

Box-Behnken 响应面法结合多指标综合评分法优化龙眼叶提取工艺^Δ

黄光强^{1*}, 郑飘雪¹, 梁洁^{1,2,3,4,5#}, 陈奎奎¹, 曹玉嫔¹, 胡珏¹, 安施佳¹, 梁晶春¹, 刘星晨¹, 朱晓峰^{5#} (1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2. 广西壮瑶药工程技术研究中心, 南宁 530200; 3. 广西优势中成药与民族药开发工程技术研究中心, 南宁 530200; 4. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心华南分中心, 南宁 530200; 5. 暨南大学中医学院, 广州 510632)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)14-1688-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.14.05



摘要 目的 根据黄酮类和酚酸类成分优化龙眼叶的提取工艺。方法 采用高效液相色谱法同时测定龙眼叶中没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚的含量。在单因素实验的基础上,以乙醇体积分数、料液比、提取时间为考察因素,上述6种成分含量的综合评分为考察指标,采用Box-Behnken响应面法优化龙眼叶的提取工艺。结果 龙眼叶的最优提取工艺为乙醇体积分数100%,料液比1:7(g/mL),提取时间90 min,提取温度80℃。经3次实验验证,所得平均综合评分为97.54分(RSD=0.33%,n=3),与预测综合评分(99.05分)的相对误差为1.55%。结论 Box-Behnken响应面法结合多指标综合评分法可用于龙眼叶的提取工艺优化,且所得最优提取工艺稳定、可行。

关键词 龙眼叶;Box-Behnken响应面法;综合评分;提取工艺;高效液相色谱法;含量测定

Optimization of the extraction technology of the leaves of *Dimocarpus longan* by Box-Behnken response surface methodology combined with multi-index comprehensive score

HUANG Guangqiang¹, ZHENG Piaoxue¹, LIANG Jie^{1,2,3,4,5}, CHEN Kuikui¹, CAO Yupin¹, HU Jue¹, AN Shijia¹, LIANG Jingchun¹, LIU Xingchen¹, ZHU Xiaofeng⁵ (1. School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Zhuang Yao Medicine Center of Engineering and Technology, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Superior Chinese Patent Medicine and Ethnic Medicine Development Engineering Technology Center, Nanning 530200, China; 4. South China Branch of National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of Traditional Chinese Medicine Solid Preparation, Nanning 530200, China; 5. School of TCM, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the extraction technology of the leaves of *Dimocarpus longan* according to flavonoids and phenolic acids. **METHODS** The contents of gallic acid, protocatechuic acid, ethyl gallate, quercetin, luteolin and kaempferol in the leaves of *D. longan* were determined by HPLC. Based on single factor test, with the ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and extraction time as factors, using comprehensive scores of the contents of above six components as indexes, the extraction technology of the leaves of *D. longan* was optimized by Box-Behnken response surface methodology. **RESULTS** The optimal extraction technology included ethanol volume fraction of 100%, solid-liquid ratio of 1:7 (g/mL), extraction time of 90 min, extraction temperature of 80℃. After 3 times of validation tests, the average comprehensive score was 97.54 (RSD=0.33%, n=3), relative error of which with predicted score (99.05) was 1.55%. **CONCLUSIONS** Box-Behnken response surface methodology combined with multi-index comprehensive score can be used for the extraction technology of the leaves of *D. longan*, and the optimized extraction technology is stable and feasible.

Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.82160771);广西科技计划项目(No.桂科AD20238058);广西教育厅广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目(No.桂教人[2019]5号);广西第八批自治区特聘专家项目(No.桂人才通字[2019]13号);广西研究生教育创新计划项目(No.YCSW2021227)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药及民族药质量控制。电话:0771-4953513。E-mail:443773694@qq.com

#a 通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药民族药药效物质基础与质量标准。电话:0771-4953513。E-mail:liangjie1101@126.com

#b 通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:内分泌代谢病的基础和临床。E-mail:81187251@qq.com

KEYWORDS leaves of *Dimocarpus longan*; Box-Behnken response surface methodology; comprehensive score; extraction technology; HPLC; content determination

