

响应面法优化藏药绿萝花总黄酮的超声波辅助提取工艺

杨小军^{1*}, 丁永辉²(1.西北民族大学化工学院,兰州 730124;2.甘肃省食品药品监督管理局,兰州 730070)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3565-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.36

摘要 目的:优化藏药绿萝花总黄酮的超声波辅助提取工艺。方法:通过单因素试验考察超声波法提取过程中的时间、温度、乙醇体积分数、液料比和功率对超声波法提取藏药绿萝花总黄酮提取率的影响;在此基础上,固定超声功率进行4因素5水平的Box-Behnken中心组合设计,采用响应面法分析4个因素及其交互作用对总黄酮提取率的影响,确定最优因素及水平并进行验证试验。结果:最优超声提取工艺为超声提取时间29 min、提取温度44℃、乙醇体积分数78%、液料比13:1(ml/g);3次验证试验中总黄酮的平均提取率为2.130%,与理论值的相对误差为0.005%。结论:优化工艺合理可行,可用于藏药绿萝花总黄酮的超声提取。

关键词 藏药绿萝花;总黄酮;超声波辅助提取;Box-Behnken中心组合设计;响应面法;工艺优化

Study on Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Technology for Total Flavonoids from Tibetan *Scindapsus aureus* by Response Surface Method

YANG Xiao-jun¹, DING Yong-hui² (1.School of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730124, China;2.Gansu Food and Drug Administration, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from Tibetan *Scindapsus aureus*. METHODS: The single-factor test was adopted to investigate the effects of extraction time, extraction temperature, the volume fraction of ethanol, the ratio of liquid to solid and power on the extraction rate of total flavonoids from Tibetan *Scindapsus aureus* in the process of ultrasonic-assisted extraction, based on which, four-factor and five-level Box-Behnken central component design was performed with unchanged ultrasonic power, and then response surface method was adopted to analyze the effects of the 4 factors and their interaction on the extraction rate of total flavonoids to determine the optimal factor and level, and verification tests were conducted. RESULTS: The optimal ultrasonic-assisted extraction technology was as follows as extraction time of 29 min, temperature of 44℃, volume fraction of ethanol of 78%, ratio of liquid to solid of 13:1 (ml/g). In three verification tests, the average extraction rate of total flavonoids was 2.130%, with an relative error of 0.005% compared to the theoretical value. CONCLUSIONS: The optimal technology is reasonable and feasible, and can be used for the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from Tibetan *Scindapsus aureus*.

KEYWORDS Tibetan *Scindapsus aureus*; Total flavonoids; Ultrasonic-assisted extraction; Box-Behnken central component design; Response surface method; Technology optimization

藏药绿萝花 *Scindapsus aureus* (Linden ex Andre) Engl. 为天南星科绿萝属黄叶绿萝(别名:黄金葛)的干燥花及花蕾,是青藏高原寒冷地带特有的植物药材;其性微寒,具有浓烈的香气。众多研究表明,藏药绿萝花中的黄酮类物质是其主要药用成分,具有较多的药理活性作用,如抑菌、抗病毒、抗氧化、抗衰老等,对高血压、高血脂和冠心病等有明显的治疗作用^[1-3]。因此,藏药绿萝花作为一种药用资源,对其进行研究是很有必要的。

藏药绿萝花黄酮类物质的研究发展至今,报道了许多有效的提取方法^[2-4]。超声波辅助提取技术也是其中一种,由于其具有操作简便、节能、省时等特点而被广泛用于天然药物的浸提。传统的工艺设计方法,如正交设计、均匀设计等,都有各自的局限性,不能全面地优化工艺。响应面分析法采用多元二次回归方法作为函数估计的工具,研究因子与响应面之间、因子与因子之间的相互关系,该方法试验次数少、周期短、

得到的回归方程精度高、可研究几种因素间的交互作用,是一种具有突出优势的优化试验条件的数学统计方法^[5-9]。

本研究探讨超声辅助提取藏药绿萝花中总黄酮成分,在查阅相关文献^[1-9]和预试验的基础上,选择超声提取时间、温度、乙醇体积分数、液料比和功率作为考查因素,采用Box-Behnken中心组合设计及响应面法对绿萝花总黄酮超声波提取条件进行全面优化,为提高绿萝花中总黄酮的提取率和更好地开发以绿萝花黄酮为主的药物及功能食品提供合理的依据。

