

响应曲面法优化甘松总黄酮超声提取工艺

张宇霞^{1,2}, 马世震^{1*}, 谭亮¹, 冯海生¹

¹中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810001; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 研究超声波辅助提取甘松中总黄酮的最佳提取工艺条件。在单因素试验基础上, 选取乙醇体积分数、提取时间、液料比和提取次数进行 Box-Behnken 中心组合设计, 以总黄酮提取率为响应值, 采用响应曲面法优化提取工艺。结果最佳提取条件为: 乙醇体积分数 55%, 提取时间 35 min, 料液比 1:35 (g/mL), 提取 3 次, 该条件下总黄酮提取率为 39.102 mg/g, 与模型预测值 40.275 mg/g 的误差为 3.00%。响应曲面法可以优化甘松总黄酮的提取工艺, 为甘松质量控制提供了科学依据。

关键词: 响应曲面法; 甘松; 总黄酮; 超声提取工艺

中图分类号: R932

文献标识码: A

Optimization of Ultrasonic Extracting Process for Total Flavonoids from *Nardostachys chinensis* Batal. By Response Surface Methodology

ZHANG Yu-xia^{1,2}, MA Shi-zhen^{1*}, TAN Liang¹, FENG Hai-sheng¹

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To optimize ultrasonic-assisted extraction process of total flavonoids from *Nardostachys chinensis* Batal. On the basis of the single factor test, ethanol concentration, extraction time, ratio of material and liquid, and extraction times were selected for Box-Behnken central composite designing. With extraction yield of total flavonoids as response value, the extracting process was optimized by the response surface method (RSM). The optimized extraction conditions were as follows: ethanol concentration was 55%, the extraction time was 35 min, the ratio of material and liquid was 1:35 (g/mL), the extraction times was 3 times. The extraction yield of total flavonoids was 39.102 mg/g and the relative error was 3.00% that compared with actual value. The RSM technology optimization for extracting total flavonoids from *N. chinensis* Batal. was suitable. In addition, it can be used to assist the quality evaluation of *N. chinensis* Batal.

Key words: response surface method; *Nardostachys chinensis* Batal; total flavonoids; ultrasonic extraction optimization

甘松为败酱科植物甘松 (*Nardostachys chinensis* Batal.) 或匙叶甘松 [*N. jatamansi* (D. Don) DC.] 的干燥根及根茎, 主要分布在印度、尼泊尔及我国四川、青海、甘肃、西藏等地。甘松具有理气止痛, 开郁醒脾的功能, 可治胃痛、胸腹胀满、头痛、瘕病、脚气等病症。研究表明, 甘松具有抗抑郁、抗心律失常、促进 PC12D 细胞中神经因子诱导的神经突生长^[1-3] 等药理作用。甘松根茎中含有黄酮类^[4,5]、多糖^[6]、苯丙素类、萜类、挥发油、有机酸等化合物, 目前关于萜类和挥发油的报道较多^[7,8]。黄酮类物质在自然界中存在广泛, 具有抑制 NCI-H446 细胞系肺癌干细

胞自我更新、抗氧化、促进细胞增殖等作用^[9-11], 已应用于医药、保健品、化妆品等领域。然而, 甘松总黄酮的提取未见报道, 本文通过超声辅助提取, 以乙醇为溶剂, 考察了乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取次数对甘松根茎中的总黄酮提取率的影响, 采用响应曲面分析法优化最佳提取工艺。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘松药材购于甘肃省陇西县文峰药材市场, 经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰教授鉴定为甘松 (*Nardostachys chinensis* Batal.) 的干燥根及根茎。

芦丁对照品 (批号: MUST-13040302, 成都曼斯特生物科技有限公司); 无水乙醇、氢氧化钠、硝酸

收稿日期: 2014-07-18 接受日期: 2014-09-05

基金项目: 中国科学院藏药研究重点实验室项目 (Y34291OZ1)

* 通讯作者 E-mail: szma@nwipb.cas.cn

铝、亚硝酸钠均为分析纯(天津市百世化工有限公司);纯化水为实验室自制。

1.2 仪器与设备

Varian Cary 300 Bio 紫外-可见分光光度仪(美国 Varian 公司); ESJ182-4 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司); KQ-100E 型超声波清洗器(昆山超声仪器科技公司);安亭 TDL40B 离心机(上海安亭科学仪器厂); UPT-II-20L 超纯水机(成都优普公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 芦丁对照品溶液制备

