Global Science Publishing

响应面法优化郁李仁总黄酮提取工艺及其对便秘模型小鼠的影响

葛佳瑞，余涛，李娜，杨铭（通讯作者），庞亚蓉，杜蓓
陕西国际商贸学院，陕西咸阳

DOI:10.62836/medicine.v3i5.1524

摘要：目的：优化郁李仁总黄酮的超声辅助提取工艺，并评价其对便秘模型小鼠的通便作用。方法：在单因素试验基础上，采用Box-Behnken响应面法考察乙醇体积分数、液料比和超声时间对郁李仁总黄酮得率的影响；建立盐酸洛哌丁胺诱导的便秘小鼠模型，按总黄酮低、中、高剂量（50、100、200mg/kg）连续灌胃14d，测定首粒黑便时间、6h排便粒数、粪便含水率、小肠推进率及血清胃动素（MTL）、P物质（SP）、血管活性肠肽（VIP）水平。结果：最优提取工艺为乙醇体积分数64%、液料比22mL/g、超声时间33min，经验证总黄酮得率达（9.71±0.06）mg/g，与预测值的相对误差为0.14%；回归模型极显著（$P<0.0001$），失拟项不显著（$P=0.4235$），$R^2=0.9958$。与模型组比较，各剂量组首粒黑便时间显著缩短，6h排便粒数、粪便含水率和小肠推进率显著升高，血清MTL、SP水平显著上调而VIP水平显著下调（$P<0.05$），且呈一定剂量依赖性。结论：优化后的提取工艺稳定可行，郁李仁总黄酮对便秘模型小鼠具有明显通便作用，其机制可能与调节胃肠运动相关神经递质的分泌有关。

关键词：郁李仁；总黄酮；响应面法；Box-Behnken设计；便秘；小鼠

Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Flavonoids from Pruni Semen by Response Surface Methodology and Its Laxative Effect on Constipated Mice

Jiarui Ge, Tao Yu, Na Li, Ming Yang *, Yarong Pang, Bei Du
Shaanxi University of International Trade & Commerce, Xianyang, Shaanxi

Abstract: Objective: To optimize the ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from Pruni Semen (Yuliren) and to evaluate its laxative effect on constipated mice. Methods: Based on single-factor experiments, a three-factor, three-level Box-Behnken design coupled with response surface methodology (RSM) was employed to investigate the effects of ethanol concentration, liquid-to-solid ratio and ultrasonic time on the extraction yield of total flavonoids. A loperamide-induced constipation model was established in KM mice, which were randomly divided into six groups (n = 10) and orally administered with total flavonoids at 50,100 and 200 mg/kg for 14 consecutive days. The time to the first black stool, stool pellet number within

*2024年陕西省教育厅一般专项计划项目，基于多维谱效关系的郁李仁润肠通便药效物质辨识研究，项目编号：24JK0332；
2025年国家级大学生创新训练项目，郁李仁总黄酮的提取分离及抗便秘活性谱效关系研究，项目编号：202513123004；
2026年省级大学生创新训练项目，无蔗糖黑麦山楂神曲烘焙饼干的配方优化与控糖特性分析，项目编号：S202613123013；
2025年陕西省大学生创新训练计划省级立项项目，栀子厚朴汤的抗抑郁作用研究，项目编号：S2025131230050。

6 h, fecal water content, small intestinal propulsion rate, and serum levels of motilin (MTL), substance P(SP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) were determined. Results: The optimum extraction conditions were as follows: ethanol concentration 64%, liquid-to-solid ratio 22 mL/g and ultrasonic time 33 min. Under these conditions, the verified yield of total flavonoids was (9.71±0.06) mg/g, with a relative deviation of 0.14% from the predicted value. The regression model was highly significant (P<0.0001) and the lack-of-fit test was not significant (P=0.4235), with R^2 = 0.9958. Compared with the model group, all flavonoid-treated groups showed significantly shortened time to the first black stool, increased stool pellet number, higher fecal water content and small intestinal propulsion rate, as well as up-regulated serum MTL and SP levels and down-regulated VIP level (P<0.05) in a dose-dependent manner. Conclusion: The optimized process is stable and feasible. Total flavonoids from Pruni Semen exert a marked laxative effect on constipated mice, which may be associated with the regulation of gastrointestinal neurotransmitters.

