

引用:姜文倩,郑陈静,吕曼,等.酸枣仁中斯皮诺素超声提取工艺优化研究[J].现代中医药,2024,44(3):106-110.

# 酸枣仁中斯皮诺素超声提取工艺优化研究<sup>\*</sup>

姜文倩 郑陈静 吕曼 杨海波 崔春利<sup>\*\*</sup> 蒙跃龙 林萍 邓庆庆

(陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046)

**摘要:**目的 优化酸枣仁中斯皮诺素的超声提取工艺。方法 在单因素实验基础上,以斯皮诺素含量( $Y$ )为评价指标,乙醇体积分数( $X_1$ )、提取功率( $X_2$ )和液料比( $X_3$ )为考察对象,利用响应面法优化酸枣仁中斯皮诺素的提取工艺,并对其提取过程数据进行拟合。结果 通过优化并结合实际将酸枣仁最佳工艺参数设定为液料比为 20:1;超声功率 820 W;乙醇体积分数 80%,在超声温度 30 ℃条件下提取 40 min,进行 3 次平行验证实验,得出斯皮诺素平均含量为 1.1973 mg·g<sup>-1</sup>。结论 采用响应面法优化酸枣仁中斯皮诺素提取工艺方法可行。

**关键词:**斯皮诺素;酸枣仁;超声提取;响应面法

中图分类号:R283 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2024)03-0106-05

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2024.03.020

优质的睡眠是人体健康的基石之一,但是现代社会的生活压力巨大,生活节奏较快,失眠成为较为常见的疾病之一<sup>[1]</sup>。中医认为失眠是由心神失养,阴血不足,阳盛阴衰,阴阳失交所引起的以不寐为特征的一类病症。病因复杂,病机主要为情志所伤、饮食不节、病后年迈、先天心虚胆怯等<sup>[2]</sup>。酸枣仁养心安神,可镇静催眠<sup>[3]</sup>。酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *Spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,具有益气补肝、生津活血等功效,三萜类、黄酮类、氨基酸类以及各种脂肪油等化合物是酸枣仁的主要成分<sup>[4-5]</sup>,这些成分对神经中枢和心血管等都能产生一定的作用和影响,在临床应用中发挥了镇定、催眠以及镇痛的功效<sup>[6-7]</sup>。

传统提取方法耗材多,加工时间长,因此,本研究在前人研究的基础上用响应面分析法<sup>[8-9]</sup>优化、考察酸枣仁最佳提取工艺<sup>[10-11]</sup>。酸枣仁主要活性成分包括皂苷、三萜类化合物、黄酮类化合物等<sup>[12]</sup>,吴玉兰等发现黄酮类成分具有镇静催眠作用,其中斯皮诺素确定是酸枣仁汤镇静催眠的药效物质基础之一,因此以酸枣仁中的斯皮诺素含量为此响应面的优化指标<sup>[13-14]</sup>,通过紫外检测其

吸光度对提取工艺单因素进行优化。为工业化大生产提供一定的借鉴<sup>[15]</sup>。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** AP224W 电子分析天平(日本岛津公司);UV-2600 紫外分光光度计(北京金科瑞达科技有限公司);QE-400 粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);BILON-1000CT 多用途恒温超声波提取机(上海比朗仪器制造有限公司);HH-2A 水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

**1.2 试药** 炒酸枣仁(泽群中药饮片有限公司);斯皮诺素(批号: MUST-18051904,成都钠钨锂生物科技有限公司);95%乙醇(安徽安特食品股份有限公司);色谱甲醇(霍尼韦尔公司);石油醚(60~90℃)(成都市科隆化学品有限公司);5%香兰素冰醋酸、冰醋酸、高氯酸等均为分析纯(均购自成都市科龙化工试剂厂);水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-水,采用梯度洗脱(梯度条件见表1);柱温:25 ℃;检测波长:335 nm;流量:1 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:5 μL。

<sup>\*</sup> 基金项目:陕西省科技厅社发攻关项目(2015SF-246);陕西省大学生创新创业训练项目(S202110716076)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:崔春利,高级实验师。E-mail:cc1906@163.com

