

泽泻总三萜超声辅助提取工艺优化

Optimization of extraction process for total triterpenoids in *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. by response surface methodology

石峰^{1,2} 陈雨^{1,2} 张亚琴^{1,2} 马留辉^{1,2}

SHI Feng^{1,2} CHEN Yu^{1,2} ZHANG Ya-qin^{1,2} MA Liu-hui^{1,2}

窦明明^{1,2} 杨正明^{1,2} 陈兴福^{1,2}

DOU Ming-ming^{1,2} YANG Zheng-ming^{1,2} CHEN Xing-fu^{1,2}

(1. 四川农业大学农学院, 四川 成都 611130; 2. 农业部西南作物生理生态与耕作重点实验室, 四川 成都 611130)

(1. Agronomy College of Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 2. Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Cultivation in Southwest, Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 611130, China)

摘要:以提高泽泻总三萜的提取率为目的,在浸提温度、浸提时间、乙醇体积分数、料液比及超声时间的单因素基础上,采用四因素三水平 Box-Behnken 响应面试验设计,优选总三萜提取工艺。结果表明:最佳提取条件为乙醇体积分数 70%、浸提时间 46.00 min,浸提温度 57.00 °C,料液比 1:14 (g/mL),超声时间 30 min,该条件下总三萜提取得率为 2.98%。

关键词:泽泻;总三萜;超声提取

Abstract: The optimum conditions of ultrasonic extraction of total triterpenoid from leaves of *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. were investigated in this study. On the basis of single factor experiments, with yields of total triterpenoid as indexes, the three levels of four factors of Box-Behnken experimental design and response surface methodology was adopted to optimize extraction conditions by taking extraction temperature, ethanol concentration, extraction time and the ratio of material to solvent as factors. Results: Optimal extraction technology was as following, i.e. the ethanol concentration of 70%, the extracting for 46.00 min at 57.00 °C, and the ratio of material to solvent was 1:14 (g/mL), ultrasonic time for 30 min. Then the total triterpenes extraction rate reached 2.98% in this condition.

Keywords: *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; total triterpenoid; ultrasonic extraction

药材泽泻为泽泻科植物泽泻 [*Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.] 的块茎^[1],又名水泻、芒芋、泽芝、及泻、如意菜等^[2],在中国福建、四川等地大规模种植,素有“建泽泻”“川泽泻”之称,具有较高的营养价值和药用价值。2002 年 3 月中国卫生部明确,泽泻可用作保健食品原料。现代研究^[3]表明,泽泻化学成分主要以萜类为主,含有三萜、二萜、倍半萜、多糖等成分,其中三萜类化合物具有抗血栓、降血脂、降血糖、降低血黏度、抗动脉粥样硬化、延缓衰老、利尿、解痉、保肝、抗炎、免疫调节等功效。

目前关于植物总三萜的研究较多,主要有热回流法、超声辅助提取和超临界二氧化碳萃取^[4-6]等。其中热回流提取虽然提取率较高,但时间长、能耗高;超临界二氧化碳萃取操作复杂,且安全性低;而超声提取既节能效率又高,是很多活性物质提取的新技术^[7]。邓迎娜等^[8]采用超声提取泽泻总三萜,且优于传统乙醇回流提取,最大提取率不足 2%。本研究在此基础上增加温浸辅助提取,采用超声、温浸辅助提取泽泻中总三萜,在单因素试验基础上,以泽泻总三萜提取率为评价指标,利用响应面法进行优化,为深入开发和有效利用泽泻中总三萜类活性成分提供相应的科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

超声波清洗仪:SB 25-12 DTDN 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

电热鼓风干燥箱:101-3 AB 型,天津市泰斯特仪器有限公司;

电子恒温水浴锅:DZKW-4 型,北京中兴伟业仪器有限公司;

基金项目:四川省“十二五育种攻关”项目(编号:2011NZ0098-12-01)

作者简介:石峰,男,四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:陈兴福(1964—),男,四川农业大学教授,博士。

E-mail:562159905@qq.com

收稿日期:2017-09-10

酶标仪:Multiskan FC型,上海辅泽商贸有限公司;

精密电子天平:JD 300-3千分之一型,沈阳龙腾电子有限公司;

高速万能粉碎机:QE-100克型,浙江屹立工贸有限公司。

1.2 材料与试剂

泽泻:采自四川省眉山市彭山区谢家镇红石村,经四川农业大学陈兴福教授鉴定为泽泻科植物泽泻[*Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.]的块茎,经干燥、粉碎并过60目筛,备用;