Keywords: Pruni Semen; total flavonoids; response surface methodology; Box-Behnken design; constipation; mice

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

郁李仁购自××中药材市场（产地：内蒙古），经××大学×××教授鉴定为蔷薇科植物欧李Prunus humilis Bge.的干燥成熟种子，符合《中国药典》2025年版一部项下规定。芦丁对照品（纯度≥98%，批号：20240315）购自××生物科技有限公司；盐酸洛哌丁胺胶囊（2mg/粒）购自××制药有限公司；枸橼酸莫沙必利片（5mg/片）；小鼠MTL、SP、VIP酶联免疫吸附测定（ELISA）；无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠、活性炭、阿拉伯树胶等均为分析纯[1]。

1.2 仪器与设备

UV-1800型紫外-可见分光光度计（日本岛津公司）；KQ-500DE型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，功率250W）；TGL-16M型高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；SpectraMax i3型酶标仪（美国Molecular Devices公司）；ME204型电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.3 实验动物

SPF级雄性KM小鼠60只，6～8周龄，体质量18～22g，购自××实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK(×)20××-000×。饲养于温度（23±2）℃、相对湿度（50±10）%、明暗交替12 h的环境中，自由进食饮水。

1.4 方法

1.4.1 总黄酮含量测定

采用亚硝酸钠-硝酸铝比色法测定。精密称取芦丁对照品10mg，用60%乙醇溶解并定容至50mL，得质量浓度0.2mg/mL的对照品溶液。分别精密量取0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL置10mL量瓶中，加入5%亚硝酸钠溶液1.0mL，摇匀静置6min，加入10%硝酸铝溶液1.0mL，静置6min，再加入4%氢氧化钠溶液4.0mL，用60%乙醇定容，静置15min后于510nm处测定吸光度（A）。以A值（Y）对质量浓度（X，mg/mL）进行线性回归，得回归方程Y=11.426X+0.003　1（r=0.999 3），线性范围为0.01～0.05mg/mL。总黄酮得率按下式计算：得率（mg/g）＝C×V×N/m，式中C为提取液中总黄酮质量浓度（mg/mL），V为提取液体积（mL），N

为稀释倍数，m为药材质量（g）[2]。

1.4.2 单因素试验

将郁李仁药材于55℃烘干至恒重，粉碎后过60目筛。精密称取粉末2.0g，在固定超声功率250 W、超声温度45℃条件下，依次考察乙醇体积分数（40%、50%、60%、70%、80%）、液料比（10、15、20、25、30mL/g）和超声时间（10、20、30、40、50min）对总黄酮得率的影响，每个水平平行3次。提取液抽滤后定容至100 mL，按1.4.1项下方法测定得率[3]。

1.4.3 Box-Behnken响应面试验

在单因素试验基础上，选取乙醇体积分数（A）、液料比（B）和超声时间（C）为考察因素，以总黄酮得率（Y）为响应值，采用三因素三水平Box-Behnken试验设计优化提取工艺，因素与水平见**表1**。共安排17组试验（含5个中心点），试验方案与结果见**表2**。

1.4.4 便秘模型构建、分组与给药

小鼠适应性饲养7d后，按体质量随机分为6组，每组10只：空白对照组（NC组）、模型组（MC组）、阳性对照组（PC组）及郁李仁总黄酮低、中、高剂量组（LD、MD、HD组），分组与给药方案见**表3**。除NC组灌胃等体积0.5%羧甲基纤维素钠（CMC-Na）溶液外，其余各组灌胃盐酸洛哌丁胺10mg/kg造模，1次/d，连续14d；造模同时，各组按0.1mL/10g灌胃体积给予相应受试物，连续14d。末次给药后各组禁食不禁水12h，除NC组外，其余各组再次灌胃洛哌丁胺以维持便秘状态，30 min后进行各项指标测定[4]。

