

响应面法优化超声提取熟地黄中 5-羟甲基糠醛的工艺

曾令峰^{a,b} 沈建伟^a 王环^a 张本印^{a,b} 张学平^c 张晓峰^{①a}

^a(中国科学院西北高原生物研究所 西宁市城西区西关大街 59 号 810008)

^b(中国科学院研究生院 北京市 100049)

^c(青海夏都医药有限公司 西宁市 810003)

摘要 采用响应面法优化了超声提取熟地黄中 5-羟甲基糠醛的工艺。选取提取时间、溶剂浓度和温度 3 个因素为随机因子, 在单因素的基础上进行 3 因素 3 水平 Box-Behnken 中心组合试验设计, 以 5-羟甲基糠醛得率为响应值进行响应面分析。优化后的超声提取熟地黄中 5-羟甲基糠醛的条件为: 在提取时间 61.6 min, 溶剂体积分数 90.5%, 提取温度为 53.9°C, 5-羟甲基糠醛得率理论值为 0.3403%, 验证值为 0.3389%, 两者间的相对误差为 0.4%, 验证值与理论值相吻合, 说明该优化方法可行。

关键词 响应面法; 超声提取; 熟地黄; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R914; O657.7⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-1261-06

1 引言

地黄是玄参科 (*Scrophulariaceae*) 多年生草本植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 的块根^[1]。其是中药大宗药材, 具有极高的药用价值, 始载于《神农本草经》, 列为上品。熟地黄是生地黄的炮制品, 具有益精填髓, 滋阴补血的功能。经过炮制, 熟地黄中 5-HMF 含量高于生地黄 20 倍左右^[2], 2005 版药典已将 5-羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, 5-HMF) 收录为熟地黄质量控制的标准物质^[3], 地黄在炮制加工过程中, 多糖成分会发生变化, 炮制后果糖和葡萄糖等己糖含量显著增加, 可能是与其寡糖发生脱果糖反应和梓醇分解有关^[4,5], 增加的果糖和葡萄糖等单糖极有可能转变成 5-HMF。这种单糖增多的现象不仅限于中药材领域, 且在食品, 糖工业, 石油化工, 高分子材料等领域都会涉及到 5-HMF。有关 5-HMF 药理的研究表明, 其可能是中药复方中一个未被人们所了解的活性成分, 在中药复方中可能发挥着独特的药效^[6]。基于此, 有必要对熟地黄中的主要活性成分 5-HMF 进行研究, 本文旨在通过响应面法优化地黄中 5-HMF 提取工艺, 为后续研究提供一定的参考。

2 实验部分

2.1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 1100 G1314A 紫外检测仪, Agilent 1100 G1311A 四元泵, Agilent 1100 配套化学工作站; FW80 高速粉碎机(天津泰斯特公司); AB104-N 电子天平(梅特勒-托利多公司); Autoscience AS 超声清洗器(天津奥特赛恩斯公司);

① 联系人, 手机: (0) 13519703453; E-mail: lingfengzeng@yahoo.com.cn; x fzhangg@126.com

作者简介: 曾令峰(1983—), 男, 安徽省宣城市人, 在读硕士, 研究方向为应用植物化学。

收稿日期: 2010-06-23; 接受日期: 2010-08-05

Milli ZQ Element 超纯水仪(西班牙 Millipore 公司)。

熟地黄药材购自青海西宁药材市场;5-羟甲基糠醛(5-HMF)对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:111626-200806)。甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。实验用水为超纯水。

2.2 对照液的配制

准确称取 5-HMF 对照品 1mg,加 80% 甲醇溶解,于 25mL 容量瓶中以 80% 甲醇定容,摇匀,得质量浓度为 0.04mg/mL 的 5-HMF 标准溶液。

2.3 供试液的制备

将熟地黄药材切成 0.5cm×1cm 大小的方块,在 80℃ 干燥 24h 后粉碎过 80 目筛。准确称取药材粉末 1g 置于 100mL 锥形瓶中,加 80% 甲醇 30mL,超声 1h,过滤,将滤液移入 50mL 容量瓶中,加 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即为供试液。

2.4 样品分析

2.4.1 色谱条件

依利特 E1617069-C₁₈ 色谱柱(5μm, 4.6mm×250mm),甲醇-水(8:92)为流动相,检测波长 284nm,柱温 30℃,流速 1.0mL/min,理论塔板数按 5-HMF 计算不低于 5000。