精密称取芦丁干燥对照品 15.8 mg,置于 25 mL 容量瓶中,加 60% 乙醇溶解,稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.63 mg/mL 的对照品溶液。

1.3.2 检测波长的确定

准确移取对照品溶液 2.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,加入 60% 乙醇稀释至 15 mL,加入 1.0 mL 5% NaNO_3 溶液,摇匀,放置 6 min,加入 1.0 mL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,放置 6 min。再次加入 1.0 mL 40% NaOH 溶液,用 60% 乙醇定容至刻度,摇匀,放置 10 min。从“加入 60% 乙醇稀释至 15 mL”起,按上述方法依次加显色剂作为试剂空白。以试剂空白为参比,在波长 400 ~ 800 nm 进行扫描,结果对照品在 510 nm 有最大吸收,故选择 510 nm 为测定波长。

1.3.3 标准曲线绘制

分别精密移取芦丁对照品溶液 0.00、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00 mL 于 25 mL 容量瓶中,从“加入 60% 乙醇稀释至 15 mL”起,以试剂空白为参比,按照“1.3.2”项下方法于波长 510 nm 测定吸光值。以芦丁浓度 C (mg/mL) 为横坐标,吸光值 A 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 11.178C - 0.0132$, $r = 0.9997$ 。结果表明,芦丁在 0.022 ~ 0.067 mg/mL 范围内线性关系良好。

1.3.4 总黄酮的提取及含量测定

原料经干燥粉碎后,过 40 目标准筛,备用。准确称取 0.5 g 原料粉末置具塞锥形瓶中,以一定的料液比加入一定体积分数的乙醇溶液,密塞,摇匀,称定重量,进行一定时间的超声处理(40 °C, 40 kHz, 功率 360 W)。冷却至室温,用补重法补足缺失的重量。将提取液在 4000 rpm 条件下离心 5 min,沉淀以上述同样条件提取和离心,合并上清液,混匀,待用。取 2.0 mL 上清液于 25 mL 容量瓶中,按照“1.3.2”项下方法测定吸光度,计算总黄酮提

取率。

1.3.5 单因素试验设计

以甘松总黄酮提取率为指标,考察乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取次数对甘松根茎中的总黄酮提取率的影响。

1.3.6 响应曲面试验设计

在单因素试验基础上,选取 4 因素 3 水平,以总黄酮提取率为响应值(Y),根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,进行响应曲面分析。4 因素为乙醇体积分数(X_1)、液料比(X_2)、超声时间(X_3)、提取次数(X_4),3 水平为低(-1)、中(0)、高(1)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 乙醇体积分数的影响

固定液料比 1:30 (g/mL),超声时间 30 min,提取 1 次,改变乙醇体积分数(40%、50%、60%、70%、80%),总黄酮提取率随乙醇体积分数变化结果见图 1。

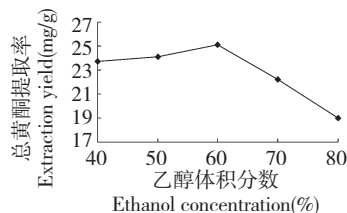


图 1 乙醇体积分数对总黄酮提取率的影响

Fig. 1 Effect of ethanol concentration on extraction yield of total flavonoids

由图 1 可知,乙醇体积分数在 60% 时总黄酮提取率最大,之后逐渐下降,所以选择乙醇体积分数在 60% 为宜。分析其原因是由于黄酮类化合物种类较多,根据相似相溶原理,其溶解性与溶剂的极性密切相关。

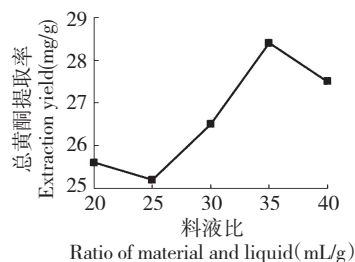


图 2 液料比对总黄酮提取率的影响

Fig. 2 Effect of ratio of solid to liquid on extraction yield of total flavonoids

2.1.2 液料比的影响

固定乙醇体积分数 60%, 超声时间 30 min, 提取 1 次, 改变液料比 (1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/mL), 总黄酮提取率随液料比变化结果见图 2。

