

张明明,黄芳,张长丽. 响应面法优化野菊花中绿原酸的提取工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):327-329.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.116

响应面法优化野菊花中绿原酸的提取工艺

张明明,黄芳,张长丽

(南京晓庄学院生物化工与环境工程学院,江苏南京 211171)

摘要:以野菊花为原料,研究绿原酸最佳提取工艺条件。在乙醇浓度、液固比、提取时间等单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,应用响应面分析法对野菊花中绿原酸提取工艺进行优化。结果表明,超声波辅助提取野菊花中绿原酸的最佳工艺条件为:乙醇浓度 80%、液固比 26 mL : 1 g、提取时间 35 min。在该条件下,绿原酸实际提取率达 2.32%,与模型预测值(2.35%)接近。

关键词:野菊花;绿原酸;超声波提取;响应曲面法

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0327-03

野菊花(*Chrysanthemum indicum*)别称山菊花、甘菊花,为菊科多年生草本植物,外形与菊花相似,野生于山坡草地、田边路旁,具有疏风清热、消肿散热、抗菌消炎、降血压等多种药理作用^[1-2]。绿原酸是菊花中的一种重要成分,属酚类化合物,具有抗菌、降压、降脂、抗病毒、抗肿瘤、保肝利胆、促进肠道蠕动、清除自由基、兴奋中枢神经系统等多种生物活性,是菊科植物中的主要药理成分之一^[3-6]。目前,绿原酸提取工艺主要有水浴提取法、乙醇回流法、超声提取法、微波提取法、超临界流体萃取法等^[7-10]。本试验采用超声波辅助提取野菊花中绿原酸,并用响应面法对其提取工艺进行优化,为工业化提取野菊花中绿原酸提供了参考。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

AUY120 电子天平(日本岛津);UV2450 紫外分光光度计(日本岛津);KQ-200KDB 高功率速控超声清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器设备有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(河南郑州长城科工贸有限公司)。

野菊花购于南京中药材市场,去除苞片后 35℃ 干燥,粉碎,过 40 目筛,备用。绿原酸标准品(中国药品生物制品检定所),无水乙醇(分析纯),试验用水均为二次蒸馏水。

1.2 试验方法

1.2.1 绿原酸的提取工艺 准确称取 2 g 干燥的野菊花粉末于烧杯中,加入 80% 乙醇溶液,在超声清洗器中超声提取,

设置一定的超声温度、超声功率、超声时间,提取一定次数后过滤。滤液在旋转蒸发仪中浓缩,定容至 50 mL,得到绿原酸提取液,测定其吸光度,分析绿原酸含量,计算绿原酸提取率。
1.2.2 绿原酸含量的测定 准确称取绿原酸标准品,用乙醇配制浓度为 0.1 mg/mL 的储备液。分别吸取上述溶液 0.10、0.30、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 于 10 mL 容量瓶中,定容摇匀。以乙醇为参照,在绿原酸的最大吸收波长 327 nm 下依次测定吸光度。以绿原酸浓度 C 为横坐标,吸光度 D 为纵坐标进行回归分析,绘制标准曲线,标准曲线方程为 $D = 41.757C + 0.0387$,相关系数 $r = 0.9991$,可见绿原酸浓度在 0.001 ~ 0.025 mg/mL 范围内与吸光度 D 呈良好的线性关系。将提取的绿原酸稀释一定倍数,再在 327 nm 下测定吸光度,根据标准曲线及公式(1)计算绿原酸的提取率(y):

$$y = CVn/m \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 表示绿原酸浓度,mg/mL; V 表示体积,L; n 表示稀释倍数; m 表示野菊花粉末的质量,g。

1.2.3 单因素试验 分别以乙醇浓度、液固比、超声时间、超声温度、超声功率等为因素,考察各因素对绿原酸提取率的影响。

1.2.4 响应面法试验设计 在单因素试验的基础上,选择乙醇浓度、液固比、提取时间 3 个因素作为考察对象,以绿原酸提取率为响应值,采用 Dsign Expert 7.0 统计分析软件中的 Box-behnken 中心组合试验设计,对提取条件进行优化。具体试验因素水平及编码见表 1。

表 1 响应面法优化野菊花中绿原酸的提取工艺设计

因素	A:乙醇浓度 (%)	B:液固比 (mL : g)	C:提取时间 (min)
-1	75	22 : 1	30
0	80	26 : 1	35
1	85	30 : 1	40