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 ~ 10	88→81	12→19
10 ~ 16	81→80	19→20
16 ~ 22	80→0	20→100
22 ~ 30	0	100

**2.2 对照品溶液的配制** 称取斯皮诺素对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,以色谱甲醇配制成质量浓度为 0.4 mg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液,精密移取 2 mL 对照品溶液置于 10 mL 容量瓶中,加色谱甲醇制成每 1 mL 含 0.08 mg 的对照品溶液,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 取酸枣仁粗粉(过四号筛)8.0 g,精密称定,置索氏提取器中,加入石油醚(60 ~ 90 ℃)适量,加热回流 6 h,弃去石油液,挥去溶剂,药渣转移至超声提取机提取杯中,加 80% 乙醇 160 mL,设定提取温度 30 ℃,功率 850 W,插入 ϕ10 变幅杆超声提取 40 min,过滤,残渣用 80% 乙醇 80 mL 洗涤 2 次,合并洗液与滤液,回收溶剂至干,残渣加甲醇溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.4 检测波长的确定**<sup>[16]</sup> 分别取对照品与供试品溶液放在 200 ~ 400 nm 波长范围进行扫描,结果两种溶液的紫外光谱中,最大吸收均在 335 nm 处,故确定高效液相检测波长为 335 nm。

**2.5 标准曲线的绘制**<sup>[17]</sup> 分别取 2, 5, 10, 15 和 20 μL 体积的斯皮诺素(0.08 mg · mL<sup>-1</sup>)对照品溶液进样检测,以斯皮诺素对照品溶液的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,建立回归方程  $Y = 11.623X - 0.0092$ ,  $r = 0.9999$ ,斯皮诺素在 0.16 ~ 1.6 μg 范围内,线性关系良好。

3 响应面法超声提取工艺

3.1 单因素实验考察

**3.1.1 液料比** 平行称取 4 份干燥的酸枣仁 8.0 g,精密称定,分别加入 12、15、20、25 倍水量,在乙醇体积分数为 70%、超声温度为 30 ℃、超声功率为 750 W 的条件下提取 40 min,测得斯皮诺素含量依次为: 1.2907, 1.4557, 1.9793, 1.9230 mg · g<sup>-1</sup>。适当的液料比有利于斯皮诺素的提取,这是因为提取试剂的增多可加大传质动力,促进固相酸枣仁中黄酮类物质向液相提取试剂中

的迁移<sup>[18]</sup>。由此可知当液料比为 20 : 1 (mL · g<sup>-1</sup>) 时,酸枣仁中斯皮诺素的提取率最大,若继续增大其液料比,提取率变化不明显,故选取 20 倍提取溶剂作为进一步筛选单因素条件。

**3.1.2 乙醇体积分数** 用乙醇为溶剂进行提取时,回流法效果优于渗漉法<sup>[19]</sup>。乙醇回流法是浸提法中的一种<sup>[20]</sup>。平行称取 4 份干燥的酸枣仁 8.0 g,精密称定,分别加入 50%、70%、80%、95% 的乙醇作为溶媒,在液料比为 12 : 1,超声温度为 30 ℃,提取功率为 750 W 的条件下提取 40 min,测得斯皮诺素含量依次为: 0.9206、1.2914、1.6952、0.8270 mg · g<sup>-1</sup>,由此可知当乙醇体积分数在 80% 后斯皮诺素含量明显下降,故选取乙醇体积分数为 80% 作为进一步筛选单因素条件。

**3.1.3 提取温度** 平行称取 4 份干燥的酸枣仁 8.0 g,精密称定,提取温度分别设为 10 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃,在乙醇体积分数为 70%、液料比为 12 : 1、超声功率为 750 W 的条件下提取 40 min,测得斯皮诺素含量依次为: 1.1040、1.1188、1.2882、1.2849、1.1129 mg · g<sup>-1</sup>。温度的升高,有助于传质过程,使分子扩散运动越激烈,加快溶质的扩散和溶剂的渗透,有利于酸枣仁的提取<sup>[21]</sup>。当提取温度为 30 ℃ 时,酸枣仁中斯皮诺素的提取率最大,若继续增大温度,提取率开始慢慢下降,故选取 30 ℃ 提取温度作为进一步筛选单因素条件。

