

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	广西横州	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。

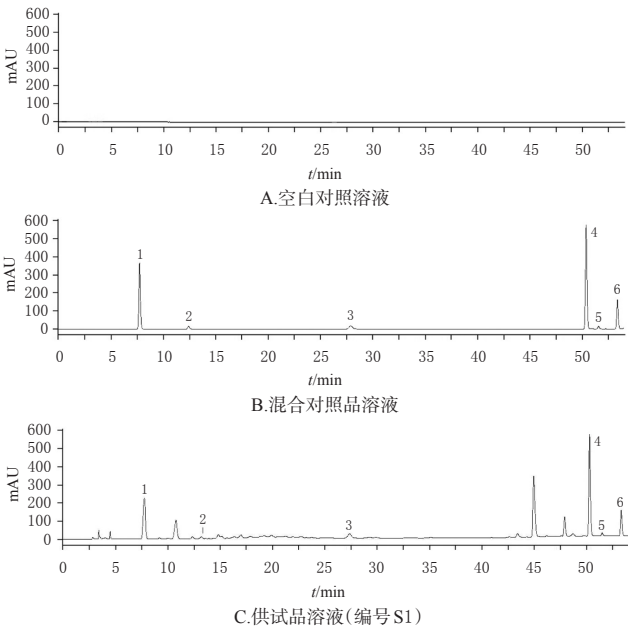
2.1.2 供试品溶液的制备 取龙眼叶药材粉末 2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入乙醇-盐酸(体积比为 9:1,下同)16 mL^[3],称定质量,水浴提取 90 min,放冷,再次称定质量,用乙醇-盐酸补足减失的质量,于 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

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	r	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/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回收率/ %	平均加样回收率/ %	RSD/ %
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 酸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
山奈酚	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%;山奈酚的含量其次,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)=ΣDiJ×权重系数^[16-17],即 $Y=DiJ_{\text{没食子酸}}\times30\%\times100+DiJ_{\text{原儿茶酸}}\times5\%\times100+DiJ_{\text{没食子酸乙酯}}\times20\%\times100+DiJ_{\text{槲皮素}}\times30\%\times100+DiJ_{\text{木犀草素}}\times5\%\times100+DiJ_{\text{山奈酚}}\times10\%\times100^{[17]}$,式中 DiJ 表示某指标的

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。

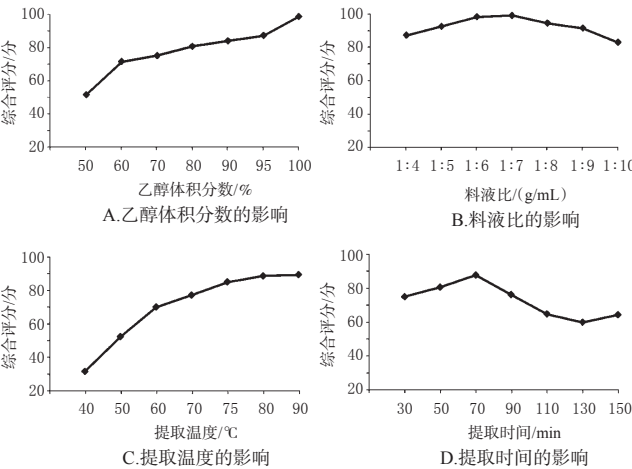


图2 乙醇体积分数等因素对综合评分的影响

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			
总离差	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。

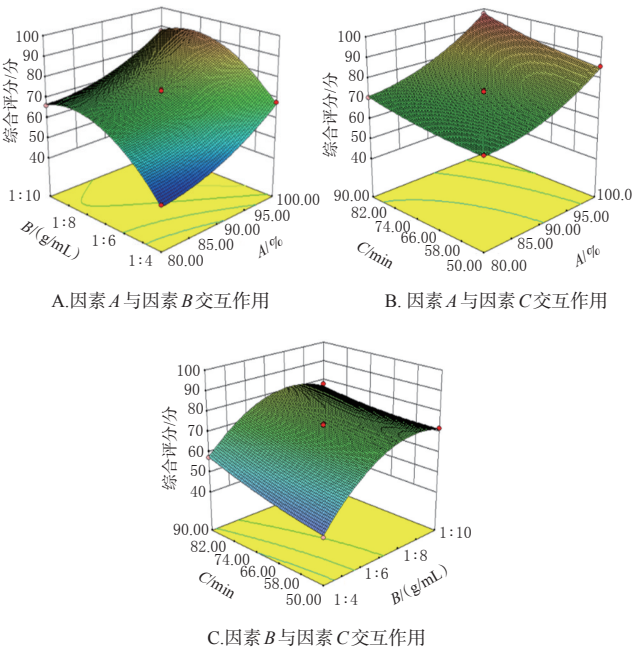


图3 各因素交互作用对综合评分的响应面图

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法同时测定野老鹳草中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