

响应面分析法优化肉苁蓉苯乙醇苷提取反应 及其抗氧化反应研究

刘洋¹, 修效友², 汪维云^{1*}

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 安徽德昌药业饮片有限公司, 亳州 236800)

摘要: 为优选管花肉苁蓉苯乙醇苷提取最佳工艺并对经分离纯化的苯乙醇苷进行抗氧化活性评价研究, 以管花肉苁蓉中的苯乙醇苷得率为检测指标, 采用响应面分析法, 分别优化乙醇浸提法、超声提取法、微波提取法 3 种方法的提取效果, 选出最优条件, 并进行比较; 采用 DPPH 法体外测定苯乙醇苷的抗氧化能力。结果表明, 微波辅助提取法在最短时间内具有最高的苯乙醇苷得率, 超声波辅助提取法次之, 而乙醇浸提法时间最长, 得率最低; 随着苯乙醇苷浓度的增加其 DPPH 自由基清除能力也不断增强, 当浓度在 60~70 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 时达到最大。该试验对提高管花肉苁蓉的利用率具有实际指导意义, 为管花肉苁蓉中苯乙醇苷化合物的药理和生物活性研究提供参考。

关键词: 管花肉苁蓉; 苯乙醇苷; 响应面分析; 提取工艺; DPPH

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0294-05

Optimization of phenylethyl alcohol glycosides extraction process from *Cistanche tubulosa* by response surface analysis (RSA)

LIU Yang¹, XIU Xiaoyou², WANG Weiyun¹

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Anhui Dechang Pharmaceutical Industry Ltd., Co, Bozhou 236800)

Abstract: In order to optimize the extraction process of phenylethyl alcohol glycosides from *Cistanche tubulosa*, the effects of ethanol extraction, ultrasonic extraction, and microwave extraction on the yield ratio of phenylethyl alcohol glycosides were studied using response surface analysis (RSA). The antioxidant capacity of phenylethyl alcohol glycosides was determined by *in vitro* antioxidant analysis using DPPH method. As results, the microwave extraction method showed the highest yield of benzyl ethanol in the shortest time followed by the ultrasonic extraction method. The ethanol extraction method showed the lowest efficiency with the longest processing time. With the increase of the phenylethyl alcohol glycosides concentration, the DPPH radical scavenging capacity was also increasing and its maximum value occurred at the concentration of 60-70 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. This study provides valuable information to improve the extraction process of phenylethyl alcohol glycosides from *Cistanche tubulosa*, which will benefit the research on the pharmacological and biological activity research of this compound.

Key words: *Cistanche tubulosa*; phenylethyl alcohol glycosides; response surface analysis; extraction technology; DPPH

管花肉苁蓉为列当科植物管花肉苁蓉的干燥带鳞叶的肉质茎^[1], 管花肉苁蓉又称红柳大芸或管花大芸, 产于我国内蒙古、新疆等地, 是贵重而罕见的寄生药材, 具有益精养血、补肾助阳、润肠通便之功能^[2], 为中医常用的补肾壮阳药物。肉苁蓉的

主要药用成分为苯乙醇苷类^[3], 鉴于其较高的药用价值, 其提取工艺研究值得深入探讨。目前文献记载的对肉苁蓉中苯乙醇苷类物质提取方法和提取条件^[4]的研究尚不全面深入, 为此, 本试验通过响应面分析法优化其提取条件, 旨在为有效开发利用药

收稿日期: 2014-04-17

基金项目: 2012 年安徽省科技攻关项目 (12011402137) 资助。

作者简介: 刘洋, 硕士研究生。E-mail: 584643864@qq.com

* 通信作者: 汪维云, 博士, 教授。E-mail: weiyunw@126.com

材资源提供参考。

药理试验研究表明管花肉苁蓉中的苯乙醇苷类化合物具有广泛的药理和生物活性, 如抗肝毒素、消炎、止痛和抗氧化活性等^[5-8]。其中尤为引人注目的是具有非常好的抗氧化活性, 本试验主要对苯乙醇苷类化合物的抗氧化活性进行了系统的分析, 采用 DPPH 抗氧化体外评价方法^[9], 测量不同浓度苯乙醇苷的抗氧化活性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

仪器包括 天平、水浴锅、分光光度计、微波提取仪、超声仪、中药粉碎机; 试药为: 肉苁蓉购自北京同仁堂, 经中药与天然产物研究所鉴定为列当科植物管花肉苁蓉的带鳞叶肉质茎。松果菊苷对照品(111670-200502)对照品购自中国药品生物制品鉴定所。水为自制超纯水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 苯乙醇苷得率计算方法 按照文献[6]中的方法进行测定与计算。

