

响应面法优化金龙胆草总黄酮的 超声波提取工艺研究

刘 姍^{1,2}, 胡洪利¹, 陈 惠¹

(1. 四川农业大学 生命科学与理学院, 四川 雅安 625014; 2. 攀枝花学院 生物与化学工程学院, 四川 攀枝花 617000)

摘要: 利用超声波辅助提取, 结合响应面法(RSM)优化金龙胆草总黄酮的提取工艺。在单因素基础上选取试验因素水平, 根据中心组合设计原理采用三因素三水平的响应面分析法进行最佳工艺的优化。结果表明, 在分析各个因素的显著性和交互作用后, 得出金龙胆草总黄酮的最佳提取工艺条件为: 提取工作时间 23.4 min, 间隔 2 s, 乙醇体积分数 73%, 料液比 1:38, 在此条件下实际提取的总黄酮含量为 8.285%。采用超声波辅助提取金龙胆草总黄酮的提取工艺方便可行, 得到的总黄酮含量较高, 值得进一步开发研究。

关键词: 金龙胆草; 总黄酮; 超声波提取; 响应面分析

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0148-05

Response Surface Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of Total Flavonoids from *Conyza blinii* Lévl.

LIU Shan^{1,2}, HU Hong-li¹, CHEN Hui¹

(1. College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Department of Biological and Chemical Engineering, Panzhihua University, Panzhihua 617000, China)

Abstract: The aim is to study the extraction technique conditions of total flavonoids from *Conyza blinii* Lévl. (CBL). On the basis of single factor experiment, the optimum conditions for extraction of total flavonoids were obtained through Box-Behnken center-united experiment design and response surface methodology. The results showed that the optimum conditions were as follows: the extraction time of 23.4 min, solid-liquid ratio of 1:38, and alcohol density of 73%. Under this condition, the extraction rate of total flavonoids could be up to 8.285% at once extraction. The extraction process optimized by RSM of total flavonoids was convenient and feasible and the content of total flavonoids was high. This method was worth further developing for application.

Key words: *Conyza blinii* Lévl.; total flavonoids; ultrasonic extraction; response surface methodology

金龙胆草为菊科白酒草属植物苦蒿的干燥地上部分, 分布于云南中、南部, 四川攀西地区及贵州部分地区, 系 20 世纪 70 年代四川省发掘的民间草药, 具有清热化痰、止咳平喘、解毒利湿、凉血止血的功效。金龙胆草已收录于中国药典 2010 年版一部及《四川省药品标准》^[1]。研究发现, 金龙胆草含有丰富的皂苷、萜类及酚酸性物质, 包括芦丁、槲皮素、圣草素、山奈酚等丰富的黄酮类化合物^[2]。超声细胞

粉碎法是一种液相剪切破碎法, 机制可能与超声波引起的空穴现象有关, 其利用超声分散破坏植物组织, 增强溶剂穿透组织的能力, 提高中草药有效成分提取率^[3]。选择金龙胆草地上全草为原料, 采用超声波破碎仪提取其总黄酮成分, 同时选择乙醇体积分数、提取时间、料液比 3 个单因素作为考察对象, 利用响应面法(RSM)探讨最佳提取工艺, 以期为综合利用金龙胆草资源, 开发黄酮类制品奠定基础。

收稿日期: 2012-07-27

作者简介: 刘 姍(1980-), 女, 四川乐山人, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事应用分子生物学研究。

E-mail: chuannong2010@126.com

1 材料和方法

1.1 材料与设备

金龙胆草全草(购于四川省米易县中药店)、芦丁标准品(中国药品生物制品检定所,批号 100080-200707),其他试剂均为分析纯。

JY88-N II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、UV-2802 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)、恒温水浴锅、SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市英峪仪器厂)、RE-2000 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)、T 系列电子天平(天津市天平电子仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 总黄酮提取方法 将金龙胆草全草置于 50℃ 烘箱中烘至恒定质量,粉碎过孔径 212 μm 筛,精密称取金龙胆草粉末 0.65 g 置于 25 mL 烧杯中,乙醇超声波提取 2 次,抽滤合并滤液,用石油醚洗涤 3 次,旋转蒸发后定容,利用紫外可见光谱仪测定总黄酮吸光度并计算含量。