1 材料

1.1 仪器

SPECORD50型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SK82002H型超声波仪(上海科导超声仪器有限公司);AHK-04A型手提式粉碎机(广州市旭朗机械设备有限公司);B204-S型万分之一电子天平(北京普析通用仪器有限责任公司);DHG-9075A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)。

* 讲师,硕士。研究方向:药物制剂及分析。E-mail:923835496@qq.com

1.2 药材

绿萝花产自西藏自治区,购于西藏众友大药房(批号:130244),经兰州大学药学院生药教研室马志刚教授鉴定为天南星科绿萝属黄叶绿萝 *Scindapsus aureus* 的干燥花及花蕾。

1.3 药品与试剂

芦丁对照品(美国Sigma公司,批号:120715-201216,供含量测定用,纯度:99.22%);无水乙醇、甲醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠(天津市百世化工有限公司),以上试剂均为分析纯;蒸馏水(试验时自制)。

2 方法与结果

2.1 黄酮提取率的测定

2.1.1 对照品溶液的制备 准确称取干燥至恒质量的芦丁对照品 20.00 mg,置于 100 ml 量瓶中,加少量甲醇,微微加热至溶解,放置冷却后再加无水甲醇稀释至刻度,摇匀即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 将绿萝花用粉碎机粉碎,过 3 号药筛,准确称取 3.00 g 放入锥形瓶内,用无水乙醇浸泡 12 h 后,进行超声提取。提取结束后进行减压抽滤,所得滤液转移至 100 ml 量瓶内,用无水乙醇定容至刻度,即得。

2.1.3 标准曲线的绘制及方法学考察^[4] 分别量取对照品溶液 0、0.5、1.0、2.0、2.5 ml,分别置于 25 ml 量瓶中,各先加入 70% 乙醇使其体积为 8 ml,然后再各加入 50 g/L 的亚硝酸钠溶液 1.0 ml,摇匀,反应 6 min 后再加入 100 g/L 的硝酸铝溶液 1.0 ml,摇匀,静置 5 min;各加入 10.0 ml 氢氧化钠溶液(40 g/L),最后用 70% 乙醇定容,静置 15 min。以不含芦丁对照品的溶液作空白,在 400~600 nm 波长范围扫描芦丁对照品溶液吸收光谱,确定最大吸收波长为 510 nm;再在最大波长处测吸光度,以对照品的质量浓度(c)为横坐标,吸光度(A)为进行线性回归,得回归方程为 $A=0.0830c+0.0883$ ($r=0.9997$)。结果表明,芦丁检测质量浓度线性范围为 4~20 $\mu\text{g/ml}$ 。根据相关要求方法进行方法学考察,结果精密性、稳定性、重复性和回收率试验均符合要求。

2.1.4 总黄酮提取率的测定 准确量取样品溶液 1.0 ml,按“2.1.3”项下方法操作,计算总黄酮质量浓度,再按下式计算总黄酮提取率:总黄酮提取率(%)=样品溶液中总黄酮的质量(g)/原料质量(100 g)。

2.2 单因素试验

在查阅相关文献^[1-3]和预试验的基础上,选择超声提取时间、温度、乙醇体积分数、液料比和功率为试验因素。

2.2.1 超声提取时间的选择 精确称取 5 份粉碎的藏药绿萝花各 3.0 g,置于 100 ml 锥形瓶中,固定 80% 乙醇为提取溶剂、温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 、液料比为 12:1、功率为 300 W,考察提取时间分别为 10、20、30、40、50 min 时黄酮提取率的变化。提取时间对黄酮提取率的影响见图 1A。

由图 1A 可知,起初总黄酮提取率随提取时间的延长而升高;提取时间达到 30 min 时,总黄酮提取率达到最高;之后总黄酮提取率略有下降。分析其原因可能是由于提取时间过长,超声波对黄酮的结构有所破坏,以致总黄酮提取率下降,因此选择提取时间为 30 min。