23-乙酰泽泻醇B对照品:批号PS15031701,纯度 $\geq 98\%$,成都普思生物科技股份有限公司;

无水乙醇、香草醛、冰乙酸、高氯酸等:分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 泽泻总三萜的提取 准确称取泽泻干燥块茎粉末1.0 g,按照试验方案加入一定量的一定体积分数乙醇,在一定温度下浸提一定时间,并超声提取一定时间,过滤,取滤液稀释一定浓度于试管中,作为待测液。

1.3.2 泽泻总三萜含量与提取率的测定

(1) 对照品溶液的制备:精密称取23-乙酰泽泻醇B对照品1.26 mg,于25 mL容量瓶中,加乙醇适量溶解,摇匀,定容,得到浓度为0.050 4 mg/mL的23-乙酰泽泻醇B对照品溶液,待用。

(2) 样品溶液的制备:精密量取1.3.1项下待测液0.2 mL,用相应体积分数的乙醇稀释至1 mL,摇匀,即得样品溶液。

(3) 测定波长的确定:分别取对照品溶液和样品溶液,按照1.3.2(4)项下显色方法显色,于400~600 nm波长之间扫描,结果表明,两者均在555 nm波长处有最大吸收,故选择555 nm为检测波长。

(4) 标准曲线的绘制:精密吸取对照品溶液0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mL于10 mL的试管中,在60 °C水中把溶剂挥干,挥干后于试管中加入0.2 mL的5%香草醛-冰乙酸溶液,0.8 mL高氯酸,60 °C水浴15 min,冷却5 min,加冰醋酸5.0 mL,摇匀,测定波长为555 nm^[8]。横坐标为23-乙酰泽泻醇B含量,纵坐标为吸光度,得到标准曲线: $Y = 8.496X + 0.000 1$,相关系数 $R^2 = 0.999 4$,表明吸光度与质量线性关系良好。

(5) 样品含量测定:取1.3.2(2)项下样品溶液0.2 mL,按照1.3.2(4)项下方法显色,在555 nm波长处测定吸光度,根据标准曲线的回归方程计算,得样品总三萜含量,按式(1)计算提取率。

$$c = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

c ——总三萜提取率,%;

m_1 ——总三萜含量,g;

m_2 ——泽泻原料重,g。

1.3.3 单因素试验

(1) 乙醇体积分数对泽泻总三萜提取率的影响:准确称

取泽泻干燥块茎粉末1.0 g于50 mL离心管中,分别加入40%,50%,60%,70%,80%,90%乙醇16 mL,置50 °C恒温水浴锅浸提45 min,超声30 min,测定总三萜含量,3次平行试验取平均值,计算总三萜提取率。

(2) 料液比对泽泻总三萜提取率的影响:准确称取泽泻干燥块茎粉末1.0 g于50 mL离心管中,分别加入80%乙醇8,10,12,14,16 mL,置50 °C恒温水浴锅中浸提45 min,超声30 min,测定总三萜含量,3次平行试验取平均值,计算总三萜提取率。

(3) 超声时间对泽泻总三萜提取率的影响:准确称取泽泻干燥块茎粉末1.0 g于50 mL离心管中,加入80%乙醇12 mL,置50 °C恒温水浴锅浸提45 min,超声10,20,30,40,50 min,测定总三萜含量,3次平行试验取平均值,计算总三萜提取率。

(4) 浸提时间对泽泻总三萜提取率的影响:准确称取泽泻干燥块茎粉末1.0 g于50 mL离心管中,加入80%乙醇12 mL,置50 °C恒温水浴锅浸提15,25,35,45,55 min,超声30 min,测定总三萜含量,3次平行试验取平均值,计算总三萜提取率。

(5) 浸提温度对泽泻总三萜提取率的影响:准确称取泽泻干燥块茎粉末1.0 g于50 mL离心管,加入80%乙醇12 mL,分别在30,40,50,60,70 °C恒温水浴锅中,浸提45 min,超声30 min,测定总三萜含量,3次平行试验取平均值,计算总三萜提取率。

1.3.4 响应面试验设计 根据单因素试验结果,采用浸提时间、乙醇体积分数、浸提温度和料液比为试验因素,建立四因素三水平的Box-Behnken响应面试验设计,以总三萜提取率为响应值。

