

响应面优化提取向日葵列当中苯乙醇苷的工艺研究

吕佳佳^{1,2}, 张 勇¹, 戴余军^{1*}, 江 芹¹, 魏帅润喆¹, 蔡树龙¹, 殷 晓¹

(1. 湖北工程学院 湖北省植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖北 孝感 432000;

2. 湖北大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430062)

摘 要:以向日葵列当全草为原料, 采用响应面优化乙醇加热回流法从向日葵列当中提取苯乙醇苷。以苯乙醇苷得率为评价指标, 通过单因素试验设计, 考察了溶剂质量分数、提取温度、提取时间、液固比和提取次数对苯乙醇苷提取效果的影响, 并选用 Central Composite Design 响应面设计法分析建立了溶剂质量分数、提取温度、提取时间和液固比的二次多项式回归模型, 优化提取工艺。结果表明, 乙醇加热回流法提取向日葵列当中苯乙醇苷的最佳工艺参数为: 溶剂质量分数为 55%, 提取温度为 85 ℃, 提取时间为 90 min, 液固比为 30:1 (mL/g), 提取 4 次。在此条件下, 苯乙醇苷得率可达 10.223%, 与模型预测值 10.117% 相当, 建立的模型真实可靠。该提取方法简单高效, 有利于向日葵列当资源的开发利用。

关键词: 向日葵列当; 苯乙醇苷; 乙醇加热回流法; 响应面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-4824(2021)06-0005-07

向日葵列当 (*Orobanchae cumana* Wallr.) 俗称独根草、兔子拐棍, 为列当科 (Orobanchaceae) 列当属 (*Orobanchae*) 一年生全寄生性草本植物, 在我国分布很广, 主要分布于河北、北京、新疆、山西、内蒙古、黑龙江、辽宁、吉林等省 (自治区、直辖市)^[1-2]。列当属多种植物在我国部分地区民间已作为药用, 其全草可入药, 具有强筋壮骨、壮阳补肾、延缓衰老、改善脑组织循环、增强免疫等功效^[3-4]。其主要的活性成分为苯乙醇苷 (phenylethanoid glycosides, PhGs), 是一类由咖啡酸、苯乙醇苷元和糖基组成的天然化合物, 其结构特征主要是以 β -葡萄糖为母核的并含有酯键及氧苷键, 羟基和甲氧基连于苯乙基上, 中心葡萄糖基上常连有乙酰基和咖啡酰基^[5], 其结构式见图 1。现代药理研究表明, 苯乙醇苷类化合物在抗菌、抗炎、抗氧化、抗病毒、增强免疫力等方面发挥着重要的作用^[6-12]。向日葵列当是一种专化性较强的

寄生性杂草, 由于其自身没有叶绿素, 不能进行光合作用, 得完全靠从寄主向日葵根部吸取营养而存活, 从而影响向日葵的产量和品质^[13-15]。所以长期以来, 向日葵列当一直被当作农田杂草进行防治根除, 其药用价值被长期忽视。

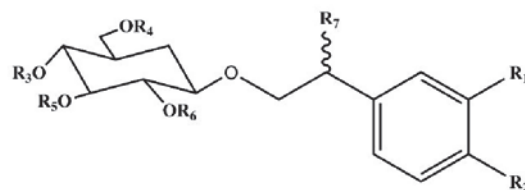


图 1 苯乙醇苷基本结构

本研究以向日葵列当全草为原料, 采用乙醇加热回流法提取向日葵列当中苯乙醇苷, 在单因素的试验结果的基础上, 利用响应面法对其工艺条件进行优化, 以期对向日葵列当药用资源的开发利用奠定基础。

收稿日期: 2021-09-06

基金项目: 湖北省技术创新专项 (2018ABA098); 国家自然科学基金 (31700069)

