

房海灵,卢艳花,聂 桦,等. 响应面法优化广东紫珠总黄酮的超声波提取工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):265-267.

# 响应面法优化广东紫珠总黄酮的超声波提取工艺

房海灵<sup>1,2</sup>, 卢艳花<sup>2</sup>, 聂 桦<sup>1</sup>, 朱培林<sup>1</sup>

(1. 江西省林业科学院,江西南昌 330032; 2. 华东理工大学,上海 200237)

**摘要:**通过单因素试验结合响应面对广东紫珠中总黄酮的提取工艺进行优化研究。以乙醇浓度、料液比、提取时间为自变量,总黄酮提取率为响应值,设计 3 因素 3 水平响应面分析试验,来确定广东紫珠总黄酮最佳超声提取工艺。超声波法提取广东紫珠中总黄酮的优化条件为:提取溶剂 66% 乙醇,料液比 1:42,提取时间为 44 min;该条件下,总黄酮得率可达到 16.15%。

**关键词:**广东紫珠;总黄酮;超声波提取;响应面法

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0265-03

广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun.) 为马鞭草科(Verbenaceae)紫珠属(*Callicarpa* L.) 多年生落叶灌木,别名万年青、珍珠风、臭常山、老鸦饭、金刀菜等。2010 年版《中国药典》记载<sup>[1]</sup>,广东紫珠以干燥茎、叶入药,其味苦、涩,性凉,具有收敛止血、散瘀、清热解毒之功效,临床上常用于治疗宫颈糜烂出血、阴道炎、宫颈炎等症。研究表明,广东紫珠的主要化学成分为黄酮、苯乙醇苷、萜类及挥发油等。其中黄酮类成分如木犀草素、鼠李素等具有显著的抗菌、消炎、抗病毒、抗肿瘤等药理作用<sup>[2-6]</sup>,因此,研究广东紫珠黄酮类化合物的提取工艺对广东紫珠的进一步开发利用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为广东紫珠,于 2011 年 10 月采自江西省萍乡

市芦溪县。主要试剂:芸香苷对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 100802200306)。无水乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等均为分析纯。主要仪器:FA1104 电子天平,CTXNW 循环超声提取机,754 型紫外可见分光光度计。

### 1.2 测定方法

**1.2.1 标准曲线建立** 精确称取 105℃ 干燥恒重的芸香苷对照品 25.90 mg,加 70% 乙醇溶解并定容至 25 mL 中,摇匀得质量浓度 1.036 mg/mL 的对照品溶液,取 1 mL 对照品溶液至 10 mL 容量瓶中定容。分别取上述芸香苷对照品溶液 0、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 mL 于 6 个 10 mL 容量瓶中,各加入 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.3 mL,摇匀,放置 6 min 后加入 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 0.3 mL,摇匀,6 min 后加入 4% NaOH 溶液 2 mL,混匀,70% 乙醇定容至刻度。10 min 后于 510 nm 处测吸光度,空白试剂为参比,以吸光度为纵坐标、芸香苷质量浓度为横坐标绘制标准曲线,用最小二乘法进行线性回归,得芸香苷质量浓度与吸光度间回归方程: $D = 1.036C + 0.016$ ,  $r = 0.997$ 。

**1.2.2 供试样品总黄酮含量测定** 称取广东紫珠粉末 0.2 g,加入提取溶液浸泡 12 h 后,进行提取,过滤,得样品溶液,备用。取 1 mL 样品溶液至 10 mL 容量瓶中定容,精密量取 2 mL 上述溶液,按照上述建立标准曲线的方法,依次加入 NaNO<sub>2</sub> 溶液、Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液和 NaOH 溶液,混匀,70% 乙醇定容至刻度。静置 10 min 后测定吸光度,根据回归方程计算样品中总黄酮含量。

收稿日期:2013-10-25

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81102799);江西省科技支撑计划(编号:20111BBG70030-4);江西省博士后科研择优资助项目;江西省财政林业专项(编号:2011511201)。

作者简介:房海灵(1983—),女,山西晋中人,博士,助理研究员,主要从事药用植物资源及质量评价研究。Tel:(0791)83833641;E-mail:fanghaiing2013@163.com。

通信作者:朱培林,研究员,主要从事森林药材与食品研究。Tel:(0791)83833803;E-mail:yczpl@126.com。

## 参考文献:

- [1] Gancel A L, Feneuil A, Acosta O, et al. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*) [J]. Food Research International, 2011, 44(7): 2243-2251
- [2] Oscar A M, Fabrice V, Sonia C, et al. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1497-1501.
- [3] Skirvin R M, Hellman E W. Blackberry products and production regions [J]. HortScience, 1984, 19(2): 195-197.

