

响应面法优化山丹鳞茎总黄酮提取工艺的研究

张昊,邵青,贺晓龙,王延峰*

(延安大学 生命科学学院/陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心,陕西 延安 716000)

摘要:在单因素试验的基础上,采用响应面法优化山丹鳞茎总黄酮提取工艺条件。结果表明,山丹鳞茎总黄酮提取最佳工艺为乙醇体积分数73%、料液比32:1(mL/g)、回流温度69℃、回流时间120 min。经证明,总黄酮含量试验值(4.685 mg/g)与预测值(4.729 mg/g)基本一致,RSD为0.661%,表明所得工艺参数可靠。

关键词:山丹;总黄酮;乙醇回流提取;响应面法

中图分类号:S567.23 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2016)03-0152-05

Optimization of Extraction Process of Total Flavonoids from *Lilium pumilum* bulb Using Response Surface Methodology

ZHANG Hao, SHAO Qing, HE Xiaolong, WANG Yanfeng*

(College of Life Science, Yan'an University/Shaanxi Province Engineering Research Center of Regional Biological Resources Conservation and Utilization, Yan'an 716000, China)

Abstract: The method of response surface analysis was adopted to optimize the extraction conditions of total flavonoids from *Lilium pumilum* bulb on the basis of single-factor experiment. The results showed that the optimum technological conditions were ethanol concentration of 73%, material-liquid ratio of 32:1, reflux temperature of 69℃ and reflux time of 120 min. Under such conditions, the actual value of total flavonoids extracted was 4.685 mg/g, which was basically coincident with the predicted value 4.729 mg/g. RSD was 0.661%, indicating that the optimum process conditions were reliable.

Key words: *Lilium pumilum*; total flavonoids; reflux extraction with ethanol; response surface methodology

山丹(*Lilium pumilum*)又称细叶百合,是百合科百合属多年生草本植物。鳞茎可入药,用于治疗阴虚燥咳,劳嗽咳血,虚烦惊悸,失眠多梦,精神恍惚^[1]。黄酮类化合物是一种广泛存在于植物中的次级代谢产物,具有多种生物活性的多酚类化合物^[2],具有扩张血管、防御病原体、抗氧化、抗炎、抗癌、增加免疫力及调节细胞信号转导通路等多种生物活性^[3]。目前关于黄酮的提取方法报道较多,包括有机溶剂提取、超声波辅助提取、微波辅助提取、碱提酸沉、超临界提取等^[4-8],而有关山丹鳞茎中总

黄酮的提取鲜有报道。鉴于此,对山丹鳞茎总黄酮的提取工艺进行研究,采用乙醇回流提取法并通过响应曲面法优化得到其最佳提取工艺,以期对山丹资源的开发利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验样品 山丹鳞茎由延安大学生命科学学院提供。

1.1.2 试验药品 芦丁标准品(北京世纪奥科生

收稿日期:2015-09-15

基金项目:陕西省高水平大学建设专项资金资助项目(生物学2012SXTS06);陕西省科技厅农业攻关项目(2012K01-02);延安市科技局项目(2012Ks-13)

作者简介:张昊(1987-),男,陕西泾阳人,在读硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学。

E-mail:15191167658@sohu.com

*通讯作者:王延峰(1970-),男,陕西凤翔人,教授,博士,主要从事生物资源开发利用、园艺农业标准化产业化技术研究。

E-mail:wyfcollege@sohu.com

物技术有限公司)、乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为分析纯。

1.1.3 仪器设备 UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)、N-1200B 旋转蒸发仪(上海爱浪仪器有限公司)、AUY220 电子天平(日本岛津公司)、SHB-3A 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂)、HH-6B 恒温水浴锅(江苏常州国华电器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验材料处理 将山丹鱗茎清洗干净,晾干后粉碎过孔径为 0.3 mm 的筛,装入广口瓶密封保存。

1.2.2 总黃酮标准曲线的绘制 以芦丁为标品,采用 $\text{NaNO}_3 - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 比色法测定在 510 nm 处的吸光值^[9],利用 UVprobe 软件生成芦丁标准曲线,回归方程为 $y = 13.06418x - 0.00411$, $R^2 = 0.99942$ 。

1.2.3 山丹鱗茎总黃酮提取含量的测定 设置回流条件后依次进行提取、抽滤、旋蒸、定容,按 1.2.2 方法测量吸光度并计算山丹鱗茎中黃酮的含量,其计算公式为^[10]: 提取含量 (mg/g) = CV/m , 式中, C 为提取液的总黃酮质量浓度 (mg/mL), V 为提取液的体积 (mL), m 为称取试验材料的质量 (g)。