**3.1.4 提取功率** 平行称取 4 份干燥的酸枣仁 8.0 g,精密称定,提取功率分别设为 650 W、750 W、850 W、950 W,在乙醇体积分数为 70%、液料比为 12 : 1、超声温度为 30 ℃ 条件下提取 40 min,测得斯皮诺素含量依次为: 1.0353、1.2882、1.9061、1.7806 mg · g<sup>-1</sup>,由此可知当提取功率为 850 W 时,酸枣仁中斯皮诺素的提取率最大,故选择 850 W 提取功率作为进一步筛选单因素条件。

3.2 优化超声提取工艺

**3.2.1 因素水平设计**<sup>[22]</sup> 与结果分析 根据上述单因素实验结果,以斯皮诺素含量为响应值,以液料比、乙醇体积分数、超声功率为自变量,每个因素根据单因素实验结果设计 3 个水平,分别用代码 -1、0、1 表示,采取响应面的方法对实验进行优化,

来确定斯皮诺素的最佳提取条件。实验结果、回归方程及响应面分析方差分析结果见表 2~4。

表 2 实验因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A 乙醇体积分数 (%)	70	80	90
B 超声功率 (W)	750	850	950
C 液料比 (mL · g <sup>-1</sup> )	10	20	30

表 3 响应面分析表与响应值

序号	X1 乙醇 体积 (%)	X2 提取 功率 (W)	X3 液料比 (mL · g <sup>-1</sup> )	斯皮诺素含量 (mg · g <sup>-1</sup> )
1	80	850	1:20	0.8683
2	70	950	1:20	0.6315
3	90	750	1:20	0.5778
4	80	850	1:20	1.0000
5	90	950	1:20	0.4440
6	70	750	1:20	0.7525
7	80	850	1:20	0.7658
8	90	850	1:10	0.5065
9	80	850	1:20	0.9149
10	80	950	1:10	0.7105
11	70	850	1:10	0.6127
12	90	850	1:30	0.4353
13	80	850	1:20	0.8542
14	80	950	1:30	0.7308
15	80	750	1:10	0.7021
16	70	850	1:30	0.7165
17	80	750	1:30	0.7308

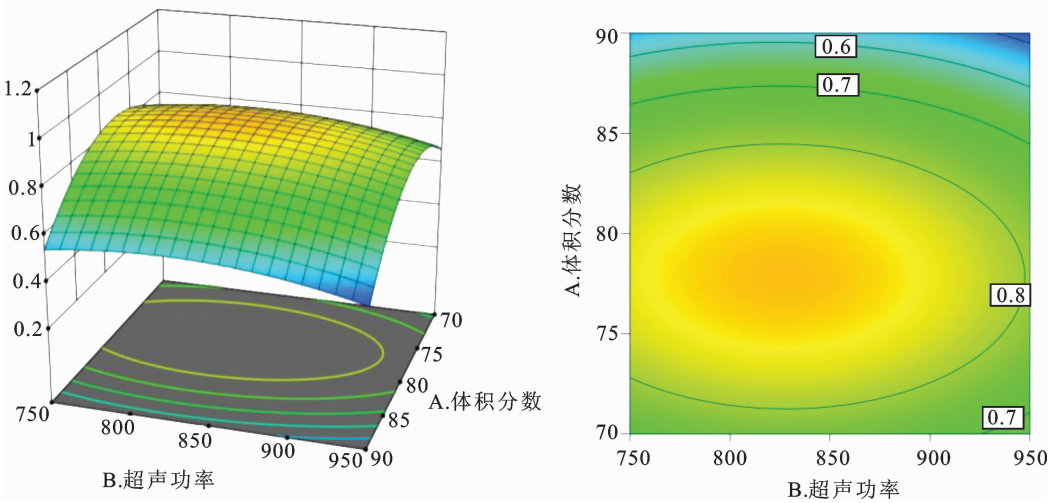
对表 3 中的数据进行软件分析,以斯皮诺素含量(Y)为优化指标分别对影响斯皮诺素含量的 3

