

响应面法优化柠条锦鸡儿花中总黄酮超声提取工艺

马玉梅^{1,2}, 陈涛¹, 杨雪^{1,2}, 申诚^{1,2}, 闫淑萍^{1,2}, 李玉林^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; ²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:本文以青海地区柠条锦鸡儿花为研究对象,用超声波辅助提取柠条锦鸡儿花中总黄酮,在选取提取温度、乙醇浓度、超声时间、料液比做单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 响应面法优化柠条锦鸡儿花中总黄酮提取工艺。结果表明:柠条锦鸡儿花总黄酮最优提取工艺为:提取温度 80 ℃,乙醇浓度 50%,超声时间 60 min,料液比 1:20。应用优化后的提取工艺进行 3 组验证实验,总黄酮的得率为 31.38 mg/g, RSD 为 0.17%。Box-Behnken 响应面法优化柠条锦鸡儿花中总黄酮的提取工艺稳定、可行。

关键词:柠条锦鸡儿花;总黄酮;响应面分析法;超声提取

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0130-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.021

Optimization of extraction of total flavonoids from *Caragana korshinskii* Kom. with ultrasound technology by response surface analysis

MA Yu-mei^{1,2}, CHEN Tao¹, YANG Xue^{1,2}, SHEN Cheng^{1,2}, YAN Shu-ping^{1,2}, LI Yu-lin^{1*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this paper, *Caragana korshinskii* Kom. flowers in Qinghai region was taken as the research object. The total flavonoids in *C. korshinskii*. flowers were extracted with the aid of ultrasound. On the basis of single factor experiments on extraction temperature, ethanol concentration, ultrasonic time and solid-liquid ratio, Box-behnken response surface method was used to optimize the extraction process of total flavonoids from *C. korshinskii* flowers. The results showed that the optimal extraction process for total flavonoids from *C. korshinskii*. flowers were as follows; extraction temperature 80 ℃, ethanol concentration 50%, ultrasonic time 60 min, and material-liquid ratio 1:20. The optimized extraction process was used to perform three sets of verification experiments. The total flavonoid yield was 31.38 mg/g and the RSD was 0.17%. Box-Behnken response surface method for the optimization of extraction of total flavonoids from *C. korshinskii* is stable and feasible.

Key words: *Caragana korshinskii* Kom. flowers.; total flavonoids; response surface analysis; ultrasonic extraction

柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii* Kom.)是豆科(Leguminosae)锦鸡儿属(*Caragana*)丛生落叶灌木,青海产2种,1变种和1变型^[1]。锦鸡儿属植物是干旱和半干旱荒漠、寒冷地区植被恢复和生态重建中集生态、经济和社会效益于一身的理想树种,不仅有重要的水土保持作用,同时也作为干旱地区牲畜优质饲草广泛使用^[2]。

锦鸡儿属植物还有悠久的药用历史,用作治疗头晕耳鸣、妇女气虚白带、肺虚久咳、小儿消化不良、

风湿性关节炎、疥癣等症^[3,4]。研究表明该属植物主要含有黄酮类、生物碱、甾体类、苯丙素类、萜类等化学成分^[5-9]。但是柠条锦鸡儿花中黄酮类成分的研究鲜有报道,柠条锦鸡儿花中黄酮类化合物提取工艺的研究也尚未见报道。为全面利用该植物资源,本文采用单因素实验和响应面设计,探索了柠条锦鸡儿花中总黄酮超声提取法的最适参数,以期为柠条锦鸡儿花的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 植物材料

柠条锦鸡儿花采于青海西宁火烧沟,经中国科学院西北高原生物研究所周昌范高工鉴定为豆科

收稿日期:2019-10-23 接受日期:2019-11-20

基金项目:青海省重点研发与转化计划(2019-SF-123)

*通信作者 Tel:86-971-6183048; E-mail:liyulin@nwipb.cas.cn

(Leguminosae) 锦鸡儿属 (*Caragana*) 植物柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii* Kom.)。60 ℃ 烘干, 粉碎后过 40 目筛, 装入干燥容器中备用。