1.2.2 总黄酮含量的测定方法 对照品溶液的制备:取芦丁对照品 10.3 mg,置 100 mL 容量瓶中,加少量 75% 乙醇,置于水浴上微热溶解,冷却,再加 75% 乙醇定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 0.103 mg/mL 标准溶液。

标准曲线绘制:精密量取对照品溶液 0、2、4、6、8、10、12 mL 置 25 mL 容量瓶中,加水至 12 mL,加入 5% NaNO₂ 溶液 1.0 mL,放置 6 min;再加 10% Al(NO₃)₃ 溶液 1.0 mL,摇匀,放置 6 min;再加 10% NaOH 溶液 10 mL,摇匀,加水定容,室温放置 15 min。在最大吸收波长处测定吸光度,同时以试剂空白作参比。以吸光度为纵坐标,溶液质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

总黄酮含量的测定:分别取一定量的待测提取液于 50 mL 容量瓶中,按照上述方法配置待测样品溶液,并测定吸光度。根据回归方程式,求出相当于样品吸光度的黄酮含量,按下式求出总黄酮含量。

总黄酮含量 = $\frac{C \times V_1 \times V_2}{G \times V_3 \times 1000} \times 100\%$, 其中: C 为通过线性方程计算出的样品质量浓度 (mg/mL), V_1 为提取液定容量 (mL), V_2 为测定时定容量 (mL), V_3 为测定时吸取量 (mL), G 为称取药材质量 (g)。

1.2.3 金龙胆草总黄酮提取条件的单因素试验设计

1.2.3.1 提取时间对总黄酮得率的影响 按照 1.2.1 方法,准确称取 0.65 g 已处理的样品干粉,按照 1:30 的料液比,加入 70% 乙醇溶液,而后在超声波破碎仪中分别按工作时间 15、20、25、30、35 min,

间隔 2 s 提取,测试所得样品溶液的总黄酮提取率。

1.2.3.2 乙醇体积分数对总黄酮得率的影响 按照 1.2.1 方法,准确称取 0.65 g 已处理的样品干粉,按照 1:30 的料液比,分别加入 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇溶液,而后在超声波破碎仪中按工作时间 20 min,间隔 2 s 提取,测试所得样品溶液的总黄酮提取率。

1.2.3.3 料液比对总黄酮得率的影响 按照 1.2.1 方法,准确称取 0.65 g 已处理的样品干粉,按照 1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 的料液比,加入不同体积 70% 的乙醇溶液,而后在超声波破碎仪中按工作时间 20 min,间隔 2 s 提取,测试所得样品溶液的总黄酮提取率。

1.2.4 响应面优化试验 在单因素试验基础上,采用 Design-Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken 试验设计原理设计响应面试验,选取金龙胆草总黄酮提取工艺中影响含量高低的 3 个主要因素乙醇体积分数、提取时间、料液比进行优化组合(表 1)。

表 1 金龙胆草总黄酮提取响应面分析因素和水平

因素	水平		
	-1	0	1
提取时间(X_1)/min	20	25	30
乙醇浓度(X_2)/%	60	70	80
料液比(X_3)	1:30	1:35	1:40

2 结果与分析

2.1 可见最大吸收波长和芦丁标准曲线的确立

将样品溶液与芦丁标准溶液进行显色并扫描,光谱如图 1 所示,2 种溶液在 420~680 nm 波段扫描后均在 510 nm 处出现最大吸收峰,因此,后续采用 510 nm 处吸收值来确定总黄酮含量。按照 1.2.2 方法绘制芦丁标准曲线,如图 2 所示,得到回归方程为 $y=10.946x-0.0071$, $R^2=0.9997$,证明在此测试范围内芦丁浓度与吸光度呈很好的线性关系。