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇浓度对绿原酸提取率的影响 由图 1 可知,随乙醇浓度的增加,绿原酸提取率先迅速增加后降低。当乙醇浓

收稿日期:2014-01-17

基金项目:江苏省高校自然科学研究项目(编号:13KJD150001);南京晓庄学院科研项目(编号:2012NXY18);江苏省大学生实践创新训练计划。

作者简介:张明明(1992—),男,江苏射阳人,主要从事应用化学研究。E-mail:zhangmingming@163.com。

通信作者:黄芳(1978—),女,贵州贵阳人,硕士,讲师,主要从事天然产物提取与分析研究。Tel:(025)86178264;E-mail:fanghuang1998@163.com。

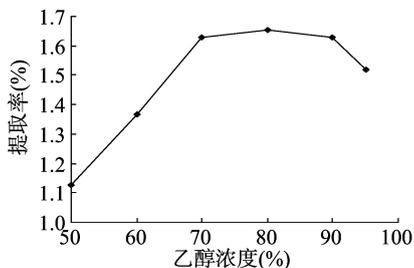


图1 乙醇浓度对绿原酸提取率的影响

度为80%时,提取率最高,达1.66%;此后乙醇浓度再增加,提取率降低。说明野菊花中绿原酸在浓度为80%的乙醇中溶解度最大,因此乙醇浓度选择80%。

2.1.2 液固比对绿原酸提取率的影响 由图2可知,绿原酸提取率随液固比的增加而上升。当液固比为26 mL : 1 g时,提取率最高,为2.31%;此后再增加液固比,提取率反而下降,也会给后序工艺带来困难,因此最终确定液固比为26 mL : 1 g。

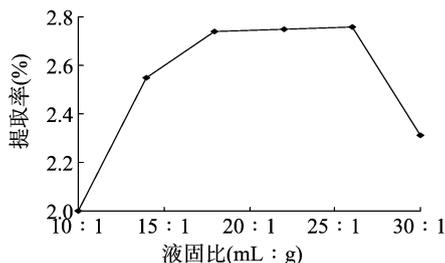


图2 液固比对绿原酸提取率的影响

2.1.3 超声时间对绿原酸提取率的影响 由图3所示,超声10~30 min时,随着超声时间的增加,绿原酸提取率呈上升趋势,至超声30 min时,提取率最高;当超声时间在30~50 min时,提取率趋于稳定不再发生变化;此后,超声时间增加到60 min,因提取时间太长,绿原酸分解,提取率反而减小。所以提取时间宜选择30 min。

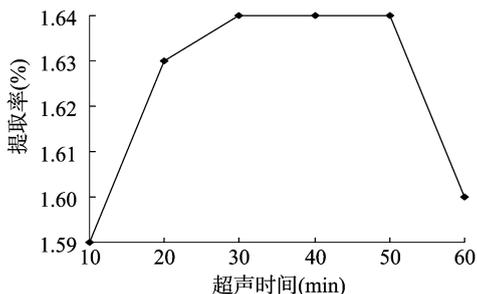


图3 超声时间对绿原酸提取率的影响

2.1.4 提取温度对绿原酸提取率的影响 从图4可以看出,随着提取温度的增加,绿原酸提取率增加。当提取温度达35℃时,提取率最高,为2.47%;此后再提高超声温度,提取率反而下降,可能是由于温度过高导致绿原酸发生分解^[11]。因此,提取温度宜选择35℃。

2.1.5 超声功率对绿原酸提取率的影响 由图5可知,绿原酸的提取率随着超声功率的增加显著上升,当超声功率达200 W时,提取率最高,为1.35%。由此可见,超声功率越高,绿原酸析出越充分,因此超声功率选择200 W。

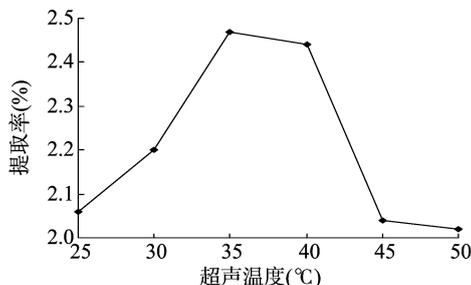


图4 提取温度对绿原酸提取率的影响

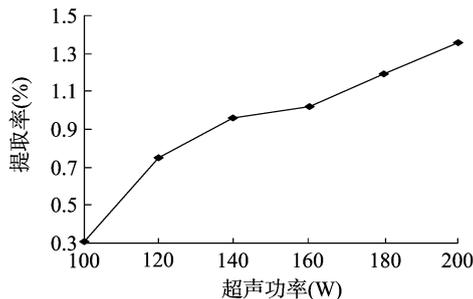


图5 超声功率对绿原酸提取率的影响

2.1.6 提取次数对绿原酸提取率的影响 由图6可知,随着提取次数的增加,绿原酸提取率逐渐减小。当提取1次时,提取率最高,为2.99%;另外从提取成本考虑,宜选择提取1次。