1.1.2 试剂

芦丁, 购自上海源叶生物科技有限公司。其他试剂均为市售商品级分析纯试剂。

1.1.3 仪器与设备

Epoch2 紫外可见分光型微孔板分光光度计(时代联想生物科技有限公司); KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); UPT-II-10T 优普系列超纯水机(成都超纯科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 芦丁对照品溶液的制备

精密称取芦丁对照品 10 mg, 用 70% 乙醇定容至 50 mL 容量瓶中, 制得 0.20 mg/mL 的芦丁对照品溶液, 冷藏, 备用。

1.2.2 标准曲线的绘制

精密吸取芦丁对照品溶液 0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.4 mL 5% NaNO_2 溶液, 静置 6 min, 加入 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液 0.4 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加入 5.00 mL 4% NaOH 溶液, 用 70% 乙醇定容至 10 mL, 摇匀, 静置 10 min, 在 510 nm 处测定吸光度。以芦丁对照溶液的浓度为横坐标 (C), 吸光度为纵坐标 (A) 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 7.474 6C + 0.059 4$ ($R^2 = 0.999 1$)。

1.2.3 柠条锦鸡儿花中总黄酮的超声提取方法

称取样品粉末 1.00 g 置于 100 mL 锥形瓶中, 加入 70% 乙醇溶液 30 mL, 浸泡 10 min, 在 60 ℃ 水温下, 40 KHz 超声提取 40 min, 抽滤, 冷却至室温, 用 70% 乙醇补足失重。精密吸取 1 mL 溶液置 10 mL 容量瓶中, 按“1.2.2”项下方法测定吸光度, 计

算总黄酮含量。

1.2.4 单因素试验

以提取温度、乙醇浓度、超声时间、料液比四个因素为研究对象, 以柠条锦鸡儿花中总黄酮得率为指标进行单因素试验。

1.2.4.1 提取温度对黄酮得率的影响

在乙醇浓度 70%、料液比 1:30 g/mL、超声时间 40 min 的条件下, 设置不同提取温度 40、50、60、70、80 ℃, 考察提取温度对黄酮得率的影响, 以选择最佳提取温度范围。

1.2.4.2 乙醇浓度对黄酮得率的影响

在提取温度 60 ℃、料液比 1:30 g/mL、超声时间 40 min 的条件下, 设置不同乙醇浓度 20%、40%、60%、80%、100%, 考察乙醇浓度对黄酮得率的影响, 以选择最佳乙醇浓度。

1.2.4.3 超声时间对黄酮得率的影响 在提取温度 60 ℃、料液比 1:30 g/mL、乙醇浓度 70% 的条件下, 设置不同超声时间 20、30、40、50、60 min, 考察超声时间对黄酮得率的影响, 以选择最佳超声时间。

1.2.4.4 料液比对黄酮得率的影响

在提取温度 60 ℃、超声时间 40 min、乙醇浓度 70% 的条件下, 设置不同料液比为 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL, 考察料液比对黄酮得率的影响, 以选择最佳料液比。

1.2.4.5 Box-Behnken 响应面优化试验设计

在单因素试验结果基础上, 按照 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 选取提取温度、乙醇浓度、超声时间、料液比 4 个因素为考察因素, 总黄酮得率为响应值, 设计 4 因素 3 水平共 29 个试验组的响应面试验, 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行分析, 得到模型回归方程, 以确定柠条锦鸡儿花中总黄酮含量的最佳提取工艺参数。响应面因素水平见表 1。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平

Table 1 Factor levels used in Box-Behnken design

水平 Level	因素 Factor			
	A 提取温度 Extraction temperature (℃)	B 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	C 超声时间 Ultrasonic time (min)	D 料液比 Solid-liquid ratio (g/mg)
-1	60	40	40	1:20
0	70	60	50	1:30
1	80	80	60	1:40