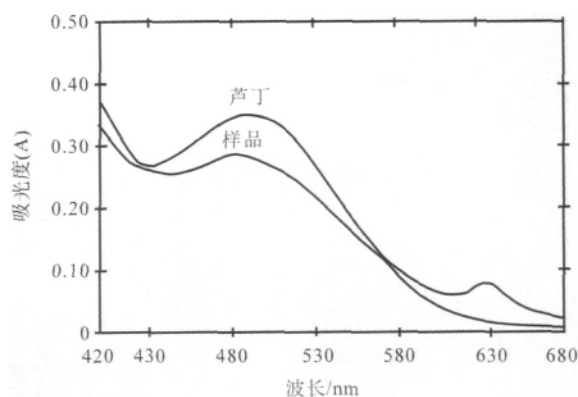


图 1 芦丁和样品溶液可见最大吸收波长扫描结果

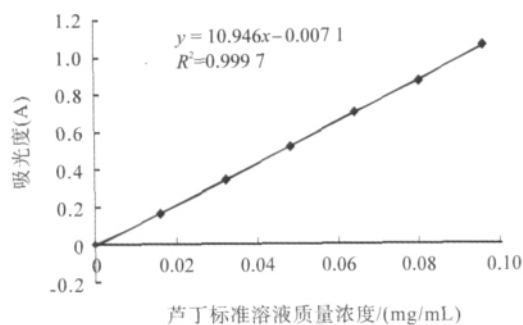


图2 芦丁标准曲线

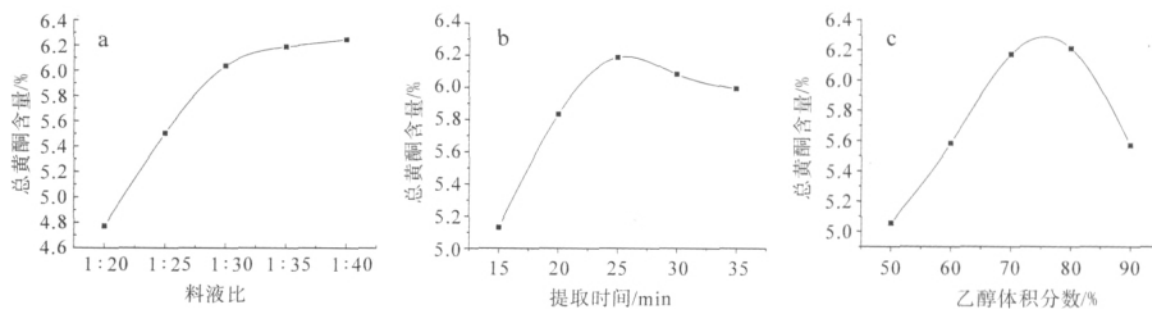


图3 不同因素对金胆草总黄酮含量的影响

2.3 金胆草总黄酮提取响应面试验结果

响应面分析试验设计及结果见表2,其中试验号2、3、10、11、16是中心试验,其余为析因试验,采用软件处理得响应面分析结果见图4-6。

表2 金胆草总黄酮提取响应面试验设计及结果

序号	X_1	X_2	X_3	总黄酮含量/%
1	25	60	1:30	5.754
2	25	70	1:35	7.913
3	25	70	1:35	8.124
4	20	70	1:40	7.092
5	20	80	1:35	6.464
6	25	80	1:40	8.052
7	30	60	1:35	5.850
8	25	80	1:30	5.773
9	25	60	1:40	6.013
10	25	70	1:35	7.968
11	25	70	1:35	8.094
12	20	70	1:30	6.015
13	30	80	1:35	6.844
14	30	70	1:30	6.424
15	20	60	1:35	6.921
16	25	70	1:35	8.197
17	30	70	1:40	6.885

2.2 金胆草总黄酮提取单因素试验结果

从图3-a可以看出,料液比越低提取所得总黄酮越高,但是料液比1:35与1:40差别不大,因此不再考虑继续选取料液比1:45做试验,而选定1:30、1:35、1:40作为响应面设计的3个料液比水平。从图3-b可以看出,20、25、30 min为提取效果最理想的3个提取时间水平。虽然60%乙醇和90%乙醇提取效果差不多(图3-c),但是从经济角度考虑,最终选取60%、70%、80%乙醇体积分数为后续试验水平。