2.4.2 线性关系考察

准确量取质量浓度为 0.04mg/mL 的对照品溶液 1, 4, 8, 12, 16, 20μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标,对照品峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制校准曲线。得回归方程 $y = 910.35x - 3.8269, r^2 = 0.9999$ 。结果表明在 0.04—0.8μg 范围内,进样量与峰面积呈良好的线性关系。

3 结果与讨论

3.1 5-HMF 含量测定方法学考察

3.1.1 精密度、重复性和稳定性

取上述对照液在 2.4.1 色谱条件下,连续进样 5 次,5-HMF 峰面积 RSD= 0.32%,说明仪器精密度良好;取熟地黄药材粉末按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试液,以 2.4.1 项色谱条件进行测定,5-HMF 峰面积 RSD= 1.67%,表明本方法重现性良好;取供试液分别在 1, 4, 8, 12, 16, 20h 以上述条件进行测定, RSD 为 0.74%,表明 5-HMF 在 20h 内稳定性良好。

3.1.2 加样回收率

准确称取已知含量的供试品粉末 6 份,加入一定量的对照品,按照供试液制备方法制备,以上述色谱条件进行测定,计算回收率,结果表明 5-HMF 的平均回收率为 101.2%, RSD 为 1.4%,表明本方法准确可靠。

3.2 单因素试验

3.2.1 提取时间对 5-HMF 得率的影响

在溶剂体积分数和温度分别固定为 80% 和 55℃ 时,超声时间对 5-HMF 得率的影响如图 1。由图可知在 30—50min 内,5-HMF 得率无太大的

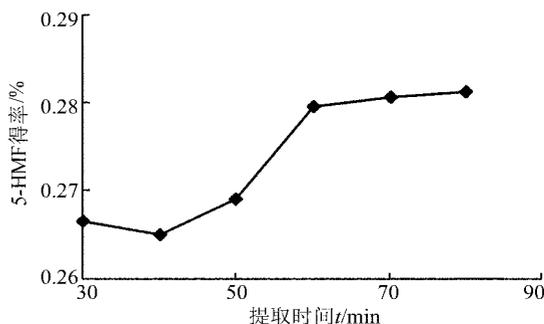


图 1 提取时间对 5-HMF 得率的影响

变化,但在 50—60min 内有较大的增加,随后随时间延长增幅并不明显,在 60, 70min 和 80min 处 5-HMF 得率无显著差异($P > 0.05$)。考虑时间成本,因此选择 60min 作为最佳提取时间。

3.2.2 溶剂体积分数对 5-HMF 得率的影响

以超声时间为 1h, 温度为 55℃ 的提取条件, 考察甲醇体积分数对 5-HMF 得率的影响。由图 2 可见随着溶剂体积分数的增大, 5-HMF 得率也随之增高, 达到 80% 时基本平稳, 所以本试验选择的溶剂体积分数为 90%, 此时溶剂极性应与溶质极性相近。

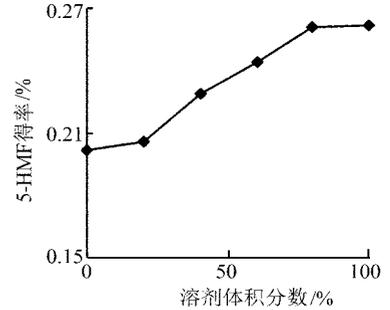


图 2 溶剂体积分数对 5-HMF 得率的影响

3.2.3 温度对 5-HMF 得率的影响

提取时间为 1h, 溶剂体积分数为 90% 时, 温度对 5-HMF 得率的影响见图 3。由图可见在 30—45℃ 范围内 5-HMF 得率基本不变, 无显著差异($P > 0.05$), 但随后温度升高, 其得率迅速增大, 50℃ 时达到顶点, 随后又迅速下降。下降原因可能因其分子上有一活泼羟基, 升温使其稳定性下降, 较易受到外界影响发生反应。因此可能过高的提取温度导致了其与熟地黄中的其他物质发生了反应, 致使其得率下降。本试验选择 50℃ 作为提取的最佳温度。