1.4 数据处理

运用Excel和Design-Expert 8.0.7.1软件程序,利用响应面分析法对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数对总三萜提取率的影响 由图1可知,在乙醇体积分数80%以内,泽泻总三萜的提取率逐渐增加;当乙醇体积分数为80%时,总三萜提取率有峰值。乙醇体积分数超过80%,随着乙醇体积分数进一步增加,总三萜提取

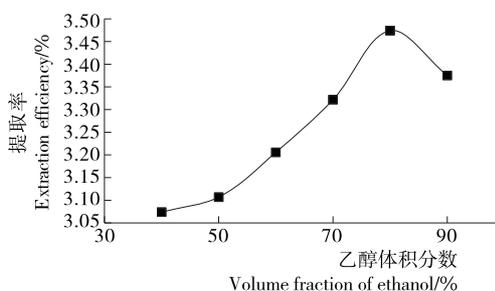


图1 乙醇体积分数对泽泻总三萜提取率的影响
Figure 1 Effect of ethanol concentration on yield of the total triterpenoid

率反而降低,可能是三萜类化合物是弱极性物质,随着乙醇体积分数的继续增加,溶剂极性越弱,导致三萜类化合物的溶解度降低,总三萜提取率下降^[6]。因此,确定最佳的乙醇体积分数为 80%。

2.1.2 料液比对总三萜提取率的影响 由图 2 可知,随着溶剂用量的增加,总三萜的提取率也逐渐增加。当料液比达到 1:12 (g/mL)以后,提取率呈现微弱的下降趋势,可能是总三萜含量在 1:12 (g/mL)左右达到峰值,随着溶剂量的继续增大,反而起到稀释的效果。为节约成本,综合考虑选择 1:12 (g/mL)为适宜的料液比。

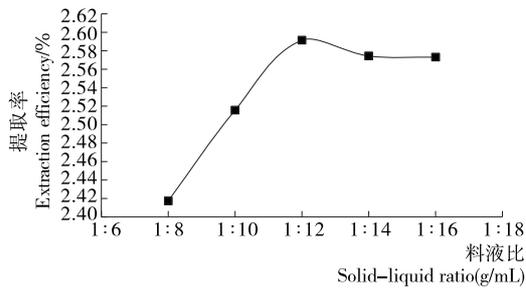


图 2 料液比对泽泻总三萜提取率的影响

Figure 2 Effect of solid-liquid ratio on yield of the total triterpenoid

2.1.3 超声时间对总三萜提取率的影响 由图 3 可知,总三萜的提取率随着超声时间的延长而增大,30 min 后提取率反而缓慢下降,可能是三萜类化合物的结构稳定性对超声比较敏感,长时间在较强的机械剪切、振动作用下,其结构可能会发生改变^[9],从而降低提取率。因此,综合考虑能源消耗和生产效率,选择超声提取时间为 30 min。

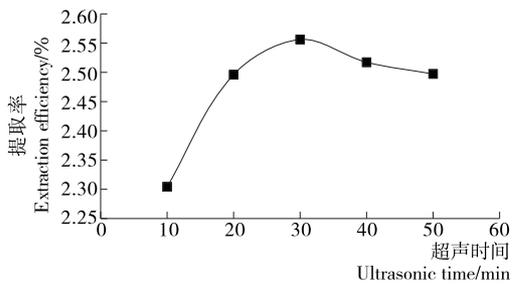


图 3 超声时间对泽泻总三萜提取率的影响

Figure 3 Effect of ultrasonic time on yield of the total triterpenoid

2.1.4 浸提时间对总三萜提取率的影响 由图 4 可知,样品在溶剂中浸提,随着时间的延长,提取率呈上升趋势。当时间为 45 min 时,提取率出现峰值,随着浸提时间的延长,提取率反而下降,可能是在一定温度下,三萜类化合物长时间在提取剂中其结构稳定性减弱。因此,选择 45 min 为较适宜的浸提时间。

2.1.5 浸提温度对总三萜提取率的影响 由图 5 可知,浸提温度在 60 °C 以内时,提取率随之增加。在 60 °C 时,提取率出现峰值,温度继续升高,提取率反而下降。可能是三萜类化合物对温度比较敏感,当温度升高到一定程度以后,长时