龙眼叶为无患子科龙眼属植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour.的叶或嫩芽,味甘淡、性平,具有解表清热、解毒利湿等功效^[1]。龙眼叶作为广西民间常用中药,分布广泛且资源丰富。有研究表明,龙眼叶具有降血糖、抗氧化等作用^[2-4]。本课题组前期证实,龙眼叶主要含有没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、山柰酚、木犀草

素、槲皮素、槲皮苷和紫云英苷等成分^[5-6]。其中,没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚可通过抑制 α -葡萄糖苷酶的活性,而发挥降血糖的作用^[5];没食子酸和原儿茶酸等酚酸类成分具有抗氧化活性^[7-9]。这表明龙眼叶的活性成分为黄酮类和酚酸类成分。虽然本课题组前期已测定了龙眼叶中黄酮类成分的含量,但指标成分主要为槲皮素、木犀草素、山柰酚等成分^[10],单一指标并不能系统全面地反映龙眼叶的质量。因此以黄酮类和酚酸类成分作为考核指标,可以对龙眼叶提取工艺进行更全面的评价。

Box-Behnken 响应面法能直观反映各影响因素之间的交互关系,可对多因素、多水平结果进行分析,具有实验次数相对较少、检测精确度高等优点^[11];同时其可通过对各因素的显著性及相互作用进行分析,确定工艺条件的最佳组合^[12]。目前,有关龙眼叶提取工艺的研究较少,主要为龙眼叶中总黄酮的提取工艺研究^[13-14]。基于此,在前期研究的基础上^[15],本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法同时测定了龙眼叶中没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚的含量;同时以乙醇体积分数、料液比、提取时间为考察因素,上述6种成分含量的综合评分为考察指标,采用Box-Behnken 响应面法优化龙眼叶的提取工艺,旨在为龙眼叶的综合评价及资源开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 LC 2030 型 Plus HPLC 仪(日本 Shimadzu 公司),SQP 型万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],XMTD-7000 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司),DZG-303A 型超纯水仪(重庆颐洋企业发展有限公司),H1650-W 型离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸对照品(批号 RP1911126,纯度 99.99%)、原儿茶酸对照品(批号 RP190605,纯度 99.99%)、没食子酸乙酯对照品(批号 RP200120,纯度 99.85%)、槲皮素对照品(批号 RP200602,纯度 99.25%)、木犀草素对照品(批号 RP191106,纯度 98.66%)、山柰酚对照品(批号 RP200312,纯度 99.83%)均购自成都麦德生科技有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

8 批龙眼叶药材(编号 S1~S8)于 2019 年 11 月采集

于广西不同产地,经广西中医药大学药学院滕建北教授鉴定为无患子科植物龙眼 *D. longan* Lour. 的叶。8 批龙眼叶药材来源信息见表 1。

表 1 8 批龙眼叶药材来源信息

编号	产地	采集时间	批号	编号	产地	采集时间	批号
S1	广西贺州	2019年11月	20191101	S5	广西南宁	2019年11月	20191105
S2	广西柳州	2019年11月	20191102	S6	广西梧州	2019年11月	20191106
S3	广西梧州	2019年11月	20191103	S7	广西平南	2019年11月	20191107
S4	广西钦州	2019年11月	20191104	S8	广西北海	2019年11月	20191108

2 方法与结果

2.1 没食子酸等成分的含量测定

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚对照品适量,用甲醇溶解并定容,制成上述各成分质量浓度分别为 204.00、17.46、21.30、235.40、6.30、65.70 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

