

基于响应面法和熵权法优化连翘叶中连翘酯苷A、连翘苷和芦丁提取工艺

刘路路, 李 可, 韦智江, 郭 然, 赵梓邯, 代 熙, 李卫东

Optimization of Extraction Process of Forsythioside A, Forsythinin and Rutin from *Forsythia suspensa* Leaves Based on Response Surface Methodology and Entropy Weight Method

LIU Lulu, LI Ke, WEI Zhijiang, GUO Ran, ZHAO Zihan, DAI Xi, and LI Weidong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040240>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于熵权法和灰色关联度法的鲜食糯玉米品质评价

Quality Evaluation of Different Varieties of Fresh-edible Waxy Corns Based on Entropy Weight Method and Grey Interconnect Degree Analysis

食品工业科技. 2021, 42(14): 241-248

连翘果、连翘叶乙醇提取物的抑菌活性及成分分析

Antimicrobial Activities and Component Analysis of Ethanol Extracts from *Forsythia suspensa* Fruit and *Forsythia suspensa* Leaves

食品工业科技. 2019, 40(6): 89-94

连翘叶成分及生物活性研究进展

Research Progress on Composition and Biological Activity of *Forsythia suspensa* Leaves

食品工业科技. 2020, 41(18): 344-352

超声波法提取紫薯茎叶中总黄酮的工艺优化

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from Stems and Leaves of Purple Sweet Potato by Ultrasonic Method

食品工业科技. 2018, 39(15): 189-194

响应面法优化超声波协同酶法提取杜仲叶多糖工艺

Optimization of Ultrasonic and Enzymatic-assisted Extraction of Polysaccharides from *Eucommia ulmoides* Oliver Leaves by Response Surface Method

食品工业科技. 2020, 41(22): 193-198,220

响应面法优化东北红松针总黄酮的超声辅助乙醇提取工艺

Optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction of total flavonoids from *Pinus koraiensis* needles by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(4): 143-149



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

刘路路, 李可, 韦智江, 等. 基于响应面法和熵权法优化连翘叶中连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取工艺 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 166–173. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040240

LIU Lulu, LI Ke, WEI Zhijiang, et al. Optimization of Extraction Process of Forsythioside A, Forsythin and Rutin from *Forsythia suspensa* Leaves Based on Response Surface Methodology and Entropy Weight Method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 166–173. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040240

基于响应面法和熵权法优化连翘叶中连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取工艺

刘路路, 李 可, 韦智江, 郭 然, 赵梓邯, 代 熙, 李卫东*

(北京中医药大学中药学院, 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 102488)

摘 要: 本文优化了连翘叶多指标成分的超声提取工艺。采用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 同时测定连翘叶提取物中连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁的提取量, 以乙醇浓度、液料比、提取温度及提取时间为考察因素, 运用熵权法计算权重系数, 进行多指标综合评分, 并以综合评分为指标, 通过 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺。结果表明, 连翘叶最佳提取工艺: 乙醇浓度 50%, 液料比 28:1 mL/g, 提取温度 51 ℃, 提取时间 25 min。验证实验表明在此优化工艺条件下, 连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁的提取量分别为 69.69、22.87、22.46 mg/g, 综合评分为 32.18, RSD 均小于 3%。该提取工艺稳定、可行, 有效成分提取量较高, 适用于连翘叶连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁的提取。

关键词: 连翘叶, 多指标测定, 熵权法, 响应面法, 超声提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)02-0166-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040240



本文网刊:

Optimization of Extraction Process of Forsythioside A, Forsythin and Rutin from *Forsythia suspensa* Leaves Based on Response Surface Methodology and Entropy Weight Method

LIU Lulu, LI Ke, WEI Zhijiang, GUO Ran, ZHAO Zihan, DAI Xi, LI Weidong*

(Engineering Research Center of Ministry of Education for Standardized Production of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: In this paper, the ultrasonic extraction technology of *Forsythia suspensa* leaves was optimized based on multi-index components. The contents of forsythioside A, forsythin and rutin were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The ethanol concentration, liquid-solid ratio, extraction time and extraction temperature were taken as the factors. The entropy weight method was used to obtain comprehensive score by calculating the weight coefficient of each index. Subsequently, the comprehensive score was taken as the index. Finally the Box-Behnken response surface methodology was adopted to optimize the extraction process. The optimum extraction conditions of *Forsythia suspensa* leaves were as follow: Ethanol concentration 50%, liquid to material ratio 28:1 mL/g, extraction temperature 51 ℃, extraction time 25 min. The results of the validation tests showed that under the optimal conditions, the extraction amount of forsythioside A, forsythin and rutin were 69.69, 22.87 and 22.46 mg/g, respectively, the RSD was less than 3% and comprehensive score was 32.18. The extraction technology was stable and feasible, and the extraction quantity of active components was high. It was suitable for the extraction of *Forsythia suspensa* leaves.

