

# Box-Behnken设计-响应面法优化小槐花中柠檬酚的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺<sup>Δ</sup>

黄周锋<sup>1,2\*</sup>, 胡筱希<sup>1#</sup>, 黄建猷<sup>1</sup>, 谭晓<sup>1</sup>, 陆国寿<sup>1</sup>, 梁新巧<sup>3</sup>(1.广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022; 2.广西中药质量标准重点实验室, 南宁 530022; 3.广西中医药大学药学院, 南宁 530022)

中图分类号 R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)09-1085-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.09.12

**摘要** 目的:优化小槐花中柠檬酚的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺。方法:以柠檬酚含量为评价指标,乙醇体积分数、固液比、硫酸铵加入量、超声时间、超声温度为考察因素,在单因素试验的基础上,使用Box-Behnken设计-响应面法优化小槐花中柠檬酚的提取工艺并进行验证。结果:小槐花中柠檬酚的最优提取工艺为乙醇体积分数95.35%,固液比1:50.35(g/mL),硫酸铵加入量4.49 g,超声时间48.7 min,超声温度57.6 ℃。3次验证试验中,柠檬酚的含量分别为0.637 8、0.638 4、0.625 4 mg/g,与预测值(0.630 5 mg/g)相近。结论:优化的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺稳定、可行,可用于小槐花中柠檬酚的提取。

**关键词** 小槐花;柠檬酚;双水相提取;超声提取;Box-Behnken设计;响应面法;工艺优化

## Optimization of Ultrasonic-assisted Ethanol-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Aqueous Two-phase Extraction of Citrusinol from *Desmodium caudatum* by Box-Behnken Design-response Surface Methodology

HUANG Zhoufeng<sup>1,2</sup>, HU Xiaoxi<sup>1</sup>, HUANG Jianyou<sup>1</sup>, TAN Xiao<sup>1</sup>, LU Guoshou<sup>1</sup>, LIANG Xinqiao<sup>3</sup>(1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China; 3. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530022, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize ultrasonic-assisted ethanol-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase extraction technology of citrusinol from *Desmodium caudatum*. METHODS: Using the content of citrusinol as indexes, with ethanol volume fraction,

- 学成分研究[J].中草药,2000,31(7):12-14.
- [4] 李德坤,李静.木贼挥发油成分的研究[J].中草药,2001,32(6):499-500.
- [5] 董蕊,孙昌霞.木贼醇提物不同萃取部位总酚酸、黄酮含量测定及抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2018,39(8):56-60,66.
- [6] 甄艳军,侯建明.木贼对大鼠高脂血症及主动脉内膜早期粥样硬化病变的影响[J].中国老年学杂志,2004,24(7):643-645.
- [7] 孙昌霞.木贼总黄酮的提取及对APAP致小鼠肝损伤保护作用的初步研究[D].长春:吉林农业大学,2018.
- [8] 潘旭,张昌浩.木贼化学成分和药理作用研究近况[J].吉林医药学院学报,2018,39(3):216-218.
- [9] 李方丽.白花蛇舌草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[D].济南:山东中医药大学,2016.
- [10] 张春梅.木贼乙酸乙酯提取物抗肿瘤活性成分研究[D].延边:延边大学,2012.
- [11] 张宪,赵惠萍,张小茜,等.木贼质量标准的研究[J].中国中医药信息杂志,2005,12(5):48-50.
- [12] 酆红岩,汤小伟,周坚祥,等.HPLC法测定木贼中槲皮素和山柰素的含量[J].齐鲁药事,2012,31(7):400-401.
- [13] 李军山,陈钟,张肖建,等.木贼配方颗粒质量标准研究[J].西部中医药,2017,30(3):25-27.
- [14] 许鑫,苏瑞,金敏婷,等.木贼中3种成分的HPLC-DAD-MS分析[J].中国执业药师,2011,8(8):30-33.
- [15] 杨捷,朱冷音,徐翠珊,等.麦枣怡神颗粒的指纹图谱研究[J].中国药房,2019,30(17):2374-2378.
- [16] 张森,陈龙,朱华,等.石仙桃药材HPLC指纹图谱的建立及聚类分析[J].中国药房,2019,30(13):1792-1795.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:57-58,104,202,204-206,224-225.
- [18] 对外贸易经济合作部.中华人民共和国外贸行业标准:药用植物及制剂进出口绿色行业标准[J].中药研究与信息,2001,3(8):9-10.

