

响应面法优化细果角茴香中总黄酮的超声提取条件

张秋龙^{1,2}, 梁永欣³, 李文聪^{1,2}, 索有瑞¹, 丁晨旭^{1*}, 王洪论¹

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³青海民族大学, 西宁 810007

摘要:采用响应面法优化超声波辅助提取细果角茴香中总黄酮的工艺研究。在单因素试验的基础上, 选择超声时间、乙醇浓度、料液比为自变量, 以总黄酮的提取率为响应值, 进行 Box-Behnken 中心组合实验设计, 采用响应面法(RSM)评估了这些因素对总黄酮提取率的影响。结果表明, 超声波法辅助提取细果角茴香中总黄酮的最佳工艺条件为液料比 33 mL/g, 乙醇浓度为 58%, 提取时间为 34.5 min。在此条件下, 总黄酮的提取率达 1.525%。

关键词:细果角茴香; 总黄酮; 超声提取; 响应面

中图分类号: R932

文献标识码: A

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms by Response Surface Analysis

ZHANG Qiu-long^{1,2}, LIANG Yong-xin³, LI Wen-cong^{1,2}, SUO You-rui¹, DING Chen-xu^{1*}, WANG Hong-lun¹

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

²Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China;

³Qinghai Nationalities University, Xining, 810007, China

Abstract: Response surface methodology (RSM) is applied to optimize ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms. Based on single experiments, the concentration of ethanol, ratio of liquid to solid, and extraction time are selected for Box-Behnken central composite designing. RSM is employed to study the effect of these factors on the yield of total flavonoids. The results indicates that the optimal extraction conditions are 33:1 mL/g as the ratio of liquid to solid, 58% of aqueous ethanol, with 34.5 min extraction. Under the optimized conditions, the extraction yield of total flavonoids is up to 1.525%.

Key words: *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms; total flavonoids; ultrasonic extraction; response surface methodology

藏药角茴香 (*Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms) 为罂粟科角茴香属植物^[1], 别名咽喉草、山黄连或野茴香等, 藏药名为巴尔哇打、巴尔巴达。生长于海拔 4.300 km 以下的草原、草甸、砂砾地上^[2], 味苦性凉, 清血热、温热和毒热^[3]。《西藏常用中草药》称其有解热镇痛、消炎解毒之功效, 可治伤风感冒、头痛、四肢关节疼痛、胆囊炎, 并解食物中毒。《陕甘宁青中草药选》中称: 细果角茴香能治流感、咽喉肿痛、目赤等症。现代分析化学和天然产物化学研究发现: 细果角茴香中含有多种生物碱成分, 如: 原阿片碱、隐品碱、血根碱等^[4]。但国内文献关

于细果角茴香中其它化学成分如总黄酮的含量研究尚少见报道, 刘永红等人^[7]曾用甲醇为提取溶剂, 采用正交法研究过提取工艺, 本文用乙醇代替毒性较大的甲醇, 采用超声波辅助提取法^[5,6], 在单因素实验的基础上, 使用响应面法^[8,9]优化细果角茴香中总黄酮的提取工艺, 为细果角茴香的进一步研究开发提供更精确的科学依据和数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

细果角茴香: 采收于青海互助县北山, 经中科院西北高原生物研究所中药学专家索有瑞研究员鉴定, 自然风干, 粉碎; 芦丁, 购于北京生物医药公司; 其它化学试剂均为分析纯。

仪器: T6 新世纪紫外-可见分光光度计, 北京谱

收稿日期: 2012-10-23 接受日期: 2013-04-25

基金项目: 青海省科技厅项目(2010-J-111 2010-Z-719)

* 通讯作者 E-mail: cxding@nwipb. cas. cn

析通用仪器有限责任公司生产;KQ-500E 型超声波清洗器(500W),昆山市超声仪器有限公司;N-1100 旋转蒸发仪,上海爱朗仪器有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SHZ-3 型循环水多用真空泵,上海亚荣生化仪器厂;DLSB-5/20 低温冷却循环泵,郑州长城科工贸有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁标准液的配制

精确称取 120 °C 干燥恒重的芦丁标样 10 mg,用 30% 乙醇溶解并定容于 50 mL 容量瓶中,摇匀,即得浓度为 0.2 mg/mL 标准溶液。

1.2.2 吸收曲线绘制

准确移取芦丁标液 5.00 mL,按标准曲线下的测定方法,在 450 ~ 600 nm 处测定吸收光谱,在 510 nm 处有最大吸收,故选择 510 nm 为测定波长。