个因素进行线性回归方程拟合,最终得到的方程为: $Y=0.8806-0.0937\times X_1-0.0308\times X_2+0.0102\times X_3-0.0032\times X_1X_2-0.0438\times X_1X_3-0.0021\times X_2X_3-0.2150\times X_{12}-0.0642\times X_{22}-0.0979\times X_{32}$  ( $R^2=0.9039;R_{Adj}^2=0.7804$ ),将此方程模型用 F 检验进行方差分析并检验模型系数的显著性,结果见表 4。

由表 4 可知,对酸枣仁中斯皮诺素含量的影响最大( $P<0.05$ )的是乙醇体积分数,超声功率和液料比也有影响。回归方程  $P>0.05$ ,没有显著差异,表示本模型拟合度良好。响应面的三维曲线和等高线见图 1~3。

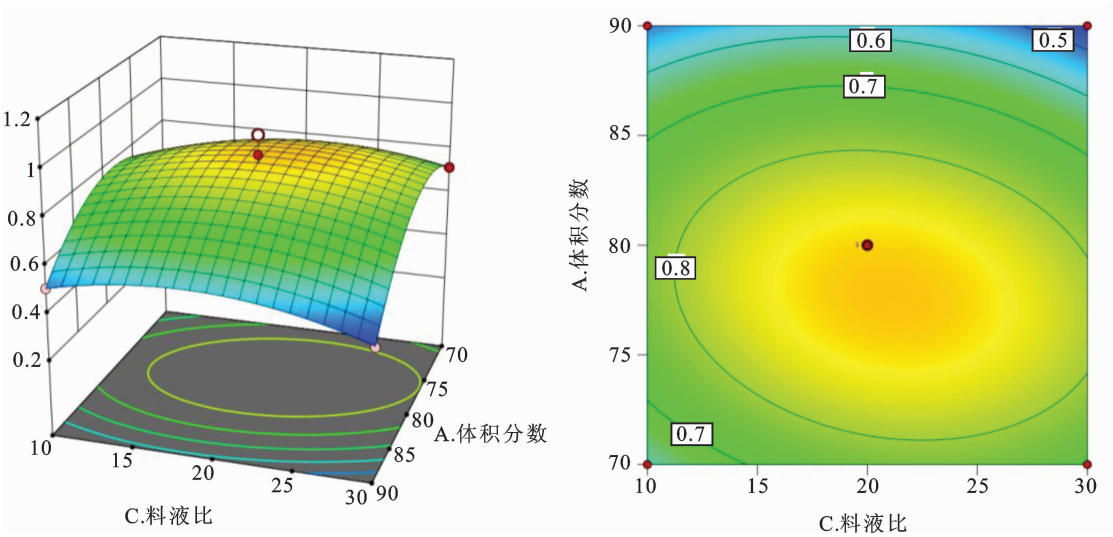
表 4 酸枣仁中斯皮诺素的提取工艺回归分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P(F>F <sub>α</sub> )
Model	0.3596	9	0.0400	7.32	0.0078
A-X <sub>1</sub>	0.0702	1	0.0702	12.86	0.0089
A-X <sub>2</sub>	0.0076	1	0.0076	1.39	0.2768
A-X <sub>3</sub>	0.0008	1	0.0008	0.1516	0.7086
AB	0.0000	1	0.0000	0.0075	0.9333
AC	0.0077	1	0.0077	1.40	0.2750
BC	0.0000	1	0.0000	0.0032	0.9565
A <sub>2</sub>	0.1947	1	0.1947	35.65	0.0006
B <sub>2</sub>	0.0174	1	0.0174	3.18	0.1178
C <sub>2</sub>	0.0403	1	0.0403	7.39	0.0299
残差	0.0382	7	0.0055		
失拟性	0.0088	3	0.0029	0.3970	0.7631
纯误差	0.0295	4	0.0074		
总差	0.3978	16			