- [4] 白 洁, 马永昆, 张 龙, 等. 超高压处理对黑莓汁有机酸、Vc 及其协同抗氧化性的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(5): 221-225.
- [5] 吴文龙, 王小敏, 李维林, 等. 黑莓优良品种果汁加工性能的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(8): 129-131.
- [6] 方 亮, 赵慧芳, 屈乐文, 等. 三种黑莓果酱的研制与感官评价 [J]. 食品工业, 2011(8): 10-12.
- [7] 周剑忠, 刘小莉, 张丽霞, 等. 黑莓汁加工中关键工艺参数优化研究 [J]. 江西农业学报, 2012, 24(4): 113-115.
- [8] 单成俊, 周剑忠, 王 英, 等. 陶瓷复合膜澄清黑莓果酒工艺研究 [J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 67-69, 137.
- [9] 唐喜国, 杜云建. 黑莓山楂复合果汁的研制 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(22): 11406-11407, 11410.

1.3 提取方法确定

在相同提取温度、提取溶剂、料液比条件下,采用超声波和回流提取法对广东紫珠总黄酮进行提取,超声波提取总黄酮得率为 15.43%,高于回流提取(9.98%)。此外,超声波提取操作简单,具有省时、高效、节能的优点,故本试验采用超声波提取法。

1.4 超声波辅助提取总黄酮的单因素试验

分别以乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度为单因素,考察各单因素对广东紫珠总黄酮得率的影响。每个单因素水平重复 3 次,测其吸光值。

1.5 响应面分析法优化超声波辅助提取总黄酮的工艺参数

在单因素试验的基础上,确定 Box - Behnken 设计的自变量,运用 Design - Expert 8.0.5 软件程序,根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理<sup>[7-9]</sup>,采用 3 因素 3 水平的响应面分析法,以总黄酮得率为响应值作响应面,对提取条件进行优化。

2 结果与分析

2.1 超声波辅助提取广东紫珠总黄酮的单因素试验结果

2.1.1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响 精确称取广东紫珠粉末 0.2 g,以料液比 1 g : 40 mL 分别加入 40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 乙醇溶液 8 mL,50 ℃ 下作用 30 min,进行超声波提取,结果见图 1。乙醇浓度在 40% ~ 70% 范围内,总黄酮得率随乙醇浓度增加而增加,70% 乙醇浓度广东紫珠总黄酮得率最高为 15.69%,显著高于其他乙醇浓度的得率。乙醇浓度选用 60%、70%、80% 作为响应面试验的 3 个水平。70% 显著高于其他乙醇浓度的得率,因此,乙醇浓度选用 70%。

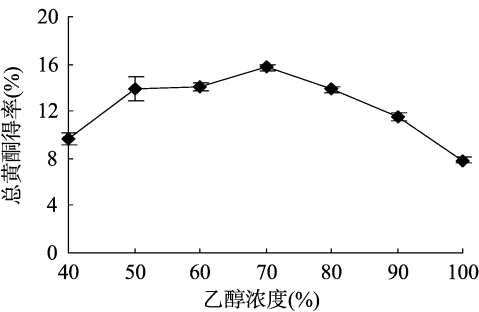


图1 乙醇浓度对总黄酮得率的影响

2.1.2 料液比对总黄酮得率的影响 称取广东紫珠粉末 0.2 g,以 70% 乙醇溶液为提取溶剂,料液比(g : mL)分别为 1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50、1 : 60、1 : 70,50 ℃ 下超声波作用 30 min 进行提取,结果见图 2。广东紫珠总黄酮得率随提取溶剂的增加而呈现出先增高后趋于稳定的趋势,且料液比为 1 : 40 时广东紫珠总黄酮得率最高,为 15.86%,因此,料液比选用 1 : 30、1 : 40、1 : 50 作为响应面试验的 3 个水平。

