

响应面法优化冻绿叶中黄酮类物质的提取工艺

高霞¹, 孔冬梅^{1*}, 卫晓军²

¹山西大学生命科学学院, 太原 030006; ²交口县卫明西医诊所, 吕梁 032400

摘要: 利用超声波辅助提取技术, 以乙醇溶液为溶剂, 采用单因素试验考察乙醇体积分数、液料比、提取时间和提取温度对冻绿叶黄酮提取量的影响, 并通过响应面法优化冻绿叶黄酮的提取工艺。得到黄酮类物质的最佳提取条件: 乙醇体积分数 70%、液料比 33: 1、提取时间 50 min 和提取温度 30 °C。在此条件下, 黄酮提取量理论值为 35.18 mg/g, 实测值为 35.07 mg/g, 与理论值基本吻合。

关键词: 冻绿叶; 黄酮; 提取; 响应面

中图分类号: O629

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.036

Optimization of Extraction of Flavonoids from the Leaves of *Rhamnus utilis* by Response Surface Methodology

GAO Xia¹, KONG Dong-mei^{1*}, WEI Xiao-jun²

¹College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

²WeiMing Western Medicine Clinic of Jiaokou County, Liliang 032400, China

Abstract: Flavonoids in *Rhamnus utilis* were extracted with ultrasonic-assisted extraction technology using ethanol as solvent. A series of single-factor experiments were made to investigate the effects of ethanol concentration, liquid/solid ratio, extraction time and temperature on flavonoids yield. Response surface method was used to optimize the extraction process. The optimum extraction parameters were determined as: ethanol concentration of 70%, liquid/solid ratio of 33: 1, extraction time of 50 min and temperature of 30 °C. Under these conditions, the extraction yield of total flavonoids was 35.07 mg/g, which was consistent with the predicted value (35.18 mg/g).

Key words: *Rhamnus utilis*; flavonoids; extraction; response surface

冻绿(*Rhamnus utilis*)是鼠李科鼠李属的一种落叶灌木或小乔木, 主要分布于我国河北、山西、陕西、甘肃等地。冻绿叶味苦、甘, 性凉。据《中华本草》记载, 冻绿具有“清热利湿, 消积通便”等功效, 民间主要用于治疗水肿腹胀、疝瘕、瘰疬、疮疡、便秘等^[1]。但关于冻绿药理作用或活性成分的研究却鲜见报道。最近, 李丽等对冻绿茎化学成分及其抑菌性进行了研究, 发现冻绿茎乙醇提取物的乙酸乙酯部位对四种致病菌(大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌、金黄色葡萄球菌)具有明显的抑制作用, 并从该提取物中分离得到山萘酚、墨沙酮、木樨草素等 8 个化合物^[2]。而笔者对冻绿叶活性成分的初步分析表明, 冻绿叶中含有丰富的黄酮类物质。本研究以冻绿叶为原料, 利用超声波辅助有机溶剂提取法提

取冻绿叶中的黄酮类化合物, 采用响应面法优化冻绿叶黄酮的提取工艺条件, 为该植物在新型药物及保健品的开发等方面提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

采于山西省吕梁地区的新鲜冻绿叶片; 芦丁标准品; 乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠, 均为分析纯。

KQ-250E 型医用超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SpectraMax M5 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 冻绿叶中黄酮类物质的提取流程^[3,4]

新鲜叶片→烘干, 粉碎, 过 70 目筛→称取 1 g 粉末, 加入乙醇→超声波提取→离心, 收集上清液, 定容至 50 mL→一定反应后测吸光度

1.2.2 芦丁标准曲线的绘制^[5]

首先用30%的乙醇配制出0.2 mg/mL的芦丁标准溶液,分别吸取该溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,各加入5% NaNO₂溶液0.3 mL并混匀,静置6 min,继而将0.3 mL 10% Al(NO₃)₃分别注入其中,混合均匀,静置6 min;然后各加入4% NaOH溶液4 mL,混匀;再以30%乙醇定容到10 mL,静置20 min后,于510 nm波长下测吸光度。

1.2.3 测定冻绿叶中黄酮含量

按照1.2.2的方法测定出冻绿叶的吸光度。依据芦丁标准曲线计算出冻绿叶黄酮的质量浓度(c),再由以下公式计算出冻绿叶黄酮提取量。

$$\text{冻绿叶黄酮提取量 (mg/g)} = \frac{c \times 10\text{mL} \times 50\text{mL}}{2\text{mL} \times 1\text{g}}$$