1.4.5 指标测定

（1）排便功能：各组小鼠灌胃墨汁（含5%活性炭和5%阿拉伯树胶）0.25mL/只，单笼饲养，记

表1. Box-Behnken试验因素与水平

水平	A乙醇体积分数/%	B液料比/(mL/g)	C超声时间/min
-1	50	15	20
0	60	20	30
1	70	25	40

表2. Box-Behnken试验设计与结果

试验号	A乙醇体积分数/%	B液料比/(mL/g)	C超声时间/min	得率/(mg/g)	预测值/(mg/g)
1	50	15	30	7.27	7.29
2	70	15	30	8.11	8.06
3	50	25	30	7.61	7.66
4	70	25	30	9.28	9.26
5	50	20	20	7.31	7.30
6	70	20	20	8.80	8.87
7	50	20	40	8.22	8.15
8	70	20	40	8.95	8.96
9	60	15	20	8.00	7.99
10	60	25	20	8.57	8.52
11	60	15	40	8.16	8.21
12	60	25	40	9.23	9.24
13	60	20	30	9.42	9.46
14	60	20	30	9.48	9.46
15	60	20	30	9.41	9.46
16	60	20	30	9.40	9.46
17	60	20	30	9.58	9.46

表3. 动物实验分组与给药方案

组别	n	造模	给药剂量/(mg/kg)
空白对照组（NC）	10	0.5%CMC-Na	—
模型组（MC）	10	洛哌丁胺	—（等体积CMC-Na）
阳性对照组（PC）	10	洛哌丁胺	莫沙必利2.5
低剂量组（LD）	10	洛哌丁胺	总黄酮50
中剂量组（MD）	10	洛哌丁胺	总黄酮100
高剂量组（HD）	10	洛哌丁胺	总黄酮200

录自灌胃至排出首粒黑便的时间；随后连续收集6h粪便，称量湿重，65℃烘干12h后称量干重，计算粪便含水率，含水率（%）＝（湿重－干重）/湿重×%100。同时记录6h排便粒数。（2）小肠推进率：另取同批小鼠，灌胃墨汁20min后脱颈椎处死，取幽门至盲肠段小肠平铺，测量小肠全长与墨汁推进距离，小肠推进率（%）＝墨汁推进距离/小肠全长×100%。（3）血清指标：小鼠眼球取血，4℃静置1h后，3 000 r/min离心10 min，分离血清，按ELISA试剂盒说明书测定MTL、SP、VIP水平[5]。

1.4.6 统计学处理

响应面试验采用Design-Expert 13.0软件进行建模与优化；动物实验数据经SPSS 26.0软件分析，结果以均数±标准差表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD法，P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

乙醇体积分数对总黄酮得率的影响见**图1A**。得率随乙醇体积分数升高呈先增大后减小的趋势，在60%时达到最大值9.38mg/g。乙醇体积分数过低时，溶剂与黄酮类苷元的极性不匹配，郁李仁苷A、B等苷类成分溶出不充分；体积分数过高时，脂溶性杂质（油脂、色素）竞争性溶出，并与蛋白质、多糖形成复合物包裹细胞碎片，反而抑制黄酮扩散，故选择50%～70%进一步考察。

液料比的影响见**图1B**。液料比由10mL/g增至20 mL/g时，得率由7.91 mg/g升至9.39 mg/g，此后继续增大液料比，得率不升反降。溶剂用量过小时固液两相浓度梯度小、传质推动力不足；溶剂过多时单位体积超声能量密度下降，且后续浓缩负担加重，故选择15～25 mL/g为宜。

超声时间的影响见**图1C**。30min时得率最高（9.40mg/g）。超声空化效应可破坏种皮致密结构、加速胞内物质释放，但时间过长，机械剪切与热效应会使部分黄酮结构被破坏，同时杂质溶出增多，故选择20～40 min进一步优化。

2.2 响应面优化结果

2.2.1 回归模型建立与方差分析

以总黄酮得率为响应值，对**表2**数据进行多元回归拟合，得二次多项式回归方程（编码变量）：$Y=9.46+0.59A+0.39B+0.24C+0.21AB-0.19AC+0.13BC-0.78A^2-0.61B^2-0.36C^2$。方差分析结果见**表4**。