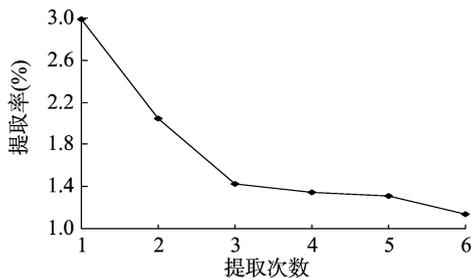


图6 提取次数对绿原酸提取率的影响

2.2 响应面试验优化绿原酸提取工艺

2.2.1 绿原酸提取试验方案及方差分析 根据Box-behnken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、液固比和超声时间3个对绿原酸提取率影响较大的因素,对提取工艺条件进行响应面试验优化。试验结果见表2,回归模型的方差分析见表3。

3个因素经拟合得到绿原酸提取率回归方程: $y = 2.34 + 0.021A + 0.023B + 0.086C + 0.095AB + 0.022AC + 0.025BC - 0.25A^2 - 0.25B^2 - 0.25C^2$ 。表3显示,方程的 R^2 为0.9986,说明该模型达极显著水平($P < 0.0001$),失拟项在0.10水平上不显著($P > 0.10$)。 R^2_{Adj} 为0.9967,说明建立的模型能够解释99.67%响应值的变化,可见回归方程拟合度和可信度均很高,试验误差较小。

根据回归方程作响应面图,考察所拟合的响应面形状,分析各提取条件对绿原酸提取率的影响,响应面图如图7所示,3组图直观地反映了乙醇浓度、液固比、超声时间3个因素对响应值的影响。结合回归方程及图7可以看出,各试验因素对提取率的影响不是简单的线性影响。各因素对提取率影响

表2 绿原酸提取工艺响应面设计及其结果

试验号	A(%)	B(mL:g)	C(min)	提取率(%)
1	75	22:1	35	1.88
2	85	22:1	35	1.75
3	75	30:1	35	1.73
4	85	30:1	35	1.98
5	75	26:1	30	1.74
6	85	26:1	30	1.72
7	75	26:1	40	1.85
8	85	26:1	40	1.92
9	80	22:1	30	1.71
10	80	30:1	30	1.71
11	80	22:1	40	1.85
12	80	30:1	40	1.95
13	80	26:1	35	2.33
14	80	26:1	35	2.35
15	80	26:1	35	2.34
16	80	26:1	35	2.34
17	80	26:1	35	2.33

表3 回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.070 000 0	9	0.120 000 0	536.36	<0.000 1
A	0.003 613 0	1	0.003 613 0	16.26	0.005 0
B	0.004 050 0	1	0.004 050 0	18.23	0.003 7
C	0.060 000 0	1	0.060 000 0	267.90	<0.000 1
AB	0.036 000 0	1	0.036 000 0	162.51	<0.0001
AC	0.002 025 0	1	0.002 025 0	9.12	0.0194
BC	0.002 500 0	1	0.002 500 0	11.25	0.0122
A ²	0.260 000 0	1	0.260 000 0	1187.00	<0.000 1
B ²	0.270 000 0	1	0.270 000 0	1210.84	<0.000 1
C ²	0.330 000 0	1	0.330 000 0	1488.66	<0.000 1
残差	0.001 555 0	7	0.000 222 1		
失拟项	0.001 275 0	3	0.000 425 0	6.07	0.057 0
纯误差	0.000 280 0	4	0.000 070 0		
总和	1.070 000 0	16			