作者简介: 吕佳佳 (1995-), 男, 湖北黄冈人, 湖北大学生命科学学院硕士研究生。

戴余军 (1972-), 女, 湖北天门人, 湖北工程学院湖北省植物功能成分利用工程技术研究中心教授, 硕士, 本文通信作者。

1 实验方法

1.1 仪器与试剂

T9CS 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); HH-6 型数显恒温水浴锅(常州市亿能实验仪器厂); GTR16-2 型高速冷冻离心机(北京时代北利离心机有限公司); PTX-JA2105 电子天平(华志电子科技有限公司); 超纯水(Milli-Q 纯水系统, 武汉优普纯水设备有限公司)。向日葵列当于 2020 年 9 月购自内蒙古商都县; 毛蕊花糖苷标准品(CAS No.: 61276-17-3, 批号: M01101910014, HPLC > 99%) 购自北京中科质检生物技术有限公司; 甲醇(色谱级)和乙醇(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 苯乙醇苷的提取

1.2.1 原料预处理

将一定量向日葵列当洗净后, 置 60 ℃ 干燥箱烘干, 于多功能粉碎机中粉碎, 过 60 目筛(0.25 mm 孔径), 密封冷藏备用。

1.2.2 提取工艺流程

向日葵列当粉与一定体积分数的乙醇配制成一定液固比→在一定温度下加热回流一定时间→离心(转速 5000 r/min, 15 min)→滤渣重复浸提一定次数→合并滤液, 得到待测样品溶液。

1.2.3 最大吸收波长的确定

精密量取适量标准品、样品溶液, 于 200 ~ 800 nm 处进行全波长扫描。

1.2.4 样品中苯乙醇苷含量的测定

本研究采用紫外分光光度法测定向日葵列当中苯乙醇苷含量^[16]。用乙醇配制毛蕊花糖苷标准液(100 μg/mL), 精确吸取 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 mL 标准液并定容至 25 mL, 充分混匀。以 95% 乙醇为空白, 在 335 nm 下测定吸光度值, 以毛蕊花糖苷浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。回归方程为: $y = 0.0289x + 0.003$ ($R^2 = 0.9999$), 表明在 0 ~ 52 μg/mL 范围内毛蕊花糖苷浓度与吸光度值具有良好的线性关系。

样品溶液用 95% 乙醇溶液稀释至合适浓度, 测定 335 nm 处吸光度值, 计算样品中苯乙醇苷含量。苯乙醇苷得率的计算公式为:

$$Y(\%) = \frac{C \times V \times N \times 10^6}{M} \times 100\%$$

式中: Y 为苯乙醇苷得率(%), C 为样品溶液中苯

乙醇苷的含量(μg/mL), V 为样品溶液体积(mL), N 为稀释倍数, M 为样品质量(g)。

1.2.5 影响提取效果的因素试验

1) 单因素试验设计

分别对溶剂的种类(乙醇、甲醇、水)、溶剂质量分数(35%, 45%, 55%, 65%, 75%)、提取温度(35, 50, 65, 80, 85 ℃)、提取时间(30, 60, 90, 120, 150 min)、液固比(10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 (mL/g))、提取次数(1, 2, 3, 4, 5)进行单因素考察。

2) 响应面优化试验

在单因素试验结果的基础上, 根据响应面法 Central Composite Design 设计原理, 以单因素结果所选因素为自变量, 苯乙醇苷得率为响应值, 进行 4 因素 3 水平响应面试验, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行多元线性回归方程拟合, 检验模型, 根据模型进行响应值预测, 优化向日葵列当中苯乙醇苷的提取工艺条件, 并进行验证试验。

1.2.6 数据处理

所有试验均重复 3 次, 所得数据分别用 Excel 2016、Design-Expert 8.0.6 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 最大吸收波长的确定