(收稿日期:2019-11-23 修回日期:2020-02-23)

(编辑:林静)

Δ 基金项目:广西自然科学基金面上项目(No.2019GXNSFAA-245081);广西自然科学基金青年科学基金项目(No.2017GXNSFBA-198214)

\* 助理研究员,硕士。研究方向:天然产物化学。E-mail: fer-hung@126.com

# 通信作者:助理研究员,硕士。研究方向:中药化学。E-mail: huxiaoxi0124@126.com

solid-liquid ratio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  addition amount, ultrasonic time and ultrasonic temperature as factors, based on the single factor tests, Box-Behnken design-response surface methodology was used to optimize the extraction technology of citrusinol. RESULTS: The optimized extraction technology of citrusinol included that ethanol volume fraction was 95.35%, the solid-liquid ratio was 1:50.35 (g/mL),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  addition amount was 4.49 g, ultrasonic time was 48.7 min, ultrasonic temperature was 57.6 °C. In 3 times of validation tests, the extraction rates of citrusinol were 0.637 8, 0.638 4, 0.625 4 mg/g, respectively, which was close to predicted value (0.630 5 mg/g). CONCLUSIONS: The optimized ultrasonic-assisted ethanol- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aqueous two-phase extraction technology is stable and feasible, and can be used for the extraction of citrusinol from *D. caudatum*.

**KEYWORDS** *Desmodium caudatum*; Citrusinol; Aqueous two-phase extraction; Ultrasonic extraction; Box-Behnken design; Response surface methodology; Technology optimization

小槐花 [*Desmodium caudatum* (Thunb.) DC.] 为豆科山蚂蝗属植物, 以全株入药, 为广西壮、瑶民族常用药材, 被收载于《广西中药材标准》<sup>[1]</sup>、《广西壮族自治区壮药质量标准》<sup>[2]</sup>、《中国瑶药学》<sup>[3]</sup>。小槐花壮药名为裸文沾, 瑶药名为握麻红, 主要分布于广西、安徽、浙江、江西等省。本课题组前期对壮瑶药小槐花进行了深入的研究, 并从中提取分离出了一种 A 环并吡喃环黄酮结构的化合物柠檬酚 (化学结构见图 1); 随后的活性研究发现, 该化合物可通过破坏人肝癌 HepG2 细胞的 F-actin 骨架, 阻止纺锤体形成, 从而抑制癌细胞的增殖, 并呈剂量依赖性, 提示柠檬酚具有潜在的抗肿瘤作用<sup>[4-9]</sup>。

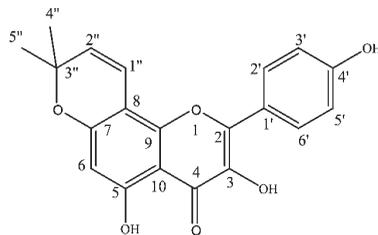


图 1 柠檬酚的化学结构

Fig 1 Chemical structure of citrusinol

目前, 黄酮类化合物多以有机溶剂回流或超声提取, 溶剂用量大且后续处理复杂<sup>[10-11]</sup>。双水相提取具有分相快、条件温和、操作安全方便、污染小等优点, 现已广泛应用于中药有效成分分离和生物化学等领域<sup>[12-15]</sup>。中药中的活性成分大多为微量成分, 且初生代谢产物和次生代谢产物共存, 因此为提高活性成分的提取效果, 本研究以乙醇-硫酸铵为双水相<sup>[16]</sup> (与常见的碳酸钠、磷酸氢二钠、氯化铵等盐相比, 硫酸铵在乙醇中的溶解度更低, 更利于黄酮类成分的分离), 利用超声与双水相体系相结合的方法提取小槐花中的柠檬酚; 以柠檬酚含量为评价指标, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化其提取工艺, 旨在为小槐花药材中活性成分的有效提取及其进一步开发利用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2695 型高效液相色谱 (HPLC) 仪 (美国 Waters 公司); HH-S2 型数显恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂); JJ224BC 型电子天平 (常熟双杰测试仪器厂); KS-

3200DE 型超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司); LDZ4-0.8A 型离心机 (北京医用离心机厂)。

### 1.2 药品与试剂

小槐花药材采自广西鹿寨县, 经广西壮族自治区中医药研究院卢文杰主任中药师鉴定为小槐花 [*D. caudatum* (Thunb.) DC.] 的全草, 标本存放于广西壮族自治区中医药研究院中药研究所标本室; 柠檬酚对照品 (本实验室自制, HPLC 法检测纯度:  $\geq 98\%$ ); 甲醇为色谱纯, 磷酸、乙醇、硫酸铵等其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 小槐花粗提物的制备

