 2004, 17(6): 433-436.
- [11] 刘延泽. 植物组织破碎提取法及闪式提取器的创制与实践[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 401-407.
- [12] 吴冬梅. 闪式提取器在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 34; 37.