由图 2 知, 液料比在 1:20~1:35(g/mL) 总黄酮提取率变化较大, 在 1:35(g/mL) 时达到峰值, 为 26.5 mg/g, 所以选择液料比 1:35(g/mL) 为宜。

2.1.3 超声时间影响

固定乙醇体积分数 60%, 液料比 1:30(g/mL), 提取 1 次, 改变超声时间 (20、25、30、35、40 min), 总黄酮提取率随提取时间变化结果见图 3。

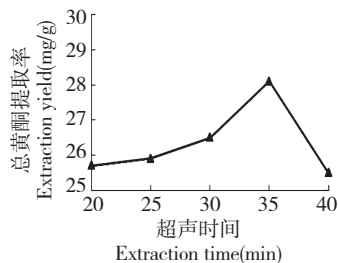


图 3 提取时间对总黄酮提取率的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on extraction yield of total flavonoids

由图 3 知, 随着超声时间的增加, 总黄酮提取率

也增加, 在 35 min 时达到最大值, 之后随着时间延长提取率又开始下降, 这可能与超声时间过长而黄酮类化合物容易分解有关。所以选择最佳超声时间为 35 min。

2.1.4 提取次数的影响

固定乙醇体积分数 60%, 液料比 1:30(g/mL), 超声时间 30 min, 改变超声次数 (1、2、3、4 次), 总黄酮提取率随超声次数变化结果见图 4。

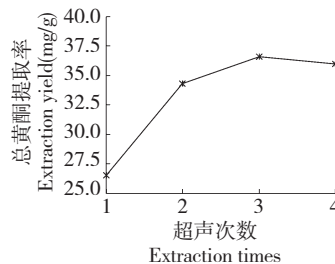


图 4 超声次数对总黄酮提取率的影响

Fig. 4 Effect of extraction times on extraction yield of total flavonoids

由图 4 可知, 提取 3 次时, 总黄酮提取率最大, 所以提取次数选择 3 次为宜。

2.2 响应曲面法分析法优化

2.2.1 Box-Behnken 试验设计及结果

表 1 中心组和试验 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 1 Design and results of Box-Behnken test

试验号 No.	X_1 (%)	X_2 (mL/g)	X_3 (min)	X_4	实测提取率 Measured value (mg/g)	预测提取率 Predictive value (mg/g)
1	50(-1)	40(1)	35(0)	3(0)	36.7	37.31
2	60(0)	35(0)	35(0)	3(0)	40.2	39.88
3	60(0)	35(0)	30(-1)	2(-1)	36.2	36.41
4	70(1)	35(0)	40(1)	3(0)	37.2	36.51
5	60(0)	30(-1)	35(0)	2(-1)	35.2	35.58
6	60(0)	35(0)	30(-1)	4(1)	36.5	36.35
7	60(0)	35(0)	40(1)	4(1)	38.2	37.66
8	60(0)	35(0)	35(0)	3(0)	39.3	39.88
9	60(0)	30(-1)	30(-1)	3(0)	36.6	36.78
10	60(0)	30(-1)	40(1)	3(0)	37.1	38.04
11	70(1)	30(-1)	35(0)	3(0)	34.9	33.96
12	70(1)	40(1)	35(0)	3(0)	35.5	36.20
13	50(-1)	35(0)	35(0)	4(1)	38.4	38.48
14	50(-1)	35(0)	30(-1)	3(0)	38.9	39.36
15	50(-1)	35(0)	35(0)	2(-1)	35.5	35.29
16	60(0)	35(0)	35(0)	3(0)	40.0	39.88
17	50(-1)	35(0)	40(1)	3(0)	37.6	37.68
18	50(-1)	30(-1)	35(0)	3(0)	39.8	38.78

19	60(0)	40(1)	35(0)	2(-1)	35.9	35.21
20	60(0)	40(1)	40(1)	3(0)	36.9	37.28
21	60(0)	30(-1)	35(0)	4(1)	35.5	35.96
22	60(0)	40(1)	30(-1)	3(0)	38.7	38.31
23	60(0)	35(0)	35(0)	3(0)	39.8	39.88
24	70(1)	35(0)	35(0)	4(1)	32.7	33.46
25	70(1)	35(0)	35(0)	2(-1)	33.9	34.38
26	60(0)	35(0)	40(1)	2(-1)	35.5	35.33
27	70(1)	35(0)	30(-1)	3(0)	34.9	34.60
28	60(0)	35(0)	35(0)	3(0)	40.1	39.88
29	60(0)	40(1)	35(0)	4(1)	37.7	37.10