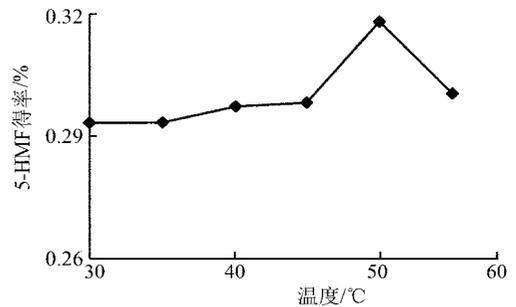


图 3 温度对 5-HMF 得率的影响

3.3 响应面优化超声提取 5-HMF 的条件

在单因素试验的基础上进行 3 因素 3 水平 Box-Behnken 中心组合实验设计。以 X_1 , X_2 , X_3 和 Y 分别代表提取时间, 溶剂体积分数, 提取温度 3 个因素以及 5-HMF 得率。试验因素水平、设计方案和结果见表 1。表 1 中 1—12 为析因试验, 13—15 为中心点试验。3 个中心点试验用以估计实验误差。

响应面分析软件采用 SAS RSREG 程序对所得数据进行数据分析。实验以随机次序进行, 以 5-HMF 得率为响应值进行多元二次回归分析, 得回归方程如下:

$$Y = 0.332167 + 0.010838X_1 + 0.008X_2 + 0.017588X_3 - 0.026833X_1X_1 - 0.010633X_3X_3 - 0.005575X_1X_2 - 0.0025X_1X_3 - 0.028808X_2X_2 - 0.003525X_2X_3$$

表 1 响应面 Box-Behnken 中心组合试验设计及 5-HMF 得率

编号	X_1 (min)	X_2 (%)	X_3 (°C)	Y (%)
1	- 1(50)	- 1(80)	0(75)	0.2507
2	1(70)	- 1(80)	0(75)	0.2875
3	- 1(50)	1(100)	0(75)	0.2767
4	1(70)	1(100)	0(75)	0.2912
5	- 1(50)	0(90)	- 1(60)	0.2637
6	1(70)	0(90)	- 1(60)	0.2864
7	- 1(50)	0(90)	1(90)	0.3080
8	1(70)	0(90)	1(90)	0.3207
9	0(60)	- 1(80)	- 1(60)	0.2651
10	0(60)	1(100)	- 1(60)	0.2893
11	0(60)	- 1(80)	1(90)	0.3032
12	0(60)	1(100)	1(90)	0.3133
13	0(60)	0(90)	0(75)	0.3313
14	0(60)	0(90)	0(75)	0.3316
15	0(60)	0(90)	0(75)	0.3336

统计分析结果见表 2, $P \leq 0.05$ 为显著项, $P \leq 0.01$ 为高度显著项。本模型显著性检验 $P \leq 0.001$, 说明本模型具有统计学意义。回归决定系数为 0.99263, 校正决定系数为 0.97932, 失拟

项 $P = 0.06491 > 0.05$, 相对标准偏差为 1.27%, 说明此模型与实验拟合度较高, 可用来对熟地黄中超声提取 5-HMF 的工艺进行模拟和预测。结果中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_{12} 、 X_{22} 和 X_{32} 均为极显著项, 对 5-HMF 得率的影响极为显著, $X_1X_2 < 0.05$, 为显著项, X_1X_3 和 X_2X_3 均 > 0.05 , 对 5-HMF 得率影响不显著, 但 X_1X_3 和 X_2X_3 两项间的交互作用不明显。

表 2 统计分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
X_1	0.00094	1	0.00094	65.79527	0.00041
X_2	0.00051	1	0.00051	35.85225	0.00181
X_3	0.00248	1	0.00248	173.2785	0.00014
X_1X_2	0.00012	1	0.00012	8.70555	0.03187
X_1X_3	0.00003	1	0.00003	1.75062	0.24306
X_2X_3	0.00005	1	0.00005	3.48036	0.12113
X_1X_1	0.00266	1	0.00266	186.16311	0.00014
X_2X_2	0.00306	1	0.00306	214.57572	0.00016
X_3X_3	0.00042	1	0.00042	29.23366	0.00293
模型	0.00961	9	0.00107	4.73856	0.00012
线性	0.00393	3	0.00131	91.64201	0.00014
二次项	0.00548	3	0.00007	4.64551	0.06572
失拟度	0.00007	3	0.00002	14.55810	0.06491
纯误差	0.00003	2	0.00002		
确定系数				0.99263	
校正确定系数				0.97932	
相对标准偏 (%)				1.27	

