



张金华,周丹,张滢,等. Box-Behnken 设计-响应面法优化菜头肾酚类成分的提取工艺[J]. 黑龙江农业科学, 2022(5):80-84,85.

Box-Behnken 设计-响应面法优化菜头肾酚类成分的提取工艺

张金华^{1,2}, 周丹², 张滢^{2,3}, 赵祺², 姜程曦²

(1. 大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000; 2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035; 3. 池州市九华山黄精研究所, 安徽 池州 247100)

摘要:为促进菜头肾中酚类成分的开发利用,本研究对乙醇浓度、料液比和温度进行单因素研究,应用 Box-Behnken 响应面分析法建立模型,以多酚提取量作为响应值,确定菜头肾中多酚提取的最佳条件。结果表明:通过响应面法预测的回归模型分析,确定了菜头肾多酚的最佳工艺条件为提取温度 50 ℃,料液比 1:22,乙醇浓度 75%,此工艺条件下多酚得率为 5.896 mg·g⁻¹,预测值与实际值一致,表明该工艺条件可提高菜头肾多酚的得率。

关键词:菜头肾;多酚;提取;优化

菜头肾是一种中药材,来源于爵床科黄猄草属菜头肾(*Championella sarcorrhiza* C. Ling)干燥根茎,别名肉根马蓝^[1],具有养阴益肾,清热解毒的功效。临床上用于治疗肾虚、传染性肝炎、肾炎或肾盂肾炎、高血压初期胆固醇偏高,外用治疗疮疖肿、肌腱扭伤。其茎、叶能抑制金黄色葡萄球菌。菜头肾分布于我国西南、浙江、广西及湖北等地,是浙江温州地区广为流传的七肾汤的一味主药,具补肾、增强生殖能力的作用,用于肾虚所致的腰酸背痛、慢性腹泻、遗精盗汗以及冲任不固等^[2-3]。

多酚类是植物中一组化学物质的统称,因有多个酚基团得名,又称黄酮类^[4],目前在自然界中已经发现 4 000 多种多酚类化合物,其结构都十分复杂,大多是和糖结合形成糖苷,或者以衍生物形式存在^[5]。多酚具有抗氧化和去除过氧化物的功能,能够预防癌症及老化;多酚能够防止坏胆固醇的氧化,减少血小板凝集,起到保护血管,预防高胆固醇及心脏病复发的作用,对静脉曲张也有一定治疗功效;多酚抑菌具有极好的选择性,可抑制有害菌落,促进有益菌落^[6-8]。目前,关于菜头肾的研究主要集中于化学成分鉴定、基因组序列分析等方面^[9-12],对于其多酚类提取工艺优化鲜

见报道。本研究通过单因素试验,用响应面法建立模型,确定多酚的最佳提取条件,为进一步开发菜头肾的药用价值提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菜头肾(产地为温州永嘉);无水乙醇(生产批号为 2012073607,西陇科学股份有限公司);没食子酸标准品(生产批号为 C11062419,上海麦克林生化科技有限公司);福林酚试剂 1 mol·L⁻¹(生产批号为 C11335395,上海麦克林生化科技有限公司);无水碳酸钠(生产批号为 20200421,国药集团化学试剂有限公司)。

SP-754P 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);TGL-16gR 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);HL-500 型高速多功能粉碎机(上海塞耐机械有限公司);BSA224S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线绘制 配制 0.1 mg·mL⁻¹没食子酸标准品溶液:精确称定 25 mg 没食子酸标准品粉末,加蒸馏水在棕色容量瓶中定容至 250 mL。用移液枪分别移取 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 和 1.50 mL 于 10 mL 具塞试管中,再分别加入 1 mL (1 mol·L⁻¹) 福林酚试剂,反应 5 min 后分别加入 2 mL 12% 的 Na₂CO₃ 溶液,摇匀后用蒸馏水定容至 10 mL,室温避光条件下反