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行多元回归拟合,得到总黄酮含量(Y)对提取时间(A)、乙醇体积分数(B)和料液比(C)的二次多项回归方程为:

$$Y = 8.06 - 0.20A + 0.35B + 0.62C + 0.31AB - 0.38AC + 0.51BC - 0.53A^2 - 0.96B^2 - 0.70C^2$$
同时,对模型进行方差分析,结果见表3。由表3可以看出, R^2 为0.9809, R^2 值越接近1,说明此模型越能预测其响应值^[4]。信噪比大于4被认为是很好的模型信号,该模型的校正拟合系数为0.9563,同时信噪比为15.953,表明信号很强,能很好地解释响应值的变化。当模型“Prob>F”值小于0.05时,显示该指标影响显著,由表3可知,整个模型是显著的,而失拟项大于0.05时不显著,表明此模型拟合程度较小。因此可用该回归方程模拟真实试验。通过软件分析,得到超声波提取金胆草总黄酮的最佳条件:提取工作时间为23.35 min,乙醇体积分数为72.96%,料液比为1:38,在此条件下提取的总黄酮含量为8.34252%。

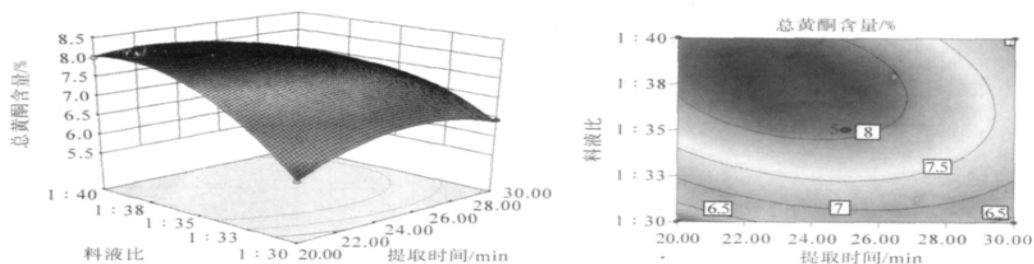


图4 提取时间和料液比对金胆草总黄酮提取影响的响应面及等高线

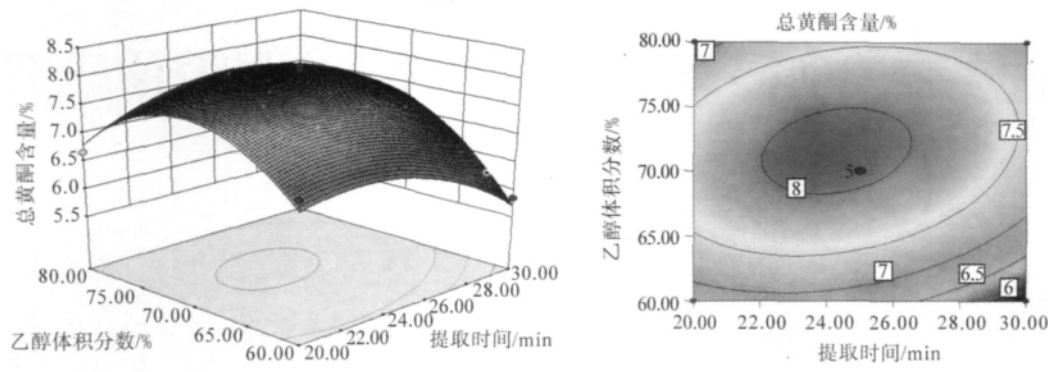


图 5 乙醇体积分数和提取时间对金龙胆草总黄酮提取影响的响应面及等高线

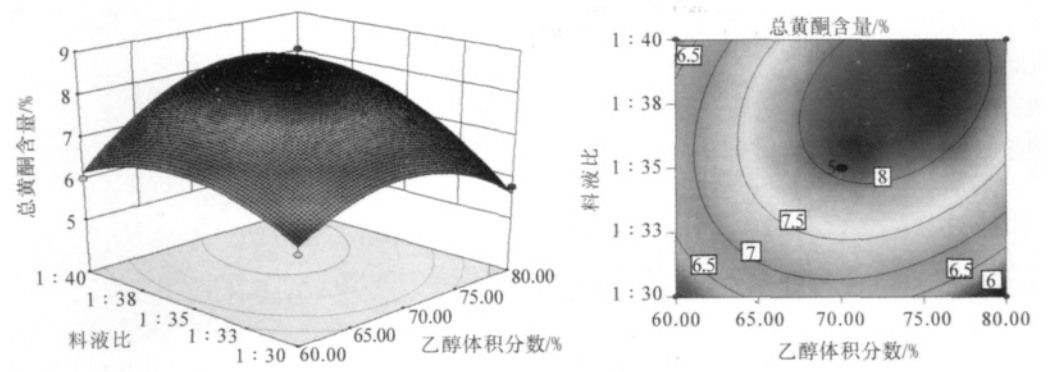


图 6 料液比和乙醇体积分数对金龙胆草总黄酮提取影响的响应面及等高线

同时,由 3 个影响因素的分析值大小可以看出,在所选择的试验条件下,各因素对总黄酮含量的影响主次顺序为:料液比>乙醇体积分数>提取时间。

表 3 总黄酮含量回归方程方差分析

项目	分析值
复相关系数平方(R^2)	0.980 9
预测相关系数	0.747 9
校正拟合系数	0.956 3