1.2.4 单因素试验设计 称取试验材料 10 g, 分别固定乙醇体积分数为 70%、料液比为 30:1 (mL/g, 下同)、回流温度为 70 °C 及回流时间为 120 min 中的 3 个因素, 分别考察第 4 个因素中乙醇体积分数 (50%、60%、70%、80%、90%)、料液比 (10:1、20:1、30:1、40:1、50:1)、回流温度 (50、60、70、80、90 °C)、回流时间 (60、90、120、150、180 min) 对山丹鱗茎中总黃酮提取含量的影响, 进行单因素试验。

1.2.5 响应面试验设计 为了解因素之间的相互作用对山丹鱗茎总黃酮提取的影响, 在单因素试验的基础上, 运用 Design Expert 8.0.6 软件设计四因素三水平响应面试验(表 1)。

表 1 响应面试验因素与水平

水平	乙醇体积分数(A)/%	料液比(B)/(mL/g)	回流温度(C)/°C	回流时间(D)/min
-1	60	20:1	60	90
0	70	30:1	70	120
1	80	40:1	80	150

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 乙醇体积分数 由图 1 可知, 乙醇体积分数为 70% 时, 总黃酮提取含量最高。黃酮类物质的极

性范围很广, 依据相似相溶原则, 提取液极性与黃酮类物质极性临近时有助于黃酮类物质最大限度地析出。乙醇体积分数为 70% 时可能与黃酮类物质极性最为接近, 因此使得总黃酮最大程度地析出。故初步设 70% 为最佳乙醇体积分数。

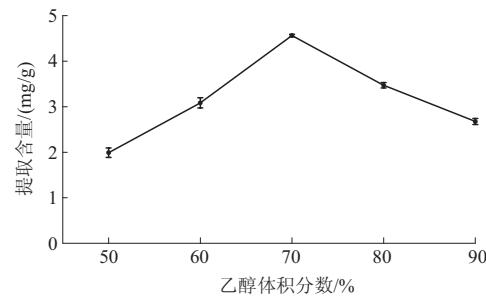


图 1 乙醇体积分数对总黃酮提取含量的影响

2.1.2 料液比 由图 2 可知, 当料液比为 30:1 时, 总黃酮提取含量最高, 然后再增加提取液的量也不会显著影响总黃酮的提取含量, 其原因可能是提取溶剂与提取材料的边界层浓度差变小, 物质扩散程度到达了平衡状态^[11]。料液比为 30:1 时, 总黃酮在乙醇溶液的扩散程度可能已经平衡, 考虑成本等因素初步选取 30:1 为最佳料液比。

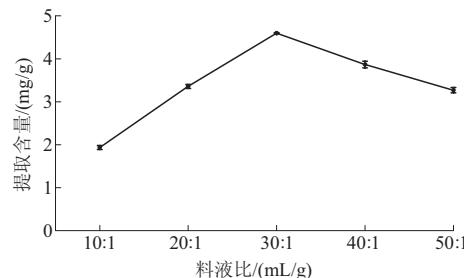


图 2 料液比对总黃酮提取含量的影响

2.1.3 回流温度 由图 3 可知, 当温度达到 70 °C 时总黃酮提取含量最高。70 °C 之前由于温度的升高使提取速率加大, 相同时间内的提取含量上升; 温度超过 70 °C 时提取含量有所降低, 可能是某些黃酮类物质在温度过高时发生质变。故初步设 70 °C 为最佳回流温度。

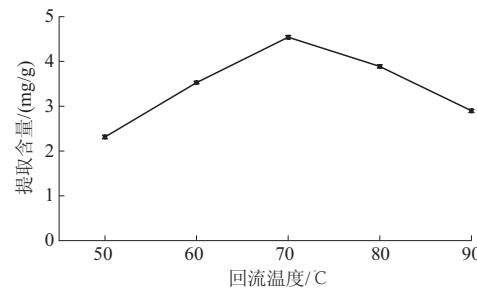


图 3 回流温度对总黃酮提取含量的影响

2.1.4 回流时间 由图 4 可知, 回流时间为 120 min

时,总黄酮提取含量最高。超过 120 min 后总黄酮含量下降。可能是已经提取出来的一部分黄酮被分解,亦或是时间过长会提取出更多非黄酮物质。故初步设 120 min 为最佳回流时间。