收稿日期:2022-01-08

基金项目:大理药业股份有限公司横向课题(KJHX1603)。

第一作者:张金华(1984—),男,学士,工程师,从事药物开发及中药生物工程研究。E-mail:276657178@qq.com。

通信作者:姜程曦(1971—),男,博士,研究员,硕导,从事中药学研究。E-mail:jiangchengxi@126.com。

应 1 h,于 625 nm 处测定样品吸光度,进行回归分析。

1.2.2 多酚提取量测定 将菜头肾样品烘干,粉碎后过 50 目筛,备用。精确称取 1 g 菜头肾粉末,按料液比 1:20 加入 20 mL 浓度为 60% 的乙醇于锥形瓶中,摇匀,置于 50 ℃ 水浴锅中,反应 2 h 后 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清液 1 mL,稀释 5 倍,再移取 1 mL 置于 10 mL 具塞试管中,加入 1 mL 福林酚试剂,反应 5 min 后加入 12% Na₂CO₃ 溶液,摇匀,用蒸馏水定容至 10 mL,置于黑暗中反应 1 h,在 625 nm 处测定吸光度,根据标准曲线测得菜头肾多酚的提取量。

1.2.3 单因素试验 设计单因素试验,分别考察 4 个因素对菜头肾多酚提取量的影响,即提取温度(40, 50, 60, 70 和 80 ℃)、料液比(g:mL)(1:15, 1:20, 1:25, 1:30 和 1:35)、乙醇浓度(40%、50%、60%、70% 和 80%)和提取时间(1, 2, 3, 4 和 5 h)。研究单因素时,控制其他变量,固定提取温度 50 ℃,料液比 1:20,乙醇浓度 60%,提取时间 2 h。3 次平行试验,根据标准曲线测得菜头肾多酚的提取量。

1.2.4 响应面因素水平设计 结合单因素试验结果,根据 Box-Behnken 中心组合试验的设计原理,选择提取温度 A、料液比 B、乙醇浓度 C 这 3 个因素为自变量进行优化,以菜头肾多酚提取量为响应对象,用 Design-Eepert 11.2.0 软件,设计三因素三水平响应面试验(表 1)。通过回归分析确定菜头肾多酚的最佳提取条件。

表 1 响应面分析的因素水平

因素水平	A 提取温度/℃	B 料液比/(g:mL)	C 乙醇浓度/%
-1	50	1:15	60
0	60	1:20	70
1	70	1:25	80

1.2.5 数据分析 设置三因素三水平的二次回归方程,拟合自变量与响应值的函数关系,建立以多酚含量为响应值的评价体系。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析,采用 Design-Expert 11.2.0 软件设计响应面试验并进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 线性关系的考察

对没食子酸浓度与吸光度进行线性回归(图 1),得到回归方程为 $y=0.1167x-0.0122$, $R^2=0.9997$,可知含量和吸光度相关性显著。

2.2 单因素试验

2.2.1 提取温度 由图 2 可知,在 40~50 ℃ 时,菜头肾多酚提取量随温度升高而增加,当温度达到 50 ℃ 时菜头肾多酚提取量达到最大值。这是由于温度升高导致了分子运动加快,使分子的碰撞几率增加,使溶质挥发性及溶剂扩散系数增加,提高了菜头肾中多酚的溶出速度。当温度大于 50 ℃ 时,菜头肾多酚提取量呈现逐步下降的趋势,这可能是由于高温破坏了多酚的结构^[13]。故选择 50 ℃ 为最适提取温度。