Key words: *Forsythia suspensa* leaves; multi-index determination; entropy weight method; response surface method; ultrasonic extraction

收稿日期: 2021-04-26

作者简介: 刘路路 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源评价与利用, E-mail: lulu3875@163.com。

* 通信作者: 李卫东 (1970-), 男, 博士后, 研究员, 研究方向: 中药资源评价与利用, E-mail: liweidong2005@126.com。

连翘叶是木犀科植物连翘(*Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl)的干燥叶片。《中华本草》记载“连翘茎叶,性寒,主治心肺积热”^[1]。连翘叶的生物活性成分包括苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮类、有机酸类、萜类等化合物^[2-3]。现代药理研究表明连翘叶具有抗病毒、抗菌、抗氧化、保肝、降血糖血脂等作用^[4-9]。连翘叶生物量大,活性多样,但由于连翘的主要用药部位是果实,生产中大量连翘叶被丢弃,目前其开发利用仅限于小部分地区连翘茶的应用,这造成了极大的资源浪费及巨大的经济损失^[10-11]。2017年,国家正式批准连翘叶作为新资源食品,为连翘叶的开发利用提供了理论依据和政策支持。

目前连翘叶多采用热水浸提、回流等效率较低的方法进行提取,而超声作为一种提取效率高、耗时短、应用范围广的方法,在连翘叶上的应用研究较缺乏。此外,连翘叶的提取多针对连翘酯苷 A、连翘苷等单一成分^[12-15],有关连翘叶多指标成分的提取工艺研究报道较少。研究表明,连翘叶中连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁的含量均高于作为药材原料入药的连翘果实中的含量^[16],且具有抗氧化^[7,17-19]、抗菌抗病毒^[5-6,20]、降血脂^[21]、神经保护^[22-23]等多种药理活性,共同构成连翘叶发挥临床疗效的物质基础。因此本研究以此三个活性成分为指标,采用效率高、时间短的超声提取法,对提取过程中的关键因素,即乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度加以考察。并采用熵权法计算连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁的相关权重,结合 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM),优选提取工艺,为连翘叶资源的综合开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

连翘叶 2020年8月采自山西省安泽县,经北京中医药大学李卫东研究员鉴定为木犀科连翘属植物连翘的叶,置通风处阴干,粉碎过4号筛,低温储存备用;连翘酯苷 A(批号:PS000582)、连翘苷(批号:PS000579) 成都普斯生物科技有限公司;芦丁(批号:T27F10Z81699) 上海源叶生物科技有限公司;甲醇 分析纯,北京化工厂;醋酸 分析纯,北京化学试剂公司;乙腈 色谱纯, Fisher Scientific 公司;娃哈哈纯净水 杭州娃哈哈集团有限公司。

Waters alliance 型高效液相色谱仪、Waters 2998 PDA 检测器、Empower 软件系统 美国 Waters 公司;BT25S 型 1/100000 电子分析天平 赛多利斯科学仪器北京有限公司;HH-S4A 型电热恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司;RE-52 型旋转蒸发器、SHZ-Ⅲ型真空泵 上海亚荣生化仪器厂;DFY-200C 型摇摆式高速粉碎机 温岭市林大机械有限公司;FD-2A 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPLC 含量测定方法的建立

1.2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含连翘酯苷 A 1.880 mg、连翘苷 0.700 mg 和芦丁 1.000 mg 的混合对照品溶液。

1.2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取连翘叶粉末(过 4 号筛)1 g,置于 50 mL 锥形瓶中,于一定乙醇浓度、液料比、提取时间、提取温度条件下超声提取,冷却后于 4 ℃ 下以 8000 r/min 转速离心 20 min,移出上清液后定容至 100 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,待用。

1.2.1.3 色谱条件 色谱柱: Waters Xbridge™ shield C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(A)-0.4% 乙酸水溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 10%~15% A; 8~18 min, 15%~22% A; 18~25 min, 22%~40% A; 25~30 min, 40%~95% A; 30~35 min, 95% A);测定波长: 277 nm;体积流量: 1 mL/min;柱温: 30 ℃;进样量: 20 μL^[24]。

1.2.1.4 线性关系考察 依次稀释“1.2.1.1”项下混合对照品溶液,分别稀释 2、4、8、16、32 倍,甲醇溶解,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得系列质量浓度的混合对照品溶液。精密吸取系列不同质量浓度的混合对照品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。以各对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,进行回归分析。

1.2.1.5 精密度试验 取“1.2.1.1”项下混合对照品溶液,按“1.2.1.3”项下色谱条件进样检测,连续进样 6 次。计算连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁峰面积的 RSD。

1.2.1.6 重复性试验 取同一批供试品粉末,平行 6 份。按“1.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1.3”项下色谱条件依次进样检测。计算连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁的提取量及 RSD。

1.2.1.7 稳定性试验 取同一批供试品溶液,按“1.2.1.3”项下色谱条件在 0、2、4、6、8、12 h 分别进样测定。计算连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁峰面积的 RSD。

1.2.1.8 加样回收率试验 取已知各指标成分含量的连翘叶供试品粉末 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别加入等量的连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁对照品,按“1.2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“1.2.1.3”项下色谱条件依次进样检测,计算得到连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁的平均加样回收率及 RSD。

1.2.1.9 指标成分的提取量测定 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积。采用外标法通过标准曲线回归方程计算各指标成分质量浓度,根据公式计算提取量。

$$M = C \times 100 / W \quad \text{式 (1)}$$

式中: M 表示指标成分提取量, mg/g ; C 表示通过标准曲线回归方程得到的指标成分质量浓度, mg/mL ; 100 为定容的体积; W 表示称样量, g 。

1.2.2 单因素实验

1.2.2.1 不同乙醇浓度对连翘叶中活性成分提取量的影响 液料比 $30:1 \text{ mL/g}$, 提取时间 30 min , 提取 1 次, 提取温度 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在其它条件固定的情况下, 考察乙醇浓度 30% 、 40% 、 50% 、 60% 、 70% 对连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取量的影响。