称取小槐花药材 600 g, 加 20 倍量 (mL/g) 50% 乙醇, 于 90 °C 回流提取 2 次, 每次 1 h; 合并 2 次提取液, 减压浓缩至 200 mL 后, 加乙醇 500 mL 醇沉; 滤过, 滤液蒸干, 即得粗提物 35.41 g。

### 2.2 柠檬酚的含量测定

采用 HPLC 法检测。

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBrige-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (80:20, V/V); 测定波长: 282 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.2.2 溶液的制备 ①对照品贮备液: 精密称取柠檬酚对照品 1.0 mg, 加无水乙醇定容至 5 mL, 超声 (功率: 200 W, 频率: 40 kHz, 下同) 使溶解, 制得质量浓度为 200 μg/mL 的对照品贮备液, 备用。②供试品溶液: 精密称取“2.1”项下所得粗提物 0.2 g, 加无水乙醇定容至 50 mL, 超声使溶解, 制得供试品溶液。③空白溶液: 取适量无水乙醇溶液经超声处理后, 作为空白溶液。

2.2.3 系统适用性试验 取对照品溶液 (50 μg/mL, 用无水乙醇将“2.2.2①”项下对照品贮备液稀释所得)、供试品溶液、空白溶液各适量, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图 (见图 2)。结果, 供试品溶液与对照品溶液在相应位置有相同的色谱峰, 且空白溶液对待测物的测定无干扰; 理论板数按柠檬酚计不低于 2 000, 分离度  $> 1.5$ , 表明本方法专属性强。

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.2①”项下对照品贮备液适量, 用无水乙醇稀释, 得质量浓度分别为 6.25、12.5、

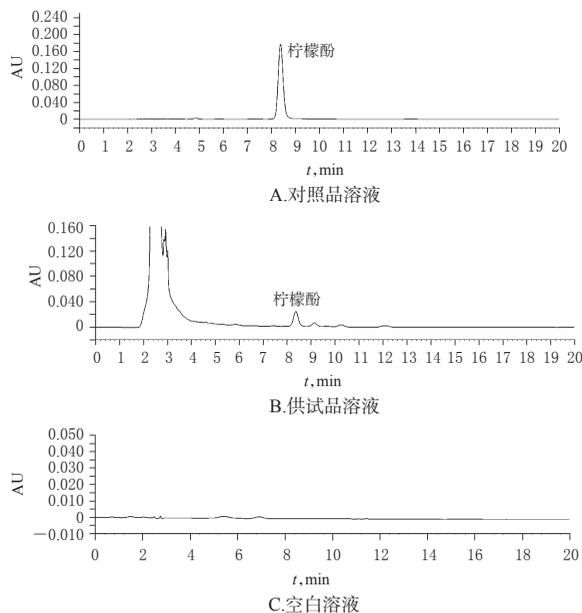


图2 高效液相色谱图  
Fig 2 HPLC chromatograms

25、50、100、200  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度( $c$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $A$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程为  $A=48\ 790c+64\ 160$  ( $R^2=0.999\ 3$ ),柠檬酚检测质量浓度的线性范围为  $6.25\sim 200\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.2.5 定量限与检测限考察 取“2.2.4”项下线性范围下限质量浓度( $6.25\ \mu\text{g/mL}$ )的标准溶液,用无水乙醇倍比稀释,以信噪比  $10:1$ 、 $3:1$  分别计算定量限、检测限。结果,柠檬酚的定量限、检测限分别为  $293$ 、 $88\ \text{ng/mL}$ 。

2.2.6 精密度、重复性与稳定性试验 ①取“2.2.4”项下  $50\ \mu\text{g/mL}$  柠檬酚标准溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果,柠檬酚峰面积的RSD为  $1.35\%$  ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。②取同一批粗提物样品共6份,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,按外标法计算柠檬酚的含量( $\text{mg/g}$ )。结果,样品中柠檬酚的平均含量为  $0.587\ 2\ \text{mg/g}$ ,RSD为  $1.01\%$  ( $n=6$ ),表明本方法的重复性较好。③取同一份供试品溶液,在室温下分别放置  $0$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $6$ 、 $12$ 、 $24\ \text{h}$  时按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,得柠檬酚峰面积的RSD为  $0.98\%$  ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置  $24\ \text{h}$  内的稳定性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知柠檬酚含量的小槐花粗提物约  $1.0\ \text{g}$ ,共6份,分别加入一定量的对照品贮备液,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,计算柠檬酚的加样回收率,结果见表1。