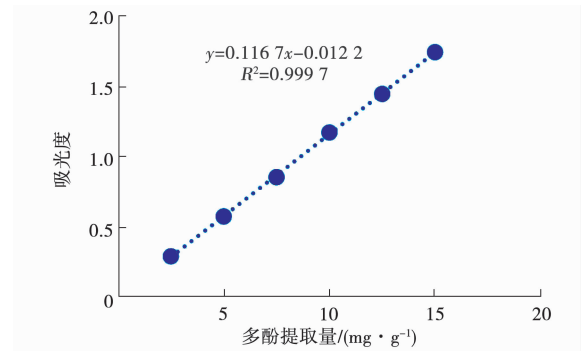


图 1 没食子酸标准曲线

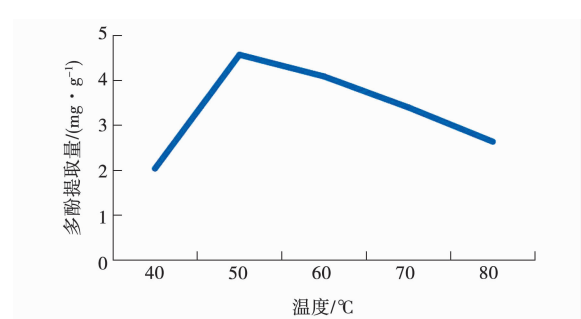


图 2 提取温度对菜头肾多酚提取量的影响

2.2.2 料液比 由图 3 可知,菜头肾多酚的提取量随萃取溶剂体积的增加呈先上升后略有下降的趋势,当料液比为 1:20(g:mL)时多酚提取量达到最大值,这可能是由于料液比为 1:20(g:mL)时多酚已经溶解至饱和,溶剂的量再增加已不能提高多酚的提取量^[14]。故选择 1:20(g:mL)料液比为最佳提取条件。

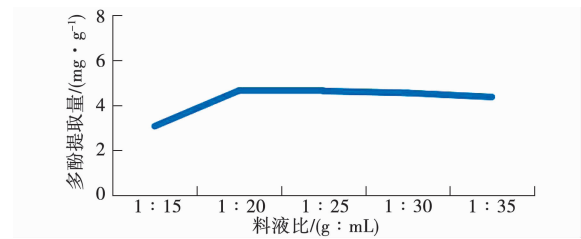


图 3 料液比对菜头肾多酚提取量的影响

2.2.3 乙醇浓度 由图 4 可知,菜头肾多酚提取量先随乙醇浓度提高而缓慢增加,后略下降,当乙醇浓度为 70%时,菜头肾多酚提取量最高。这可能是由于过高的乙醇浓度使乙醇与多酚的极性相似程度降低^[15],而脂溶性和醇溶性杂质溶出所致。故选择 70%乙醇浓度为最佳提取条件。

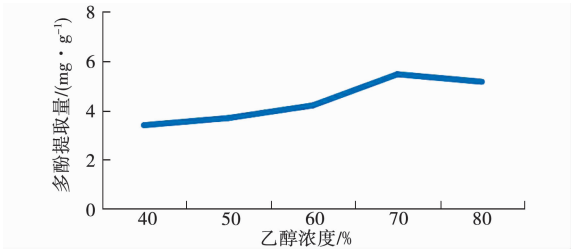


图 4 乙醇浓度对菜头肾多酚提取量的影响

2.2.4 提取时间 由图 5 可知,随着提取时间的增加,菜头肾多酚提取量呈先上升后快速下降趋势,并在提取时间为 3 h 达到最高。时间延长后,可能是由于溶出的多酚被氧气氧化,或者发生类降解反应而使提取量下降。故选择 3 h 为最佳提取时间。

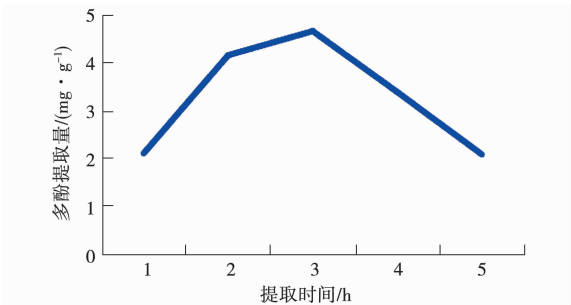


图 5 提取时间对菜头肾多酚提取量的影响

2.3 响应面法试验

响应面法优化溶剂萃取菜头肾多酚的试验结果见表 2。利用 Design-Expert 11.2.0 对各因素试验结果进行二次项式回归拟合,得到菜头肾多酚的回归模型方程: $Y = 4.94 - 0.342\ 4A + 0.562\ 4B + 0.434\ 5C - 0.004\ 3AB - 0.407\ 0AC - 0.280\ 5BC + 0.374\ 4A^2 - 0.526\ 6B^2 - 0.724\ 9C^2$ 。上述回归方程中,因变量与自变量之间的线性相关系数 $R^2 = 0.957\ 3$,说明菜头肾多酚实际提取量与预测值的相关性好,模型决定系数 $R^2_{Adj} = 0.902\ 3$,说明该模型拟合程度较好。响应面试验结果方差分析见表 3。该模型通过显著性 ($P < 0.05$) 检验,失拟项不显著 ($P = 0.400\ 3$),说明该模型能较好地预测菜头肾多酚的提取量。根