2.1.3 提取时间对总黄酮得率的影响 称取广东紫珠粉末 0.2 g,以料液比 1 g : 40 mL 加入 70% 乙醇溶液 8 mL,50 ℃ 下超声波分别作用 10、20、30、40、50、60 min 进行提取,结果见图 3。超声波作用时间在 10 ~ 30 min 范围内,广东紫珠总黄酮得率随提取时间延长而增加,且 30 min 时总黄酮得率最高,

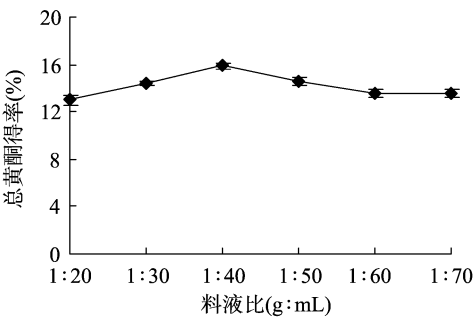


图2 料液比对总黄酮得率的影响

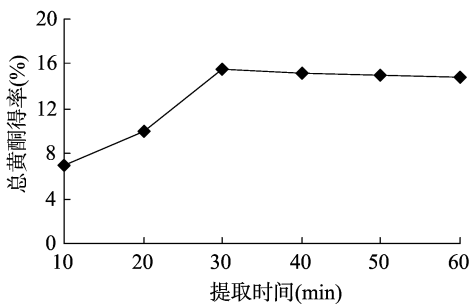


图3 提取时间对总黄酮得率的影响

为 15.56%,作用时间再延长时总黄酮得率反而下降。因此,超声波作用时间选用 20、30、40 min 作为响应面试验的 3 个水平。

2.1.4 提取温度对总黄酮得率的影响 称取广东紫珠粉末 0.2 g,以料液比 1 g : 40 mL 分别在 20、30、40、50、60、70 ℃ 下作用 30 min,进行超声波提取,结果见图 4。提取温度在 40 ~ 70 ℃,广东紫珠总黄酮得率变化较小,因此,在响应面试验中,提取温度不作为考察因素。

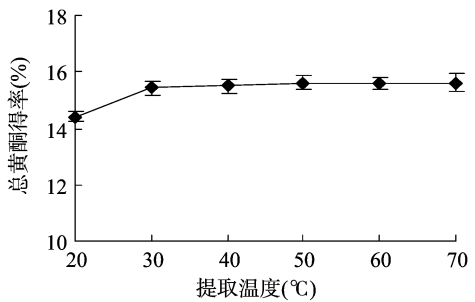


图4 提取温度对总黄酮得率的影响

2.2 响应面分析法优化广东紫珠中总黄酮的提取工艺

2.2.1 响应面分析因素水平的选择 根据 Box - Behnken 的中心组合试验设计原理,综合单因素试验结果,选取乙醇浓度、提取时间和料液比 3 个因素,进行 3 因素 3 水平试验设计,利用 Design - Expert 7.1.6 软件进行数据拟合,试验因素与水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

水平	因素		
	乙醇浓度(%)	料液比(g : mL)	提取时间(min)
-1	60	1 : 30	30
0	70	1 : 40	40
1	80	1 : 50	50

2.2.2 响应面分析方案及结果 以乙醇浓度( $X_1$ )、料液比( $X_2$ )、提取时间( $X_3$ )为自变量,总黄酮得率( $Y$ )为响应值,进行响应面分析试验,试验方案及试验结果见表 2。

2.2.3 方差分析结果 通过 Design - Expert 8.0.5 软件进行二次响应面回归分析,对试验结果回归拟合后所得的模拟方程为: $Y = 15.87 - 0.81X_1 + 0.51X_2 + 0.49X_3 + 0.43X_1X_2 + 0.27X_1X_3 + 0.04X_2X_3 - 0.92X_1^2 - 0.9X_2^2 - 0.59X_3^2$ ,其决定系数  $R^2 = 0.9466$ ,表明该回归模型的拟合情况较好,试验值与预测值比较接近,模型的可靠性可通过方差分析及相关系数来考察(表 3)。

对回归方程去一阶偏导数等于 0,整理可得如下 3 式:

$-0.81 - 1.84X_1 + 0.43X_2 + 0.27X_3 = 0;$  (1)

$0.51 + 0.43X_1 - 1.8X_2 + 0.04X_3 = 0;$  (2)

$0.49 + 0.27X_1 + 0.04X_2 - 1.18X_3 = 0。$  (3)