### 2.3 单因素试验

精密称取小槐花粗提物适量,以柠檬酚含量为评价指标,对乙醇体积分数( $80\%\sim 100\%$ )、固液比[ $1:40\sim 1:60$ ( $\text{g/mL}$ ,下同)]、硫酸铵加入量( $1.5\sim 5.5\ \text{g}$ )、超声时

间( $20\sim 60\ \text{min}$ )、超声温度( $30\sim 70\ ^\circ\text{C}$ )等因素<sup>[13]</sup>进行单因素试验。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )  
Tab 1 Results of recovery tests( $n=6$ )

称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
1.021 5	0.586 2	0.60	1.192 9	101.12	100.32	2.57%
1.024 1	0.595 6	0.60	1.215 6	103.52		
1.035 4	0.605 4	0.60	1.195 2	98.30		
1.014 2	0.568 4	0.60	1.184 2	102.63		
1.024 5	0.587 9	0.60	1.168 7	96.80		
1.014 7	0.570 2	0.60	1.167 4	99.53		

2.3.1 乙醇体积分数 精密称取小槐花粗提物  $0.2\ \text{g}$ ,在固液比为  $1:40$ 、硫酸铵加入量为  $1.5\ \text{g}$ 、超声温度为  $30\ ^\circ\text{C}$ 、超声时间为  $20\ \text{min}$  的条件下,分别用  $80\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$ 、 $95\%$ 、 $100\%$  乙醇进行提取。取提取液适量,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,并按外标法计算样品中柠檬酚的含量。结果,乙醇的体积分数可影响双水相的分水能力,当乙醇体积分数为  $80\%\sim 90\%$  时,柠檬酚含量有随乙醇体积分数升高而降低的趋势;当乙醇体积分数  $>90\%$  时,柠檬酚含量有随乙醇体积分数升高而升高的趋势;当乙醇体积分数为  $100\%$  时,柠檬酚的含量最高,且趋于稳定,详见图3A。

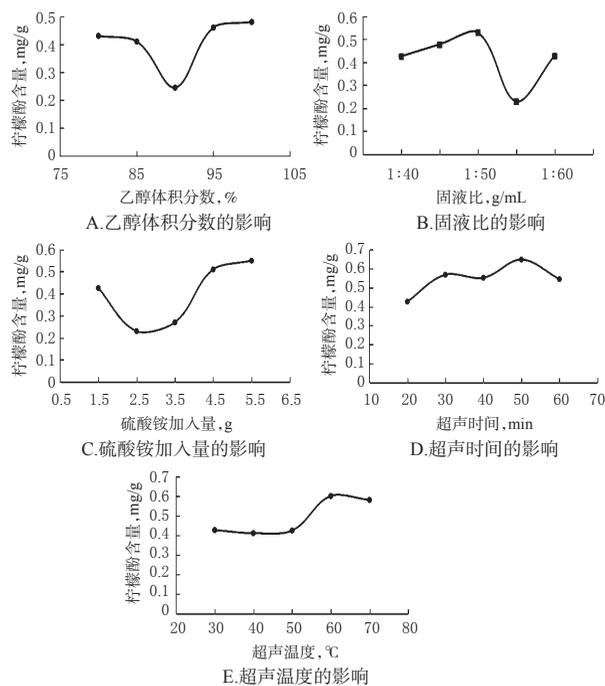


图3 乙醇体积分数、固液比、硫酸铵加入量、超声时间及温度对柠檬酚含量的影响

Fig 3 Effects of ethanol volume fraction, solid-liquid ratio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  addition amount, ultrasonic time and temperature on the content of citric acid

2.3.2 固液比 精密称取小槐花粗提物  $0.2\ \text{g}$ ,在乙醇体积分数为  $80\%$ 、硫酸铵加入量为  $1.5\ \text{g}$ 、超声温度为

30 ℃、超声时间为20 min的条件下,分别以固液比1:40、1:45、1:50、1:55、1:60进行提取。取提取液适量,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,并按外标法计算样品中柠檬酚的含量。结果,当固液比为1:40~1:50时,柠檬酚含量有上升的趋势,提示增加溶剂量可有助于提高柠檬酚的溶出程度;当固液比超过1:50后,柠檬酚含量先下降再升高,含量的下降可能与大量杂质溶出有关,详见图3B。