据表 3 中 F 值可知,各因素对菜头肾多酚提取量影响贡献率为料液比最高,乙醇浓度次之,最后为提取温度。

表 2 响应面试验结果 (n=3)

序号	A 提取温度	B 料液比	C 乙醇浓度	多酚提取量/ (mg·g ⁻¹)
1	1	0	-1	4.109
2	1	1	0	5.008
3	-1	0	-1	4.212
4	-1	0	1	5.892
5	0	1	-1	4.215
6	1	0	1	4.161
7	0	0	0	4.983
8	0	-1	-1	2.298
9	0	0	0	4.581
10	0	0	0	5.129
11	0	-1	1	3.731
12	0	1	1	4.526
13	0	0	0	4.855
14	-1	1	0	5.469
15	1	-1	0	4.123
16	-1	-1	0	4.567
17	0	0	0	5.172

表 3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.0928	9	0.0110	17.4000	0.0005
A	0.0094	1	0.0094	14.8600	0.0063
B	0.0254	1	0.0254	40.2500	0.0004
C	0.0151	1	0.0151	23.8300	0.0018
AB	0.0001	1	0.0001	0.0011	0.9740
AC	0.0066	1	0.0066	10.5100	0.0143
BC	0.0031	1	0.0031	4.9600	0.0608
A ²	0.0059	1	0.0059	9.3200	0.0184
B ²	0.0115	1	0.0115	18.2700	0.0036
C ²	0.0220	1	0.0220	34.8900	0.0006
残差	0.0044	7	0.0006		
失拟误差	0.0021	3	0.0007	1.2600	0.4003
纯误差	0.0023	4	0.0006		
总和	0.1033	16			

基于上述回归方程,利用 Design-Expert 11.2.0 软件绘制响应曲面及等高线图,直观地反映了提取温度、乙醇浓度与料液比之间的交互作

用对菜头肾多酚提取量的影响。在响应曲面图的分析中,若曲线走势越陡,说明多酚提取量受到的影响越大,交互作用明显;反之曲线走势越平滑,交互作用越不明显^[16],图 6a、b 曲面陡峭,说明提

取温度和乙醇浓度的交互作用明显,图 6c、d 曲面坡度平缓,说明提取温度与料液比交互作用较不明显,图 6e、f 等高线趋向椭圆,说明料液比与乙醇浓度交互作用明显。