式(1)、式(2)、式(3)联立方程组,解得  $X_1 = -0.34$ ,  $X_2 = 0.21$ ,  $X_3 = 0.35$ 。代入前述的变换公式得到乙醇浓度、料液比、提取时间,即广东紫珠总黄酮提取最佳条件为提取溶剂乙醇 66.6%,温度为 50℃,料液比为 1 g : 42.1 mL,提取时间为 43.5 min。由回归方程预测广东紫珠总黄酮得率为 16.151%。采用优化条件:乙醇浓度 66%,料液比 1 g : 42 mL,提取时间 44 min,进行提取试验,实际得率为 16.10%,与理论预测值基本吻合。

表 2 响应面分析方案及试验结果

序号	影响因素			总黄酮得率(%)	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	试验值	理论值
1	-1	-1	0	14.58	14.78
2	1	-1	0	12.10	12.29
3	-1	1	0	15.14	14.95
4	1	1	0	14.38	14.18
5	-1	0	-1	14.67	14.95
6	1	0	-1	12.5	12.78
7	-1	0	1	15.68	15.40
8	1	0	1	14.58	14.31
9	0	-1	-1	13.89	13.41
10	0	1	-1	14.44	14.36
11	0	-1	1	14.24	14.32
12	0	1	1	14.95	15.43
13	0	0	0	15.69	15.87
14	0	0	0	16.05	15.87
15	0	0	0	16.15	15.87
16	0	0	0	15.69	15.87
17	0	0	0	15.78	15.87

3 结论

本研究以广东紫珠提取液中总黄酮含量为量化指标,通

表 3 回归模型方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
$X_1$	5.30	1	5.30	33.18	0.000 7
$X_2$	2.10	1	2.10	13.16	0.008 4
$X_3$	1.95	1	1.95	12.22	0.010 1
$X_1X_2$	0.74	1	0.74	4.63	0.068 4
$X_1X_3$	0.29	1	0.29	1.79	0.222 4
$X_2X_3$	0.006 4	1	0.006 4	0.04	0.847 0
$X_1^2$	3.58	1	3.58	22.43	0.002 1
$X_2^2$	3.41	1	3.41	21.35	0.002 4
$X_3^2$	1.48	1	1.48	9.25	0.018 8
残差	1.12	7	0.16		
失拟项	0.93	3	0.31	6.78	0.0478
误差	0.18	4	0.046		
总离差	20.91	16			
模型	19.80	9	2.20	13.78	0.001 1

过单因素试验对乙醇浓度、料液比、提取时间、提取温度等因素进行考察,确定了进一步试验范围,再应用响应面分析法对其中 3 个因素的最佳水平范围及其交互作用进行研究和探讨,建立了影响总黄酮得率的二次多项数学模型,依据回归分析结果可知,超声波提取广东紫珠总黄酮的最佳条件为乙醇浓度为 66%,料液比为 1 : 42,提取时间 44 min。在此条件下,由回归方程预测广东紫珠总黄酮得率为 16.15%。采用此优化条件进行试验,实际得率与理论预测值基本吻合,表明响应面分析的优化结果具有一定的实用价值。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:40.

[2] 周伯庭,李新中,钟广蓉,等. 广东紫珠地上部位主要药效学试验[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(2):204-206.

[3] 周伯庭,李新中,徐平声,等. 广东紫珠地上部位化学成分研究( I ) [J]. 中南药学,2004,2(4):238-239.

[4] 陈艳华,冯 锋,任冬春,等. 广东紫珠地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物,2008,6(2):120-122.

[5] 贾 安,杨义芳,孔德云,等. 广东紫珠超临界提取物的 GC - MS 成分分析及体外抗菌活性[J]. 中国医药工业杂志,2012,43(3):178-181.

[6] 贾 安,杨义芳,孔德云,等. 广东紫珠挥发油化学成分的 GC - MS 分析及体外抗菌活性[J]. 中药材,2012,35(3):415-418.

[7] 李君玲. 紫荆皮总黄酮超声提取工艺优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(7):266-267.

[8] Box G P, Hunter W G, Hunter J S. Statistics for experimenters, an introduction to design, data analysis and model building [M]. New York: John Wiley and Sons, 1990.

[9] 栗红生. 冬凌草总黄酮提取工艺的正交设计优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(5):237-238.