1.2.2.2 不同液料比对连翘叶中活性成分提取量的影响 乙醇浓度 40% , 提取时间 30 min , 提取 1 次, 提取温度 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在其它条件固定的情况下, 考察液料比 $10:1$ 、 $15:1$ 、 $20:1$ 、 $25:1$ 、 $30:1$ 、 $35:1 \text{ mL/g}$ 对连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取量的影响。

1.2.2.3 不同提取时间对连翘叶中活性成分提取量的影响 乙醇浓度 40% , 液料比 $30:1 \text{ mL/g}$, 提取 1 次, 提取温度 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在其它条件固定的情况下, 考察提取时间 10 、 20 、 30 、 40 、 50 min 对连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取量的影响。

1.2.2.4 不同提取温度对连翘叶中活性成分提取量的影响 乙醇浓度 40% , 液料比 $30:1 \text{ mL/g}$, 提取 1 次, 提取时间 30 min 。在其它条件固定的情况下, 考察提取温度 20 、 30 、 40 、 50 、 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 对连翘酯苷 A、连翘苷和芦丁提取量的影响。

1.2.3 响应面实验 在单因素实验基础上, 以乙醇浓度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)为考察因素, 各指标成分提取量为评价指标, 综合评分(M)为响应值, 利用 Design-Expert 11.0.4.0 软件进行 Box-Behnken 响应面实验设计, 筛选各因素最优组合条件。试验因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A乙醇浓度 (%)	B液料比 (mL/g)	C提取时间 (min)	D提取温度 ($^{\circ}\text{C}$)
-1	30	20:1	20	40
0	40	25:1	30	50
1	50	30:1	40	60

1.3 数据处理

每个实验重复 3 次, 响应面优化分析及方差分析采用 Design-Expert 11.0.4.0 软件, 作图采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件。

采用熵权法对多个指标进行客观赋权。首先对数据 x_{ij} 根据式 1 进行归一化处理, 得到归一化数据 x'_{ij} , 再根据式 2 得到标准化数据 p_{ij} , 再根据式(3)计算第 j 个指标的信息熵 H_j , 得到的各指标信息熵根据式 4 转化为熵权 w_j , 即得评价指标的熵值。

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \min(x_i)}{\max(x_i) - \min(x_i)} \quad \text{式 (2)}$$

$$p_{ij} = \frac{x'_{ij}}{\sum_{i=1}^m x'_{ij}} (i = 1, 2, \dots, m; j = 1, 2, 3) \quad \text{式 (3)}$$

$$H_j = -k \sum_{i=1}^m p_{ij} \ln(p_{ij}) k = \frac{1}{\ln(m)} \quad \text{式 (4)}$$

$$w_j = \frac{(1 - H_j)}{\sum_{j=1}^n H_j} \quad \text{式 (5)}$$

式中: x_{ij} 表示第 i 次试验时第 j 个评价指标的提取量值; $\min(x_i)$ 为第 j 个评价指标的提取量最小值; $\max(x_i)$ 为第 j 个评价指标的提取量最大值; x'_{ij} 表示第 i 次试验时第 j 个评价指标的归一化值; p_{ij} 表示第 i 次试验时第 j 个评价指标的标准化值; H_j 表示第 j 个评价指标的信息熵值; w_j 表示第 j 个评价指标的熵权值。

2 结果与分析

2.1 HPLC 含量测定方法的结果

2.1.1 色谱图 “1.2.1.3”项色谱条件下对照品及样品的色谱图显示 3 种指标成分在检测波长下分离良好, 与对照品保留时间相同, 见图 1。

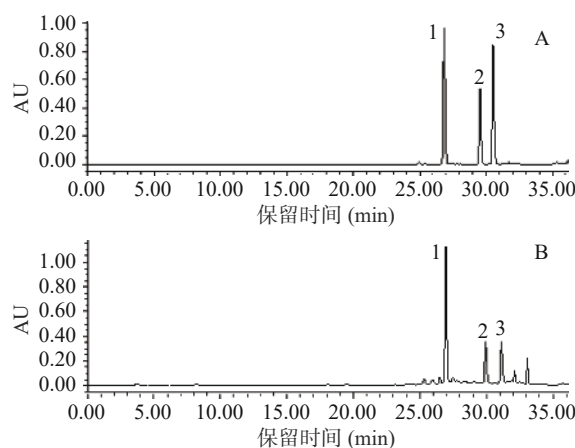


图 1 混合对照品溶液(A)与供试品溶液(B)
HPLC 色谱图(277nm)

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and sample (B) (277 nm)

注: 1: 连翘酯苷 A; 2: 芦丁; 3: 连翘苷。

2.1.2 线性关系 “1.2.1.4”项下得到各指标成分的回归方程、相关系数(r)及线性范围, 见表 2, 显示连翘酯苷 A、连翘苷、芦丁分别在 $0.058 \sim 1.880$ 、 $0.022 \sim 0.700$ 、 $0.031 \sim 1.000 \text{ mg/mL}$ 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系

2.1.3 方法学考察 “1.2.1.5~1.2.1.8”项下得到的精密密度、重复性、稳定性和加样回收率结果见表 3。结果表明精密度和重复性均良好, 供试品溶液在 12 h 内稳定, 加样回收率合格, 符合定量分析的要求。