信噪比	15.953
Prob>F	
A	0.025 8
B	0.001 6
C	<0.000 1
模型 F 值	<0.000 1
失拟项	0.066 1

依据模型分析值及试验的易操作性,选取工作时间 23.4 min,间隔 2 s,乙醇体积分数 73%,料液比 1:38 进行验证试验,3 次试验平均总黄酮含量为 8.285%,与预测值接近,由此可见,采用 RSM 法优化得到的提取条件参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论与讨论

金龙胆草作为一种仅在昆明、攀西一带流行的民间药材,到 20 世纪 70 年代才由四川省组织开发,2003 年由攀枝花市科技局牵头成功进行了野生植

株的人工驯化^[5],目前已有金龙胆草皂苷片等产品面市。金龙胆草的次生代谢成分已有一定研究,例如总皂苷含量^[6-7]、苦蒿素含量^[8]等都有所报道,但黄酮类成分却尚未见报道。本试验首次测试了金龙胆草中总黄酮的含量,为 8.285%,表明金龙胆草中含有较高的黄酮成分,这或许与其抗炎抗肿瘤的功

效有关,值得深入研究并扩大应用。本试验使用超声波细胞破碎仪进行次生代谢产物的提取,这一辅助提取方式有效节省了时间,并且提取效率较高,发热量小,提取时不用考虑黄酮有效成分的破坏,但也发现,要准确得到总黄酮含量,并使试验重现性高,需要十分注意仪器的使用要求,考虑到超声波不是均匀分布在溶剂中的这一特点,每次提取都必须使烧杯固定在同一位置,并使探针保持在液面下的同一高度,这一经验也为后续研究时减小试验误差,提高重复性提供参考。

在提取过程中,本研究采用了响应面法进行工艺的优化,建立了总黄酮含量与各影响因素之间的数学模型,依此数学模型可以预测理论提取率。根据此二次回归模型,确定金龙胆草总黄酮的最佳提取工艺参数:提取时间 23.4 min,间隔 2 s,乙醇体积分数 73%,料液比 1:38,在此工艺条件下提取金龙胆草总黄酮的实际一次得率可达 8.285%。回归数学模型能较好地预测理论含量。(下转第 159 页)