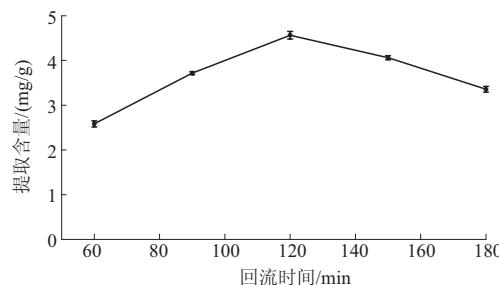


图 4 回流时间对总黄酮提取含量的影响

2.2 响应面法优化山丹鳞茎总黄酮提取工艺

2.2.1 试验方案及回归方程 在单因素试验的基础上,综合考虑回流温度、乙醇体积分数、料液比、回流时间 4 个因素对山丹鳞茎总黄酮提取的影响设计响应曲面试验,设计如表 2。并根据 Box - Behnken 中心组合原理^[12]对其进行回归拟合,得到二次多项回归方程为: $R = -74.17860 + 1.13775A + 0.68696B + 0.22816C + 0.13798D + 0.0003775AB + 0.0002675AC - 0.000075AD - 0.000855BC + 0.00009BD + 0.000265833CD - 0.000791808A^2 - 0.00502433B^2 - 0.00386308C^2 - 0.000586593D^2$ 。

由表 3 可知,对山丹鳞茎总黄酮提取所建立的

表 2 中心组合试验设计及结果

编号	A/%	B/(mL/g)	C/°C	D/min	提取含量/(mg/g)
1	70	40:1	70	90	3.441
2	80	40:1	70	120	3.606
3	70	40:1	70	150	3.480
4	60	20:1	70	120	1.871
5	70	20:1	80	120	2.804
6	60	30:1	80	120	1.925
7	80	30:1	70	90	3.555
8	60	30:1	70	90	2.008
9	80	30:1	70	150	3.606
10	70	20:1	60	120	3.294
11	60	30:1	70	150	1.861
12	70	30:1	70	120	4.687
13	80	30:1	80	120	3.604
14	80	30:1	60	120	3.894
15	70	30:1	70	120	4.532
16	70	30:1	60	90	3.621
17	70	30:1	80	90	3.425
18	70	30:1	70	120	4.501
19	70	30:1	60	150	3.539
20	70	20:1	70	150	2.787
21	70	30:1	70	120	4.605
22	70	40:1	80	120	3.485
23	70	30:1	80	150	2.873
24	70	30:1	70	120	4.514
25	60	40:1	70	120	2.398
26	70	20:1	70	90	2.896
27	70	40:1	60	120	3.534
28	80	20:1	70	120	3.203
29	60	30:1	60	120	2.362

表 3 回归模型方差分析

方差	离差平方和	Df	均方	F	Prob > F	显著性
模型	19.10	14	1.36	95.91	<0.0001	**
A	6.81	1	6.81	478.95	<0.0001	**
B	0.80	1	0.80	55.89	<0.0001	**
C	0.38	1	0.38	26.52	0.0001	**
D	0.053	1	0.053	3.75	0.0733	
AB	3.844	1	3.844	0.27	0.6113	
AC	5.402	1	5.402	0.38	0.5477	
AD	9.801	1	9.801	0.69	0.4205	
BC	0.049	1	0.049	3.42	0.0858	
BD	5.476	1	5.476	0.38	0.5450	
CD	0.055	1	0.055	3.88	0.0689	
A ²	7.73	1	7.73	543.57	<0.0001	**
B ²	3.44	1	3.44	242.07	<0.0001	**
C ²	1.85	1	1.85	129.79	<0.0001	**
D ²	3.11	1	3.11	218.35	<0.0001	**
残差	0.20	14	0.014			
失拟项	0.17	10	0.017	2.89	0.1592	
纯误差	0.024	4	6.058			
总变异	19.30	28				

注: *、** 分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。

二次多项模型具有显著性,失拟项不显著,校正系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.9794$ 、复相关系数 $R^2 = 0.9897$,说明回归方程充分拟合。各因子对提取含量的影响程度为 $A > B > C > D$,其中 A, B, C 及二次项 A^2, B^2, C^2, D^2 影响极显著,而交互项影响都不显著,说明各因素对总黃酮提取的影响不是简单的线性关系^[13]。

2.2.2 响应曲面分析 响应曲面反映了任意2个因素取零点水平时,其他2个因素的相互作用对山丹鱗茎总黃酮提取含量的影响,可以找到它们在提取过程中相互影响的关系。图5—10直观地反映了各因素交互作用对响应值的影响,乙醇体积分数、料液比、回流温度对总黃酮的提取有着极显著的影响,表现为曲线相对较陡,而回流时间对总黃酮提取的影响为不显著,表现为曲线较为平滑,随其数值的上升或下降响应值变化较小,与表3结果相吻合。