由**表4**可见，模型P<0.0001，极显著；失拟项P=0.4235>0.05，不显著，说明未知因素对试验结果干扰小，模型拟合充分。决定系数R^2=0.995 8，调整R^2=0.990 4，与预测R^2（0.965 0）相差小于0.2，模型预测能力良好；C.V.=0.90%＜10%，试验精密度与可靠性较高；信噪比＞4，模型可用于导航设计空间。一次项A、B、C及二次项A^2、B^2、C^2均达极显著水平（P<0.0001），交互项AB、AC极显著（P<0.01），BC显著（P<0.05）。各因素F值比较，A（462.74）＞B（205.23）＞C（73.10），即各因素对总黄酮得率的影响顺序为：乙醇体积分数＞液料比＞超声时间。

2.2.2 交互作用分析

各因素交互作用对总黄酮得率影响的响应面及等高线见**图2**。等高线形状越接近椭圆形、响应

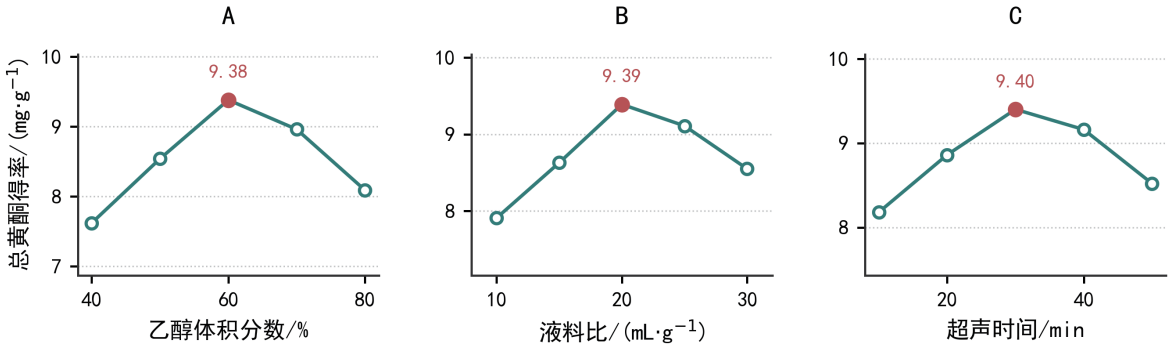


图1. 各单因素对郁李仁总黄酮得率的影响

表4. 回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	10.0137	9	1.1126	184.10	<0.0001
A	2.7966	1	2.7966	462.74	<0.0001
B	1.2403	1	1.2403	205.23	<0.0001
C	0.4418	1	0.4418	73.10	<0.0001
AB	0.1722	1	0.1722	28.50	0.0011
AC	0.1444	1	0.1444	23.89	0.0018
BC	0.0625	1	0.0625	10.34	0.0147
A^2	2.5633	1	2.5633	424.14	<0.0001
B^2	1.5680	1	1.5680	259.45	<0.0001
C^2	0.5389	1	0.5389	89.17	<0.0001
残差	0.0423	7	0.0060		
失拟项	0.0198	3	0.0066	1.18	0.4235
纯误差	0.0225	4	0.0056		
总变异	10.0560	16			

注：R^2=0.9958，调整R^2=0.9904，预测R^2=0.9650，变异系数（C.V.）=0.90%，信噪比=29.7。

面曲面越陡峭，表明两因素交互作用越显著。乙醇体积分数与液料比、乙醇体积分数与超声时间交互作用的响应面坡度较陡，等高线密集且呈明显椭圆形，与方差分析中AB、AC极显著的结果一致；液料比与超声时间交互作用的曲面相对平缓，交互强度较弱。等高线沿乙醇体积分数方向分布最为密集，进一步印证了该因素的主导地位；模型预测的响应峰值位于试验设计中心点附近的可操作区域内，未出现边界外推问题，说明回归模型能够较好地反映真实提取过程。

2.2.3 最优工艺条件与验证

对回归方程求解并结合响应面分析，理论最大得率为9.69mg/g，对应乙醇体积分数64%、液料比22.1mL/g、超声时间33min。结合实际操作的可行性，将最优工艺修正为乙醇体积分数64%、液料比22mL/g、超声时间33min（超声功率250W、温度45℃）。在此条件下进行3次平行验证试验，总黄酮得率分别为9.71、9.76、9.65mg/g，平均（9.71±0.06）mg/g，与模型预测值的相对误差为0.14%，RSD为0.57%（n=3），表明该工艺重现性好、模型预测准确，可用于郁李仁总黄酮的放大提取。