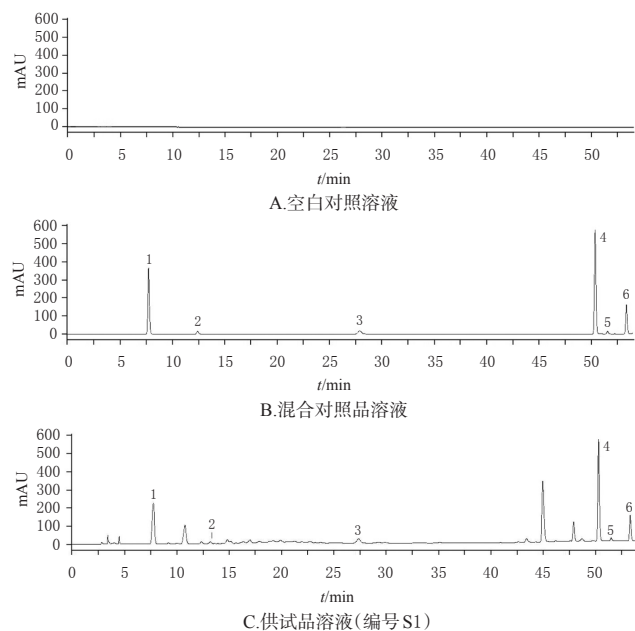
2.1.2 供试品溶液的制备 取龙眼叶药材粉末 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入乙醇-盐酸(体积比为 9:1,下同)16 mL^[3],称定质量,水浴提取 90 min,放冷,再次称定质量,用乙醇-盐酸补足减失的质量,于 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 色谱条件 以 InertSustain C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~14 min, 10% A \rightarrow 26% A; 14~26 min, 26% A \rightarrow 28% A; 26~38 min, 28% A \rightarrow 40% A; 38~54 min, 40% A \rightarrow 75% A);检测波长为 280 nm(没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯)、360 nm(槲皮素、木犀草素、山柰酚);流速为 1.0 mL/min;柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 5 μL 。

2.1.4 系统适用性试验 取上述混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液(甲醇)适量,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。由图 1 可知,各色谱峰的分离度均大于 1.5,理论板数均不低于 5 000,空白对照溶液不干扰测定。

2.1.5 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μL ,按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以各待测成分的进样量为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。结果见表 2。

2.1.6 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚峰面积的 RSD 分别为 0.10%、0.27%、0.52%、0.16%、0.32%、0.11% ($n=6$),表明仪器精密度良好。



1:没食子酸;2:原儿茶酸;3:没食子酸乙酯;4:槲皮素;5:木犀草素;6:山柰酚

图1 6种成分的混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液的HPLC图

表2 6种成分的回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
没食子酸	$Y=3\ 493\ 591.67x+34\ 087.13$	0.999 9	0.204 00~2.040 00
原儿茶酸	$Y=1\ 938\ 971.67x+939.74$	0.999 9	0.017 64~0.176 40
没食子酸乙酯	$Y=3\ 417\ 482.56x+1\ 102.37$	0.999 9	0.023 10~0.231 00
槲皮素	$Y=4\ 854\ 122.23x+63\ 373.99$	0.999 9	0.235 40~2.354 00
木犀草素	$Y=4\ 740\ 542.52x+188.29$	0.999 9	0.006 30~0.063 00
山柰酚	$Y=4\ 707\ 855.78x+12\ 004.66$	0.999 9	0.065 70~0.657 00

2.1.7 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液(编号S1),分别于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚峰面积的RSD分别为0.35%、1.01%、1.86%、0.15%、0.97%、0.11% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.8 重复性试验 取龙眼叶药材(编号S1),共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚含量的RSD分别为1.77%、1.62%、2.29%、1.50%、1.26%、1.23% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 取已知含量的龙眼叶药材(编号S1),每份约1 g,共6份,精密称定,分别精密加入没食子酸对照品1.452 0 mg、原儿茶酸对照品0.162 8 mg、没食子酸乙酯对照品0.188 6 mg、槲皮素对照品1.764 0 mg、木犀草素对照品0.050 0 mg和山柰酚对照品0.455 8