表 2 线性关系考察结果
Table 2 Results of linear relationship investigation

指标性成分	线性回归方程	<i>r</i>	<i>n</i>	线性范围(mg/mL)
连翘酯苷A	$Y = 15227008.7617X + 192504.3035$	0.9998	6	0.058~1.880
连翘苷	$Y = 12575561.4418X + 17580.7313$	0.9999	6	0.022~0.700
芦丁	$Y = 9698992.4208X - 95383.7214$	0.9994	6	0.031~1.000

表 3 精密度、重复性、稳定性和加样回收率结果
Table 3 Results of precision, reproducibility, stability and recovery

指标性成分	精密度	重复性		稳定性	加样回收率	
	RSD(%)	提取量(mg/g)	RSD(%)	RSD(%)	平均加样回收率(%)	RSD(%)
连翘酯苷A	1.69	67.02	1.20	1.42	99.11	0.87
连翘苷	0.30	20.58	1.26	2.28	99.53	1.16
芦丁	0.69	21.63	2.34	1.64	100.98	1.11

2.2 单因素实验结果

2.2.1 不同乙醇浓度对连翘叶多指标提取量的影响

由图 2 可知,连翘酯苷 A 的提取量随着乙醇浓度的增加先上升后下降,在乙醇浓度为 40% 时达到峰值,为 63.66 mg/g。而连翘苷和芦丁的提取量则随乙醇浓度的增加有较小幅度的增加。这和刘伟霞等^[25]的结果基本一致。综合考虑选择最佳乙醇浓度为 40%,并将其作为响应面试验研究参数。

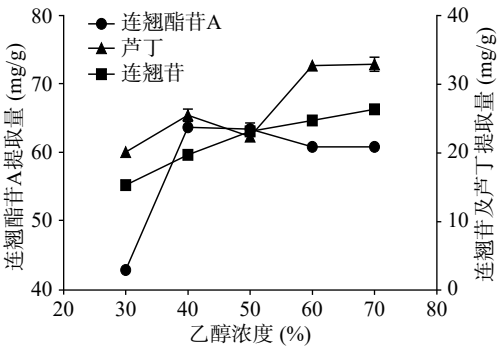


图 2 不同乙醇浓度对连翘叶多指标提取量的影响
Fig.2 Effects of different ethanol concentration on the extraction amount of multi-index of *Forsythia suspense* leaves

2.2.2 不同液料比对连翘叶多指标提取量的影响

由图 3 可知,三种成分的提取量趋势基本一致。当液料比增加时,三种成分的提取量先上升后下降或保持平稳。这主要是因为液料比增加,指标成分与溶剂边界层浓度差变大,成分越容易渗透出来,直至成分在溶剂中的扩散达到了平衡,提取量将不再升高。连翘酯苷 A 和连翘苷提取量在 25:1 mL/g 时达到峰值,分别为 56.79 和 20.97 mg/g。芦丁在 20:1 mL/g 时达到峰值,为 32.17 mg/g。综合考虑选择最佳液料比为 25:1 mL/g,并将其作为响应面试验研究参数。

2.2.3 不同提取时间对连翘叶多指标提取量的影响

由图 4 可知,三种成分的提取量变化趋势较一致,均随着提取时间的延长而增加。这可能是因为指标成分与溶剂边界层存在浓度差,超声时间延长强化了空化和机械效应,有利于有效成分的溶出^[26]。三种

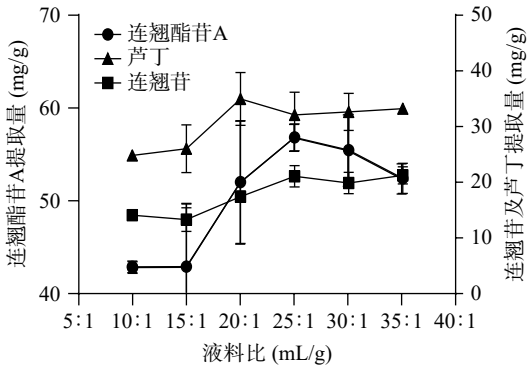


图 3 不同液料比对连翘叶多指标提取量的影响
Fig.3 Effects of different liquid-solid ratios on the extraction amount of multi-index of *Forsythia suspense* leaves

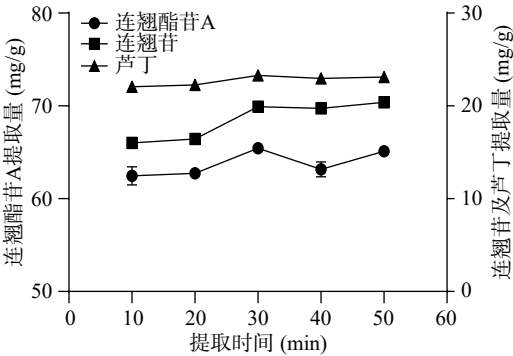


图 4 不同提取时间对连翘叶多指标提取量的影响
Fig.4 Effects of different extraction times on the extraction amount of multi-index of *Forsythia suspense* leaves

成分的提取量均在 30 min 时达到峰值,连翘酯苷 A 为 65.44 mg/g,连翘苷为 19.92 mg/g,芦丁为 23.30 mg/g。综合考虑选择最佳提取时间为 30 min,并将其作为响应面试验研究参数。

2.2.4 不同提取温度对连翘叶多指标提取量的影响

由图 5 可知,提取温度对连翘酯苷 A 提取量影响较显著,对连翘苷和芦丁的提取量影响较小。当温度为 50 ℃ 时,连翘酯苷 A 提取较完全,为 57.88 mg/g。随着提取温度的继续增加,总提取量开始下降,推测其原因可能是连翘酯苷 A 分子中具有酯键,较高温