1.3 数据处理

运用 Microsoft Excel 分析数据、作图。采用 Design-Expert 8.0.6.1 分析处理响应曲面模型回归方程及方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

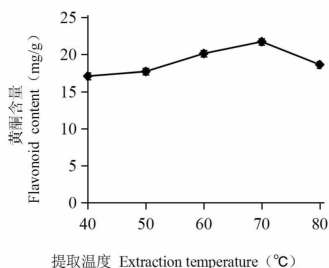


图1 提取温度对黄酮含量的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on flavonoid content

图1表明,当提取温度在40~70℃之间,柠条锦鸡儿花中总黄酮含量随着提取温度的增加而增多,当提取温度为70℃时总黄酮含量达到最大,继续增加提取温度,总黄酮含量减少。可能是由于随着提取温度的升高,黄酮类化合物遭到破坏,从而导致黄酮类化合物含量降低。因此选择提取温度为60~80℃进行响应面试验设计。

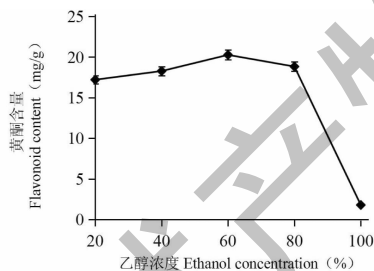


图2 乙醇浓度对黄酮含量的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on flavonoid content

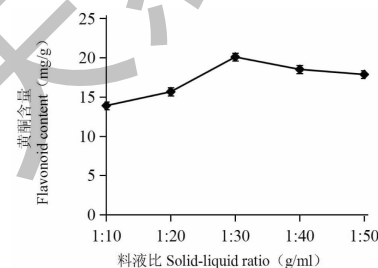


图3 料液比对黄酮含量的影响

Fig. 3 Effect of solid-liquid ratio on flavonoid content

条锦鸡儿花中总黄酮含量随着乙醇浓度的增大而增加,当乙醇浓度为60%时总黄酮含量达到最大,继续增加乙醇浓度,总黄酮含量减小。原因可能是随着乙醇浓度的增加,黄酮类化合物的溶解达到饱和,而极性较小的亲脂性化合物溶解度增加,从而导致黄酮类化合物含量降低。因此选择乙醇浓度为40%~80%进行响应面试验设计。

图3表明随料液比的增加,黄酮得率也增加,当料液比为1:30 g/mL时,黄酮得率达到最大,继续增加溶剂的用量,黄酮得率反而有所下降,可能是因为料液比过小,黄酮溶解不完全,而料液比过大,样品中非黄酮类化合物的溶出增加,与黄酮类化合物形成竞争,从而使得黄酮类化合物溶出变少。因此选择料液比为1:20~1:40 g/mL进行响应面试验设计。

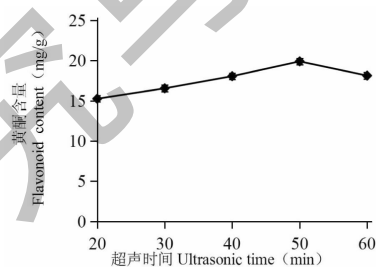


图4 超声时间对黄酮含量的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic time on flavonoid content

图4表明,20~50 min内黄酮得率随超声时间的增加而增大,在超声时间50 min时,黄酮得率达到最大,但超声时间大于50 min后,黄酮得率略有下降,可能是随着时间的延长,黄酮类化合物溶出达到饱和,不再明显溶出。因此选择超声时间为40~60 min进行响应面试验设计。