2.2.2 提取温度的选择 精确称取 5 份粉碎的藏药绿萝花各 3.0 g,置于 100 ml 锥形瓶中,固定提取时间为 30 min、80% 乙醇为提取溶剂、液料比为 12:1、功率为 300 W,考察提取温度

分别为 25、35、45、55、65 $^{\circ}\text{C}$ 时总黄酮提取率的变化。提取温度对总黄酮提取率的影响见图 1B。

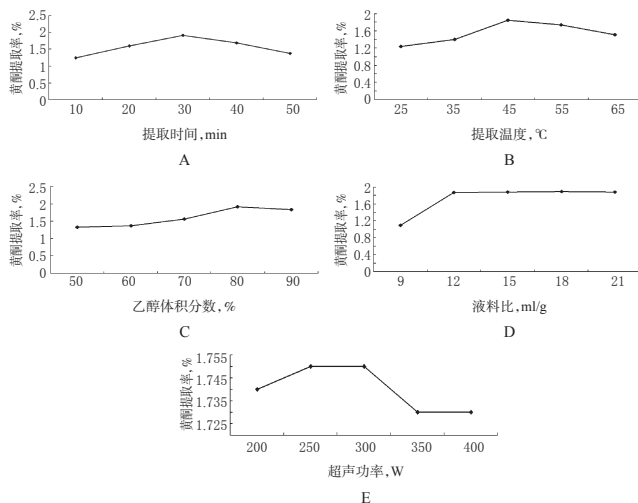


图1 各因素对总黄酮提取率影响的单因素试验

A. 提取时间; B. 提取温度; C. 乙醇体积分数; D. 液料比; E. 超声功率

Fig 1 Single-factor test for evaluating the effects of the factors on total flavonoids

A. extraction time; B. extraction temperature; C. volume fraction of ethanol; D. ratio of liquid to solid; E. ultrasonic power

由图 1B 可知,起初总黄酮提取率随提取温度上升而升高;提取温度达到 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,总黄酮提取率达到最高;之后总黄酮提取率略有下降。分析其原因可能是由于提取温度过高,对总黄酮的结构有所破坏所致,以致总黄酮提取率下降,因此选择提取温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3 乙醇体积分数的选择 精确称取 5 份粉碎的藏药绿萝花各 3.0 g,置于 100 ml 锥形瓶中,固定提取时间为 30 min、温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 、液料比为 12:1、功率为 300 W,考察提取溶剂乙醇体积分数分别为 50%、60%、70%、80%、90% 时总黄酮提取率的变化。提取溶剂乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响见图 1C。

从图 1C 中可知,总黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而升高;但当乙醇体积分数大于 80% 时,总黄酮提取率开始下降。根据相似相溶原理,极性相似可达到最大溶解度,在乙醇体积分数为 80% 时,总黄酮提取率达到峰值,即此时溶剂与溶质极性相似,故选择乙醇体积分数为 80%。

2.2.4 液料比的选择 精确称取 5 份粉碎的藏药绿萝花各 3.0 g,置于 100 ml 锥形瓶中,固定提取时间为 30 min、温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 、80% 乙醇为提取溶剂、功率为 300 W,考察液料比分别为 9:1、12:1、15:1、18:1、21:1 时总黄酮提取率的变化。液料比对总黄酮提取率的影响见图 1D。

由图 1D 可知,初始时总黄酮的提取率随液料比增大而快速升高;当液料比(ml/g)超过 12:1 时,总黄酮提取率增加幅度不大,从节约原料的基础考虑,选取液料比为 12:1。

2.2.5 超声功率的选择 精确称取 5 份粉碎的藏药绿萝花各 3.0 g,置于 100 ml 锥形瓶中,固定提取时间为 30 min、温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 、80% 乙醇为提取溶剂、液料比为 12:1,考察提取功率分别 200、250、300、350、400 W 时总黄酮提取率的变化。提取功率对总黄酮提取率的影响见图 1E。