**2.3.3 硫酸铵加入量** 精密称取小槐花粗提物0.2 g,在乙醇体积分数为80%、固液比为1:40、超声温度为30 ℃、超声时间为20 min的条件下,分别加入硫酸铵1.5、2.5、3.5、4.5、5.5 g进行提取。取提取液适量,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,并按外标法计算样品中柠檬酚的含量。结果,当硫酸铵加入量为1.5~2.5 g时,柠檬酚含量随着硫酸铵加入量的增加而降低;当硫酸铵加入量为2.5~4.5 g时,柠檬酚含量也随之增加;当硫酸铵加入量>4.5 g时,柠檬酚含量增加不明显,且若再继续加入硫酸铵,则双水相体系饱和,使得其分相能力减弱,详见图3C。

**2.3.4 超声时间** 精密称取小槐花粗提物0.2 g,在乙醇体积分数为80%、固液比为1:40、超声温度为30 ℃、硫酸铵加入量为1.5 g的条件下,分别超声提取20、30、40、50、60 min。取提取液适量,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,并按外标法计算样品中柠檬酚的含量。结果,当超声时间为20~50 min时,柠檬酚含量呈波浪形上升;而当超声时间>50 min时,柠檬酚含量有所下降;当超声时间为50 min时,柠檬酚含量最高,详见图3D。

**2.3.5 超声温度** 精密称取小槐花粗提物0.2 g,在乙醇体积分数为80%、固液比为1:40、超声时间为20 min、硫酸铵加入量为1.5 g的条件下,分别在30、40、50、60、70 ℃下进行提取。取提取液适量,按“2.2.2②”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,并按外标法计算样品中柠檬酚的含量。结果,当超声温度为30~50 ℃时,柠檬酚含量的变化并不明显;当超声温度为50~60 ℃,柠檬酚含量明显上升,且于60 ℃时达到最大值;当超声温度>60 ℃时,柠檬酚的含量又有所下降,详见图3E。

## 2.4 Box-Behnken设计-响应面法优化提取工艺

**2.4.1 试验设计** 根据“2.3”项下单因素试验结果和响应面中心组合试验设计原理,选取乙醇体积分数(A)、固液比(B)、硫酸铵加入量(C)、超声时间(D)、超声温度(E)等5个因素为响应因素,以柠檬酚含量为响应值,运用Design-Expert 8.0.6软件设计5因素3水平响应面试验,因素与水平见表2,试验方案及结果见表3。

**2.4.2 模型建立与方差分析** 采用Design-Expert 8.0.6软件对试验数据进行拟合,并建立二次多元回归方程:

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素				
	A, %	B, g/mL	C, g	D, min	E, ℃
-1	90	1:45	3.5	40	50
0	95	5:50	4.5	50	60
1	100	1:55	5.5	60	70

表3 试验方案及结果

Tab 3 Experimental design and results

试验号	A	B	C	D	E	柠檬酚含量, mg/g
1	-1	0	1	0	0	0.449 2
2	0	0	0	0	0	0.627 7
3	0	-1	0	-1	0	0.465 6
4	0	1	0	0	-1	0.554 4
5	0	0	1	1	0	0.501 5
6	0	0	0	0	0	0.627 7
7	0	0	0	1	1	0.525 7
8	-1	-1	0	0	0	0.391 5
9	1	0	0	1	0	0.545 3
10	0	0	-1	1	0	0.484 7
11	0	0	1	0	-1	0.477 0
12	0	1	0	1	0	0.445 7
13	0	-1	1	0	0	0.427 4
14	0	0	0	-1	-1	0.564 8
15	0	0	1	0	1	0.413 5
16	1	1	0	0	0	0.421 4
17	0	1	1	0	0	0.469 4
18	0	0	0	1	-1	0.445 1
19	0	1	0	-1	0	0.481 7
20	1	0	0	0	-1	0.462 8
21	0	-1	0	0	-1	0.393 2
22	1	0	-1	0	0	0.480 3
23	0	0	-1	0	-1	0.513 8
24	1	-1	0	0	0	0.483 0
25	0	0	0	0	0	0.627 7
26	1	0	1	0	0	0.470 5
27	0	0	0	0	0	0.627 7
28	0	-1	0	0	1	0.495 1
29	0	1	0	0	1	0.403 9
30	0	-1	0	1	0	0.450 1
31	-1	0	0	0	1	0.414 1
32	1	0	0	0	1	0.473 4
33	0	0	0	-1	1	0.439 5
34	0	0	-1	-1	0	0.517 7
35	-1	0	0	1	0	0.438 3
36	1	0	0	-1	0	0.485 2
37	-1	0	0	-1	0	0.568 3
38	0	0	-1	0	1	0.421 5
39	0	0	0	0	0	0.627 7
40	0	1	-1	0	0	0.510 7
41	-1	0	0	0	-1	0.476 8
42	-1	1	0	0	0	0.511 8
43	0	0	0	0	0	0.627 7
44	0	-1	-1	0	0	0.449 8
45	0	0	1	-1	0	0.523 2
46	-1	0	-1	0	0	0.520 6

$$Y=0.630+3.211 \times 10^{-3}A+0.015B-0.010C-0.013D-0.019E-0.045AB+0.015AC+0.048AD+0.018AE-4.720 \times 10^{-3}BC-5.124 \times 10^{-3}BD-0.063BE+2.843 \times 10^{-3}CD+$$