由图 2 可知, 标准品和样品均在 335 nm 处有最大吸收峰, 故选择 335 nm 作为本试验苯乙醇苷的测定波长。

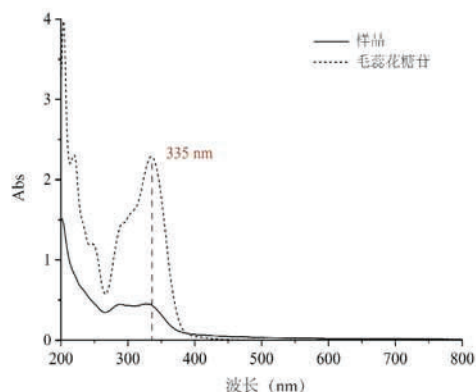


图 2 标准品和样品的扫描光谱图

2.2 单因素试验结果

2.2.1 溶剂的种类对苯乙醇苷提取效果的影响

不同的提取溶剂对苯乙醇苷提取效果的影响见图 3。由图 3 可知, 3 种不同溶剂提取苯乙醇苷得率分别为 9.23% (乙醇)、7.70% (甲醇) 和

4.31% (水), 由于乙醇具有低毒性、高渗透性和易挥发性等性质, 其在天然活性成分的提取中备受青睐。因此, 本研究选用乙醇作为后续实验提取剂。

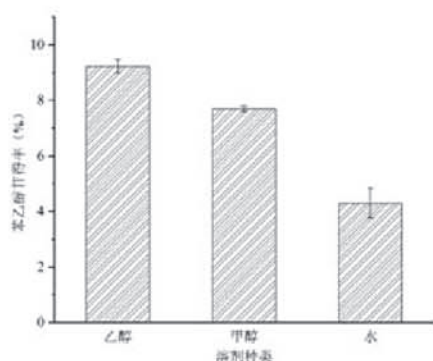


图3 溶剂种类对苯乙醇苷得率的影响

2.2.2 溶剂质量分数对苯乙醇苷提取效果的影响

不同溶剂质量分数对苯乙醇苷提取效果的影响见图4。由图4可知, 当溶剂质量分数在35%~55%时, 苯乙醇苷得率随溶剂质量分数的增大而增加, 当溶剂质量分数大于55%, 随着溶剂质量分数的增大, 苯乙醇苷得率反而下降, 这可能是较高的溶剂质量分数使苯乙醇苷的溶出率趋于饱和, 同时使其他醇溶性物质增多, 从而导致苯乙醇苷得率下降。因此选择最佳的溶剂质量分数为55%。

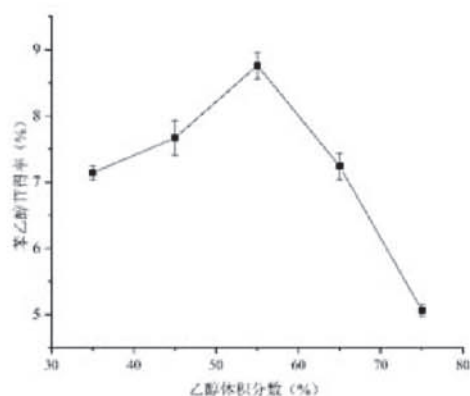


图4 溶剂质量分数对苯乙醇苷得率的影响

2.2.3 提取温度对苯乙醇苷提取效果的影响

温度的高低, 会影响苯乙醇苷分子之间的扩散速度。不同提取温度对苯乙醇苷提取效果的影响见图5。由图5可知, 随着提取温度的升高, 苯乙醇苷提取得率呈现先升高后降低的趋势, 在30~80℃时, 随提取温度的增加而升高, 当提取温度超过80℃后, 苯乙醇苷提取得率呈下降趋势, 这可能是由于过高的提取温度影响了苯乙醇苷的稳定性, 因此选择最佳的提取温度为80℃。

2.2.4 提取时间对苯乙醇苷提取效果的影响

时间因素是影响工业化产量周期的一个关键性因素, 因此常作为工业提取重要的因素考察。不同提取时间对苯乙醇苷提取效果的影响见图6。由图6可知, 随着提取时间的延长, 苯乙醇苷提取得率呈现先升高后急剧下降至基本稳定的趋势。在60 min时, 苯乙醇苷得率最高, 这可能是因为60 min前, 原料中的物质在提取溶剂中得到充分溶解。继续延长浸提时间, 开始急剧下降最后趋于稳定, 这可能是由浸提时间过长导致苯乙醇苷物质的活性发生改变, 且较长的时间也会大大影响工业化生产周期。因此选择最佳的提取时间为60 min。