1.2.4 单因素试验

分别考查乙醇体积分数、提取时间、液料比和提取温度对冻绿叶黄酮提取效果的影响,不同条件下均做三次重复试验取平均值得到黄酮的提取量,结果均采用均值±标准差形式表示。

1.2.5 响应面法优化分析^[6]

采用 Design-Expert 8.0.6 软件中的 Box-Behnken Design 原理,根据单因素试验结果设计试验,试验因素及水平见表1。

表1 响应面试验因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface tests

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
(A)乙醇体积分数 Ethanol concentration (%)	70	80	90
(B)液料比 Liquid/solid ratio (mL/g)	25:1	30:1	35:1
(C)提取时间 Extraction time (min)	40	50	60
(D)提取温度 Extraction temperature (°C)	30	40	50

2 结果与分析

2.1 芦丁标准曲线的绘制

以芦丁溶液浓度作为X轴、溶液在510 nm下的吸光度作为Y轴,绘制标准曲线并得到回归方程为 $Y = 7X + 0.038$, $R^2 = 0.9986$ 。

2.2 单因素试验

2.2.1 不同体积分数乙醇对冻绿叶黄酮提取量的影响

固定液料比20:1,提取时间30 min,提取温度30 °C,选取不同的乙醇体积分数,黄酮提取量受到乙醇体积分数的影响如图1A所示。分析图1A可以看出:冻绿叶中黄酮的提取量随乙醇体积分数的增大而增大。当乙醇体积分数达到80%时,黄酮的提取量最高。之后黄酮的取量又逐渐降低。因此乙醇体积分数为80%较利于黄酮的提取。

2.2.2 不同提取时间对冻绿叶总黄酮提取量的影响

固定乙醇体积分数80%,液料比20:1,提取温

度30 °C,选取不同的提取时间,黄酮提取量受提取时间的影响如图1B所示。由图1B可知在50 min内,提取时间越长,冻绿叶中黄酮的提取量越多。50 min的提取时间得到最大的黄酮提取量。再增加提取时间则不利于黄酮的提取。因此选择提取时间50 min比较适宜。

2.2.3 不同液料比对冻绿叶黄酮提取量的影响

固定乙醇体积分数80%,提取时间50 min,提取温度30 °C,选取不同液料比,冻绿叶总黄酮提取量受液料比的影响如图1C所示。由图1C可得:较低的液料比不利于黄酮的提取,当液料比增大到30:1时,黄酮提取量最大。故选择30:1的液料比较为适宜。

2.2.4 不同提取温度对冻绿叶黄酮提取量的影响

固定乙醇体积分数80%,液料比30:1,提取时间50 min,选取不同提取温度,冻绿叶总黄酮提取量受温度的影响如图1D所示。由图1D知:40 °C是黄酮提取量最大时的温度,之后温度越高黄酮提取量越小。因此提取温度在40 °C左右比较适宜。

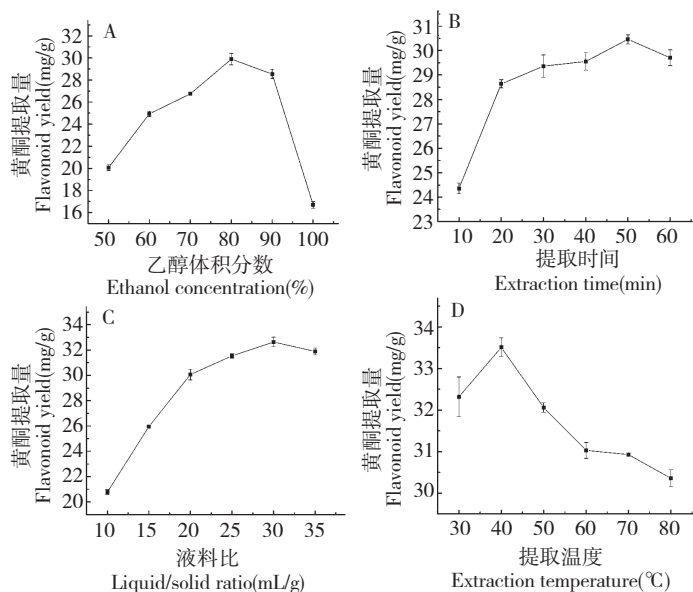


图1 乙醇体积分数(A)提取时间(B)液料比(C)及提取温度(D)对冻绿叶总黄酮提取量的影响

Fig. 1 The effects of ethanol concentration (A) extraction time (B) liquid/solid ratio (C) and extraction temperature (D) on the extraction yield of flavonoid