2.3 郁李仁总黄酮对便秘模型小鼠的影响

造模3d后，模型组小鼠逐渐出现粪便干硬细小、颗粒数减少、毛色干枯无光泽、拱背少动等表现，与便秘的临证特征相符，提示模型构建成功。

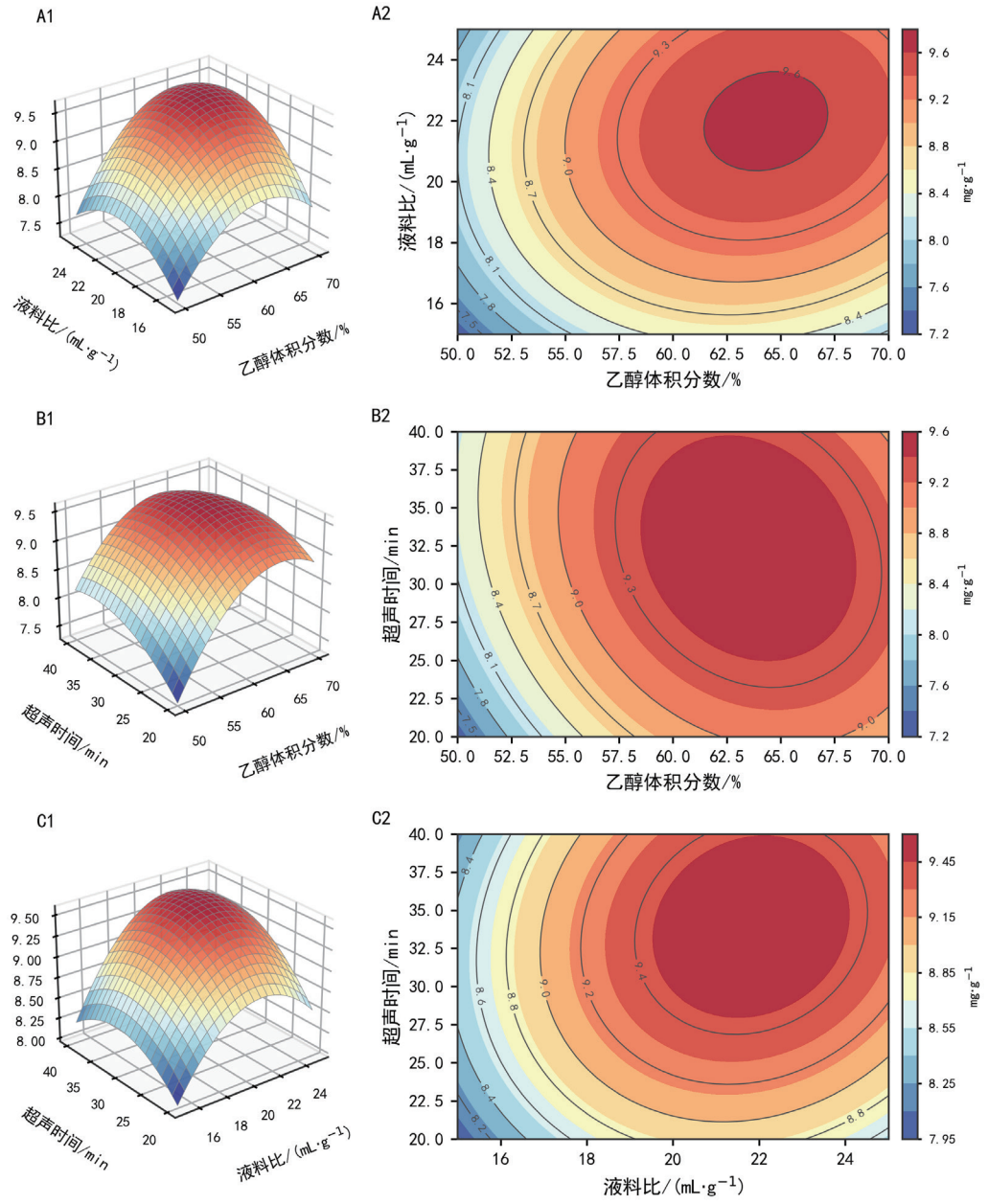


图2. 各因素交互作用对总黄酮得率影响的响应面及等高线图

造模期间模型组小鼠体质量增长缓慢，进食量明显低于空白组；给药14d内，各给药组小鼠一般状态逐步改善，高剂量组改善最明显，给药结束时各给药组体质量与进食量均较模型组有所恢复，全程无动物死亡及腹泻等不良反应出现，初步提示郁李仁总黄酮在有效剂量范围内安全性良好。