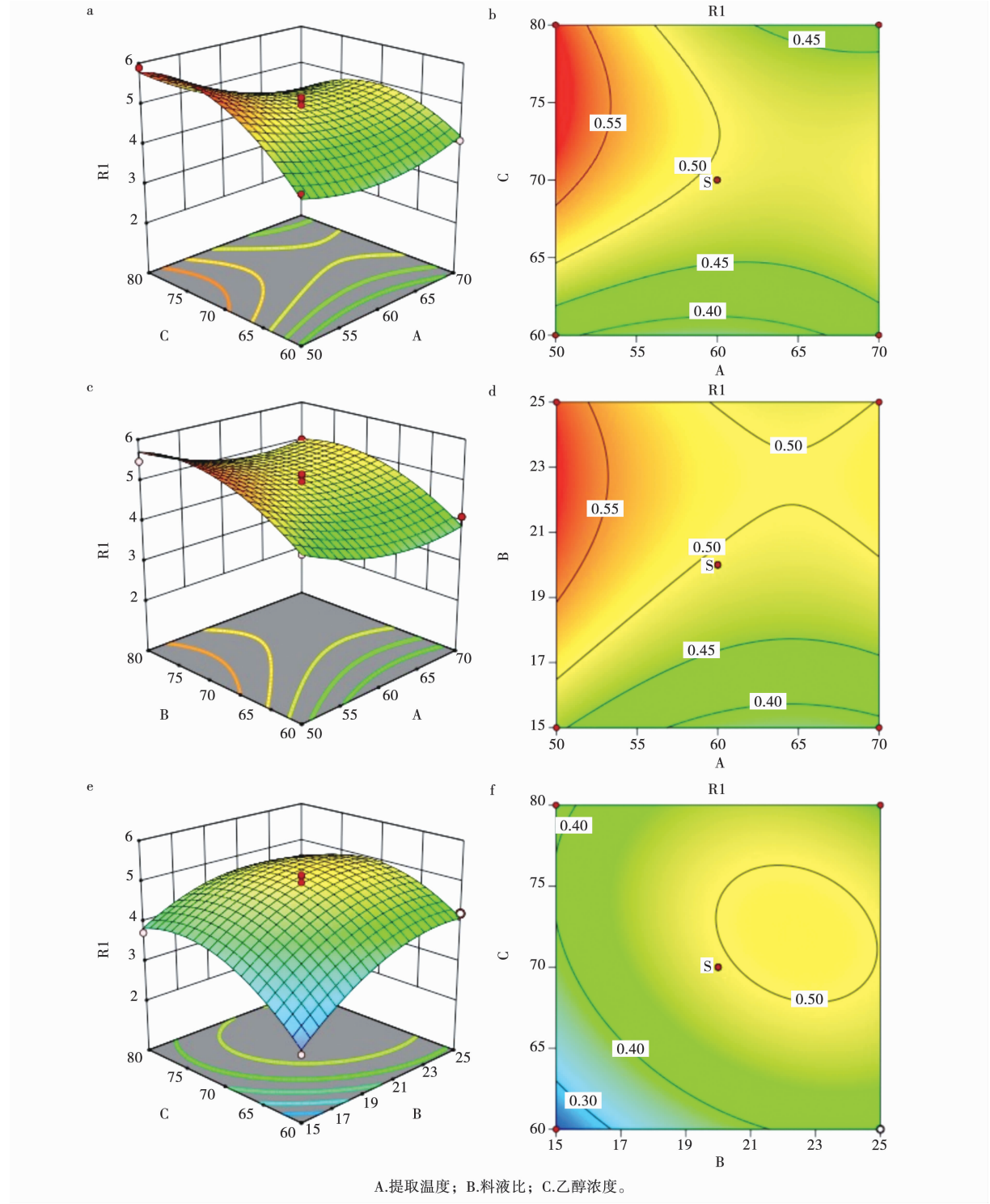


图 6 响应曲面的交互作用及等高线图

2.4 理论最优条件及验证性试验

结合回归方程和响应面分析结果,溶剂萃取法提取菜头肾多酚的最佳工艺条件为提取温度 50℃、料液比 1:22.020 7(g:mL)、乙醇浓度 75.015 3%,此工艺条件下多酚提取量预测值为 5.987 mg·g⁻¹,考虑到实际可操作性,将验证试验的提取条件调整为提取温度 50℃、料液比 1:22(g:mL)、乙醇浓度 75%,重复 3 次试验,得到菜头肾多酚提取量平均值为 5.896 mg·g⁻¹,实际结果与模型的预测值相近,说明该模型能较好地预测菜头肾多酚的提取量。

3 讨论

料液比是直接影响物质与溶剂间扩散效率的重要因素之一,在料液比较小或处于某一范围内时,提取率随料液比的增大而增大,溶剂析出效应占主,但当物质与溶剂间的扩散达到了平衡状态时,料液比增大时将会呈现提取率下降趋势^[17-18]。溶剂极性对有效物质成分的扩散也至关重要,不同浓度乙醇溶液的极性不同,多酚溶解度也不同。在一定浓度范围内,乙醇溶液能有效进入细胞,使多酚扩散到提取液中,但乙醇溶剂浓度过大时,色素、弱极性成分等溶出,抑制了某些多酚类物质的充分溶解^[19]。此外,温度升高能够加快分子运动速度和分子渗透扩散能力,加快物质溶出速率,提高提取率^[20]。在本试验中,菜头肾多酚含量随提取温度的升高而呈现出先上升后下降的趋势,提取温度升高,菜头肾内部的分子热运动加剧,更有利于多酚的析出,提取液中多酚含量升高,提取率增加。但是提取温度继续升高,超过 50℃后会对菜头肾内部分子造成一定程度的破坏,从而导致提取率降低。改变料液比和乙醇浓度,多酚含量随之先上升,达到最高值后趋于平缓下降的趋势。由此得出溶剂萃取法最佳工艺条件为提取温度 50℃、料液比 1:22(g:mL)、乙醇浓度 75%,此条件下测得菜头肾多酚提取量为 5.896 mg·g⁻¹。相比于其他中药而言,香菇多酚得率 10.91 mg·mL⁻¹^[21]、杂交构树叶多酚得率 13.62 mg·g⁻¹^[22]等,本品提取量偏低,可以进一步通过超声波提取、超临界提取等其他提取方式研究菜头肾多酚的提取工艺,为开发菜头肾提供理论基础。