mg,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率。结果见表3。

表3 6种成分的加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	样品量/	已知量/	加入量/	测得量/	加样回收率/	平均加样回收率/	RSD/
	g	mg	mg	mg	%		
没食子酸	1.005 0	1.451 3	1.452 0	2.832 1	95.10	96.55	1.55
	1.006 8	1.453 9	1.452 0	2.878 8	98.13		
	1.005 2	1.451 5	1.452 0	2.872 5	97.87		
	1.005 5	1.452 0	1.452 0	2.837 6	95.43		
	1.005 3	1.451 7	1.452 0	2.832 1	95.07		
	1.005 6	1.452 1	1.452 0	2.871 0	97.72		
原儿茶酸	1.005 0	0.164 1	0.162 8	0.326 2	99.57	99.08	1.30
	1.006 8	0.164 4	0.162 8	0.325 7	99.08		
	1.005 2	0.164 1	0.162 8	0.324 8	98.71		
	1.005 5	0.164 2	0.162 8	0.321 7	96.74		
	1.005 3	0.164 2	0.162 8	0.327 3	100.18		
	1.005 6	0.164 2	0.162 8	0.327 3	100.18		
没食子酸乙酯	1.005 0	0.183 6	0.188 6	0.374 9	101.43	102.20	0.75
	1.006 8	0.183 9	0.188 6	0.375 9	101.80		
	1.005 2	0.183 7	0.188 6	0.378 3	103.18		
	1.005 5	0.183 7	0.188 6	0.377 3	102.65		
	1.005 3	0.183 7	0.188 6	0.374 9	101.38		
	1.005 6	0.183 7	0.188 6	0.377 5	102.76		
槲皮素	1.005 0	1.783 8	1.764 0	3.505 1	97.58	99.84	2.35
	1.006 8	1.787 0	1.764 0	3.591 5	102.30		
	1.005 2	1.784 2	1.764 0	3.599 6	102.91		
	1.005 5	1.784 7	1.764 0	3.524 2	98.61		
	1.005 3	1.784 4	1.764 0	3.505 1	97.55		
	1.005 6	1.784 9	1.764 0	3.550 2	100.07		
木犀草素	1.005 0	0.049 5	0.050 0	0.100 3	101.60	101.57	0.80
	1.006 8	0.049 6	0.050 0	0.100 7	102.20		
	1.005 2	0.049 5	0.050 0	0.100 5	102.00		
	1.005 5	0.049 5	0.050 0	0.099 5	100.00		
	1.005 3	0.049 5	0.050 0	0.100 3	101.60		
	1.005 6	0.049 5	0.050 0	0.100 5	102.00		
山柰酚	1.005 0	0.457 3	0.455 8	0.916 4	100.72	102.72	1.66
	1.006 8	0.458 1	0.455 8	0.934 0	104.41		
	1.005 2	0.457 4	0.455 8	0.929 6	103.60		
	1.005 5	0.457 5	0.455 8	0.924 5	102.46		
	1.005 3	0.457 4	0.455 8	0.916 4	100.70		
	1.005 6	0.457 6	0.455 8	0.933 5	104.41		

2.2 没食子酸等成分的提取方法选择

取龙眼叶药材(编号S1)2 g,精密称定,加入乙醇-盐液10 mL,分别考察不同提取方法(水浴提取法、超声提取法和回流提取法)对没食子酸等6种成分含量的影响。结果显示,超声提取法中没食子酸等6种成分的总含量低于水浴提取法和回流提取法结果,且水浴提取法中没食子酸、槲皮素的含量较高,其他成分的含量相差不大,综合考虑选择水浴提取法。结果见表4。

2.3 综合评分计算公式的确定

根据表4结果,按含量高低分别赋予各指标成分权重系数。水浴提取法中没食子酸等6种成分的总含量为5.002 0 mg/g,其中没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚的含量分别占总含量的30.10%、3.22%、21.24%、35.12%、1.72%、8.61%,因此

表4 不同提取方法对6种成分含量的影响(n=3, mg/g)

待测成分	水浴提取法	超声提取法	回流提取法
没食子酸	1.505 4	0.676 6	1.640 6
原儿茶酸	0.161 1	0.123 5	0.150 7
没食子酸乙酯	1.062 5	0.183 5	0.813 2
槲皮素	1.756 6	1.575 5	1.823 6
木犀草素	0.085 9	0.038 6	0.082 6
山柰酚	0.430 5	0.415 2	0.447 3
总含量	5.002 0	3.012 9	4.958 0