$7.192 \times 10^{-3}CE + 0.051DE - 0.076A^2 - 0.096B^2 - 0.073C^2 - 0.052D^2 - 0.086E^2$ 。对其进行方差分析,结果见表4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	F	P
模型	0.196 6	20	25.642 0	<0.000 1
A	0.000 2	1	0.430 3	0.517 8
B	0.003 8	1	9.661 4	0.004 6
C	0.001 8	1	4.565 7	0.042 6
D	0.002 7	1	7.165 3	0.012 9
E	0.005 7	1	14.790 8	0.000 7
AB	0.008 3	1	21.560 6	<0.000 1
AC	0.000 9	1	2.472 1	0.128 5
AD	0.009 0	1	23.558 9	<0.000 1
AE	0.001 3	1	3.503 4	0.073 0
BC	$8.910 \times 10^{-5}$	1	0.232 4	0.633 9
BD	0.000 1	1	0.273 9	0.605 3
BE	0.015 9	1	41.575 4	<0.000 1
CD	$3.234 \times 10^{-5}$	1	0.084 4	0.773 9
CE	0.000 2	1	0.539 7	0.469 4
DE	0.010 6	1	27.641 6	<0.000 1
A <sup>2</sup>	0.050 8	1	132.643 5	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.080 6	1	210.385 6	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.046 7	1	121.732 6	<0.000 1
D <sup>2</sup>	0.023 7	1	61.948 9	<0.000 1
E <sup>2</sup>	0.064 8	1	168.937 6	<0.000 1
残差	0.009 6	25		
失拟项	0.009 6	20		
误差项	0	5		

由表4中模型的P值(<0.000 1)可知,该模型的拟合程度良好;柠檬酚含量与各试验因素之间的线性关系显著( $R^2=0.953 5$ ),校正系数( $R^2_{Adj}$ )为0.916 3,提示91.63%的柠檬酚含量变化可用该模型解释,因此可用该模型分析和预测柠檬酚含量。由F值可知,5个因素对柠檬酚含量的影响大小为:E(超声温度)>B(固液比)>D(超声时间)>C(硫酸铵加入量)>A(乙醇体积分数);由各一次项对应的P值可知,除A外,其余因素均对柠檬酚含量具有显著影响( $P<0.05$ );由各二次项对应的P值可知,5个因素均对柠檬酚含量具有显著影响( $P<0.000 1$ );在交互作用中,A与B、A与D、B与E、D与E之间具有显著的交互作用( $P<0.01$ )。

为进一步评价A与B、A与D、B与E、D与E之间交互作用对柠檬酚含量的影响并确定各因素的最佳水平范围,本研究采用Design-Expert 8.0.6软件绘制响应面图和等高线图,结果见图4。由图4可见,上述交互因素的响应面形状均较陡,等高线均呈明显的椭圆形,说明各交互作用均较为明显。求解二次多元回归方程,得柠檬酚最优提取工艺为乙醇体积分数95.35%,固液比1:50.35(g/mL),硫酸铵加入量4.49 g,超声时间48.7 min,超声温度57.6 °C;预测柠檬酸含量为0.630 5 mg/g。