1.2.2 乙醇浸提法响应面优化 提取时间定为 3 h, 选取乙醇浓度 A、提取温度 B、料液比 C 共 3 个因素作为自变量, 将得率百分比作为目的指标 Y 进行 Box-Behnken 响应面优化, 自变量的试验水平以 -1、0、1 进行编码, 试验设计与统计分析数据分析使用 Design Expert 7.1.6 软件进行。试验因素水平设计如表 1 所示。

1.2.3 乙醇浸提法响应面设计 相应面的具体设计见表 2。

表 1 乙醇浸提响应面因素水平

Table 1 Experimental design of RSM with three factors and three levels using ethonal extraction method

水平 Level	因素 Factor		
	A(乙醇浓度) Ethanol concentration	B(提取温度) Extraction temperature	C(料液比) Solid-liquid ratio
-1	75%	45℃	1:10
0	80%	50℃	1:12
1	85%	55℃	1:14

1.2.4 超声辅助提取法响应面优化 提取时间定为 40 min, 选取乙醇浓度 A、超声功率 B、料液比 C 共 3 个因素作为自变量, 将得率百分比作为目的指标 Y 进行 Box-Behnken 响应面优化, 自变量的试验水平以 -1、0、1 进行编码, 试验设计与统计分析数据分析使用 Design Expert 7.1.6 软件进行。试验因素水平设计如表 3 所示。

表 2 超声辅助提取法响应面因素水平

Table 2 Experimental design of RSM with three factors and three levels using ultrasonic-assisted extraction method

水平 Level	因素 Factor		
	A(乙醇浓度) Ethanol concentration	B(超声功率) Ultrasonic power	C(料液比) Solid-liquid ratio
-1	75%	140	1:14
0	80%	160	1:16
1	85%	180	1:18

1.2.5 微波辅助提取法响应面优化 根据正交试验结果, 将影响最小的提取时间定为 1.5 h, 选取乙醇浓度 A、微波功率 B、料液比 C 共 3 个因素作为自变量, 将得率百分比作为目的指标 Y 进行 Box-Behnken 响应面优化, 自变量的试验水平以 -1、0、1 进行编码, 试验设计与统计分析数据分析使用 Design Expert 7.1.6 软件进行。试验因素水平设计如表 5 所示。

表 3 微波辅助提取法响应面因素水平

Table 3 Experimental design of RSM with three factors and three levels using microwave-assisted extraction method

水平 Level	因素 Factor		
	A(乙醇浓度) Ethanol concentration	B(微波功率) Ultrasonic power	C(料液比) Solid-liquid ratio
-1	65%	100	1:14
0	70%	200	1:16
1	75%	300	1:18

1.2.6 苯乙醇苷抗氧化性的研究 将 2.5 mg DPPH 标准品, 溶于无水乙醇并定容到 100 mL, 则其浓度为 0.025 mg·mL⁻¹, 用锡箔纸包好, 避光保存。精确吸取纯化后的苯乙醇苷样品 2.0 mL 于试管中, 准确加入 2.5 mL 上述配好的 DPPH 溶液, 使其充分混合。避光静置 30 min 后在 517 nm 波长下测其吸光值 A_i 。同时测定 2 mL 苯乙醇苷和 2.5 mL 溶剂的吸光度 A_j , 再测定 2.5 mL DPPH 溶剂和 2 mL 溶剂在 517 nm 处的吸光值 A_c , 重复 3 次。待测样品对 DPPH 的清除率公式为: $K=[1-(A_i-A_j)/A_c] \times 100\%$ 。

其中, 苯乙醇苷样品浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70 和 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 乙醇浸提法响应面优化

乙醇浸提法响应面优化实验结果见表 4。

为直观考察各因素对响应值的影响, 将一个因素设为中心值, 描绘对应两因素的三维响应面图和等高线图, 结果如图 1 所示。

表 4 乙醇浸提响应面设计和结果

Table 4 Design and results of RSM using ethonal digestion

组号 No.	因素 Factor			得率/% Yield
	A	B	C	
1	-1	-1	0	2.36
2	0	0	0	3.64
3	-1	1	0	2.53
4	1	-1	0	3.62
5	0	0	0	3.71
6	1	0	1	3.28
7	1	0	-1	2.83
8	1	1	0	3.04
9	0	0	0	3.63
10	0	0	0	3.58
11	0	-1	-1	2.89
12	0	1	-1	2.19
13	0	0	0	3.6
14	-1	0	-1	1.59
15	0	1	1	3.08
16	-1	0	1	2.62
17	0	-1	1	2.96