1.2.3 标准曲线绘制

分别移取芦丁标准溶液 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 于 25 mL 容量瓶中,用 30% 乙醇稀释至 10 mL,加入 1.0 mL 5% NaNO_2 溶液摇匀,立刻加入 1.0 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液摇匀,放置 10 min。加入 5 mL 1 mol/L NaOH 溶液,用 30% 乙醇定容,混合后摇匀,放置 10 min,以试剂空白为参比,在 510 nm 处测吸光度值。以芦丁的浓度 C (mg/mL) 为横坐标,以吸光度值 A 为纵坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程为: $A = 10.39C - 0.0018$, $r = 0.9991$ 。

1.2.4 超声提取

细果角茴香粉碎后过 40 目筛,称取 1 g,加 60% 乙醇 30 mL,浸泡 15 min 后,在 50 °C 下超声 30 min,抽滤。待样品冷却到室温再进行下一次处理。合并滤液,用旋转蒸发仪回收溶剂,浓缩后用乙醇定溶于 50 mL 容量瓶中备用。实验分别考察了乙醇溶液浓度、液料比、提取温度、超声提取时间等因素对细果角茴香中总生物碱得率的影响。在单因素实验的基础上,选取乙醇浓度(A)、提取时间(B)、料液比(C)三个对总黄酮提取率影响较大的因素,对提取条件进行响应面分析,优化提取工艺条件。

1.2.5 含量测定

吸取 2 mL 滤液于 25 mL 容量瓶中,按照标曲下的测定方法测吸光度,计算含量、得率。

1.2.6 单因素实验

以乙醇为提取溶剂,主要考察乙醇溶液浓度、液料比、提取温度、超声提取时间等因素对细果角茴香

中总生物碱得率的影响。

1.2.7 细果角茴香中总黄酮的提取工艺优化

根据 Box-Behnken 中心组合实验设计原理,综合单因素实验结果,在 50 °C 下以乙醇溶液为提取剂,选取对总黄酮影响较大的因素乙醇浓度(A)、提取时间(B)、液料比(C),进行中心组合实验,并结合单因素实验条件选取合理水平。以总黄酮的得率为响应值,通过响应面分析得出超声波提取细果角茴香中总黄酮的最佳提取工艺条件和方法。实验设计因素编码及水平见表 1。

表 1 中心组合设计因素与水平表

Table 1 Factors and levels of the central composite design

水平 Level	因素 Factor		
	乙醇浓度(A) Ethanol concentration (%)	提取时间(B) Extraction time (min)	液料比(C) liquid to solid ratio (mL/g)
-1	50	25	25
0	60	30	30
1	70	35	35

2 结果与分析

2.1 单因素对细果角茴香总黄酮得率的影响

2.1.1 乙醇溶液浓度对细果角茴香中总黄酮提取率的影响

固定提取时间 30 min,提取温度 50 °C,液料比 30:1,选择乙醇浓度分别为 40%、50%、60%、70%、80% 按照 1.1.4 进行实验。结果见图 1。

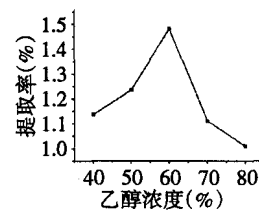


图 1 乙醇溶液浓度对总黄酮得率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

由图 1 可知,在乙醇浓度 60% 左右提取率最大,因此选择乙醇浓度在 60% 左右为宜。

2.1.2 提取时间对细果角茴香中总黄酮提取率的影响

固定乙醇浓度 60%,提取温度 50 °C,液料比 30:1 mL/g,选择超声时间分别为 20、25、30、35、40

min,按照 1.1.4 进行实验。结果见图 2。

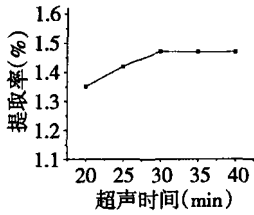


图 2 超声时间对总黄酮得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on extraction yield of total flavonoids

由图 2 可知,在 10~30 min 内,总黄酮的提取率随着时间的延长而显著增加,30 min 以后,总黄酮得率变化不大。为了节能超声处理时间在 30 min 左右为宜。

2.1.3 料液比对总黄酮提取率的影响。

固定提取温度 50 ℃,乙醇浓度 60%,提取时间 30 min,选择液料比分别为 20、25、30、35、40,按照 1.1.4 进行实验。结果见图 3。

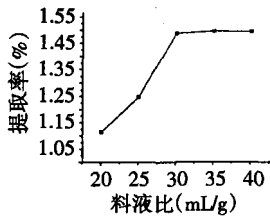


图 3 液料比对总黄酮得率的影响

Fig. 3 Effect of ratio of liquid to solid on extraction yield of total flavonoids