### 2.5 验证试验

精密称取小槐花粗提物0.2 g,按“2.4”项下最优工艺平行操作3次,所得柠檬酚的含量分别为0.637 8、

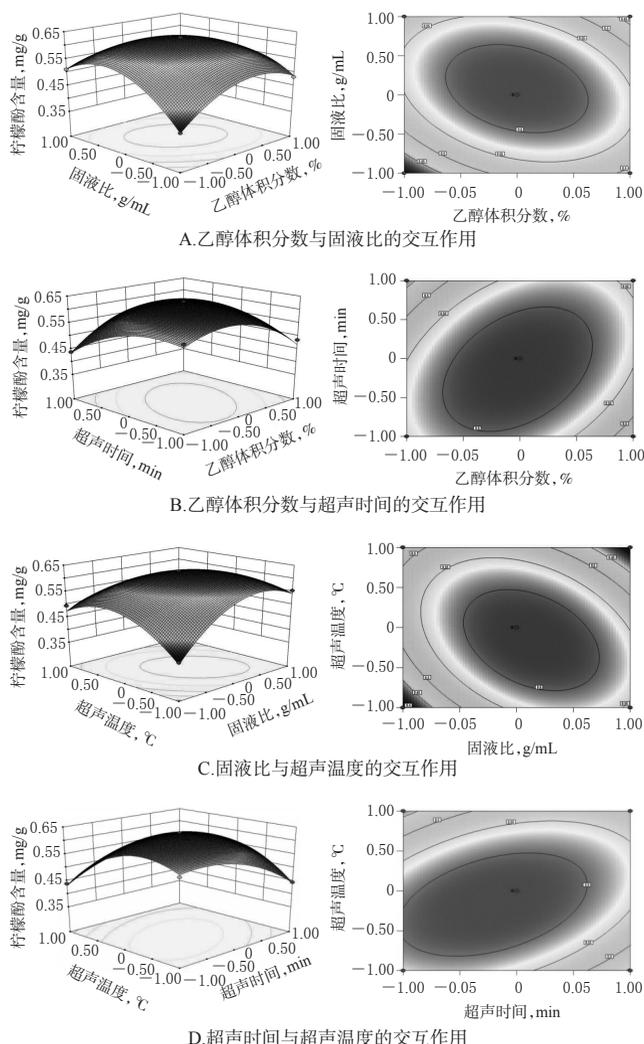


图4 A与B、A与D、B与E、D与E交互作用对柠檬酚含量影响的响应面图和等高线图

Fig 4 Response surface and contour plots of the interaction of A and B, A and D, B and E, D and E on the content of citrulinol

0.638 4、0.625 4 mg/g,平均含量为0.633 9 mg/g(RSD=1.15%, $n=3$ ),与预测值0.630 5 mg/g相近(实测值与预测值的RSD为1.16%, $n=3$ )。

### 3 讨论

黄酮类化合物在植物体内主要以糖苷形式存在,游离的较少,现多采用回流或者超声法进行提取<sup>[10-11,17]</sup>。双水相提取由于具有操作简便、分相快等优点,故在中药成分提取分离中的应用日益广泛<sup>[12]</sup>。双水相体系含水量较高,与植物体内的生理环境相似;反应条件温和,不容易造成活性成分发生改变;再辅以超声、微波等手段,可进一步改善提取的效果<sup>[18]</sup>。乙醇-硫酸铵系统是常见的双水相体系之一,其分离原理为:无机盐在溶液中可电离出正、负离子,两种离子在两相间的分配系数不同,故而形成电位差,当被提取物进入双水相体系后,由于其中所含化合物表面性质、电荷作用和分子间作用力的差异,导致其在提取过程中的化学平衡发生了变化,

最终使得目标成分转移至乙醇相,从而增加了目标成分的溶出速度和效率<sup>[19-20]</sup>。有研究指出,影响双水相成相的因素很多,如温度、pH值、双水相物质组成及含量等;同时,目标成分的结构差异也是能否形成双水相及各成分在两相中分布的关键因素<sup>[21]</sup>。因此,对双水相提取条件进行优化可准确预测体系中的分配规律,从而有效指导该技术的应用。基于此,本研究以柠檬酚含量为指标,在单因素试验的基础上,采用Box-Behnken设计-响应面法对超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取小槐花中柠檬酚的工艺进行了优化。

在前期预试验中,本课题组对柠檬酚的定量分析条件进行了筛选,包括流动相(乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液)、流速(1.0、0.8、0.6 mL/min)、柱温(20、25、30 ℃)等。综合考虑色谱响应以及色谱峰峰形、分离度等因素,最终确定了“2.2.1”项的色谱条件。

本研究进一步参考已有文献<sup>[13]</sup>,对超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺的乙醇体积分数、固液比、硫酸铵加入量、超声温度、超声时间等5个因素进行单因素试验;在此基础上,采用Box-Behnken设计-响应面法对提取工艺进行优化。结果,由回归模型预测超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取柠檬酚的最佳条件为乙醇体积分数95.35%,固液比1:50.35(g/mL),硫酸铵加入量4.49 g,超声时间48.7 min,超声温度57.6 ℃;柠檬酚预测含量为0.630 5 mg/g。经过3次验证试验,得柠檬酚的平均含量为0.633 9 mg/g,与预测值相近。柠檬酚为一种A环并吡喃环黄酮类化合物,回流或超声提取所得产物的含量较低<sup>[17]</sup>,而本研究优化的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺可大大提高小槐花提取物中该化合物的含量。