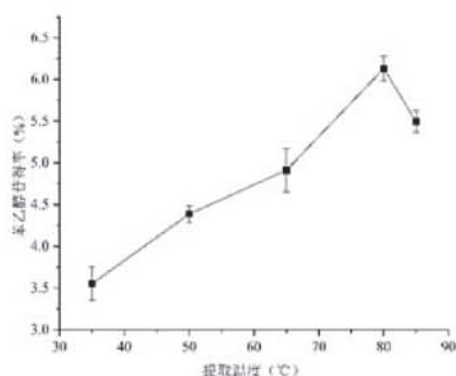


图5 提取温度对苯乙醇苷得率的影响

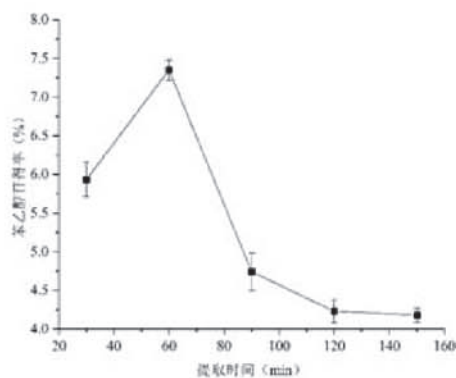


图6 提取时间对苯乙醇苷得率的影响

2.2.5 液固比对苯乙醇苷提取效果的影响

合适的液固比可以减少原料和试剂的消耗。不同液固比对苯乙醇苷提取效果的影响见图7。由图7可知, 随着液固比的增加, 苯乙醇苷提取得率随之增大, 当液固比为40:1 (mL/g)之后, 苯乙醇苷得率开始下降, 这可能是在苯乙醇苷提取的过程中, 需要一定的溶剂渗入原料的孔隙中, 进行溶解出苯乙醇苷, 当溶剂过多时, 溶解出的苯乙醇苷达到饱和后便开始稀释苯乙醇苷溶液, 进而导致苯乙醇苷得率降低。因此选择最佳的液固比为40:1 (mL/g)。

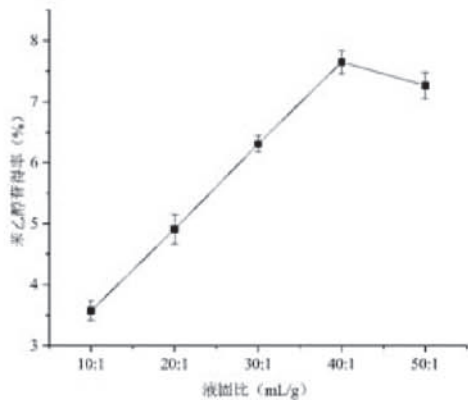


图7 液固比对苯乙醇苷得率的影响

2.2.6 提取次数对苯乙醇苷提取效果的影响

选择合适的提取次数,既可以最大限度获取苯乙醇苷,也可以在一定程度上节省时间,减少提取剂的浪费。不同提取次数对苯乙醇苷提取效果的影响见图8。由图8可知,随着提取次数的增加,苯乙醇苷提取得率随之增加,提取4次后,苯乙醇苷得率渐渐趋于稳定,说明在提取4次后,苯乙醇苷类物质已基本提出。因此,综合考虑,在优化试验中,将提取次数固定为4次。

2.3 响应面法优化向日葵列当中苯乙醇苷提取工艺

2.3.1 Design-Expert 8.0.6 设计及试验结果

在单因素试验结果的基础上,提取次数固定为4次,采用响应面(Central Composite Design)设计原理。以苯乙醇苷得率为响应值(Y),选取溶剂质量分数(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、液固比(D)作为自变量,建立4因素3水平共30个试验点的响应面分析试验模型,其中24个为析因点,6个为检验误差的中心点。因素水平见表1,试验设计和结果见表2。

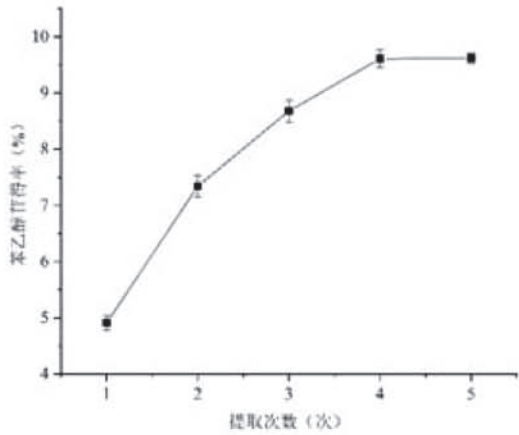


图8 提取次数对苯乙醇苷得率的影响

表1 响应面试验因素水平表

水平	因素			
	A:溶剂质量分数(%)	B:提取温度(℃)	C:提取时间(min)	D:液固比(mL/g)
-1	35	65	30	30:1
0	45	75	60	40:1
1	55	85	90	50:1