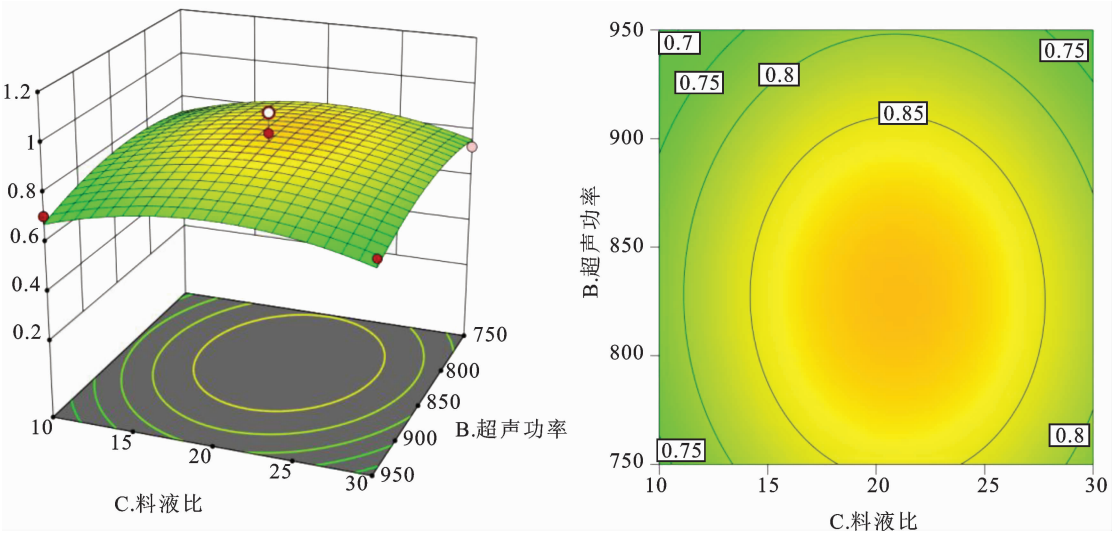


注:A. 体积分数(% ,volume fraction); B. 超声功率(W ,supersonic power)

图 1 超声功率和乙醇体积分数对斯皮诺素含量的交互作用



注:A. 体积分数(% ,volume fraction) ;C. 料液比(solid-liquid ratio)  
图 2 乙醇体积分数和液料比对斯皮诺素含量的交互作用



注:B. 超声功率(W ,supersonic power) ;C. 料液比(solid-liquid ratio)  
图 3 超声功率和液料比对斯皮诺素含量的交互作用

根据各实验因素交互作用后得到的结果可知,3 个单因素的影响先后顺序为:液料比<超声功率<乙醇体积分数。

**3.2.2 提取工艺优化与验证<sup>[23]</sup>** 以斯皮诺素含量的最大值为优化目标,得最佳工艺参数为:液料比 21∶1;超声功率 822 W;乙醇体积分数 77.6%。斯皮诺素含量预测的最大值为 1.2988 mg·g<sup>-1</sup>。结合实际提取工艺<sup>[24]</sup>,将酸枣仁最佳工艺参数设定为液料比 20∶1;超声功率 820 W;乙醇体积分数 80%,在超声温度 30 ℃ 条件下提取 40 min,进行 3 次平行验证实验,得出斯皮诺素平均含量为 1.1973 mg·g<sup>-1</sup>,与预测值接近,结果证实该模型可靠。

4 结 论

乙醇溶出率高,经济,无污染<sup>[25]</sup>,因此本研究以乙醇水溶液为提取溶剂,采用超声提取法提取酸枣仁中的斯皮诺素,通过实验确定了斯皮诺素的提取条件为:液料比 20∶1,超声功率 820 W,乙醇体积分数 80%,进行 3 次平行验证实验,得出斯皮诺素平均含量为 1.1973 mg·g<sup>-1</sup>,为工业化提取酸枣仁中的斯皮诺素提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] 李晓玲,张庆梅,任媛媛,等. 酸枣仁汤配合针刺治疗失眠临床研究[J]. 现代中医药,2022,42(4):155-158.  
[2] 周光照. 枣合首麦汤治疗失眠 31 例[J]. 现代中医药,2015,35(5):19-20.