由图 1E 可知,超声功率对绿萝花中总黄酮提取率的影响

不大。

2.3 响应面分析法优选工艺

2.3.1 试验设计^[9] 单因素试验结果表明,提取时间、提取温度、乙醇体积分数和液料比4个因素对藏药绿萝花中总黄酮的提取率都有较大影响,所以在单因素试验结果的基础上,采用响应面分析法进行4因素5水平优化试验。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	提取时间(X_1),min	提取温度(X_2),℃	乙醇体积分数(X_3),%	液料比(X_4),g/ml
+2	40	55	90	14:1
+1	35	50	85	13:1
0	30	45	80	12:1
-1	25	40	75	11:1
-2	20	35	70	10:1

按表1选取各因素与水平进行试验,并对数据进行分析,以找到最优的条件覆盖区域进一步优化提取工艺参数。试验设计与统计分析软件为Design Expert 7.1.3。

2.3.2 模型的建立及结果 根据响应面法中的Box-Behnken设计方法进行4因素5水平试验,将总黄酮提取率数据输入,建立总黄酮提取率的二次回归方程。试验的方案与结果见表2。

表2 Box-Behnken试验设计方案与结果

Tab 2 Box-Behnken design plan and its results

试验	X_1	X_2	X_3	X_4	提取率, %
1	+1	0	+1	-1	1.54
2	-1	-1	+1	0	1.65
3	0	+1	+2	0	1.95
4	0	0	+1	0	1.73
5	-1	0	0	0	1.34
6	0	+1	+1	-1	1.36
7	+1	+1	+1	-1	1.38
8	0	-1	+1	+1	1.32
9	0	0	0	0	1.56
10	0	0	+2	0	1.53
11	0	+1	+1	+1	2.12
12	0	0	0	+1	1.61
13	0	0	+1	-1	2.01
14	+1	0	0	-1	1.98
15	0	-1	+1	0	1.86
16	-1	+1	+1	-1	2.03
17	+1	-1	+1	-1	1.43
18	0	-1	0	-1	1.49
19	+1	0	+1	+1	1.85
20	-1	0	+1	+1	1.78
21	-1	0	+1	0	1.69
22	0	+1	0	-1	2.08
23	0	0	+1	-1	1.79
24	0	0	+2	+1	1.77
25	0	0	+1	-1	2.13
26	0	0	+1	-1	2.10
27	-1	0	+2	-1	1.72
28	0	-1	+2	-1	1.81
29	+1	0	+2	-1	1.53

经回归得到二次回归方程为: $Y=1.95+0.021X_1-0.042X_2+$

$0.11X_3+0.076X_4-0.21X_1X_2-0.11X_1X_3+0.047X_1X_4-0.11X_2X_3+0.055X_2X_4+0.33X_3X_4-0.11X_1^2-0.17X_2^2-0.099X_3^2-0.61X_4^2$ 。方程中, X_1 代表提取时间, X_2 代表提取温度, X_3 代表乙醇体积分数, X_4 代表液料比。由于这些因素都经过响应面处理,所以这些因素对提取率的影响程度可以用各项系数的绝对值大小决定。系数中有正数也有负数,表示影响的方向不同。从上述方程可以看出,各因素及其交互作用对总黄酮提取率影响较大的因素是 X_3 、 X_1X_2 、 X_3X_4 、 X_2^2 、 X_4^2 。

2.3.3 试验分析 将表2中数据进行回归分析,并通过Design Expert 7.1.3软件绘制各因素影响总黄酮提取率的三维效应面图。回归统计分析结果见表3;三维效应面图见图2。

表3 回归统计分析结果

Tab 3 Results of regression analysis

来源	总和	自由度	方差	F	P
X_1	0.005	1	0.005	0.15	0.709 1
X_2	0.021	1	0.021	0.58	0.458 9
X_3	0.15	1	0.15	4.29	0.057 3*
X_4	0.069	1	0.069	1.92	0.187 4
X_1X_2	0.17	1	0.17	4.80	0.046 0*
X_1X_3	0.051	1	0.051	1.41	0.254 9
X_1X_4	0.009	1	0.009	0.25	0.624 6
X_2X_3	0.046	1	0.046	1.29	0.275 6
X_2X_4	0.012	1	0.012	0.34	0.570 8
X_3X_4	0.42	1	0.42	11.76	0.004 1**
X_1^2	0.083	1	0.083	2.32	0.150 3
X_2^2	0.19	1	0.19	5.19	0.038 9*
X_3^2	0.064	1	0.064	1.79	0.202 5
X_4^2	0.17	1	0.17	4.67	0.048 6*
总离差	0.5	14	0.036		
失拟检验	0.37	10	0.037	1.08	0.511 7
净误差	0.14	4	0.034		
模型	1.80	28	0.012	14.56	0.001 7**