表2 响应面试验设计及结果

序号	A	B	C	D	苯乙醇苷得率(%)	序号	A	B	C	D	苯乙醇苷得率(%)
1	0	0	1.414	0	6.048	16	0	0	-1.414	0	5.868
2	-1	-1	-1	1	7.244	17	0	0	0	0	5.982
3	-1	-1	1	-1	8.026	18	-1	-1	1	1	5.542
4	-1	1	-1	-1	8.624	19	0	0	0	-1.414	6.479
5	1	1	-1	1	5.644	20	0	0	0	0	5.982
6	1	1	1	1	7.800	21	1	1	-1	-1	8.466
7	0	0	0	0	6.103	22	1	-1	-1	1	7.785
8	-1	1	1	-1	9.345	23	-1	-1	-1	-1	7.278
9	1	-1	-1	-1	7.858	24	-1	1	1	1	6.715
10	0	0	0	0	5.982	25	0	1.414	0	0	7.518
11	1	-1	1	-1	8.004	26	0	-1.414	0	0	5.603
12	-1.414	0	0	0	5.849	27	0	0	0	1.414	6.658
13	0	0	0	0	5.982	28	0	0	0	0	6.327
14	1.414	0	0	0	6.709	29	-1	1	-1	1	5.224
15	1	1	1	-1	10.111	30	1	-1	1	1	5.896

2.3.2 响应面方差分析

利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行方差分析,结果见表 3。由表 3 可知,模型显著性检验为极显著 ($P < 0.01$),说明模型的建立具有统计学意义。失拟项为不显著 ($P = 0.3259 > 0.05$),说明模型与实验的误差较小,无拟合因子的缺失。 F 值的大小可直接判断各因素对苯乙醇苷得率的影响程度, F 值越大,对苯乙醇苷得率的影响就越显著。 F 值大小依次为:提取温度 > 提取时间 > 溶剂质量分数 > 液固比。校正决定系数 $R^2 = 0.9951$,说明自变量引起的苯乙醇苷得率变化占 99.51%,变异系数为 0.15%,说明模型

中只有 0.15%的变异,进一步印证该模型具有较好的拟合度。

通过模型分析,以苯乙醇苷得率 (Y) 对 A 、 B 、 C 、 D 的二次多项式回归方程为:

$$Y = 6.06 + 0.3A + 0.68B + 0.18C + 0.063D + 0.044AB + 0.052AC + 0.075AD + 0.55BC - 0.41BD - 0.2CD + 0.11A^2 + 0.25B^2 - 0.051C^2 + 0.25D^2 + 0.15ABC + 0.36BCD - 0.41A^2B - 1.06A^2D - 0.079AB^2 + 0.85A^2B^2 (R^2 = 0.9951)。$$

模型中, A 、 B 、 C 、 BC 、 BD 、 CD 、 B^2 、 D^2 、 ABC 、 BCD 、 A^2B 、 A^2D 、 A^2B^2 对苯乙醇苷得率的影响为极显著 ($P < 0.01$)。

表 3 响应面方差分析表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	43.85	20	2.19	91.50	< 0.0001	* *
A	0.370	1	0.37	15.46	0.0034	* *
B	1.830	1	1.83	76.53	< 0.0001	* *
C	0.650	1	0.65	27.17	0.0006	* *
D	0.016	1	0.016	0.67	0.4343	
AB	0.031	1	0.031	1.27	0.2883	
AC	0.044	1	0.044	1.84	0.2083	
AD	0.089	1	0.089	3.72	0.0859	
BC	8.560	1	8.56	199.64	< 0.0001	* *
BD	2.640	1	2.64	110.32	< 0.0001	* *
CD	0.660	1	0.66	27.44	0.0005	* *
A^2	0.072	1	0.072	3.02	0.1165	
B^2	0.380	1	0.38	15.71	0.0033	* *
C^2	0.016	1	0.016	0.65	0.4417	
D^2	0.390	1	0.39	16.22	0.0030	* *
ABC	0.370	1	0.37	15.26	0.0036	* *
BCD	2.050	1	2.05	85.53	< 0.0001	* *
A^2B	0.530	1	0.53	22.02	0.0011	* *
A^2D	3.580	1	3.58	149.25	< 0.0001	* *
AB^2	0.020	1	0.020	0.83	0.3850	
A^2B^2	1.000	1	1.00	41.52	< 0.0001	* *
残差	0.220	9	0.024			
失拟项	0.120	4	0.030	1.51	0.3259	
纯误差	0.098	5	0.020			
总误差	44.070	29				
决定系数 $R^2 = 0.9951$ 校正系数 $R^2 R_{Adj}^2 = 0.9842$						