3 结论与讨论

由 GC-MS 检测结果可知,与 CK 相比,经 HD4 和 HD4 休止细胞发酵处理的烟叶浸膏的致香物质种类和含量均产生变化。HD4 休止细胞发酵处理的烟叶浸膏致香物质成分比 HD4 发酵处理的少了 13 种,但总含量则有 23.6% 的增长,其中,在香气中起重要作用的酮类和大分子有机酸含量增幅较大。分析原因有二:(1)HD4 直接发酵的代谢途径较 HD4 休止细胞发酵复杂,造成 HD4 发酵烟叶浸膏的致香物质种类较 CK 和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏有所增加;(2)与 HD4 直接发酵相比,HD4 休止细胞发酵作用的底物专一、代谢途径简单、底物转化率高,用该技术处理得到的样品致香物质的种类相对简单,但代谢产物的产量有明显增加。

将烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏分别按 0.02%、0.03% 和 0.04% 的量在红大烟叶(X2L)上进行添加试验,感官评价结果表明,添加 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的烟叶样品香气量、丰富性、细腻性、甜润感较添加烟叶浸膏(CK)处理的烟叶样品均有改善。就单一烟草浸膏样品而言,其在红大烟叶(X2L)上的最佳添加量分别是:烟叶浸膏(CK)为 0.04%,HD4 发酵烟叶浸膏为 0.04%,HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏为 0.03%。但添加 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的样品整体抽吸效果好于添加 HD4 发酵烟叶浸膏的样品。

参考文献:

- [1] 王娜,程书锋,庞登红,等.产香菌处理烟叶碎片制备特色烟草浸膏的工艺研究[J].香料香精化妆品,2010(2):4-9.
- [2] 张勃,贾玉红,端李祥,等.微生物发酵烟梗水提物的制备及其在再造烟叶中的应用[J].河南农业科学,2012,41(3):56-60.
- [3] 吕品,李丹,黄龙,等.烟叶产香菌的分离及其在烟用香料制备中的应用[J].烟草化学,2009(1):37-42.
- [4] 张杰,宗永立,周会舜,等.一些醛酮类香料在卷烟烟丝和滤嘴中的转移行为[J].烟草化学,2011(7):60-63.
- [5] 段继铭,曾晓鹰,刘煜宇,等.葡萄果渣发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析[J].精细化工,2009(8):781-784.
- [6] 常剑波,祁春苗,李致新.微生物有机肥对烤后烟叶化学成分和致香物质含量的影响试验[J].现代农业科技,2011(2):60-61.
- [7] 杨永锋,陈红丽,刘国顺,等.烤烟烟叶化学成分与烟气烟碱的相关性研究[J].河南农业大学学报,2008(3):259-262.
- [8] 赵达,刘伟成,裘季燕,等.枯草芽孢杆菌 B03 液体发酵条件的优化[J].华北农学报,2008,23(2):205-209.
- [9] 刘小崔,石金波,赵思明.食品用微生物发酵剂研究进展[J].山西农业科学,2011,39(12):1332-1333.
- [10] 但汉斌,魏雪生.苏云金芽孢杆菌的发酵生物学研究初报[J].天津农业科学,1996,2(1):28-31.
- [11] 张莉,李文,肖正华,等.*Citrobacter freundii* 休止细胞催化合成 L-多巴[J].微生物学通报,2003(2):45-48.

(上接第 151 页)

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:201.
- [2] 苏艳芳,刘建生.金龙胆草黄酮类成分的研究[J].中草药,2001,32(6):496-497.
- [3] 严希康.生化分离工程[M].北京:化学工业出版社,2004:44-46.
- [4] Perry D, Haaland. Experimental design in biotechnolo-

gy[M]. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., 1989:1-18.

- [5] 董运贤.野生金龙胆草的人工栽培技术[J].中国中药杂志,2003,28(10):977-978.
- [6] 李令媛,王素英.金龙胆草各部位皂苷的含量测定[J].成都医药,1980(6):25.
- [7] 苏艳芳,杨凤英.金龙胆草总皂苷的制备方法及其应用:中国,CN1957962[P].2007-05-09.
- [8] 王瑞,李文艳.金龙胆草药材质量标准研究[J].中药材,2010,33(6):884-886.