度易水解^[27]。综合考虑选择最佳提取温度为 50 ℃, 并将其作为响应面研究参数。

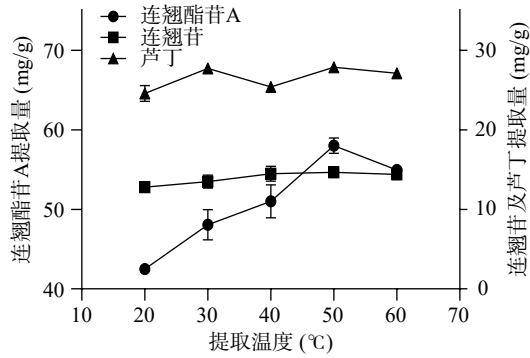


图 5 不同提取温度对连翘叶多指标提取量的影响

Fig.5 Effects of different extraction temperature on the extraction amount of multi-index of *Forsythia suspense* leaves

2.3 响应面试验结果

根据表 4 进行 Box-Behnken 中心组合实验设计, 共 29 个实验点, 研究各因素对连翘叶连翘酯苷 A、连翘苷、芦丁提取量和综合评分 M 的影响。响应面设计及其结果见表 4。

2.3.1 综合评分(M)计算 本实验采用熵权法对多个指标进行客观赋权。熵权法是一种用于衡量指标的离散程度的客观赋权法, 离散程度越大, 表明该指

标对综合评价的影响越大^[28], 已广泛应用于提取工艺研究^[29-31]。本研究利用信息熵这个工具, 计算各项指标的权重, 最终计算得到连翘酯苷 A、连翘苷及芦丁的权重值分别为 0.2022、0.4204、0.3774。按 $M = \text{连翘酯苷 A 提取量} \times 0.2022 + \text{连翘苷提取量} \times 0.4204 + \text{芦丁提取量} \times 0.3774$, 计算不同试验号下各指标成分综合评分(M), 结果见表 4。

2.3.2 模型建立及方差分析 利用 Design-Expert 11.0.4.0 软件对表 4 中综合评分 M 进行多元二次回归拟合, 得回归方程 $M = 30.48 + 2.98A + 1.47B + 0.3811C + 1.30D - 0.6789AB - 0.9088AC - 0.9716AD - 0.0121BC - 0.1739BD - 0.5509CD - 1.97A^2 - 0.5733B^2 - 0.5891C^2 - 2.43D^2$ ($R^2 = 0.9472$)。对模型进行方差分析, 结果见表 5。由表 5 可知该回归模型极显著, 说明其拟合度及预测性良好; 模型的一次项 A 项、B 项、D 项极显著 ($P < 0.01$), C 项不显著; 交互项均不显著; 二次项 A^2 项和 D^2 项影响极显著 ($P < 0.01$), B^2 项、 C^2 项不显著; 这表明各因素与综合评分 M 间并非简单的线性关系。失拟项的 P 值为 $0.1922 > 0.05$, 对综合评分 M 影响不显著, 说明该模型的拟合度良好, 可以利用该模型确定最优提取工艺条件。

2.3.3 响应面分析与优化 利用 Design-Expert 11.0.4.0 软件根据模型绘制各因素交互作用对综合评分

表 4 Box-Behnken 响应面试验设计与结果

Table 4 Box-Behnken response surface test design and results

实验号	因素				提取量(mg/g)			综合评分(M)
	A	B	C	D	连翘酯苷A	连翘苷	芦丁	
1	-1	0	0	-1	35.01	15.27	17.33	20.04
2	-1	1	0	0	65.42	18.36	22.08	29.28
3	0	0	0	0	68.02	20.86	21.40	30.60
4	1	1	0	0	70.22	22.87	21.43	31.90
5	0	-1	1	0	67.23	19.97	20.93	29.89
6	0	0	-1	-1	56.14	17.26	20.51	26.35
7	0	-1	0	-1	46.20	16.53	18.16	23.14
8	-1	-1	0	0	50.97	15.67	17.76	23.59
9	1	0	0	-1	58.99	20.78	22.27	29.07
10	-1	0	0	1	56.05	14.00	21.17	25.21
11	0	-1	-1	0	62.31	18.13	22.21	28.60
12	1	0	0	1	64.14	20.60	23.10	30.35
13	0	1	0	1	64.44	19.71	23.72	30.27
14	0	0	1	1	61.58	18.44	21.85	28.45
15	-1	0	1	0	52.90	15.58	20.79	25.09
16	0	1	-1	0	59.15	20.11	22.64	28.96
17	-1	0	-1	0	48.06	14.72	18.08	22.73
18	0	0	1	-1	59.58	19.11	20.80	27.93
19	0	1	1	0	66.83	20.55	21.29	30.19
20	0	0	0	0	65.64	20.41	20.95	29.76
21	0	0	0	0	65.79	19.54	21.46	29.62
22	0	1	0	-1	56.58	19.77	20.89	27.63
23	0	0	0	0	70.30	20.94	23.81	32.00
24	1	-1	0	0	61.92	20.57	20.58	28.93
25	0	-1	0	1	59.13	17.15	19.37	26.47
26	1	0	1	0	63.57	22.27	20.90	30.11
27	0	0	-1	1	64.59	19.56	20.64	29.07
28	1	0	-1	0	67.62	22.53	21.81	31.38
29	0	0	0	0	67.48	20.62	21.46	30.41