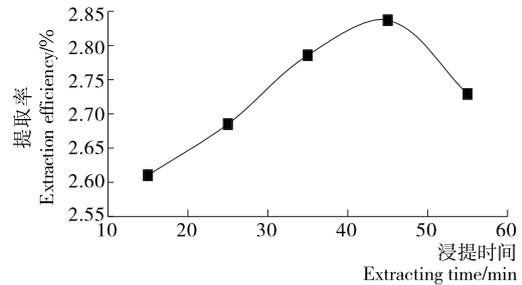


图 4 浸提时间对泽泻总三萜提取率的影响

Figure 4 Effect of extraction time on yield of the total triterpenoid

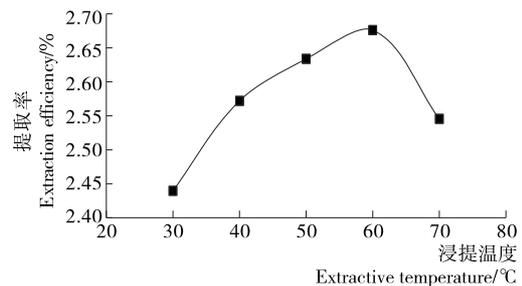


图 5 浸提温度对泽泻总三萜提取率的影响

Figure 5 Effect of extraction temperature on yield of the total triterpenoid

间受热导致其结构变化或降解,导致提取率下降^[10-11]。因此,选取 60 °C 为最佳浸提温度。

2.2 响应面法优化提取工艺

在单因素试验基础上,应用四因素三水平的中心组合试验设计,以 4 个因素作为自变量,总三萜提取率为因变量,优选泽泻总三萜的提取条件。试验因素水平见表 1。试验设计与结果见表 2。

2.3 响应面工艺优化分析

将所得数据采用 Design-Expert 8.0.7.1 软件来统计分析,得到总三萜提取率与提取条件的回归方程为:

$$R = 3.06 - 0.097 \times A - 0.040 \times B + 0.083 \times C - 0.015 \times D - 0.11 \times AB + 0.12 \times AC + 0.096 \times AD + 0.027 \times BC + 3.972E-003 \times BD + 0.14 \times CD - 0.080 \times A^2 - 0.28 \times B^2 - 0.10 \times C^2 - 0.39 \times D^2 \quad (2)$$

由表 3 可知,选用模型 $P < 0.000 1$, $F = 38.62$,说明具有统计学意义,该二次回归方程模型极显著。失拟项不显著 ($P = 0.451 9 > 0.05$),模型 R^2 为 0.974 8, $adj-R^2$ 为 0.949 5,表明回归方程拟合度良好,可以用来优化和预测总三萜最佳提

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Factors and coded levels in the central composite design

水平	A 乙醇体积分数/%	B 浸提时间/min	C 浸提温度/°C	D 料液比 (g/mL)
1	70	35	50	1:12
0	80	45	60	1:14
-1	90	55	70	1:16

取工艺条件。根据回归系数的显著性检验可知,一次项 A、B、C 均对总三萜提取率的影响达到显著效应,交互项 AB、AC、AD、CD 对提取率的交互影响显著,二次项 A²、B²、C²、D² 对提取率的影响达到显著效应。

由图 6(a)可知,在浸提温度和料液比一定条件下,随着乙醇体积分数的升高,响应值呈缓慢下降趋势,随着浸提时间的增加,响应值先升高后下降,当乙醇体积分数约至 70%、

浸提时间约至 45 min,响应值存在极大值。由图 6(b)可知,在浸提时间、料液比一定条件下,乙醇体积分数响应曲面较陡峭,说明 2 个提取条件对总三萜的提取率有较显著的交互影响,当乙醇浓度约为 70%、浸提温度约至 60 °C,响应值达最大。由图 6(c)可知,在浸提时间和浸提温度一定条件下,随着料液比的增加,响应值先升高后降低,当乙醇体积分数约为 70%、料液比约至 1:14 (g/mL),响应值最大。由

表 2 试验设计与结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

编号	A	B	C	D	总三萜提取率/%	编号	A	B	C	D	总三萜提取率/%
1	-1	-1	0	0	2.70	16	0	1	1	0	2.80
2	1	-1	0	0	2.79	17	-1	0	-1	0	2.80
3	-1	1	0	0	2.79	18	1	0	-1	0	2.36
4	1	1	0	0	2.45	19	-1	0	1	0	2.93
5	0	0	-1	-1	2.67	20	1	0	1	0	2.96
6	0	0	1	-1	2.49	21	0	-1	0	-1	2.43
7	0	0	-1	1	2.32	22	0	1	0	-1	2.37
8	0	0	1	1	2.71	23	0	-1	0	1	2.36
9	-1	0	0	-1	2.81	24	0	1	0	1	2.32
10	1	0	0	-1	2.37	25	0	0	0	0	3.11
11	-1	0	0	1	2.92	26	0	0	0	0	2.98
12	1	0	0	1	2.77	27	0	0	0	0	3.04
13	0	-1	-1	0	2.83	28	0	0	0	0	3.06
14	0	1	-1	0	2.73	29	0	0	0	0	3.09
15	0	-1	1	0	2.81						