表 5 超声辅助提取法响应面设计和结果

Table 5 Design and results of RSM using ultrasonic-assisted extraction method

组号 No.	因素 Factor			得率/% Yield
	A	B	C	
1	-1	-1	0	2.82
2	0	0	0	3.82
3	-1	1	0	1.95
4	1	-1	0	3.3
5	0	0	0	3.85
6	1	0	1	3.72
7	1	0	-1	3.25
8	1	1	0	3.24
9	0	0	0	3.95
10	0	0	0	3.9
11	0	-1	-1	2.16
12	0	1	-1	2.58
13	0	0	0	3.68
14	-1	0	-1	2.31
15	0	1	1	3.12
16	-1	0	1	3.43
17	0	-1	1	3.95

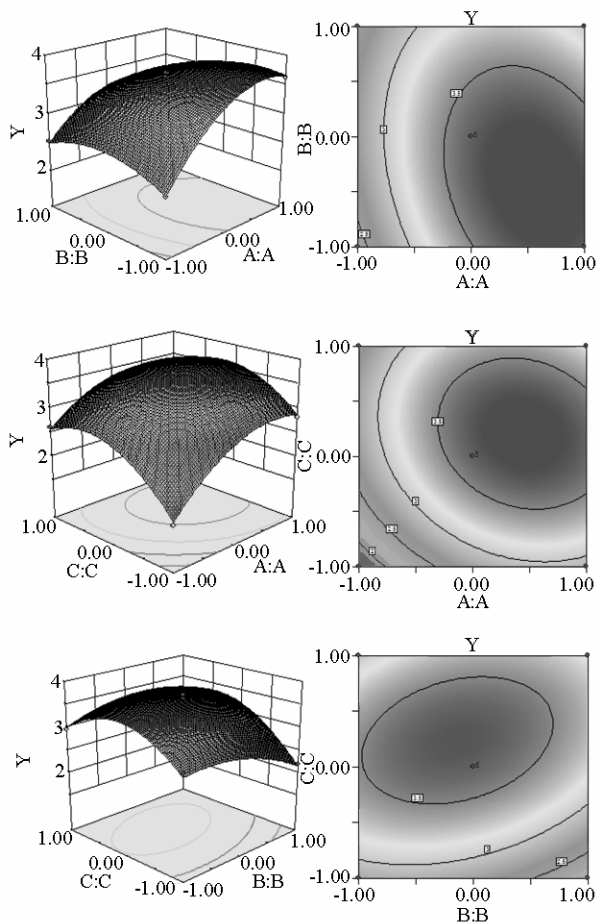


图 1 乙醇浸提响应面 3D 图形和等高线

Figure 1 Response contour of 3D surface and contour line using ethonal digestion

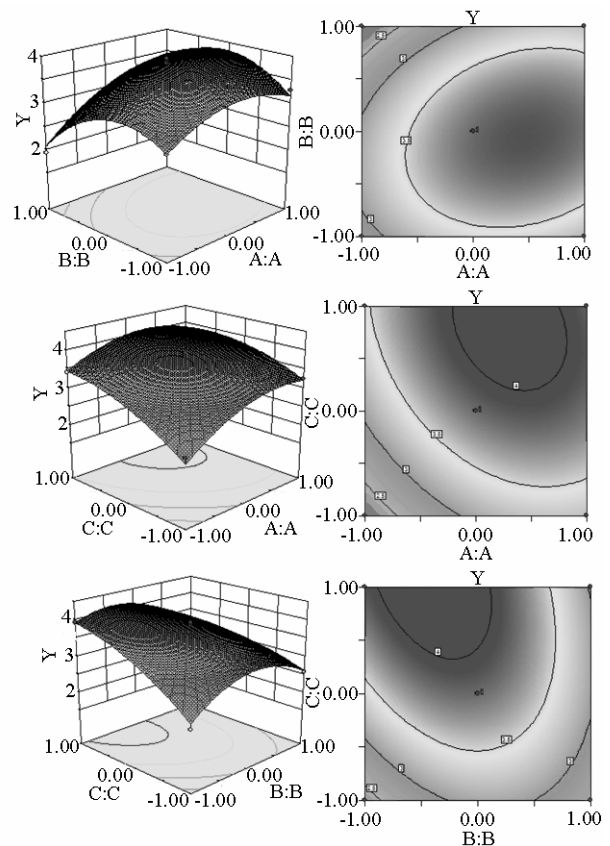


图 2 超声辅助提取法响应面 3D 图形和等高线

Figure 2 Response contour of 3D surface and contour line using ultrasonic-assisted extraction method