将权重系数设置4个梯度:没食子酸和槲皮素的含量较高,权重系数设置为30%;没食子酸乙酯的含量居中,权重系数设置为20%;山柰酚的含量其次,权重系数设置为10%;原儿茶酸和木犀草素的含量最低,权重系数设置为5%。据此得到实际综合评分(Y)= $\sum DiJ \times$ 权重系数^[16-17],即 $Y = DiJ_{\text{没食子酸}} \times 30\% \times 100 + DiJ_{\text{原儿茶酸}} \times 5\% \times 100 + DiJ_{\text{没食子酸乙酯}} \times 20\% \times 100 + DiJ_{\text{槲皮素}} \times 30\% \times 100 + DiJ_{\text{木犀草素}} \times 5\% \times 100 + DiJ_{\text{山柰酚}} \times 10\% \times 100$ ^[17],式中DiJ表示某指标的含量。

2.4 单因素实验

2.4.1 乙醇体积分数 取龙眼叶药材(编号S1),每份约2 g,共7份,精密称定,分别加入不同体积分数的乙醇(50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇)各10 mL,于80℃水浴提取50 min,考察不同乙醇体积分数对综合评分的影响。结果显示,当乙醇体积分数为100%(无水乙醇)时,综合评分最高,故选择乙醇体积分数为80%~100%进行后续实验。结果见图2A。

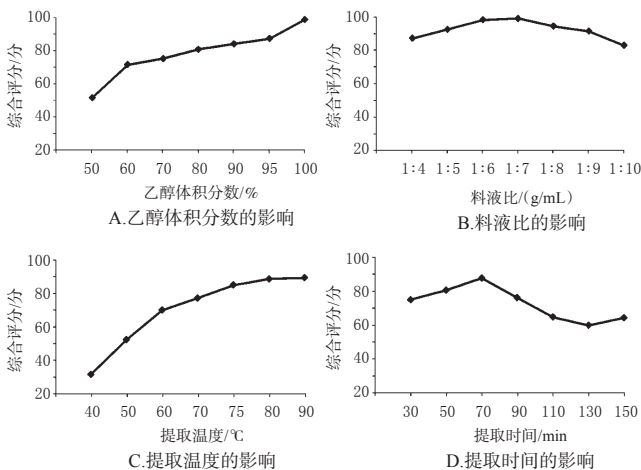


图2 乙醇体积分数等因素对综合评分的影响

2.4.2 料液比 取龙眼叶药材(编号S1),每份约2 g,共7份,精密称定,分别按不同料液比(1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10, g/mL)加入无水乙醇,于80℃水浴提取50 min,考察不同料液比对综合评分的影响。结果显示,当料液比为1:7时,综合评分最高,故选择料液比为1:4~1:10进行后续实验。结果见图2B。

2.4.3 提取温度 取龙眼叶药材(编号S1),每份约2 g,共7份,精密称定,加入无水乙醇14 mL,于不同水浴提取温度(40、50、60、70、75、80、90℃)提取50 min,考察不同水浴提取温度对综合评分的影响。结果显示,虽然提取温度为90℃时的综合评分最高,但与80℃时的综合评分相差不大。从节约能源考虑,故选择提取温度为80℃。结果见图2C。

2.4.4 提取时间 取龙眼叶药材(编号S1),每份约2 g,共7份,精密称定,加入无水乙醇14 mL,于80℃水浴分别提取不同时间(30、50、70、90、110、130、150 min),考察不同提取时间对综合评分的影响。结果显示,当提取时间为70 min时,综合评分最高,故选择提取时间为50~90 min进行后续实验。结果见图2D。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化龙眼叶的提取工艺

2.5.1 实验设计与结果 根据Box-Behnken响应面法的设计原理^[18]及单因素实验结果,以乙醇体积分数(A)、料液比(B)、提取时间(C)为考察因素,以综合评分(Y)为考察指标对龙眼叶的提取工艺进行优化。Box-Behnken响应面法优化龙眼叶提取工艺的因素与水平见表5,实验设计方案与结果见表6。