注:“*”表示在0.05水平上显著;“**”表示在0.01水平上极显著

Note: “*” refers to “significant” at the level of 0.05; “**” refers to “markedly significant” at the level of 0.01

从表3可以看出,偏回归系数显著的有 X_3 、 X_1X_2 、 X_2^2 、 X_4^2 ,表明这些因素及交互项对总黄酮的提取率影响较大;回归系数最显著的是 X_3X_4 项,也就是这个交互项对总黄酮的提取率的影响是最大的。用这个结果与上面得到的二次回归方程的结果进行比较,可以看出影响总黄酮提取率较大的项是一致的,表明上述方程有效。表3中回归方程失拟检验并不显著,表明未知因素影响不大;而拟合检验是极显著的,因为藏药绿萝花总黄酮提取率的变化规律是由这4个参数决定的,方程与实际情况的良好拟合,表明此方程能很好地对参数的变化规律进行预测。

由图2A可知,总黄酮提取率在乙醇体积分数为75%左右随提取时间的延长而升高,延长提取时间可以提高总黄酮的提取率,乙醇体积分数过高则会降低总黄酮的提取率。

由图2B可知,较低的温度条件下总黄酮提取率较低,温度的影响比较显著,而在提取温度较高区域和乙醇体积分数区域的交界处总黄酮提取率较低,即这2个因素的交互作用较其他因素的影响更大。其主要原因是,总黄酮溶解度与温度有

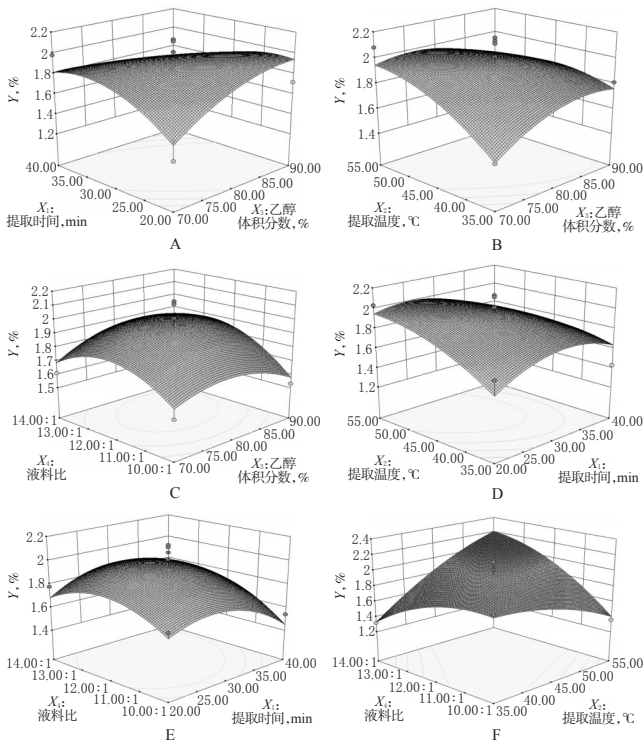


图2 各因素对黄酮提取率影响的效应面图

A. 提取时间与乙醇体积分数; B. 提取温度与乙醇体积分数; C. 液料比与乙醇体积分数; D. 提取温度与提取时间; E. 液料比与提取时间; F. 液料比与提取温度

Fig 2 Response surface figure for the effects of the factors on flavonoids extraction rate

A. extraction time and the volume fraction of ethanol; B. extraction temperature and the volume fraction of ethanol; C. the ratio of liquid to solid and the volume fraction of ethanol; D. extraction temperature and extraction time; E. the ratio of liquid to solid and extraction time; F. the ratio of liquid to solid and extraction temperature