由图 1 可知, 响应值在本试验设定范围内存在最大值, 即三维曲线的最高点, 等高线的中心点。通过响应面和等高线图, 可以直观观测出各因素对响应值的影响。响应面越陡峭, 等高线越密集, 则说明该因素对响应值影响越大。通过软件分析得到 Y 取最大值时 $A=0.54$, $B=-0.36$, $C=0.13$, 此时乙醇浓度为 82.7%, 提取温度 48.2°C, 料液比 1:12.26, Y 预测值为 3.80。考虑到可行性, 将其修正为乙醇浓度 83%, 提取温度 48°C, 料液比 1:12, 此时 Y 预测值为 3.79, 考虑到实际测量的精确性, 视为等同于最大值, 可以确认此条件为最佳方案。

2.2 超声辅助提取法响应面优化

超声辅助提取法响应面实验结果见表 5。

为直观考察各因素对响应值的影响, 将一个因素设为中心值, 描绘对应两因素的三维响应面图和等高线图, 结果如图 2 所示。

表 6 微波辅助提取法响应面设计和结果

Table 6 Design and results of RSM using microwave-assisted extraction method

组号 No.	因素 Factor			得率/% Yield
	A	B	C	
1	-1	-1	0	2.48
2	0	0	0	4.75
3	-1	1	0	2.22
4	1	-1	0	3.08
5	0	0	0	4.78
6	1	0	1	3.82
7	1	0	-1	4.01
8	1	1	0	3.25
9	0	0	0	4.81
10	0	0	0	4.69
11	0	-1	-1	3.01
12	0	1	-1	3.39
13	0	0	0	4.83
14	-1	0	-1	3.16
15	0	1	1	3.12
16	-1	0	1	3.28
17	0	-1	1	3.15

由图 2 可知, 响应值在本试验设定范围内存在最大值, 即三维曲线的最高点, 等高线的中心点。通过响应面和等高线图, 可以直观观测出各因素对响应值的影响。响应面越陡峭, 等高线越密集, 则说明该因素对响应值影响越大。通过软件分析得到 Y 取最大值时 $A=0.18$, $B=-0.36$, $C=1.00$, 此时乙醇浓度为 80.9%, 提取功率 132.8, 料液比 1:18, Y

预测值为 4.17。考虑到可行性, 将其修正为乙醇浓度 81%, 提取功率 133, 料液比 1:18, 此时 Y 预测值依然约为 4.17, 可以确认此条件为最佳方案。

2.3 微波辅助提取法响应面优化

微波辅助提取法响应面优化实验安排和结果见表 6。

为直观考察各因素对响应值的影响, 将一个因素设为中心值, 描绘对应两因素的三维响应面图和等高线图, 结果如图 3 所示。

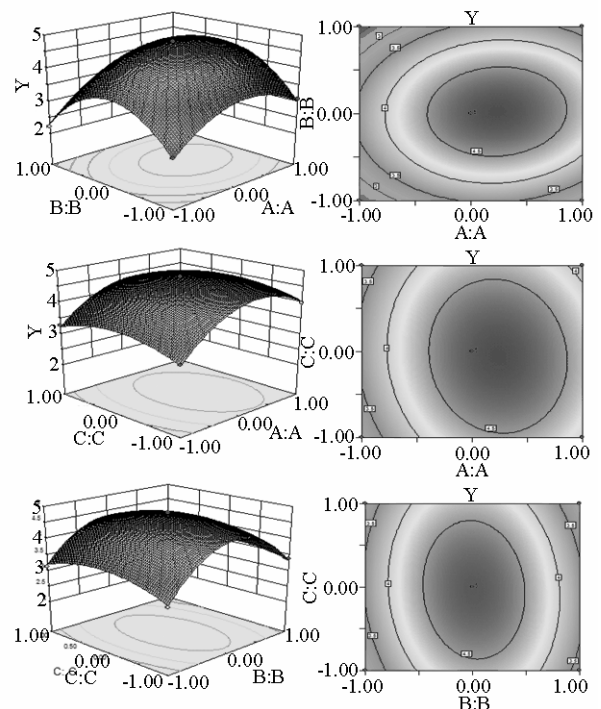


图 3 微波辅助提取法响应面 3D 图形和等高线

Figure 3 Response contour of 3D surface and contour line using microwave-assisted extraction method