表5 Box-Behnken 响应面法优化龙眼叶提取工艺的因素与水平

水平	A/%	B/(g/mL)	C/min
-1	80	1:4	50
0	90	1:7	70
1	100	1:10	90

表6 Box-Behnken 响应面法优化龙眼叶提取工艺的实验设计方案与结果

实验号	水平			Y/分	
	A	B	C	实际值	理论值
1	-1	-1	0	41.92	41.15
2	1	-1	0	67.77	67.23
3	-1	1	0	66.49	67.03
4	1	1	0	87.44	88.21
5	-1	0	-1	64.72	64.47
6	1	0	-1	85.80	85.32
7	-1	0	1	70.79	71.27
8	1	0	1	97.44	97.69
9	0	-1	-1	42.60	43.62
10	0	1	-1	72.01	71.72
11	0	-1	1	57.57	57.86
12	0	1	1	77.65	77.63
13	0	0	0	71.55	73.07
14	0	0	0	74.30	73.07
15	0	0	0	74.04	73.07
16	0	0	0	72.00	73.07
17	0	0	0	73.45	73.07

2.5.2 模型建立与方差分析 采用Design-expert 8.0.6软件对表6中的数据进行多元回归拟合,得二次多项回归方程为 $Y = 73.07 + 11.82 \times A + 11.72 \times B + 4.79 \times C - 1.22 \times$

$AB+1.39\times AC-2.33\times BC+5.03\times A^2-12.20\times B^2+1.59\times C^2$ 。方差分析结果显示,所建模型有显著性差异($P<0.01$),表明该模型的可信度较高;模型的失拟项无显著性差异($P>0.05$),表明可以用此模型进行分析和预测。决定系数(R^2)为0.996 6,表明该模型拟合度较好,实验的误差较小。因素 A 、 B 、 C 、 BC 、 A^2 、 B^2 、 C^2 的影响显著($P<0.05$),因素 AB 、 AC 的影响不显著($P>0.05$)。结果见表7。

表7 Box-Behnken 响应面法优化龙眼叶提取工艺回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	3 147.97	9	349.77	229.72	
A	1 116.99	1	1 116.99	733.61	<0.000 1
B	1 098.16	1	1 098.16	721.25	<0.000 1
C	183.55	1	183.55	120.55	<0.000 1
AB	6.00	1	6.00	3.94	0.087 5
AC	7.76	1	7.76	5.09	0.058 6
BC	21.76	1	21.76	14.29	0.006 9
A^2	106.68	1	106.68	70.06	<0.000 1
B^2	626.34	1	626.34	411.36	<0.000 1
C^2	10.59	1	10.59	6.96	0.033 5
残差	10.66	7	1.52		
失拟项	4.60	3	1.53	1.01	0.474 1
纯误差	6.05	4			
总误差	3 158.63	16			

2.5.3 各因素交互作用 利用 Design-expert 8.0.6 软件绘制各因素的响应面图。当固定其中某一因素时,可以分析其余任意2个因素交互作用对综合评分的影响,响应面的曲面越陡峭,表示因素交互作用越明显^[18]。结果显示,因素 B 与因素 C 的交互作用显著,因素 A 与因素 B 、因素 A 与因素 C 的交互作用均不显著。结果见图3。