表 5 方差分析结果
Table 5 Results of ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	218.91	14	15.64	8.29	0.0002	**
A	106.73	1	106.73	56.57	<0.0001	**
B	25.80	1	25.80	13.67	0.0024	**
C	1.74	1	1.74	0.9237	0.3528	
D	20.41	1	20.41	10.82	0.0054	**
AB	1.84	1	1.84	0.9771	0.3397	
AC	3.30	1	3.30	1.75	0.2070	
BC	3.78	1	3.78	2.00	0.1790	
BD	0.0006	1	0.0006	0.0003	0.9862	
CD	0.1209	1	0.1209	0.0641	0.8038	
A ²	25.22	1	25.22	13.37	0.0026	**
B ²	2.13	1	2.13	1.13	0.3058	
C ²	2.25	1	2.25	1.19	0.2932	
D ²	38.43	1	38.43	20.37	0.0005	**
残差	26.41	14	1.89			
失拟项	22.81	10	2.28	2.53	0.1922	
纯误差	3.60	4	0.9011			
总和	245.32	28				

注: *代表结果有显著性差异($P<0.05$); **代表结果有极显著性差异($P<0.01$)。

M 影响的响应面图, 见图 6。响应曲面坡度越大, 代表该因素对响应值影响越大。对比图 6 响应面图曲面坡度可知各因素对综合评分 M 影响大小为乙醇浓度(A)>液料比(B)>提取温度(D)>提取时间(C)。根据模型拟合结果, 预测连翘叶最优提取工艺为乙醇浓度为 50.01%, 液料比为 28.41:1 mL/g, 提取 24.98 min, 提取温度为 51.01 ℃, 综合评分为 31.90。

2.3.4 验证实验 取连翘叶粉末 3 份, 按优选的提取工艺进行处理, 考虑实际操作, 将提取工艺调整为 50% 乙醇, 液料比为 28:1 mL/g, 提取 25 min, 提取温度为 51 ℃。按此工艺条件重复 3 次, 实验结果见

表 6 工艺验证结果
Table 6 Process validation results

编号	提取量(mg/g)			综合评分(M)
	连翘酯苷A	连翘苷	芦丁	
1	68.63	22.26	22.93	31.89
2	71.37	23.43	22.53	32.79
3	69.07	22.93	21.93	31.88
$\bar{x}$	69.69	22.87	22.46	32.18
RSD(%)	2.11	2.57	2.24	1.62

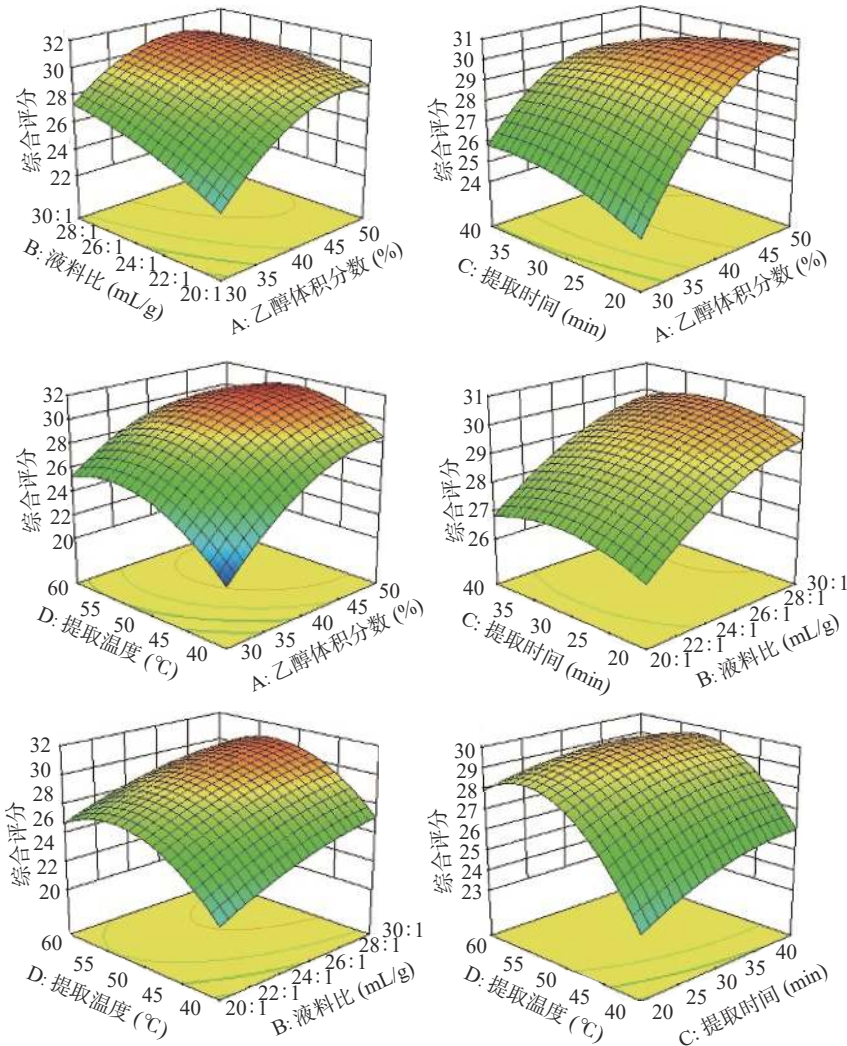


图 6 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图
Fig.6 Response surface plot of the effect of interaction of various factors on comprehensive score