注: $R^2=0.998\ 6$, $R^2_{Adj}=0.996\ 7$ 。

程度从强到弱依次为提取时间>液固比>乙醇浓度,其中提取时间对提取率的影响极显著($P<0.000\ 1$)。

2.2.2 模型的优化和验证 为检验试验结果的可靠性,进一步确定最佳工艺条件,通过软件求解方程得最佳提取工艺条件为:乙醇浓度80.317%,液固比26.26 mL:1 g,超声时间35.80 min,此时绿原酸提取率可达2.35%。为检验结果的可靠性,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺条件修正为:乙醇浓度80%、液固比26 mL:1 g、超声时间35 min进行提取试验,实际测得绿原酸提取率为2.32%,与预测值基本接近,证明响应曲面法优化菊花中绿原酸提取工艺参数的可行性。

3 结论

本研究在单因素试验基础上,利用 Design Expert 7.0 设计软件优化野菊花中绿原酸的提取工艺。根据回归方程得到绿原酸的最佳提取工艺为:乙醇浓度80%,液固比26 mL:1 g,提取时间35 min。在此条件下,绿原酸的提取率为2.32%,与理论值(2.35%)基本一致,说明该模型能很好地预测绿原酸提取条件与提取率之间的关系。

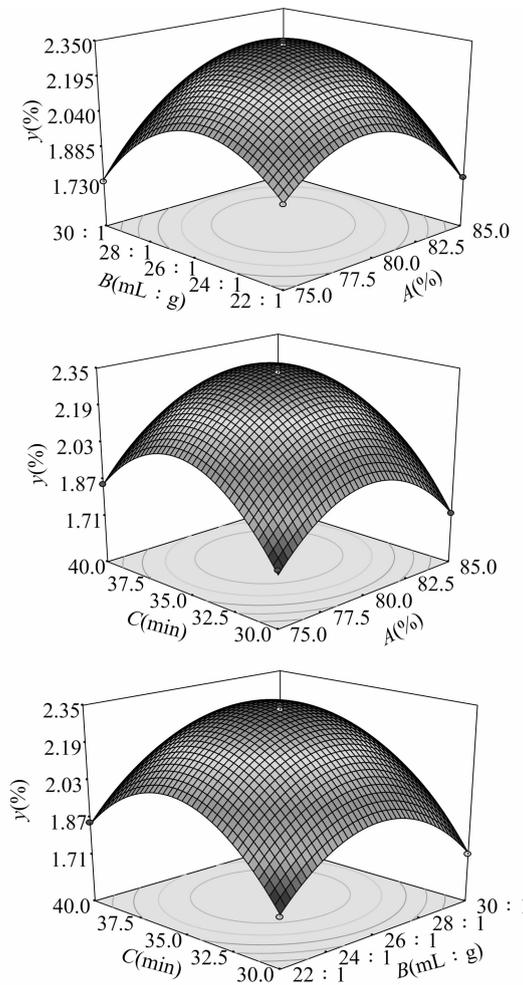


图7 乙醇浓度、液固比和提取时间对提取率影响的响应面曲线

参考文献:

- [1] 周虹云,吴长顺,程存归. 野菊花化学成分研究[J]. 中国现代应用药学,2013,30(1):31-35.
- [2] 黄芳,周宏,李健. 响应曲面法优化野菊花中黄色素提取工艺[J]. 食品工业,2012,33(12):1-4.
- [3] 吴江涛. 绿原酸的生物活性及其应用[J]. 现代农业科技,2009(19):349-350.
- [4] 郭秋娟,金邦荃,陈和平. 绿原酸生物活性与提取方法的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(8):346-348.
- [5] 王辉,田呈瑞,马守磊,等. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5):341-345.
- [6] 褚福红,陆宁,于新,等. 响应曲面法优化微波提取野菊花抗氧化物质[J]. 食品科学,2010,31(24):90-94.
- [7] 乌兰,张泽生. 金银花中绿原酸的提取及检测[J]. 食品科学,2005,26(6):130-134.
- [8] 杜延兵,裘爱泳. 绿原酸生物活性、资源及其提取纯化[J]. 现代食品科技,2006,22(2):250-252.
- [9] 凌仁怡,王娟,沈平嫄. 野菊花中绿原酸的微波辅助萃取研究[J]. 中草药,2008,39(1):60-62.
- [10] 王雪梅,蒋丽,袁红江,等. 金银花中绿原酸提取浓缩工艺[J]. 重庆理工大学学报:自然科学版,2011,25(3):47-50.
- [11] 李继睿,禹练英,杨孝辉,等. 超临界流体萃取野菊花中绿原酸提取工艺[J]. 食品研究与开发,2012,33(9):30-32.