- [3] 王晶,赵重博,柏希慧,等. 天仁安眠颗粒的质量标准研究[J]. 陕西中医药大学学报,2018,41(2):97-101.
- [4] 郝文珮,朱承根,雷小强,等. 酸枣仁水提取物中的三萜类成分[J/OL]. 药学学报:1-23 [2023-04-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20230222.1254.004.html>.
- [5] 韩鹏,李冀,胡晓阳,等. 酸枣仁的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药学报,2021,49(2):110-114.
- [6] 康健. 酸枣仁汤治疗失眠60例临床观察[J]. 实用中医内科杂志,2014,28(6):53.
- [7] 丁德正. 酸枣仁汤治疗精神疾病举隅[J]. 中华中医药杂志,2014,29(1):152-154.
- [8] 芦晓芳,赵晋忠,常丽萍. 三萜类酸枣仁皂苷的提取与纯化方法研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2017,29:1976-1982.
- [9] 芦晓芳,马清亮,王海香,等. 大孔吸附树脂分离纯化酸枣仁皂苷影响因素探讨[J]. 分子科学学报,2019,35(1):40-48.
- [10] 祝洪艳,林海成,杨鹤,等. 中心组合设计-响应面法优选酸枣仁总皂苷的提取工艺研究[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(11):3718-3726.
- [11] 赵文杰,敬思群. 响应面法回流提取新疆昆仑雪菊原花青素工艺优化[J]. 食品科技,2013,38(4):214-219.
- [12] 姚玉静,张书敏,任艳艳,等. 酸枣仁提取物、龙眼肉提取物、 $\gamma$ -氨基丁酸和酪蛋白水解物复配制剂改善睡眠功能[J]. 食品工业科技,2023,44(7):406-410.
- [13] 高蓉,李珊,陈贤金,等. 配伍对君药酸枣仁中斯皮诺素和阿魏酸的药动学影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(16):3293-3297.
- [14] 温子帅,李新蕊,木盼盼等. 酸枣仁中斯皮诺素、酸枣仁皂苷A含量测定及其质量等级划分标准研究[J]. 中国药房,2019,30(20):2802-2807.
- [15] 高声传,郭涛,夏维杰等. 比色法测定酸枣仁提取物中总皂苷的含量[J]. 实用药物与临床,2005,8(1):15-16.
- [16] 展雪锋. 一阶导数紫外分光光度法测定酸枣仁中酸枣仁皂苷A的含量[J]. 中草药,1993,24(10):525-526.
- [17] 张群. 酸枣仁总皂苷的提取纯化及酸枣仁皂苷A的生物转化研究[D]. 济南:山东中医药大学,2016.
- [18] 郭丽丽,李燕,张钰笛等. 酸枣仁皂苷提取工艺的优化及固体饮料产品的研制[J]. 食品研究与开发,2020,41(7):104-111.
- [19] 许勇,郭兴杰,范捷等. 正交设计研究补骨脂中总黄酮提取工艺[J]. 沈阳药科大学学报,2003(2):144-146.
- [20] 张宏波,洪波. 乙醇回流提取丁香酚的新方法[J]. 吉林大学自然科学学报,2001(2):106-110.
- [21] 张吉刚,林朝朋. 黄芪总黄酮的醇提工艺研究[J]. 现代食品科技,2006(3):158-160.
- [22] 杨婷婷,房雷雷,辛慧洁,等. 响应面法优化超声辅助提取酸枣仁中阿魏酰斯皮诺素[J]. 食品工业,2019,40(4):151-155.
- [23] 赵敏,战祥,徐茜,等. 响应面法优化五倍子多酚的提取工艺[J]. 湖北大学学报(自然科学版),2023,45(2):294-300.
- [24] 邹桂华,邹玉龙,徐红纳,等. 响应面法优选青叶胆中总三萜提取工艺[J]. 实验室科学,2022,25(6):29-32.
- [25] 程小丽,张伟. 酸枣仁总皂苷的提取分离及含量测定[J]. 陕西中医学院学报,2012,33(5):607-609.

(修回日期:2023-06-13 编辑:宋蓓)