表6。综合评分的实际值与预测值(31.90)的偏差为0.62%。表明该模型基本准确,响应面分析与熵权法相结合得到的连翘叶提取工艺参数稳定、可靠。

3 结论

本研究以连翘叶中三种主要活性成分连翘酯苷A、连翘苷和芦丁的提取量为评价指标,针对乙醇浓度、液料比、提取温度及提取时间进行单因素考察,并在此基础上进行响应面试验优化,得到最佳提取工艺为乙醇浓度:50%,液料比28:1 mL/g,提取温度:51℃,提取时间:25 min。该条件下,连翘酯苷A、连翘苷和芦丁的提取量分别为69.69、22.87、22.46 mg/g,综合评分为32.18,符合响应面模型验证结果。影响提取量的四个因素影响程度大小顺序为乙醇浓度(A)>液料比(B)>提取温度(D)>提取时间(C)。该工艺条件简单,操作控制容易,稳定性好,为连翘叶的综合开发利用提供了新途径。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第六册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 157-159. [Chinese Materia Medica Commission. Chinese materia medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 157-159.]
- [2] 李敬, 尤颖, 赵庆生, 等. 连翘叶成分及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 344-352. [LI J, YOU Y, ZHAO Q S, et al. Research progress on composition and biological activity of *Forsythia suspensa* leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(18): 344-352.]
- [3] 原江锋, 胡金婉, 王大红, 等. 不同产地连翘叶花中主要活性成分的含量分析[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 389-397. [YUAN J F, HU J W, WANG D H, et al. Analysis of main active components in leaves and flowers of *Forsythia suspensa* from different regions[J]. Natural Product Research and Development, 2020, 32(3): 389-397.]
- [4] KANG W, WANG J. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of *Forsythia suspensa* leaves[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2010, 19(7): 617-628.
- [5] QU X Y, LI Q J, ZHANG H M, et al. Protective effects of phillyrin against influenza A virus *in vivo*[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2016, 39(7): 998-1005.
- [6] 张元波. 连翘叶抗菌作用的主要化学物质基础研究[D]. 山西: 山西大学, 2018. [ZHANG Y B. Study on the main chemical substances of the antibacterial effect of *Forsythia suspensa* leaves[D]. Shanxi: Shanxi University, 2018.]
- [7] 张元波, 张敏, 程启斌, 等. 连翘叶抗氧化谱效相关质量评价研究[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(4): 629-634. [ZHANG Y B, ZHANG M, CHENG Q B, et al. Relationship between HPLC fingerprint chromatogram and antioxidant activity of *Forsythia suspensa* leaves[J]. Natural Product Research and Development, 2017, 29(4): 629-634.]
- [8] LIU J, LIN L, JIA Z, et al. Antibacterial potential of *Forsythia suspensa* polysaccharide against resistant *Enterobacter cloacae* with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(15): 8763-8771.
- [9] 王静, 黄庆辰, 高敏玥, 等. 连翘叶连翘苷提取物对高脂诱导大鼠肥胖的预防作用[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 85-90. [WANG J, HUANG Q C, GAO M Y, et al. Preventive effect of forsythin from *Forsythia suspensa* leaves on obesity induced by high-fat diet in rats[J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 85-90.]
- [10] 任晓红, 刘鑫. 安泽县连翘资源产业开发利用现状与对策[J]. 山西林业, 2018(5): 12-13. [REN X H, LIU X. Present situation and countermeasure of exploitation and utilization of *Forsythia* resource industry in Anze county[J]. *Forestry of Shanxi*, 2018(5): 12-13.]
- [11] 王晓燕, 杨莹莹, 叶松华, 等. 有机连翘叶茶中核心营养素及功效成分的测定[J]. 农产品加工, 2016(13): 55-56, 58. [WANG X Y, YANG Y Y, YE S H, et al. Determination of core nutrients and functional components of organic *Forsythia suspensa* leaves tea[J]. *Farm Products Processing*, 2016(13): 55-56, 58.]
- [12] 邓祥敏, 朱星宇. 连翘叶中连翘苷元制备工艺的研究[J]. 中医药学报, 2019, 47(4): 80-84. [DENG X M, ZHU X Y. Preparation technology of *Forsythia* glycogen from *Forsythia suspensa* leaves[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2019, 47(4): 80-84.]
- [13] 孙建瑞, 王大红, 邱智军, 等. 连翘叶中连翘酯苷A、芦丁和连翘苷提取纯化工艺优化[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 200-205. [SUN J R, WANG D H, QIU Z J, et al. Simultaneous extraction purification of forsythoside A, rutin and phillyrin from *Forsythia suspensa* leaves[J]. *Food Science*, 2017, 38(14): 200-205.]
- [14] 张俊顺, 骆嘉原, 姜皓卉, 等. 连翘苷的提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 193-201. [ZHANG J S, LUO J Y, JIANG Z H, et al. Optimization of extraction process of phillyrin and its antibacterial activity[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(7): 193-201.]
- [15] SUN Y S, HOU Z G, LIU Z B, et al. Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of forsythosides from the leaf of *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl and subsequent separation and purification by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2016, 54(8): 1445-1452.
- [16] 王芳, 白吉庆, 黎丹, 等. 阴坡、阳坡连翘及连翘叶中不同成分含量的比较[J]. 中国现代中药, 2016, 18(2): 185-188, 202. [WANG F, BAI J Q, LI D, et al. Comparative study on content of constituents in fruits and leaves of *Forsythia suspensa* growing on shade and sunny slope[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2016, 18(2): 185-188, 202.]
- [17] 齐建红. 连翘苷对几种食用植物油脂的抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2013, 38(4): 274-276. [QI J H. Antioxidant effects of forsythia on edible vegetable oils and fats[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(4): 274-276.]
- [18] 邱智军, 原江锋, 张国庆, 等. 连翘叶中连翘苷和连翘酯苷A对食用油脂的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 39-42. [QIU Z J, YUAN J F, ZHANG G Q, et al. Antioxidant activity of forsythin and forsythiaside A from *Forsythia suspensa* leaves on edible oils[J]. *Food Science*, 2015, 36(17): 39-42.]
- [19] YUAN J F, LIU X Q, YANG J X, et al. *Forsythia suspensa* leaves, a plant: Extraction, purification and antioxidant activity of main active compounds[J]. *European Food Research and*