2.3.1 对排便功能的影响

结果见**图3**。与NC组比较，MC组首粒黑便时间由（196.4±18.6）min延长至（306.7±26.4）min，6h排便粒数由（6.4±1.1）粒降至（2.1±0.6）粒，粪便含水率由（56.8±4.6）%降至（38.9±3.8）%，差异均有统计学意义（P<0.05）。与MC组比较，总黄酮各剂量组首粒黑便时间显著缩短、排便粒数显著增加、粪便含水率显著升高（P<0.05），并呈剂量依赖性，其中高剂量组各指标（219.8±20.4）min、（5.5±1.0）粒、（53.1±4.5）%已接近阳性对照组（228.5±21.7）min、（5.6±1.0）粒、（53.6±4.4）%，

组间差异无统计学意义（P＞0.05）。

2.3.2 对小肠推进率的影响

由图3D可见，MC组小肠推进率为（41.2±5.1）%，较NC组（68.3±5.8）%显著降低（P<0.05）。总黄酮中、高剂量组小肠推进率分别升至（56.4±5.4）%和（63.5±5.7）%，较低剂量组进一步改善，其中高剂量组与阳性对照组（62.7±5.6）%接近，组间差异无统计学意义（P＞0.05），提示郁李仁总黄酮能有效恢复洛哌丁胺抑制的肠道推进功能。

2.3.3 对血清MTL、SP、VIP水平的影响

结果见图4。MC组血清MTL由NC组的（128.6±11.4）pg/mL降至（82.4±8.6）pg/mL，SP由（96.8±8.6）pg/mL降至（62.5±6.4）pg/mL，VIP由（38.4±3.8）pg/mL升至（58.7±5.2）pg/mL（P<0.05），表明洛哌丁胺便秘模型小鼠存在胃肠肽类神经递质分泌紊乱。总黄酮干预后，各剂量组MTL、SP水平呈剂量依赖性回升，VIP水平相应下降，高剂量组MTL、SP、VIP分别为（119.7±10.8）、（89.2±8.1）、（42.9±4.0）pg/mL，与阳性对照组接近（P＞0.05）。

3 讨论

本研究采用Box-Behnken响应面法优化郁李仁总黄酮超声辅助提取工艺，构建的二次回归模型极显著，失拟项不显著，\(R^2=0.9958\)，验证试验相对误差0.14%，工艺稳定性良好。乙醇体积分数为得率首要影响因素，60%乙醇与郁李仁黄酮苷类成分极性适配，超声空化效应可加速传质，最优条件下提取33min，总黄酮得率为\((9.71\pm0.06)\\mathrm{mg/g}\)。药效试验证实，郁李仁总黄酮可调控胃肠神经递质平衡，促进肠道运动，改善小鼠便秘，且存在剂量效应，中剂量组活性接近高剂量组。本研究初步揭示其通便活性，但尚未明确单体成分贡献，机制研究维度有限，缺乏安全性评价，后续可依托谱效关系、肠道菌群及信号通路分析完善基础研究。