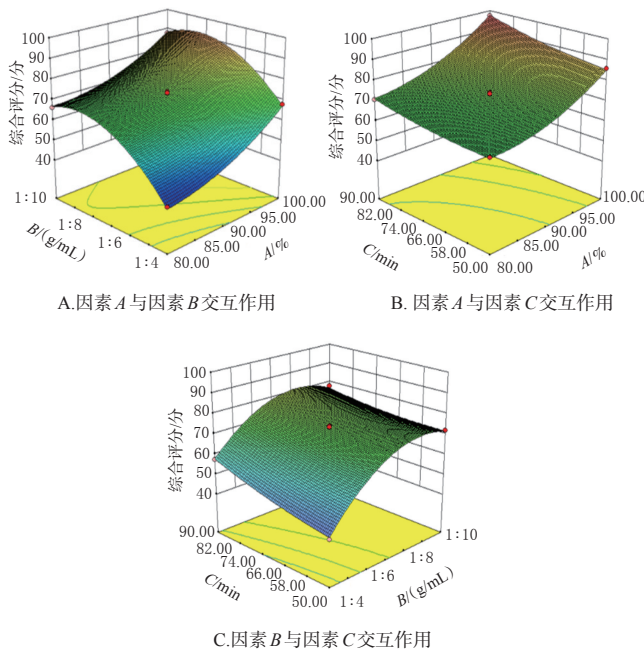


图3 各因素交互作用对综合评分的响应面图

2.5.4 最优提取工艺的确定及验证 利用 Design-expert 8.0.6 软件得到龙眼叶的最优提取工艺为 $A_3B_2C_3$, 即乙醇体积分数 100%, 料液比 1:7 (g/mL), 提取时间 90 min, 提取温度 80 ℃。在此最优提取工艺条件下进行 3 次实验验证(以编号 S1 样品验证)。结果显示,没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯、槲皮素、木犀草素和山柰酚的平均含量分别为 1.493 6、0.084 4、0.291 7、2.061 6、0.048 7、0.518 0 mg/g, 平均综合评分为 97.54 分($RSD=0.33\%$, $n=3$), 与预测综合评分(99.05 分)的相对误差为 1.55%, 表明优化所得工艺稳定、可行。结果见表 8。

表8 最优提取工艺的实验验证结果($n=3$)

实验号	没食子酸/(mg/g)	原儿茶酸/(mg/g)	没食子酸乙酯/(mg/g)	槲皮素/(mg/g)	木犀草素/(mg/g)	山柰酚/(mg/g)	综合评分/分	RSD/%
1	1.499 6	0.092 4	0.290 5	2.075 1	0.049 0	0.520 7	97.88	
2	1.488 4	0.084 5	0.291 3	2.050 8	0.048 5	0.516 0	97.49	0.33
3	1.492 9	0.076 3	0.293 4	2.059 0	0.048 5	0.517 5	97.25	
平均值	1.493 6	0.084 4	0.291 7	2.061 6	0.048 7	0.518 0	97.54	

2.5.5 样品含量测定 取 8 批龙眼叶药材粗粉约 2 g, 精密称定, 按最优提取工艺制备供试品溶液, 再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并按外标法计算样品含量。每样品平行测定 3 次。结果见表 9。

表9 8批龙眼叶药材中6种成分的含量测定结果($n=3$, mg/g)

编号	没食子酸	原儿茶酸	没食子酸乙酯	槲皮素	木犀草素	山柰酚
S1	1.502 6	0.087 4	0.278 5	2.074 3	0.049 4	0.522 7
S2	1.383 4	0.148 1	0.113 4	1.944 3	0.025 8	0.470 6
S3	1.092 7	0.157 8	0.112 8	1.590 9	0.009 4	0.318 0
S4	1.629 2	0.138 1	0.160 9	1.933 3	0.010 6	0.401 6
S5	1.370 3	0.093 6	0.141 9	2.412 0	0.028 9	0.565 9
S6	1.272 0	0.112 5	0.099 6	1.333 0	0.017 2	0.347 1
S7	1.003 7	0.143 5	0.080 2	2.220 9	0.013 8	0.572 8
S8	1.208 0	0.090 4	0.082 7	0.851 5	0.009 4	0.135 5
平均值	1.307 7	0.121 4	0.133 8	1.795 0	0.020 6	0.416 8

3 讨论

参考相关文献及本课题组前期研究发现,没食子酸、原儿茶酸、没食子酸乙酯在 280 nm 波长处有较强的紫外吸收,且干扰较少;槲皮素、木犀草素、山柰酚在 360 nm 波长处吸收较强^[15,19],故本研究采用双波长切换法(280 nm 波长处测定没食子酸、原儿茶酸和没食子酸乙酯,360 nm 波长处测定槲皮素、木犀草素和山柰酚)同时测定龙眼叶中没食子酸等 6 种成分的含量。

本研究结果显示,采用超声提取法时,没食子酸等 6 种成分的总含量低于回流提取法和水浴提取法;进一步对比回流提取法和水浴提取法后发现,采用水浴提取法时,没食子酸、槲皮素的含量较高,其他 4 种成分的含量相差不大。同时,考虑到回流提取法的装置复杂且操作繁琐,故选择水浴提取法。此外,本研究还考察了甲醇、