由图 3 可知,当料液比达到 30:1 左右时,总黄酮基本溶出,再增加提取剂用量,提取率变化不大。因而,液料比 30:1 左右为宜。

2.1.4 温度对总黄酮提取率的影响。

固定乙醇浓度 60%,提取时间 30 min,液料比为 30:1,选择提取温度分别为 40、50、60、70、80 ℃,按照 1.1.4 进行实验。结果见图 4。

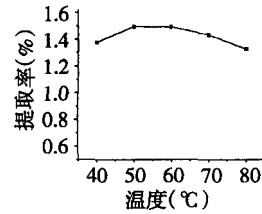


图 4 温度对总黄酮得率的影响

Fig. 4 Effect of temperature on extraction yield of total flavonoids

由图 4 可知,总黄酮的提取率随着温度的提高而提高。温度的升高会加强溶液中各分子的运动,促进扩散作用,有利于提高提取率,但温度过高有可能破坏黄酮的结构而降低其含量,故选择提取温度应为 50 ℃。

2.2 响应面分析实验结果与数据分析

利用 DesignExpert8.0.7.1 软件,通过表 2 中总黄酮得率实验数据进行多元回归拟合,对实验结果进行响应面分析,得出回归模型方差分析表和响应曲面图,分别见表 3 和图 5。

表 2 Box-Behnken 中心组合设计方案及实验结果

Table 2 Box-Behnken experiments design and the results of these experiments

实验号 No.	乙醇浓度(A) Ethanol concentration	提取时间(B) Extraction time	液料比(C) Liquid to solid ratio	总黄酮得率% Yield of total flavonoids
1	0	0	0	1.468
2	-1	0	-1	1.468
3	0	-1	-1	1.492
4	0	1	-1	1.543
5	1	1	0	1.451
6	0	-1	1	1.350
7	1	0	-1	1.468
8	-1	1	0	1.413
9	0	1	1	1.238
10	0	0	0	1.144
11	-1	0	1	1.462

12	0	0	0	1.179
13	1	0	1	1.409
14	0	0	0	1.498
15	-1	-1	0	1.450
16	0	0	0	1.363
17	1	1	0	1.457

表3 拟合二次多项式模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model

方差来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 DOF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	0.21	9	0.023	27.12	0.0001	**
A	4.80E-03	1	4.80E-03	5.66	0.0489	*
B	0.02	1	0.02	23.36	0.0019	**
C	0.13	1	0.13	156.43	< 0.0001	**
AB	1.21E-04	1	1.21E-04	0.14	0.7168	
AC	8.10E-05	1	8.10E-05	0.096	0.7662	
BC	5.18E-03	1	5.18E-03	6.12	0.0427	*
A ²	0.013	1	0.013	14.86	0.0063	*
B ²	9.73E-04	1	9.73E-04	1.15	0.3196	
C ²	0.027	1	0.027	32.35	0.0007	**
残差 Residual	5.93E-03	7	8.48E-04			
失拟性 Lack of fit	4.58E-03	3	1.53E-03	4.49	0.0905	not significant
纯误差 Pure error	1.36E-03	4	3.40E-04			
总差 Cor. error	0.21	16				
R ² = 0.9155		R ² Adj = 0.9363				

注: ** , $P < 0.01$, 差异极显著; * , $P < 0.05$, 差异显著。

Note: ** , $P < 0.01$, very significant difference; * , $P < 0.05$, significant difference.

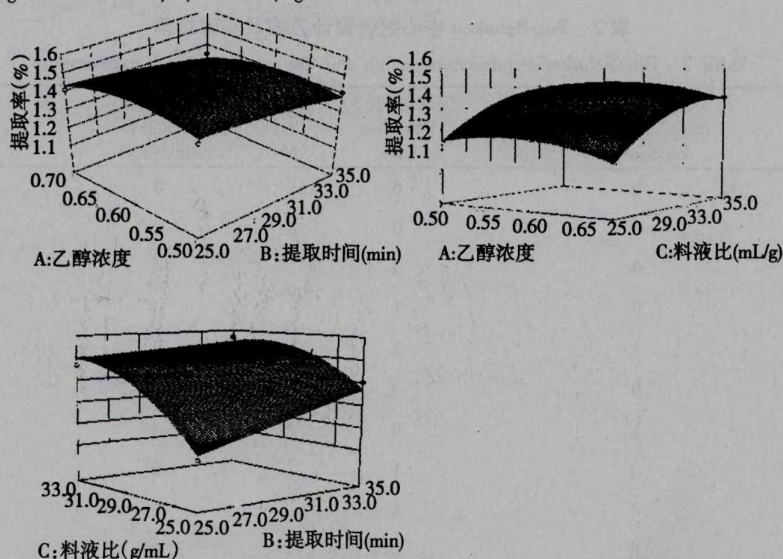


图5 各两因素交互作用对总生物碱提取率影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plots of mutual influences of extraction conditions on the extraction yields of total flavonoids