Technology, 2014, 238(4): 527–533.

[20] DING Y, ZENG L, LI R, et al. 中药连花清瘟胶囊通过抑制病毒繁殖和影响免疫功能发挥抗流感作用 [C]//第十六届国际络病学大会论文集. 石家庄: 中华中医药学会络病分会, 2020: 32–33. [DING Y, ZENG L, LI R, et al. The Chinese prescription Lianhuaqingwen capsule exerts anti-influenza activity through the inhibition of viral propagation and impacts immune function[C]//Proceedings of the 16th International Congress of Epidemiology. Shijiazhuang: China Association of Traditional Chinese Medicine Branch of Collateral Diseases, 2020: 32–33.]

[21] 周菲. 连翘叶减肥保健品开发可行性研究 [D]. 山西: 山西大学, 2018. [ZHOU F. Feasibility study of anti-obesity products about *Forsythia suspensa* leaves[D]. Shanxi: Shanxi University, 2018.]

[22] KIM J M, KIM S, KIM D H, et al. Neuroprotective effect of forsythiaside against transient cerebral global ischemia in gerbil[J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 660(2-3): 326–333.

[23] WANG H M, WANG L W, LIU X M, et al. Neuroprotective effects of forsythiaside on learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse prone (SAMP8) mice[J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2013, 105: 134–141.

[24] 王金, 王芳, 王小平, 等. 产地对连翘叶中木脂素和黄酮类成分含量的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2016, 31(4): 334–336.

[WANG J, WANG F, WANG X P, et al. Effect of the origin on the content of lignan and flavonoid constituents of *Forsythia suspensa* leaves[J]. *Northwest Pharmaceutical Journal*, 2016, 31(4): 334–336.]

[25] 刘伟霞, 杨建雄. 基于响应面法从连翘叶中提取连翘酯苷 A 和连翘苷的工艺优化 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(8): 1098–1104. [LIU W X, YANG J X. Optimization of extraction technology of forsythiaside and phillyrin in *Forsythia suspensa* leaves based on response surface methodology[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(8): 1098–1104.]

[26] 刘凤霞, 李芳蓉, 刘淑梅, 等. 超声技术在中草药黄酮类成

分提取中的应用研究 [J]. *中兽医医药杂志*, 2018, 37(6): 88–91.

[LIU F X, LI F R, LIU S H M, et al. The application of ultrasonic technology in extracting flavonoids ingredients of Chinese herbal medicine[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2018, 37(6): 88–91.]

[27] 王曙宾, 郑亚杰. 连翘提取物和连翘酯苷 A 原料中连翘酯苷 A 的稳定性研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 909–911. [WANG S B, ZHENG Y J. Study on the stability of forsythioside A in *Forsythia suspensa* extract and raw material[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, 41(6): 909–911.]

[28] 林建潮. 熵权法确定评价指标权重在 Excel 中的实现 [J]. *中国医院统计*, 2020, 27(4): 362–364. [LIN J C. Realization of entropy weight method to determine evaluation index weight in Excel[J]. *Chinese Journal of Hospital Statistics*, 2020, 27(4): 362–364.]

[29] 李冰韶, 康倩, 陈桢, 等. 基于 FAHP-熵权法优选复方双花口服液醇沉工艺研究 [J]. *中南药学*, 2019, 17(3): 414–419. [LI B S, KANG Q, CHEN C, et al. Optimization of alcohol precipitation technology for Fufang Shuanghua oral liquid based on FAHP-entropy method[J]. *Central South Pharmacy*, 2019, 17(3): 414–419.]

[30] 王继龙, 魏舒畅, 刘永琦, 等. 基于 G1-熵权法和正交设计优选黄芪百合颗粒的提取纯化工艺 [J]. *中草药*, 2018, 49(3): 596–603. [WANG J L, WEI S C, LIU Y Q, et al. Optimization of extraction and purification technology for Huangqi Baihe Granules based on G1-entropy method and orthogonal design[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(3): 596–603.]

[31] 吴振起, 高畅, 杨璐, 等. 基于层次分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选养阴清肺汤加味提取工艺 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2862–2867. [WU Z Q, GAO C, YANG L, et al. Optimization of extraction process of Modified Yangyin Qingfei Decoction by Box-Behnken response surface methodology based on analytic hierarchy process[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(12): 2862–2867.]