2.2.2 二次模型建立及显著性检验

为考察各因素及其交互作用对提取工艺的影响,应用 Design Expert 7.0.0 软件,对表 1 数据进行二次多项回归拟合,得到二次多元回归方程

$$Y = 39.88 + 0.19 X_1 - 1.48 X_2 + 0.058 X_3 + 0.57 X_4 + 0.93 X_1 X_2 - 0.58 X_1 X_3 + 0.38 X_1 X_4 + 0.90 X_2 X_3 - 1.02 X_2 X_4 + 0.6 X_3 X_4 - 1.38 X_1^2 - 1.94 X_2^2 - 0.90$$

$$X_3^2 - 2.54 X_4^2 \quad (\text{公式 } 1)$$

从表 2 回归分析结果看出,该模型对提取工艺的影响极其显著($P < 0.0001$),且 $R^2 = 0.9311$ 、 $R^2_{\text{Adj}} = 0.8621$,失拟项不显著,说明实验方法可靠,可用于甘松总黄酮提取实验的理论预测。各因素对提取工艺的影响次序为 $X_2 > X_4 > X_1 > X_3$ 。

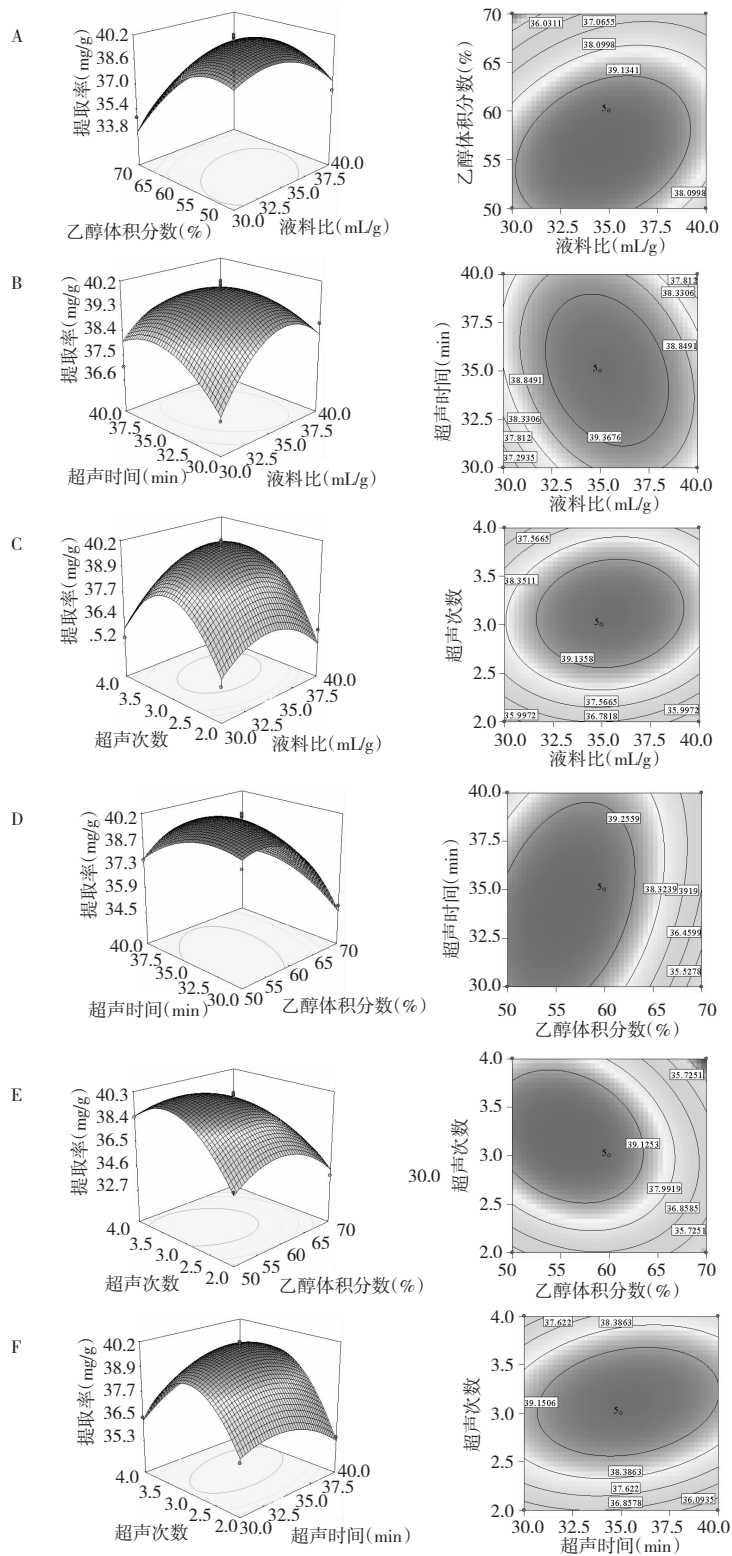
表 2 回归方程显著性检验

Table 2 Significance of regression equation

来源 source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value	显著性 Significant
模型 Model	104.22	14	7.44	13.51	<0.0001	***
X_1	0.44	1	0.44	0.80	0.3863	
X_2	26.40	1	26.40	47.90	<0.0001	***
X_3	0.041	1	0.041	0.074	0.7895	
X_4	3.85	1	3.85	6.99	0.0193	*
$X_1 X_2$	3.42	1	3.42	6.21	0.0259	*
$X_1 X_3$	1.32	1	1.32	2.40	0.1437	
$X_1 D$	0.56	1	0.56	1.02	0.3296	
$X_2 X_3$	3.24	1	3.24	5.88	0.0295	*
$X_2 X_4$	4.20	1	4.20	7.62	0.0153	*
$X_3 X_4$	1.44	1	1.44	2.61	0.1283	
X_1^2	12.31	1	12.31	22.33	0.0003	***
X_2^2	24.41	1	24.41	44.29	<0.0001	***
X_3^2	5.28	1	5.28	9.58	0.0079	**
X_4^2	41.85	1	41.85	75.92	<0.0001	***
残差 Residual	7.72	14	0.55	-	-	
失拟项 Lack of Fit	7.21	10	0.72	5.68	0.0544	not significant
纯误差 pure error	0.51	4	0.13	-	-	
总离差 Cor Total	111.94	28	-	-	-	