表 3 回归分析[†]

Table 3 The results of regression analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F	显著性
模型	1.72	14	0.12	38.62	<0.000 1	***
A	0.11	1	0.11	35.22	<0.000 1	***
B	0.019	1	0.019	5.89	0.029 3	*
C	0.082	1	0.082	25.67	0.000 2	***
D	2.59E-03	1	2.59E-03	0.81	0.382 8	
AB	0.046	1	0.046	14.48	0.001 9	**
AC	0.056	1	0.056	17.54	0.000 9	***
AD	0.037	1	0.037	11.47	0.004 4	**
BC	3.01E-03	1	3.01E-03	0.94	0.347 8	
BD	6.31E-05	1	6.31E-05	0.02	0.890 1	
CD	0.083	1	0.083	26.01	0.000 2	***
A ²	0.042	1	0.042	13.02	0.002 9	**
B ²	0.50	1	0.50	156.81	0.002 9	**
C ²	0.071	1	0.071	22.20	0.002 9	**
D ²	1.00	1	1.00	313.86	0.002 9	**
残差	0.045	14	3.19E-03			
失拟项	0.034	10	3.38E-03	1.24	0.451 9	
误差	0.011	4	2.72E-03			
总和	1.77	28				

[†] *** 表示差异极显著, P<0.01; * 表示差异显著, P<0.05。

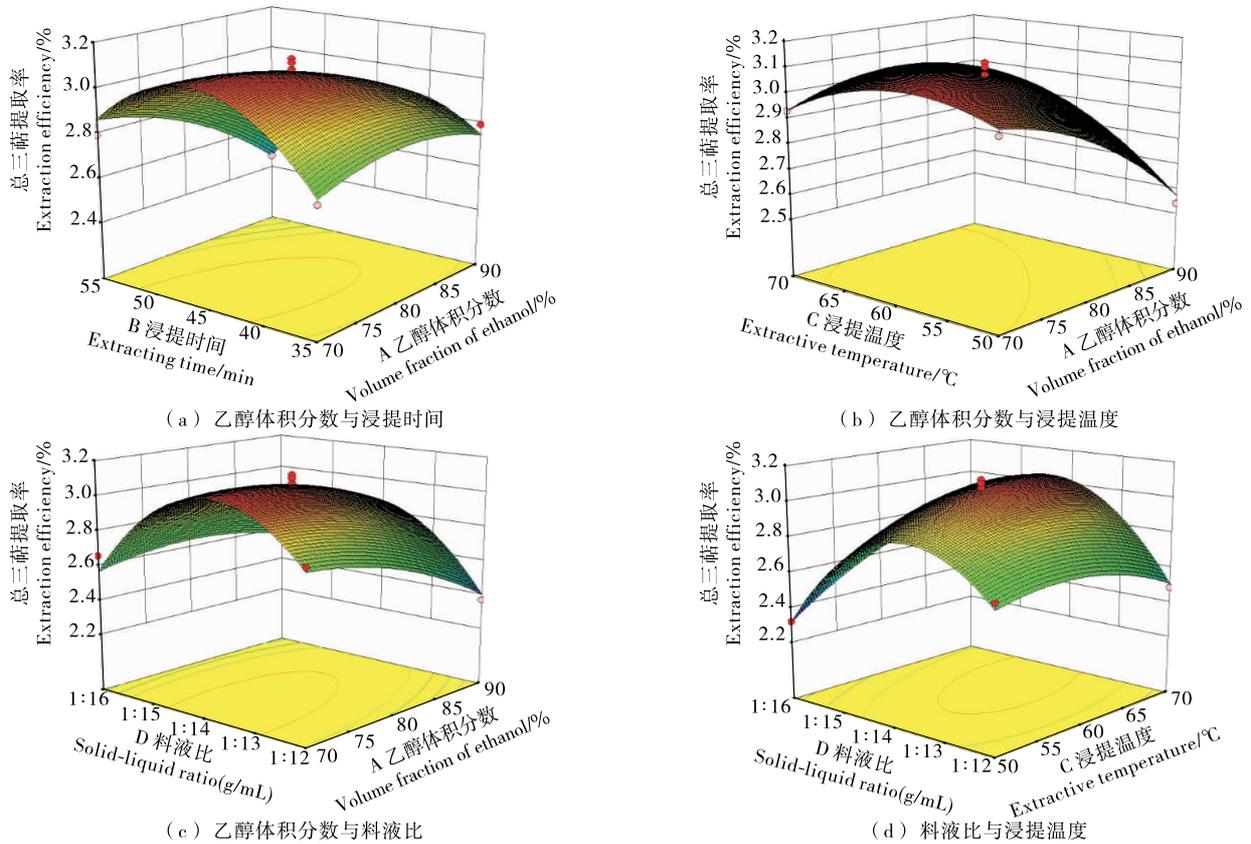


图 6 各因素两两交互作用对总三萜提取率影响的响应面图

Figure 6 Various factors on the impact of interaction on the yield of total triterpenoid

图 6(d)可知,在乙醇体积分数、浸提时间一定条件下,料液比响应曲面较陡峭,说明料液比与浸提温度对提取率具有较显著交互影响,当料液比约至 1 : 14 (g/mL)、浸提温度约至 60 ℃,响应值最大。综上可得,该模型有稳定点,且稳定点是最大值。

2.4 验证实验

根据上述分析研究,得到最佳提取条件:浸提温度 57.10 ℃,乙醇体积分数 70.00%,浸提时间 46.06 min,料液比 1 : 13.61 (g/mL),超声时间 30 min,该条件下总三萜提取率为 3.09%。

为了验证响应面优化结果的可靠性,以及可操作性,将提取条件修正为乙醇体积分数 70%,浸提时间 46 min,浸提温度 57 ℃,料液比 1 : 14 (g/mL),超声时间 30 min。按上述条件进行 3 次平行验证实验,得泽泻总三萜平均提取率为 2.98%,与理论预测值基本一致,相对偏差为 3.62%。