由方差分析结果可知:模型的 $F = 27.12$, $P = 0.0001 < 0.01$, 说明本实验所选用的二次多项模型具有高度的显著性。 $F_{失拟} = 4.49$, 失拟项 $P = 0.0905 > 0.05$, 失拟不显著。模型的决定系数 $R_{Adj}^2 = 0.9363$, 说明该模型能够解释 93.63% 的响应值变化。因此,该模型拟合程度较好,可以用此模型来分析和预测超声波提取细果角茴香中总黄酮的工艺条件。在总的作用因素中,回归方程一次项、二次项及交互项 BC 均具有较高的显著性,表明乙醇浓度、提取时间、液料比以及液料比与提取时间的交互作用对细果角茴香中总黄酮得率有较显著影响。

通过拟合可求出影响因素的一次效应、二次效应及其交互效应的关联方程,多元回归拟合分析得到细果角茴香总黄酮提取率 Y 与各因素变量 (A 乙醇浓度, B 提取时间, C 液料比)的二次方程模型为:

$$Y = 1.48 - 0.024 \times A + 0.050 \times B + 0.13 \times C + 5.500E-003 \times A \times B + 4.500E-00 \times A \times C - 0.036 \times B \times C - 0.055 \times A^2 - 0.015 \times B^2 - 0.081 \times C^2$$

从表 3 中方差分析结果可知方程一次项、二次项的影响均极显著,说明分析结果可靠;从试验所得的响应面分析结果可以找到它们在提取过程中的交互作用,如表 3 和图 5 可知提取时间和液料比之间的交互作用显著,其余项间的交互作用不明显。根据 Design Expert 8.0.7.1 软件对实验结果进行最优优化分析,确定最佳的提取条件为:乙醇浓度 58%, 提取时间 34.55 min, 液料比 32.95 mL/g, 在此条件下预测总黄酮的得率为 1.538%。

2.3 验证实验

根据模型预测结果进行近似验证实验,但考虑到实际操作的便利,将最佳工艺条件修正为乙醇浓度 58%, 提取时间 34.50 min, 液料比 33 mL/g, 在此条件下总黄酮提取率为 1.525% ($n = 3$)。

3 结论

用超声法提取细果角茴香中总黄酮,根据单因素实验结果,采用 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析对提取工艺进行优化,得出最优工艺条件为:

乙醇浓度 58%, 提取时间 34.50 min, 液料比 33 mL/g。在此工艺条件下,总黄酮提取率为 1.525% ($n = 3$)。该研究结果对细果角茴香中总黄酮的提取研究提供一定的参考价值,具有一定的实际应用前景。

参考文献

- 1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences (中国科学院西北高原生物研究所). *Flora Qinghaiica* (青海植物志), Vol 1. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997. 393.
- 2 Gao A (高昂), Jai X (贾旭). An overview of pharmaceutical research on *Hypecoum* L. of Tibetan medicine. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2011, 39: 8374-8375.
- 3 Chen BZ (陈碧珠), Fang QC (方启程). Chemical study on a traditional Tibetan drug *Hypecoum leptocarpum*. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, 20: 658-661.
- 4 Wen HX (文怀秀), Tao YD (陶燕铎). RP-HPLC determination of protopine in Tibet medicine *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009, 29: 137-139.
- 5 Liu WL (刘文丽), Yu LH (于鲁海). Ultraviolet spectrophotometry in the application of flavonoids content determination. *Xinjiang J Tradit Chin Med* (新疆中医药), 2006, 24 (3): 85-86.
- 6 Xiang YH (相炎红), Wang HY (王浩云). Study on optimization of ultrasonic-assisted extraction of alkaloids from *Sophora alopecuroides* by response surface analysis. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33: 255-258.
- 7 Liu YH (刘永红), Chen X (陈晓). Extraction and content determination of total flavonoids in *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms. *J Henan Agric Sci* (河北农业科学), 2011, 15: 106-108.
- 8 An Z (安卓), Jia CX (贾昌喜). Research on ultra-high-pressure extraction technology of falconoid from *Sonchus oleraceus* L. with response surface optimization. *J Chin Inst Food Sci Tech* (中国食品学报), 2012, 12: 105-110.
- 9 Wen ZY (温志英), Bei WJ (贝文敬). Optimization of microwave extraction technology of flavonoids from Peanut Hulls by response surface methodology. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2011, 27: 472-477.