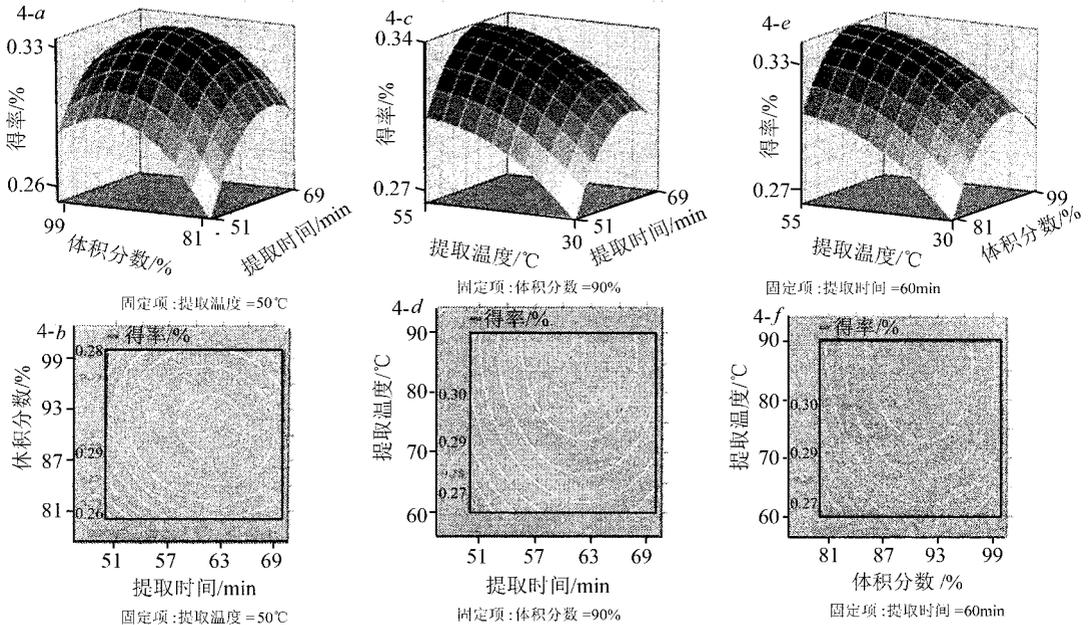


图 4 提取时间, 溶剂体积分数和温度对 5-HMF 得率的响应面图

图 4 是不同因素对 5-HMF 得率的响应面图, 其中 4-a 和 4-b 分别是固定提取温度为 50°C 时, 提取时间和溶剂体积分数对 5-HMF 得率影响的应面三维图和等高线图。从图中可见随着提取时间和溶剂体积分数的增加, 5-HMF 的得率也随之增加。当提取时间达到 62.5 min 时, 溶剂体积分数达到 92% 时, 5-HMF 得率迅速提高, 随后快速降低; 4-c 和 4-d 分别是固定溶剂体积分数为 90% 时, 提取时间和提取温度对 5-HMF 得率的响应面图和等高线图。从图中可见在提取时间刚开始

时, 5-HMF 得率变化非常大, 在图中表现为曲线比较陡, 说明在提取时间不是很充足时, 提高提取时间可提高糠醛的提取率。而对于提取温度则表现为在此较低温度范围内, 5-HMF 的提取率变化很大, 但在较高温度范围内变化不明显。4-e 和 4-f 分别是固定提取时间为 60min 时, 溶剂体积分数和提取温度对 5-HMF 得率影响的响应面图和等高线图。在较低温度范围内, 5-HMF 的提取受温度影响较大, 当温度达到 54℃ 后影响趋弱。而溶剂体积分数则明显呈现抛物线状, 在 92% 处有一最大点。由 SAS 分析得到最大响应值(Y) 时的各因素最佳提取条件为提取时间 61.6min, 溶剂体积分数 90.5%, 提取温度为 53.9℃, 模型预测的 5-HMF 最大得率为 0.3403%。