2.3 响应面分析法优化冻绿叶中黄酮类物质的提取工艺

验方案和结果如表2。共29个试验点,24个析因点,5个零点试验。

2.3.1 响应面试验设计和结果

对试验结果经过二次回归拟合后,得出拟合方

程式如下:

程式如下:

表2 响应面试验设计方案及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

试验号 No.	A	B	C	D	Y 黄酮提取量 Flavonoid yield (mg/g)
1	1	0	-1	0	30.68
2	-1	0	0	-1	34.47
3	-1	0	-1	0	31.25
4	-1	0	1	0	33.14
5	0	1	1	0	32.99
6	0	-1	0	1	32.58
7	-1	0	0	1	31.22
8	1	0	0	-1	32.04
9	0	0	0	0	34.14
10	1	-1	0	0	32.04
11	1	0	0	1	34.22
12	0	0	1	-1	34.07
13	-1	1	0	0	32.85
14	-1	-1	0	0	32.27
15	0	1	-1	0	29.98
16	0	0	0	0	34.42

17	0	0	0	0	34.55
18	0	1	0	1	32.64
19	0	-1	0	1	31.64
20	0	0	1	1	31.21
21	0	0	0	0	34.40
22	1	1	0	0	33.18
23	0	1	0	-1	32.25
24	0	0	-1	-1	30.02
25	0	-1	-1	0	30.07
26	0	0	-1	1	31.23
27	1	0	1	0	33.25
28	0	-1	1	0	31.15
29	0	0	0	0	33.67

$$Y = 34.24 + 0.017A + 1.05B + 0.35C - 0.27D + 0.17A \times B + 0.14A \times C + 1.36A \times D + 0.48B \times C - 1.02B \times D + 0.33C \times D - 0.39A^2 - 1.84B^2 - 1.26C^2 - 0.77D^2$$

2.3.2 响应面结果分析

响应面的回归显著性分析见表3。表3结果表

明该模型回归显著。模型 $R^2 = 0.9811$, 说明响应值和自变量之间的关系显著, 模型与实际试验值拟合较好。模型 $P < 0.0001$, 表明该二次方程模型达到极显著。失拟项 $P = 0.83252 > 0.1000$, 不显著, 表明该回归模型对试验结果拟合良好, 试验误差小, 因此, 可用该回归模型对试验结果进行分析和预测。

表3 回归模型显著性检验及方差分析

Table 3 Significance test and variance analysis of regression model

变异来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	Prob > F	显著性 Significance
模型 Model	56.86	14	4.06	51.97	<0.0001	* *
A	3.675E-003	1	3.675E-003	0.047	0.8315	
B	13.19	1	13.19	168.75	<0.0001	* *
C	1.43	1	1.43	18.28	0.0008	*
D	0.89	1	0.89	11.40	0.0045	*
AB	0.12	1	0.12	1.48	0.2440	
AC	0.078	1	0.078	1.00	0.3335	
AD	7.37	1	7.37	94.32	<0.0001	* *
BC	0.93	1	0.93	11.92	0.0039	*
BD	4.14	1	4.14	52.99	<0.0001	* *
CD	0.44	1	0.44	5.66	0.0322	*
A2	1.00	1	1.00	12.85	0.0030	*
B2	21.95	1	21.95	280.89	<0.0001	* *
C2	10.37	1	10.37	132.74	<0.0001	* *
D2	3.86	1	3.86	49.33	<0.0001	* *
残差 Residual	1.09	14	0.078			
失拟 Lack of Fit	0.61	10	0.061	0.50	0.8325	
纯误差 Pure Error	0.49	4	0.12			

总和 Total

57.95

28

注: * 差异显著, $P < 0.05$; ** 差异极显著, $P < 0.01$ 。Note: * Significant, $P < 0.05$; ** Extremely significant, $P < 0.01$ 。