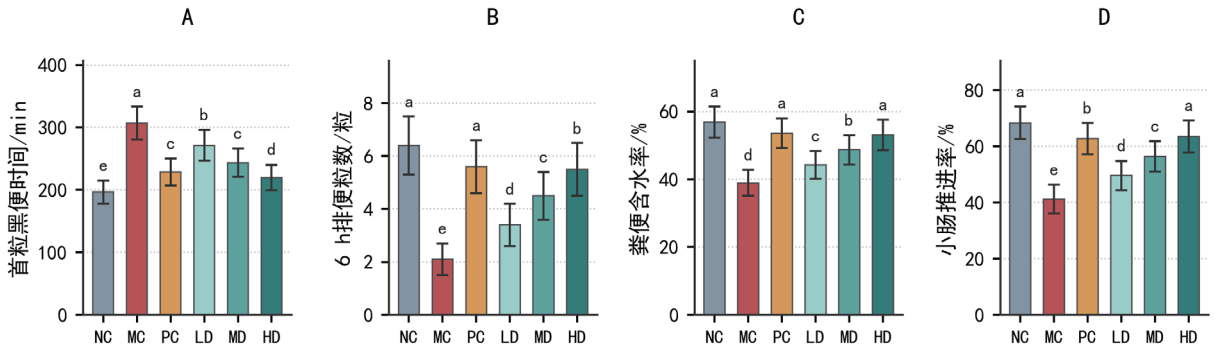


图3. 郁李仁总黄酮对便秘模型小鼠排便功能及小肠推进率的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10；不同小写字母表示组间P<0.05）

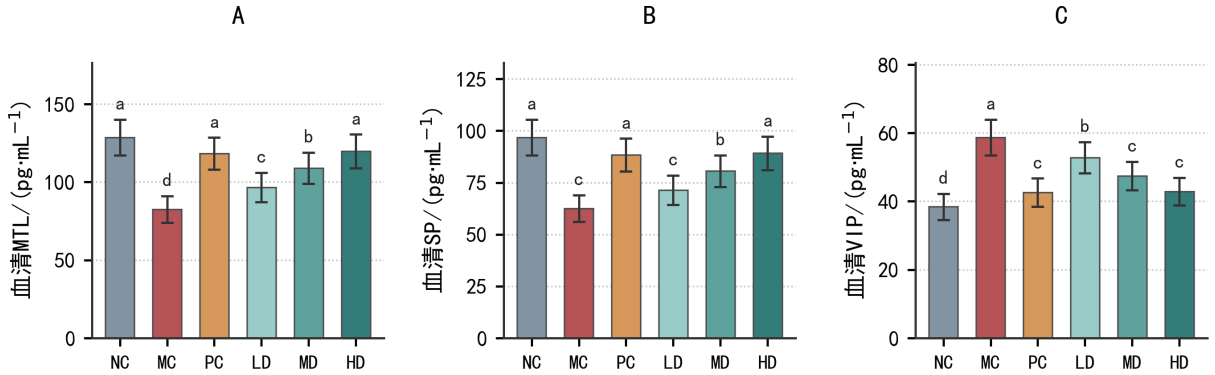


图4. 郁李仁总黄酮对便秘模型小鼠血清MTL、SP和VIP水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6；不同小写字母表示组间P<0.05）

4 结论

本研究建立的郁李仁总黄酮超声辅助提取工艺稳定可行，最优条件为乙醇体积分数64%、液料比22mL/g、超声时间33 min（功率250 W、温度45℃），经验证得率（9.71±0.06）mg/g，与预测值相对误差0.14%；各因素影响顺序为乙醇体积分数＞液料比＞超声时间。郁李仁总黄酮能显著改善洛哌丁胺诱导便秘小鼠的排便功能和小肠推进能力，其机制可能与上调MTL、SP及下调VIP、重建胃肠运动相关神经递质平衡有关，可为郁李仁总黄酮的功能食品或泻下类药物开发提供工艺与药效学依据。

参考文献

[1]刘星劼,张永清,李佳.中药郁李仁本草考证及化学成分研究[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(12):100-103.

[2]赵锦江,赵梓邯,张羽师,等.基于代谢组学分析郁李仁苷A对小鼠粪便代谢物的影响[J].现代中药研究与实践,2023,37(5):34-40.

[3]姜鹏程,陆晔晗,常芮宁,等.当归藤总黄酮超声提取工艺优化[J].中成药,2023,45(12):4081-4085.

[4]黎强,周颖,卢森华.响应面法优化消瘤藤总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J].湖北农业科学,2023,62(8):167-174.

[5]刘岩,吕宗凯,刘连芬,等.Box-Behnken响应面法优化超声提取皱皮木瓜总黄酮工艺[J].安徽农业科学,2023,51(10):144-148.

Copyright © 2026 by author(s) and Global Science Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Open Access