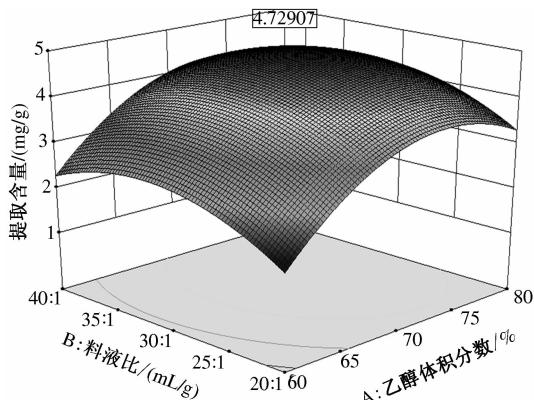


图5 乙醇体积分数和料液比对总黃酮提取含量影响的响应曲面

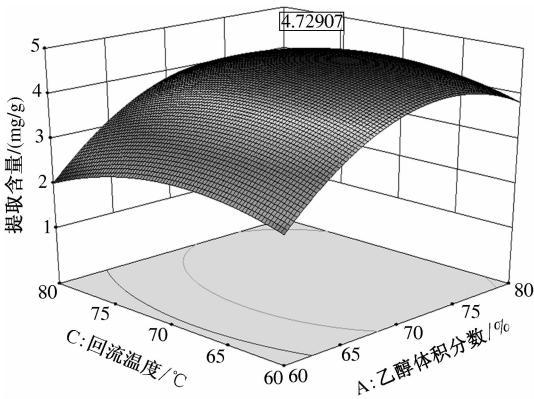


图6 乙醇体积分数和回流温度对总黃酮提取含量影响的响应曲面

2.2.3 最佳工艺条件及验证试验 用Design-Expert 8.0.6软件得出山丹鱗茎总黃酮的最佳工艺为乙醇体积分数73.39%,料液比31.58:1,回流温度68.64℃,回流时间119.39 min。考虑实际的可操作性将最佳工艺设置为乙醇体积分数73%,料液比32:1,回流温度69℃,回流时间120 min。在此