	$R^2 = 0.9311$	$R^2_{\text{Adj}} = 0.8621$	$CV = 2.00\%$	$R^2_{\text{Pred}} = 0.6220$	Adeq precision = 12.026	

注:*** $P < 0.001$ 为极显著; ** $P < 0.01$ 为高度显著; * $P < 0.05$ 为显著。

Note: *** $P < 0.001$ is extremely significant; ** $P < 0.01$ is highly significant; * $P < 0.05$ is significant.



A. 乙醇体积分数与液料比 A. ethanol concentration and ratio of material and liquid; B. 超声时间与与液料比 B. extraction time and ratio of material and liquid; C. 液料比与超声次数 C. ratio of material and liquid and extraction times; D. 乙醇体积分数与超声时间 D. ethanol concentration and extraction time; E. 乙醇体积分数与超声次数 E. ethanol concentration and extraction times; F. 超声时间与超声次数 F. extraction time and extraction times

图 5 交互作用对甘松总黄酮提取率的影响

Fig. 5 Effect of interaction on extraction yield of total flavonoids from *Nardostachys chinensis* Batal.

2.2.3 响应曲面分析

根据回归方程绘制的相应曲面图见图5。从响应曲面图中可以直观地看出两因素交互作用下各自变量对响应值的影响。图(A)表明,当乙醇体积分数一定时,提取率随着液料比的增加先升高,达到峰值又降低,当液料比一定时,随着乙醇体积分数的增加,提取率先缓慢上升,达到峰值后又急剧下降。方差分析表明,乙醇体积分数和液料比的交互项为显著项,说明二者存在交互作用。图(B)表明,当超声时间一定时,液料比的增加有助于提取率的增加,但达到峰值后又逐渐下降,液料比一定时,提取率随超声时间的变化呈现的趋势与前者基本一致。图(C)表明,当液料比一定时,提取率随超声次数的变化呈抛物线变化趋势,当超声次数一定时,随着液料比的增加,提取率逐渐上升,达峰值后又逐渐降低。图(D)表明,提取率受乙醇体积分数和超声时间交叉作用的影响,当乙醇体积分数一定时,随着超声时间的变化,提取率变化曲线较平滑,而乙醇体积分数对提取率的影响较大。图(E)表明,提取率受乙醇体积分数和超声次数交叉作用的影响,当超声次数一定时,随着乙醇体积分数的增加,提取率先增加至最大值后,又缓缓下降,而超声次数的增加对提取率影响明显。图(F)表明,超声时间及超声次数对提取率的影响较小,曲面呈现较平滑趋势。