对表3回归模型中存在显著交互作用的交互项

做响应面分析,分析结果见图2。

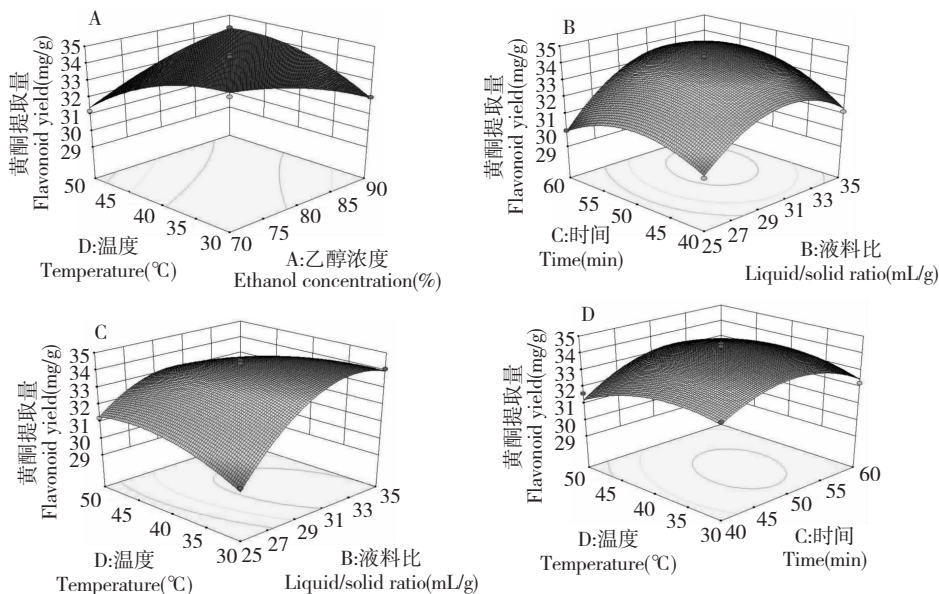


图2 不同因素的交互作用对黄酮提取量影响的响应面图

Fig. 2 Response surface plot showing the interactive effects of different factors on flavonoid yield

注: (A) 乙醇浓度和提取温度; (B) 液料比和提取时间; (C) 液料比和提取温度; (D) 提取时间和提取温度

Note: (A) ethanol concentration and extraction temperature; (B) liquid/solid ratio and extraction time; (C) liquid/solid ratio and extraction temperature; (D) extraction time and extraction temperature

由图2A可知,乙醇浓度和提取温度交互作用对黄酮提取量的影响比较明显,在较低乙醇浓度时,低温有利于黄酮的提取,但在较高乙醇浓度时,高温有利于黄酮的提取,且均可达到较大的黄酮提取量。由图2B可知,随着液料比和时间的增大,黄酮提取量呈先提高后降低的趋势。由图2C可知,在较低液料比时,黄酮提取量随温度的增加呈先升高后降低的趋势,并且整体水平不高,说明在任何温度下较低的液料比都不利于黄酮的提取,而在较高液料比时,较低的温度更利于黄酮的提取。由图2D可知,随着提取时间和温度的上升,黄酮提取量呈先上升后下降的趋势。

2.3.3 确定及验证最佳提取工艺

用Design-Expert软件对试验模型进行分析,得出最佳理论点为乙醇体积分数70.00%、液料比32.62:1、提取时间50.48 min和提取温度30.00℃,此时得到理论最大值为35.18 mg/g。为方便试验操作,将液料比改为33:1,提取时间改为50 min进行验证试验,得到黄酮提取量为35.07 mg/g,与

最大理论值接近。说明回归模型可较好地反映出冻绿叶黄酮提取的最佳条件。

3 结论

本研究考察了冻绿叶黄酮的超声波提取工艺,通过单因素试验和响应面设计对提取工艺进行优化,得到相关系数 $R^2 = 0.9811\%$ 的二次方程模型,可预测较优的工艺条件。冻绿叶黄酮的最佳提取工艺为乙醇体积分数70%、液料比33:1、提取时间50 min和提取温度30℃,该条件下黄酮提取量实际测量值达35.07 mg/g,与理论值基本吻合。

参考文献

- 1 The Chinese materia medica editorial board (中华本草编委会). Chinese Materia Medica (中华本草). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999. Vol XIII, 252-254.
- 2 Li L (李丽), Bao GH (鲍官虎). Study on the chemical constituents from the stem of *Rhamnus utilis*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1519-1521.

(下转第139页)