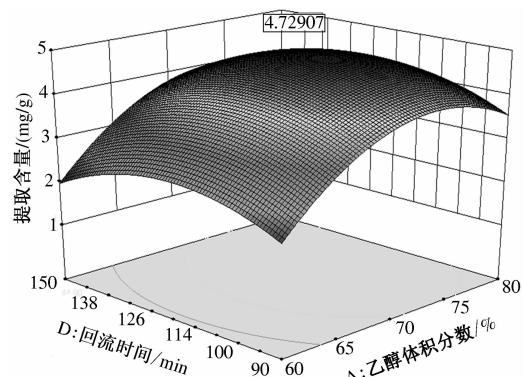


图7 乙醇体积分数和回流时间对总黃酮提取含量影响的响应曲面

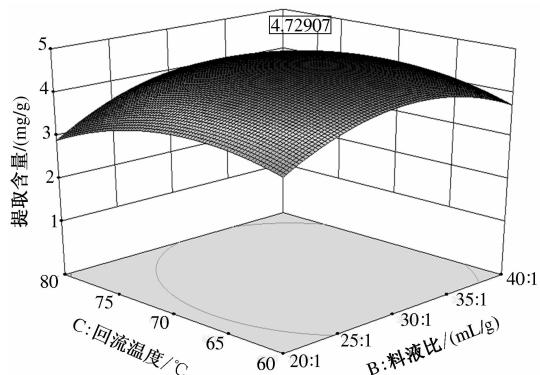


图8 液料比和回流温度对总黃酮提取含量影响的响应曲面

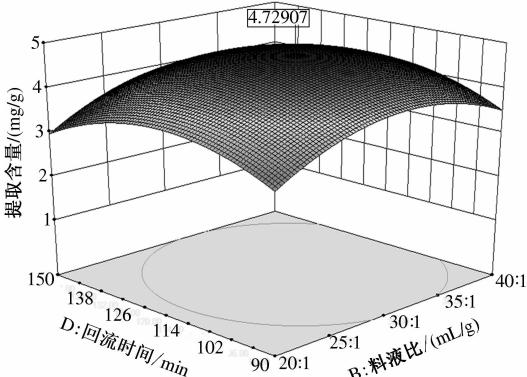


图9 液料比和回流时间对总黃酮提取含量影响的响应曲面

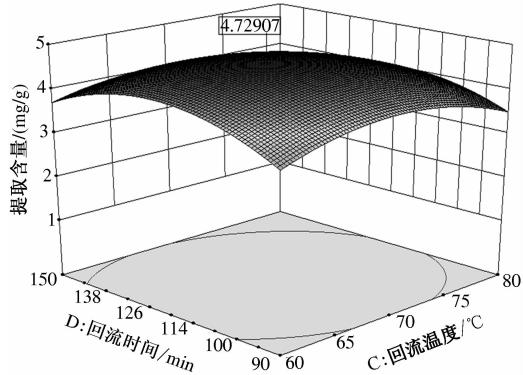


图10 回流温度和回流时间对总黃酮提取含量影响的响应曲面

条件下做 3 次验证试验,最大值(4.685 mg/g)与预测值(4.729 mg/g)的相对标准偏差(RSD)为0.661%,表明该模型可靠。

3 结论与讨论

响应面分析法解决了正交设计只能处理离散的水平值而不能找出整个区域内因素的最佳组合和最优值的问题,是研究几种因素及其交相作用的回归分析方法^[14]。本研究在单因素试验的基础上通过应用响应面法得到山丹鳞茎总黄酮的最佳提取工艺,实际的提取含量与薛长晖等在山丹叶^[15]、山丹茎^[16]中提取的黄酮含量存在差异,说明山丹不同部位中的黄酮含量可能存在差异。本试验的总黄酮提取含量略高于王润丰^[17]用超声波提取法提取的含量,可能是由于采用乙醇回流提取山丹鳞茎总黄酮时反应比较平缓,对黄酮类化合物结构的破坏较小,提取含量较高。其不足是提取时间长、提取成本大,而一些新兴的提取技术,如超声波提取法、微波辅助浸提等,它们能够缩短提取所需的时间,却存在破坏提取物中成分的可能性。本试验通过响应面法优化了山丹鳞茎中总黄酮的提取工艺:乙醇体积分数73%,料液比32:1,回流温度69℃,回流时间120 min,为连续性提取山丹鳞茎中总黄酮提供一定参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部) [M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:123.
- [2] 王立萍,王新春. 黄酮类化合物的代谢研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):226-229.
- [3] Olsen K M, Hehn A, Slimestad R, et al. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3' 5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum* [J]. BMC Plant Biology, 2010, 10:21.
- [4] 郑有飞,石春红,汪本有. 天然黄酮物质提取技术和分析方法的研究进展[J]. 分析化学学报,2009,25(14):102-107.
- [5] 游林红,揭晶,杨明利,等. 荷叶总黄酮提取工艺研究[J]. 现代农业科技,2014(6):97-98,100.
- [6] 王嫱,李祝,任秀秀. 箭叶淫羊藿总黄酮水提法提取工艺的研究[J]. 天津农业科学,2012,18(3):39-41.
- [7] 刘玲玲,孔涛,王海英,等. 菊芋总黄酮提取工艺研究[J]. 山西农业科学,2008,36(9):62-65.
- [8] 晏丽. 超声波辅助提取枫香叶总黄酮工艺研究[J]. 山西农业科学,2010,38(8):69-70,76.
- [9] 宋倩,赵声兰,刘彬球,等. 响应面法优化核桃壳总黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2013,11(18):214-217.
- [10] 徐世才,谢轶博,杨晓燕,等. 响应面法优化沙芥叶片总黄酮提取工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报,2014,41(5):875-881.
- [11] Shalmashi A. Ultrasound-assisted extraction of oil from the seeds[J]. Journal of Food Lipids, 2009, 16(4):465-474.
- [12] 傅珏生,张健,王振羽,等. 实验设计与分析[M]. 6 版. 北京:人民邮电出版社,2009:347-392.
- [13] 高义霞,景红艳,姜祖君,等. 响应面分析法优化乳苣总黄酮提取工艺的研究[J]. 中药材,2010,33(4):621-624.
- [14] 闫克玉,高远翔. 响应面分析法优化糙米总黄酮的提取工艺[J]. 食品研究与开发,2009,30(7):21-24.
- [15] 薛长晖. 微波法提取山丹茎总黄酮的工艺优化[J]. 青岛农业大学学报,2009,26(1):70-72.
- [16] 薛长晖. 山丹叶中总黄酮的最佳提取工艺[J]. 辽宁农业科学,2010(3):63-65.
- [17] 王润丰. 四种百合黄酮类化合物分离纯化与抗氧化作用的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2011.