2.3 验证试验

通过软件对模型及等高线分析,得到最佳提取条件为:乙醇体积分数 55.29%,提取时间 34.36 min,液料比 1:34.82(g/mL),提取 3.19 次,总黄酮最高提取率为 40.275 mg/g。采用以上所得最佳提取条件进行试验验证,为实际操作便利,将条件修正为:乙醇体积分数 55%,提取时间 35 min,液料比 1:35(g/mL),提取 3 次,提取率分别为 38.572 mg/g、39.011 mg/g、39.724 mg/g,平均提取率为 39.102 mg/g,与理论值的误差为 3.00%,表明该模型与实际提取效果拟合程度较好。

3 结论

本文采用超声辅助提取甘松中的总黄酮,操作简便,但由于超声过程中温度可能会升高,不易控制,考虑到温度可能对提取率的影响较大,所以未选择超声温度进行单因素考察。

通过响应曲面法得到甘松总黄酮的最佳提取条件为:乙醇体积分数 55%,提取时间 35 min,液料比

1:35(g/mL),提取 3 次。该条件下得到的平均提取率与预测值相差不大,所以该模型比较可行,可以为甘松总黄酮的进一步研究提供参考。

参考文献

- 1 Wu JJ(武姣姣). Preliminary study on the substance of anti-depressant function from *Nardostachys chinensis* Batal. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学), MSc. 2012.
- 2 Li XY(李翔宇), Luo J(罗骏), Ge YZ(葛郁芝), et al. Effect of volatile oil of *Nardostachys chinensis* on isolated ventricular myocytes I_k and I_{k1} in rats. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24:1814-1817.
- 3 Li P, Yamakuni T, Matsunaga K, et al. Nardosinone enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in a mitogen-activated protein kinase-and protein kinase C-dependent manner in PC12D cells. *J Pharm Sci*, 2003, 93:122-125.
- 4 Zhang X(张旭), Lan Z(兰洲), Dong XP(董小萍), et al. Study on the active components of *Nardostachys chinensis*. *J Chin Med Mater*(中药材), 2007, 30:38-41.
- 5 Zhang Y(张毅), Lin J(林佳), Xu LZ(徐丽珍), et al. Study on the components of *Nardostachys chinensis* (II). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38:823-825.
- 6 Jiang KN(蒋开年), Han YP(韩泳平). Study on polysaccharide S from Tibetan traditional medicine *Nardostachys chinensis*. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 42:2248-2250.
- 7 Bagchi A, Oshima Y, Hikino H, Kanshones A and B, sesquiterpenoids of *Nardostachys chinensis*. *Phytochemistry*, 1988, 27:1199-1201.
- 8 Geng XP(耿晓萍), Shi JL(石晋丽), Liu Y(刘勇), et al. Comparison study on the components of essential oils from *Nardostachys chinensis* Batal. and *N. jatamansi* (D. Don) DC. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2011, 22:60-62.
- 9 Cao XC(曹晓诚), Xiao LH(肖立红), Xiao Q(肖莽), et al. Inhibition of *Vitidis Fructus* total flavonoids on self-renewal of lung cancer stem cells derived from NCI-H446 cell line. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45:1284-1287.
- 10 Wang YM(王园美), Zhang LP(张莉萍), Li WW(李文武). Evaluation on antioxidative activity of total flavones of *Kummerowia striata*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2013, 19:276-279.
- 11 Zhang HS(张焕仕), Liu X(刘鑫), Qin P(钦佩), et al. Extraction, identification and cell proliferative effect of total flavonoids from root tuber of *Kosteletzkya virginica*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:486-489.