3.4 验证实验

在应用响应面法优化后的最佳提取条件, 即提取时间 61.6min, 溶剂体积分数 90.5%, 提取温度为 53.9℃ 对熟地黄中 5-HMF 进行 3 次平行验证实验, 5-HMF 平均得率为 0.3389%, RSD 为 1.2%, 真实值与预测值的误差为 0.4%, 两者吻合较好, 说明模型可行。

4 结论

本实验通过响应面法, 对熟地黄中 5-HMF 提取得率的影响因素(提取时间, 溶剂体积分数和提取温度)进行了研究, 实验结果表明提取时间, 溶剂体积分数和提取温度对 5-HMF 得率均有显著影响, 并在此基础上对各影响因素进行了优化, 得到最佳提取条件为提取时间 61.6min, 溶剂体积分数 90.5%, 提取温度为 53.9℃。经验证本模型预测值与真实值误差为 0.4%, 说明所建立的超声提取 5-HMF 提取工艺切实可行。

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, 1997. 214—216.
- [2] 刘美丽, 白玫, 白荣枝等. 地黄的炮制研究 I. 熟地黄中 5-羟甲基糠醛的提取分离及含量测定[J]. 中草药, 1995, 26(1): 13—14.
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 83.
- [4] Kubo M, Asano T, Matsuda H *et al.* Studies on *Rehmanniae Radix*. III. The Relation between Changes of Constituents and Improvable Effects on Hemorheology with the Processing of Roots of *Rehmannia Gluconosa*[J]. *Yakugaku Zasshi*, 1996, 116(2): 158—168.
- [5] 温学森, 杨世林, 马小军等. 地黄在加工炮制过程中 HPLC 谱图的变化[J]. 中草药, 2004, 35(2): 153—156.
- [6] 耿放, 王喜军. 5-羟甲基-2-糠醛(5-HMF) 在中药复方中的研究现状及相关药效探讨[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(6): 52—55.

Optimization of Ultrasonic Extraction of 5-Hydroxymethylfurfural from Steamed *Rehmanniae Radix* by Response Surface Methodology

ZENG Ling-Feng^{a,b} SHEN Jian-Wei^a WANG Huan^a ZHANG Ben-Yin^{a,b}

ZHANG Xue-Ping^c ZHANG Xiao-Feng^a

a(Institute of Northwest Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, P. R. China)

b(Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

c(Qinghai Xiadu Pharmaceuticals Corporation, Xining 810003, P. R. China)

Abstract Ultrasonic extraction of 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) from steamed *Rehmanniae Radix* was optimized by response surface methodology. Three factors three levels Box-Behnken design

was employed to optimize the extraction process including extraction time, solvent concentration and extraction temperature as the three random factors. The extraction conditions after optimization were as follows: extraction time of 61.6 min, methanol concentration of 90.5% and extraction temperature of 53.9°C. The relative error between the predictive yield (0.3403%) of 5-HMF under optimized conditions and results of the verification experiments (0.3389%) was only 0.4%, which indicated that the optimized method was feasible.

Key words Response Surface Methodology; Ultrasonic Extraction; Steamed *Rehmanniae Radix*; 5-Hydroxymethylfurfural

欢迎您投稿 “高效、保质、宽容”的中文核心期刊 《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为 5—9 个月,

少数(20% - 45%)为 1—5 个月,极少数(0 - 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以后出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己“争光”,而不是让自己“蒙羞”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即文字、表格、图片等齐全,并符合本刊《投稿须知》的各项要求;“清”即文字、图片打印清楚,不得有模糊不清的图片(包括上面的文字和数字);若有彩色图片及彩色曲线,请转化为清晰的黑白图片和黑色曲线,并清除图片和曲线上的背景,便于排版和复制;“定”即做到稿件内容(文字、表格、图片等)完整,无需再作增删修改。

来稿请用 Word 排版,用电子邮件发到本部电子信箱(E-mail: gpsys@263.net)。

本刊收到作者来稿后,都会在 3 日(遇公休日顺延)内发出“收稿通知”。因此,作者发送稿件后 7 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的正确的姓名和详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而产生的不良后果由作者自己负责。

本刊发表论文的宗旨是交流学术,提倡“高效、保质、宽容”的精神,欢迎被误判为“没有发表价值”的佳作再投本刊,而不是为了应付“评职称”、“拿文凭”。

《光谱实验室》编辑部