乙醇、甲醇-盐酸、乙醇-盐酸等不同提取溶剂对没食子酸等6种成分含量及色谱图的影响,结果发现,以乙醇-盐酸为提取溶剂时,没食子酸等6种成分均能完全出峰且色谱图基线平稳,干扰较小,故选择乙醇-盐酸为提取溶剂。

本研究得到的龙眼叶最优提取工艺为乙醇体积分数100%,料液比1:7(g/mL),提取时间90 min,提取温度80℃。经验证,没食子酸等6种成分的平均综合评分为97.54分,与预测综合评分(99.05分)的相对误差为1.55%;表明所得提取工艺稳定、可行,可用于龙眼叶提取工艺的优化。

综上所述,Box-Behnken响应面法结合多指标综合评分法可用于龙眼叶的提取工艺优化,且所得最优提取工艺稳定、可行。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:13卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:112.
- [2] 叶迪.微生物发酵对龙眼叶陈化影响及龙眼叶降结石效果的研究[D].广州:华南农业大学,2016.
- [3] 梁洁,滕建北,柳贤福,等.龙眼叶化学成分预试研究[J].中国民族民间医药,2010,19(4):142-143.
- [4] 梁洁,麦嘉妮,徐晖,等.龙眼叶抗氧化和抑制 α -葡萄糖苷酶活性的谱效关系研究[J].中药材,2019,42(6):1328-1333.
- [5] 黄春燕.龙眼叶降血糖活性成分及指纹图谱的研究[D].南宁:广西中医药大学,2018.
- [6] 黄光强,梁洁,韦金玉,等.基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的龙眼叶降血糖有效部位化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(6):127-138.
- [7] 施树云,郭柯柯,彭胜,等. DPPH-HPLC-QTOF-MS/MS快速筛选和鉴定杜仲黑茶中抗氧化活性成分[J].天然产物研究与开发,2018,30(11):1913-1917.
- [8] 谢晓艳,刘洪涛,张吉,等.没食子酸体外抗氧化作用研究[J].重庆医科大学学报,2011,36(3):319-322.
- [9] 肖艳华,徐卓,杜治平.青钱柳化学成分及抗氧化活性研究[J].食品科技,2019,44(10):223-228.
- [10] MAI J N, LIANG J, LIU X F, et al. Simultaneous determination of 5 components in the leaves of *Dimocarpus longan* by quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS) based on UPLC and HPLC[J]. J Anal Methods Chem, 2020, 2020:3950609.
- [11] 金青青,梁洁,徐晖,等. Box-Behnken响应面法优化龙眼叶总黄酮提取工艺[J].辽宁中医杂志,2017,44(12):2599-2601,2702.
- [12] 郑威,于雪飞,王亚立,等.响应面法优化超声辅助提取龙眼叶总黄酮的工艺研究[J].中国调味品,2018,43(8):4-9.
- [13] 马思楠,李欠,陈玉莹,等.紫花前胡的提取工艺优化研究[J].中国野生植物资源,2021,40(1):48-53,59.
- [14] 栗焕焕,毛营营,张国琴,等.响应面分析法优化吴茱萸提取工艺及多指标定量指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2020,35(11):5716-5720.
- [15] 梁洁,黄春燕,麦嘉妮,等.多指标综合评分法优选不同产地龙眼叶的提取工艺[J].中药材,2018,41(7):1694-1697.
- [16] 袁蒙蒙,阴美华,唐志书,等. Box-Behnken响应面法优化制远志与蜜远志的炮制工艺[J].中南药学,2021,19(7):1310-1315.
- [17] 王玲娇,郝玉佩,刘坤申,等. Box-Behnken响应面法结合多指标综合评分法优选柴胡安心胶囊的水提工艺[J].中国药房,2019,30(5):632-637.
- [18] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [19] 王如意,刘纲勇,梁晓欣,等. HPLC法同时测定野老鹤草中5种活性成分的含量[J].中国药房,2016,27(21):2972-2975.

(收稿日期:2021-10-10 修回日期:2022-06-09)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