由图 3 可知, 响应值在本试验设定范围内存在最大值, 即三维曲线的最高点, 等高线的中心点。通过响应面和等高线图, 可以直观观测出各因素对响应值的影响。响应面越陡峭, 等高线越密集, 则说明该因素对响应值影响越大。通过软件分析得到 Y 取最大值时 $A=0.24$, $B=0.03$, $C=-0.06$, 此时乙醇浓度为 71.2%, 提取功率 103, 料液比 1:15.88, Y 预测值为 4.82。考虑到可行性, 将其修正为乙醇浓度 71%, 提取功率 103, 料液比 1:16, 此时 Y 预测值依然约为 4.82, 可以确认此条件为最佳方案。

2.4 苯乙醇苷抗氧化性的研究

苯乙醇苷抗氧化性结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 肉苁蓉苯乙醇苷具有较强的清除 DPPH 的

能力,其清除效率与浓度具明显的依赖关系。随着苯乙醇苷浓度的增加, DPPH 的清除率也随之不断增强。当苯乙醇苷浓度增至 $60\sim 80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其清除率基本不再增加。此时, DPPH 的清除率为 71.8%。

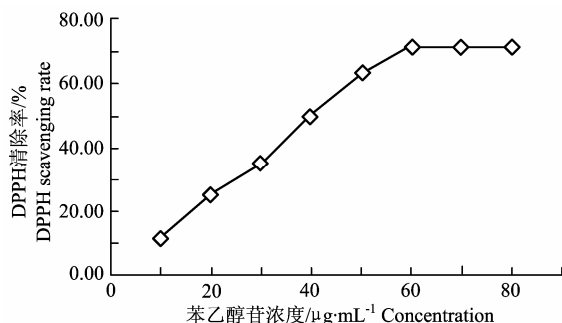


图 4 苯乙醇苷清除 DPPH 自由基能力

Figure 4 DPPH free-radical scavenging ability of phenylethyl alcohol glycosides from *Cistanche tubulosa*

3 小结与讨论

目前已有部分对管花肉苁蓉苯乙醇苷及其活性的报道,但是对其提取方法优化的报道较少。生物活性成分有效的提取方法是对其进一步开发利用、纯化、结构鉴定和药理作用研究的基础,目前对苯乙醇苷提取的研究主要使用传统单因素试验和正交设计,响应面分析方法优化管花肉苁蓉苯乙醇苷提取工艺未见报道。传统的正交设计方法是一种用线性数学模型进行设计的设计方法,可以找出多个因素水平的最佳组合,但是正交设计只能分析离散型数据,具有精度不高,预测性不佳的缺点,响应面法采用非线性模型,能求得高精度的回归方程,进行合理预测来找出最优工艺条件,是一种目前广泛被采用的的分析预测方法。

本试验通过响应面分析法确定了 3 种方法的最佳提取条件,并进行了比较。乙醇浸提法、微波辅助提取法和超声波辅助提取法对肉苁蓉苯乙醇苷的

提取工艺各不相同,由响应面分析结果显示微波辅助提取法在最短时间内具有最高的苯乙醇苷得率,超声波辅助提取法次之,而乙醇浸提法时间最长,得率最低。从节能环保、提高生产效率等方面综合考虑,应采用微波辅助提取法进行肉苁蓉苯乙醇苷的提取。

管花肉苁蓉苯乙醇苷具有较强的清除 DPPH 自由基的能力。当肉苁蓉苯乙醇苷浓度为 $60\sim 80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其清除率达到最高为 71.8%。实验证明管花肉苁蓉苯乙醇苷具有良好的抗氧化能力。因此,管花肉苁蓉苯乙醇苷作为一种有效的抗氧化剂具有广阔的开发前景。

参考文献:

- [1] 任璐. 栽培管花肉苁蓉中苯乙醇苷的提取与纯化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典(上)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997: 895-897.
- [3] Han J, Zhong J J. Effects of oxygen partial pressure on cell growth and ginsenoside and polysaccharide production in high density cell cultures of *Panax notoginseng*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(3/4): 498-503.
- [4] 吴海虹, 玄国东, 刘春泉. 肉苁蓉苯乙醇苷乙醇回流提取影响因素研究[J]. *江苏农业科学*, 2009(1): 250-251.
- [5] 王丽楠, 陈君, 杨美华, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷的含量测定[J]. *西北药学杂志*, 2008, 23(2): 67-70.
- [6] 王晓雯, 蒋晓燕, 邬利娅, 等. 肉苁蓉总苷体外清除自由基及对 OH 引发的 DNA 损伤的保护作用[J]. *中国药理学杂志*, 2001, 36(1): 29-31.
- [7] Huang D J, Ou B X, Prior R L. The chemistry behind antioxidant capacity assays[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 1841-1856.
- [8] Yen G C, Duh P D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 629-632.
- [9] 李春阳, 许时婴, 王璋. DPPH 法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(2): 102-106.