注: * * 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.3.3 响应曲面分析

响应曲面可直观反映各因素之间交互的显著性,响应曲面越陡峭,说明因素之间的交互作用越显著,影响越大,反之则影响越小^[17]。利用 Design-Expert 8.0.6 软件可以分析各因素对苯乙醇

苷得率的影响以及任意 2 个因素之间的交互作用,响应面曲线见图 9。由图 9 可知,在交互项对苯乙醇苷得率的影响中,当其他因素保持在零水平时,溶剂质量分数的改变对提取温度、提取时间和液固比的显著影响程度不大,反之也是。这说

明溶剂质量分数与提取温度、提取时间和液固比之间的交互作用并不显著, 但其他因素之间的交互作用显著, 这与表 3 方差分析结果是一致的。

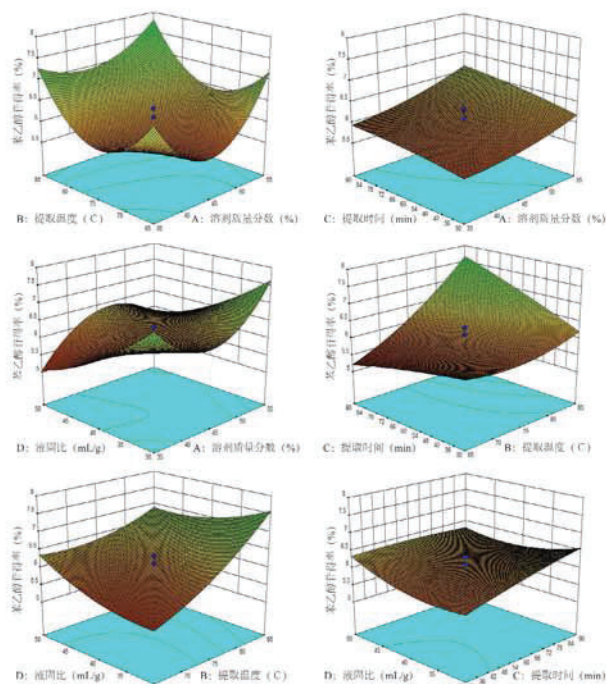


图 9 各因素交互作用对苯乙醇苷得率影响的响应面图

2.4 最佳工艺条件的确定及模型验证

为了确定最佳工艺优化参数, 利用 Design-Expert 8.0.6 软件对回归模型方程进行进一步分析, 得到向日葵列当中苯乙醇苷提取的最佳工艺参数为: 溶剂质量分数为 55%, 提取温度为 85℃, 提取时间为 90 min, 液固比为 30:1 (mL/g), 提取次数为 4 次。在此条件下, 模型预测苯乙醇苷得率为 10.117%, 与试验 15 号条件一致。为进一步确定其工艺参数的可行性及稳定性, 在上述条件下进行验证性试验, 平行测定 3 次, 苯乙醇苷平均得率为 $10.223\% \pm 0.03\%$, 与模型预测值相比, 相对误差约为 0.106%, 这说明实际值与模型预测值之间无显著性差异。由此可知, 通过此模型来预测向日葵列当中苯乙醇苷的提取工艺是可行的。

3 小结

本研究采用干燥的向日葵列当粉末为原料, 乙醇为提取溶剂进行回流提取。通过单因素试验及响应面优化试验确定了向日葵列当中苯乙醇苷的提取工艺: 溶剂质量分数为 55%, 提取温度为 85℃, 提取时间为 90 min, 液固比为 30:1 (mL/g), 提取次数为 4 次, 在此条件下, 苯乙醇苷得率为