3 结论

本试验最终确定泽泻总三萜最佳提取工艺为:乙醇体积分数 70%、浸提时间 46 min,浸提温度 57 ℃、料液比 1 : 14 (g/mL),超声时间 30 min,在此条件下总三萜得率为 2.98%。

本研究与传统的乙醇回流提取、超临界二氧化碳萃取相比,超声提取能显著提高总三萜提取率,经济有效,同时增加了温度浸提对提取率的影响,更加全面地阐述了试验因素对提

取率的影响。不足之处是在超声提取时采取人工控温,可能存在误差,若测定时采用高效液相色谱法,结果可能更精确。

参考文献

- [1] 丁霞, 吴水生. 泽泻的研究进展[J]. 中医药信息, 2008, 25(5): 19-21.
- [2] 赖满香. 骨质疏松症的中药治疗机制探讨[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(3): 235-236.
- [3] 王建平, 傅旭春. 泽泻的化学成分和药理作用研究进展[J]. 浙江医学, 2012, 34(14): 1 235-1 236.
- [4] 罗奋熔, 丘建芳, 许文, 等. 泽泻总三萜提取纯化工艺的实验室试验及中试验证[J]. 中国医药工业杂志, 2015, 45(8): 729-733.
- [5] 邓迎娜, 易醒, 肖小年, 等. 超声提取泽泻中三萜类总组分[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9): 145-147.
- [6] 易醒, 肖小年, 冯永明, 等. 超临界二氧化碳萃取泽泻中三萜类总组分[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1 129-1 130.
- [7] 齐娜, 李涵, 张志宇, 等. 新疆红肉苹果多酚的超声波辅助提取工艺优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(9): 177-182.
- [8] 李斌, 李元魁, 孟宪军, 等. 响应曲面法优化北五味子总三萜的提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 106-110.
- [9] 涂宗财, 寇玉, 王辉, 等. 荷叶多糖的超声波辅助提取和抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 108-112.
- [10] 刘洋, 赵谋明, 杨宁, 等. 响应面分析法优化仙人掌多糖提取工艺的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 42-44.
- [11] 周国仪, 舒静, 黄泽元. 响应面法优化超声提取芝麻叶黄酮的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 77-80.