4 结论

本研究利用 Box-Behnken 响应面分析法建立模型,通过对温度、料液比、乙醇浓度进行三因素三水平试验,得出溶剂萃取法提取菜头肾多酚的最佳工艺条件为提取温度 50℃、料液比 1:22(g:mL)、乙醇浓度 75%,此条件下测得菜头肾多酚提取量为 5.896 mg·g⁻¹。各因素对菜头肾多酚

提取量影响的贡献率为料液比>乙醇浓度>提取温度。并通过 Design-Expert 11.2.0 软件分析验证,优化后的纯化方法能够保证菜头肾酚类提取物精制工艺稳定性,有助于提高批次间质量均一性,可为菜头肾提取应用提供理论支撑。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 93.
- [2] 甘慈尧. 浙南本草新编[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 319-320.
- [3] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 546-547.
- [4] 李余海忠, 黄升谋. 食品营养学概论[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2018: 86.
- [5] 王振宇, 赵海田. 生物活性成分分离技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2015: 19-22.
- [6] 李云捷, 黄升谋. 食品营养学[M]. 成都: 西南交通大学出版社, 2018: 68-69.
- [7] POLONI D M, DANGLES O, VINSON J. Binding of plant polyphenols to serum albumin and LDL: Healthy implications for heart disease[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(33): 9139-9147.
- [8] MA Y B, ZHANG J X, ZHOU X Q, et al. Effect of tea polyphenols on flavour, healthcare components, physicochemical properties, and mechanisms of collagen synthesis in growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) muscle[J]. Aquaculture, 2021, 534: 736237.
- [9] 屈玲霞, 王扬, 刘永巧, 等. 菜头肾化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2019, 21(4): 438-440.
- [10] 张森尧, 潘亚琴, 徐攀, 等. 中药菜头肾中化学成分的初步分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(4): 204-205.
- [11] 赵祺, 余佳兴, 秦宇雯, 等. 基于高通量测序的菜头肾叶绿体基因组的组装及序列分析[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1744-1750.
- [12] DENG Y F, XIA N H. Validation of the name *Strobilanthes sarcorrhiza* (Acanthaceae) [J]. Novon: A Journal for Botanical Nomenclature, 2007, 17(2): 154-155.
- [13] 贾金溢, 马超, 张明, 等. 仙人掌果多酚的提取及抗氧化活性研究[J]. 中国果菜, 2020, 40(3): 65-70.
- [14] 谢佳函, 刘回民, 刘美宏, 等. 红豆皮多酚提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1): 147-157.
- [15] 付婧, 岳田利, 袁亚宏, 等. 真空耦合超声提取茶多酚的工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2013(3): 172-178.
- [16] 王俊青, 汪全, 焦阳阳, 等. 响应面法优化南方红豆杉叶总黄酮提取工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2): 86-90.
- [17] 刘艳红, 许海燕, 彭修娟, 等. 响应面分析法优化秦皮多酚超声提取工艺及体外抗氧化活性研究[J]. 西北药学杂志, 2019, 34(5): 574-579.
- [18] 常娅妮, 王亚岚, 李玲. 酸木瓜总黄酮提取工艺的优化[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(17): 52-57.
- [19] 吴双双, 王娇, 张大强. 紫薯多糖超声提取工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 农产品加工, 2019(11): 40-41, 45.
- [20] 任丹丹, 陈谷. 响应面法优化黄秋葵多糖超声提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(8): 143-146.
- [21] 刘馥源, 黄占旺, 沈勇根, 等. 香菇多酚超声波提取工艺及抗氧化性分析[J]. 中国调味品, 2022, 47(3): 14-20.
- [22] 徐百昌, 方紫依, 蒙锦燕, 等. 杂交构树叶多酚提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(3): 1046-1053.



王海洋,龙飞,沈伟祥,等.滇黄精离体快繁体系建立及优化[J].黑龙江农业科学,2022(5):85-90.