$10.223\% \pm 0.03\%$, 与模型预测值相比无显著性差异。通过响应面模型分析, 该工艺条件是稳定可行的。

[参 考 文 献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 中国医药科技出版社, 2015:68-69.
- [2] 周秀娟, 鞠爱华, 张慧文. 列当科药用植物资源分布与化学成分的研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2007 (1):94-97.
- [3] 许国青, 王晓琴, 文迪, 等. 列当科药用植物研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(10):35-38.
- [4] QU Z, ZHANG Y, ZHENG S, et al. A new phenylethanoid glycoside from *Orobanchecernua Loe-filing*[J]. Natural product research, 2012, 30(8): 948-53.
- [5] 薛景, 王爱英, 贾献慧, 等. 苯乙醇苷类化合物的分类及研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(5):282-290.
- [6] TIAN Y, LI M, LIN T, et al. A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 209:112563.
- [7] 刘晓林, 赵秀香, 魏颖颖, 等. 向日葵列当粗提物对植物病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2008 (3):104-105.
- [8] 宋小敏, 廖理曦, 董馨, 等. 毛茛花糖苷抑制脂多糖诱导的 BV-2 小胶质细胞炎症反应及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13):2506-2510.
- [9] 章文婷, 王小明, 徐荣, 等. 荒漠肉苁蓉中苯乙醇苷类与多糖含量的测定及抗氧化作用研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20(4):426-431.
- [10] 胡琼, 由淑萍, 刘涛, 等. 肉苁蓉苯乙醇总苷抗肝癌作用的实验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30 (3):194-199.
- [11] SHAO S, ZHANG F, YANG Y, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory phenylethanoid glycosides from the fruits of *Forsythia suspensa*[J]. Bioorganic Chemistry, 2021, 113:105025.
- [12] 刘东春, 王芳, 崔征, 等. 欧亚列当提取物抗脂质过氧化作用的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18 (3):204-206.
- [13] 吴文龙, 姜翠兰, 黄兆峰, 等. 我国向日葵列当发生危害现状调查[J]. 植物保护, 2020, 46(3):266-273.
- [14] AKIYAMA K, HAYASHI H. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots[J]. Ann Bot, 2006, 97: 925

- 931.
- [15] 郭振国, 陈杰, NIZAMANIL M R, 等. 生防菌对向日葵列当的防除作用的初步研究[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(6): 59–69.
- [16] ABDULWAHAB S, ALI E E, HASSAN W S, et al. Mathematically assisted UV-spectrophotometry as a greener alternative to HPLC-UV for quality control analysis of free-drug combinations[J]. Microchemical Journal, 2021, 170: 106638.
- [17] 陈红梅, 谢翎. 响应面法优化半枝莲黄酮提取工艺及体外抗氧化性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 45–50.

Optimization of Extraction Process of Phenylethanoid Glycosides from *Orobanchе cumana* Wallr. Using Response Surface Methodology

Lv Jiajia^{1,2}, Zhang Yong¹, Dai Yujun^{1*}, Jiang Qin¹, Wei Shuairunzhe¹, Cai Shulong¹, Yin Xiao¹
 (1. Hubei Province Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000, China;
 2. School of Life Science, Hubei University, Wuhan, Hubei 430062, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the extraction conditions of phenylethanoid glycosides (PhGs) from *Orobanchе cumana* Wallr by ethanol heating reflux method. Taking the yield of phenylethanoid as the evaluation index, the effects of solvent mass fraction, extraction temperature, extraction time, liquid solid ratio and extraction times on the extraction effect of PhGs were investigated through single factor experimental design. The quadratic polynomial regression model of solvent mass fraction, extraction temperature, extraction time and liquid solid ratio was established by using central composite design response surface design method, optimize the extraction process. The results showed the optimum technological parameters: the mass fraction of solvent 55%, the extraction temperature 85 °C, the extraction time 90 min, the liquid-solid ratio 30 mL/g and four times. Under these conditions, the yield of phenylethanoid glycoside can reach 10.223%, which was equivalent to the predicted value of 10.117%, and the established model was true and reliable. The extraction method is simple and efficient, which is conducive to the development and utilization of *Orobanchе cumana* Wallr resources.

Key Words: *Orobanchе cumana* Wallr; phenylethanoid glycosides; ethanol heating reflux method; response surface methodology

(责任编辑: 邹礼平)