综上所述,本研究优化所得的小槐花中柠檬酚的超声辅助乙醇-硫酸铵双水相提取工艺稳定、可行。中药成分复杂,传统分离手段步骤繁多且耗时长,双水相作为一种绿色环保的新型分离技术,可简化样品前处理过程,易于放大生产且可连续化操作,有助于单体化合物的分离<sup>[12-15]</sup>。但该法在应用时也存在一些不足,如分离选择性偏低、易乳化、相分离时间较长等,后续可结合联用高速逆流色谱、电泳等技术<sup>[22]</sup>来进一步提高提取效率。

## 参考文献

[1] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准:第1册[S].1990年版.南宁:广西科学技术出版社,1990:24.  
[2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.广西壮族自治区壮药质量标准:第1卷[S].南宁:广西科学技术出版社,2008:49.  
[3] 覃迅云,罗金裕,高志刚.中国瑶药学[M].北京:民族出版社,2002:934.

[4] 卢文杰,陆国寿,谭晓,等.壮瑶药小槐花化学成分研究[J].中药材,2013,36(12):1953-1956.  
[5] 刘瑛,陆国寿,卢文杰,等.柠檬酚对人肝癌HepG2细胞增殖的影响[J].天然产物开发与研究,2017,29(1):135-140.  
[6] 陆国寿,叶勇,卢文杰,等.壮、瑶药小槐花中异柠檬酚的分离鉴定及含量测定研究[J].天然产物开发与研究,2014,26(9):1450-1453.  
[7] 陆国寿,谭晓,陈家源,等.小槐花中的脂溶性成分分析[J].广西科学,2012,19(4):355-357.  
[8] 李燕婧,钟正贤,卢文杰.小槐花水提物药理作用研究[J].中医药导报,2013,19(4):76-78.  
[9] 李燕婧,钟正贤,卢文杰.小槐花醇提物药理作用研究[J].云南中医中药杂志,2013,34(5):64-65.  
[10] 李晓斌,陈振斌,杨畅,等.响应面分析法优化槐叶中黄酮类化合物的提取工艺[J].中国药房,2015,26(7):960-964.  
[11] 罗旭东,李成义,李俊岳,等.当归叶总黄酮提取工艺优化[J].辽宁中医杂志,2018,45(7):1456-1459.  
[12] 刘磊磊,李秀娜,赵帅.双水相萃取在中药活性成分提取分离中的应用进展[J].中草药,2015,46(5):766-773.  
[13] 何自强,张惠玲,苏天明.响应面法优化超声波辅助乙醇-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>双水相提取红景天苷[J].天然产物研究与开发,2018,30(7):1257-1265.  
[14] 宋力飞,刘常青,李曼莎,等.星点设计-响应面法优化黄芩双水相萃取工艺[J].中成药,2017,39(1):71-75.  
[15] 张琳,周欣,赵凤平,等.乙醇-硫酸铵双水相提取陈皮黄酮工艺的优化[J].中成药,2018,40(7):1510-1514.  
[16] 赵立辉,武文洁,杨昱涵.双水相系统纯化山楂叶黄酮类物质的研究[J].天然产物研究与开发,2009,21(5):849-853.  
[17] 邢东旭,廖森泰,李庆荣,等.僵蚕总黄酮超声提取工艺的优化[J].中成药,2017,39(8):1727-1730.  
[18] 朱红菊,丁玉,贾亚伟,等.桔皮中橙皮苷的新型双水相萃取[J].食品与生物技术学报,2013,32(9):995-1001.  
[19] 肖星辉,张向前,李桂芳,等.双水相萃取荒漠肉苁蓉总黄酮及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2017,38(16):5-9.  
[20] 陈丽娟,柳福智,岳强兵.正交试验法优化微波协同双水相提取甘草中总黄酮的工艺[J].中国药房,2016,27(4):525-528.  
[21] 刘绍鹏,宗志敏,魏晴,等.双水相体系中成相及有机物分配机理的初步研究[J].化工时刊,2010,24(12):21-24.  
[22] 李挺,曹学丽,董银卯.双水相体系逆流色谱技术在蛋白质分离中的应用[J].中国生物工程杂志,2006,26(2):83-88.

(收稿日期:2019-08-07 修回日期:2020-02-07)

(编辑:张元媛)