滇黄精离体快繁体系建立及优化

王海洋^{1,2},龙飞²,沈伟祥^{1,2},董章宏^{1,2},王正德^{1,2},夏茂甜^{1,2},赵文植^{1,2},辛培尧^{1,2}

(1.西南林业大学 园林园艺学院/国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心,云南昆明 650224;2.西南林业大学 林学院/西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室,云南昆明 650224)

摘要:为促进滇黄精的工厂化生产,选取滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coil. et Hemsl)当年生幼嫩根状茎作为外植体,研究适合滇黄精腋芽诱导、增殖、生根培养的外源生长调节剂的种类、浓度配比、培养基类型,并进行移栽试验。结果表明:滇黄精根状茎诱导分化的最适培养基配方为 $1/2MS+6-BA\ 2.0\ mg\cdot L^{-1}+2,4-D\ 0.2\ mg\cdot L^{-1}+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}+琼脂\ 5.5\ g\cdot L^{-1}$;滇黄精带芽茎段增殖最适培养基配方为 $MS+6-BA\ 2.0\ mg\cdot L^{-1}+NAA\ 0.3\ mg\cdot L^{-1}+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}+琼脂\ 5.5\ g\cdot L^{-1}$;滇黄精带芽茎段生根最适培养基配方为 $1/2MS+NAA\ 0.2\ mg\cdot L^{-1}+蔗糖\ 30\ g\cdot L^{-1}+琼脂\ 5.5\ g\cdot L^{-1}$;滇黄精组培苗生长最适基质配比是腐殖质土:红泥土:珍珠岩为 $1:1:1$,其成活率可达100%。

关键词:滇黄精;离体快繁;基质筛选

滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coil. et Hemsl)是百合科(Liliaceae)黄精属(*Polygonatum*)的多年生草本植物,俗名节节高,根状茎近圆柱形或连珠状,结节为不规则菱状,直径约1~3 cm,茎高约1~3 m,茎顶端作攀援状。滇黄精

生命周期较长,一般在8~30 a^[1],主产于我国云南、贵州、四川等地,在越南、缅甸也有分布,主要分布范围集中于海拔1 200~2 200 m,年均降水量为800~1 800 mm的亚热带季风气候地区,如云南的普洱、文山以及怒江州等地区^[2]。

滇黄精作为传统的中药材广泛应用于临床医疗中,因其含有丰富的多聚糖^[3-4]、甾体皂苷^[3,5]、黄酮^[6-8]等活性物质和其他氨基酸、木质素、含氮化合物、强心苷以及人体所需的多种微量元素^[6],在功能食品、保健化妆品的开发和观赏方面也有应用。华岩等^[9]研究表明,黄精中含有的多糖

收稿日期:2022-01-15

基金项目:云南省科技人才与平台计划项目(202205AF150022);云南省科技厅科技计划重点研发项目(2018BB005)。

第一作者:王海洋(1995—),男,硕士研究生,从事林木遗传育种学习与工作。E-mail:458083617@qq.com。

通信作者:辛培尧(1975—),男,博士,教授,从事植物遗传育种与快繁研究。E-mail:xpytgyx@163.com。

Optimization of Extraction Process for Polyphenols of *Strobilanthes sarcorrhizus* C. Ling by Box-Behnken and Response Surface Methodology

ZHANG Jin-hua^{1,2}, ZHOU Dan², ZHANG Ying^{2,3}, ZHAO Qi², JIANG Cheng-xi²

(1. Dali Pharmaceutical Limited Company, Dali 671000, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 3. Jiuhua Mountain Polygonatum Institute, Chizhou 247100, China)

Abstract: In order to promote the development and utilization of *Strobilanthes sarcorrhizus* C. Ling, this study conducted a single factor study on ethanol concentration, solid-liquid ratio and temperature. Box-behnken response surface analysis was used to establish a model, and the extraction amount of polyphenols was used as the response value to determine the optimal conditions for the extraction of polyphenols from *Strobilanthes sarcorrhizus* C. Ling. The results showed that the optimal extraction conditions were determined as extraction temperature of 50 °C, solid-liquid ratio of 1:22 and ethanol concentration of 75%. The yield of polyphenols was 5.896 mg·g⁻¹ under these conditions. The predicted value was consistent with the actual value, which indicated that the process could improve the yield of polyphenols.

Keywords: *Strobilanthes sarcorrhizus* C. Ling; polyphenols; extraction; optimization