关,温度低时总黄酮溶解度差,这时提高乙醇体积分数有利于总黄酮析出。

由图2C可知,液料比在一定范围内可以使总黄酮的提取率达到最高,液料比的增加能使藏药绿萝花粉末与提取液的接触面更大,从而可以加快总黄酮的析出速度以利于提取率的提高;但是乙醇体积分数太大或者使用溶剂过多则会因为渗透压太大而降低提取率。所以这2个因素相互作用影响对提取率的影响也很大。

由图2D可知,温度越高总黄酮提取率就越大,而提取时间的影响却局限在一定的范围内。提高温度有利于总黄酮的析出,但是温度太高也会破坏总黄酮的活性物质,所以只有适当的提高温度并且提取时间选择较合理的情况下,才能提高总黄酮提取率。

由图2E可知,液料比和提取时间这2个因素的交互作用比较明显。虽然液料比增加能提高提取率,但还是受到提取时间的限制,所以有时液料比太大只会造成试剂的浪费;而提取时间太长而液料比又较少的情况下,则会造成用电浪费。

由图2F可知,液料比和提取温度有明显的交互作用,在这

2个因素取值合适的情况下,总黄酮的提取率能达到最大。

2.4 响应面法优化最优工艺参数及验证试验

在选取的4个因素中,通过响应面软件的分析得出,藏药绿萝花总黄酮的最优提取工艺参数为提取时间28.60 min、提取温度43.53℃、乙醇体积分数78.37%、液料比13.22:1(ml/g)。黄酮提取率的预测值为2.1295%。进行试验验证的时候,为了方便所取的工艺条件,都取整数,即:设置水温度为44℃,采用78%的乙醇,以13:1的液料比,提取时间为29 min。为了获得较好的结果,以这个条件做3组平行试验,得3次总黄酮提取率的平均值为2.130%(RSD=0.80%,n=3),与理论值的相对误差为0.005%,证明了模型的可行性,也表明响应面法是一个较好的优化工艺参数的方法。

3 讨论

超声辅助提取技术由于操作简便、节能、省时,近年来广泛用于天然产物的浸提^[5-8]。但是,由本次超声辅助提取黄酮的试验结果可看出,某些因素的水平并不是越大或越高提取效果就越好,如提取温度、提取时间等。因此,以超声作为提取方法时,对提取因素和水平的优化就显得特别重要。中心组合设计试验和响应面优化藏药绿萝花总黄酮超声波辅助提取工艺,能够全面地对各因素的影响进行分析。本研究设计为4因素5水平,相对于3因素4水平的试验来说,前者更全面且更具有说服力。深入地对藏药绿萝花总黄酮的提纯工艺进行研究,是为了能够更好地利用藏药绿萝花这类资源。因此,本试验具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 魏永生,郑敏燕,耿薇,等.西藏绿萝花中矿质元素的分析测定[J].林产化学与工业,2013,33(1):102.
- [2] 李文茂,石玉平,刘春纓,等.藏药绿萝花中总黄酮提取率的提取工艺研究[J].北方园艺,2013(5):144.
- [3] 陈家鹏.西藏绿萝花中黄酮和还原糖含量测定研究[J].中国民族民间医药,2010(13):2.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:616.
- [5] 纪学芳,徐怀德,张淑娟,等.响应面试验优化超声波提取光皮木瓜黄酮和多糖复合物[J].食品科学,2013,34(6):47.
- [6] 吴耀辉,龚燕飞,陈建华.粉单竹竹叶黄酮提取工艺的初步研究[J].中南林业科技大学学报,2010(6):30.
- [7] 杨静,李爽,钱芳,等.响应面法优选黄蜀葵花多糖的提取工艺[J].中国药房,2013,24(39):3688.
- [8] 马丁,阮洪生,刘树民.星点设计-响应面法优选身痛逐瘀胶囊中药材的提取工艺[J].中国药房,2013,24(11):993.
- [9] Yamazaki, Kushida N, Oguchi A, et al. Response surface design and analyses[M]. New York: Marcel Dekker Inc., 2011:149-205.

(收稿日期:2014-12-01 修回日期:2015-01-22)

(编辑:刘 萍)