2.2 Box-Behnken 响应面试验分析

以提取温度(A)、乙醇浓度(B)、超声时间(C)、料液比(D)4个因素为自变量,总黄酮提取含量为响应值,通过四因素三水平响应面试验,实验结果见表2。通过软件 Design-Expert 8.0.6.1 对表2的数据进行分析,得到方差分析结果,见表3。通过多元回归拟合分析得到柠条锦鸡儿花中总黄酮提取含量(Y)与提取温度(A)、乙醇浓度(B)、超声时间(C)、料液比(D)之间的二次多项回归方程如下:

$$Y = 24.59 - 0.066A - 3.44B + 0.86C - 4.58D - 0.22AB - 1.09AC - 0.015AD + 0.000BC + 1.38BD - 1.70CD + 0.21A^2 - 3.88B^2 - 0.036C^2 + 0.26D^2$$

图2表明,当乙醇浓度在20%~60%之间,柠

根据方差分析结果,回归方程的 $P < 0.0001$,表明试验所用的模型极为显著,失拟项检验的 $P = 0.7543 > 0.05$,不显著, $R^2 = 0.9137$,说明回归模型与实际情况拟合良好,可将该回归方程用于柠条锦鸡儿花中黄酮提取工艺的预测。二次模型统计学分析表明,因素 B、D、 B^2 的 P 值 < 0.0001 ,说明因素 B、D 与 B^2 对黄酮提取率的影响是极显著的,各因素对总黄酮提取含量的影响大小顺序为 $D > B > C$

$> A$ 。通过软件 Design-Expert 8.0.6.1 得出最佳提取工艺条件:提取温度(A) $80\text{ }^\circ\text{C}$,乙醇体积分数(B) 50.22% ,超声时间(C) 59.44 min ,料液比(D) $1:20.08$;为操作可行,将乙醇体积分数调整为 50% ,超声时间调整为 60 min ,料液比调整为 $1:20$ 。根据所得的条件进行 3 组验证实验,总黄酮平均提取含量为 31.38 mg/g ,RSD 为 0.17% ,测定结果稳定,证明该结果合理可靠。

表 2 Box-Behnken 实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design arrangement and results

实验号 No.	A	B	C	D	黄酮得率 Flavonoid yield(mg/g)
1	1	0	1	0	22.53
2	1	0	0	1	18.86
3	0	-1	0	-1	29.18
4	0	0	0	0	27.41
5	0	1	-1	0	16.77
6	0	0	-1	1	21.68
7	0	0	1	-1	32.39
8	0	1	0	1	14.25
9	0	0	1	1	21.49
10	-1	1	0	0	17.87
11	1	-1	0	0	25.45
12	0	0	-1	-1	25.76
13	-1	0	-1	0	23.55
14	0	1	0	-1	18.86
15	0	0	0	0	25.39
16	1	1	0	0	18.29
17	1	0	0	-1	31.50
18	0	1	1	0	18.42
19	-1	0	0	1	18.86
20	0	0	0	0	21.62
21	-1	-1	0	0	24.14
22	0	0	0	0	25.32
23	0	0	0	0	23.20
24	-1	0	1	0	26.00
25	0	-1	1	0	24.80
26	1	0	-1	0	24.44
27	-1	0	0	-1	31.44
28	0	-1	0	1	19.06
29	0	-1	-1	0	23.15

表 3 响应面二次多项式模型方差分析

Table 3 Variance analysis of response surface quadratic polynomial model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
模型 Model	536.48	14	38.32	10.58	<0.000 1	**
A	0.052	1	0.052	0.014	0.906 3	
B	142.28	1	142.28	39.29	< 0.000 1	**
C	8.81	1	8.81	2.43	0.141 2	
D	251.44	1	251.44	69.44	< 0.000 1	**
AB	0.20	1	0.20	0.055	0.818 5	
AC	4.75	1	4.75	1.31	0.271 2	
AD	9.000E-004	1	9.000E-004	2.846E-004	0.987 6	
BC	0.000	1	0.000	0.000	1.000	
BD	7.59	1	7.59	2.10	0.169 7	
CD	11.63	1	11.63	3.21	0.094 8	
A ²	0.28	1	0.28	0.078	0.784 7	
B ²	97.56	1	97.56	26.94	0.000 1	**
C ²	8.251E-003	1	8.251E-003	2.279E-003	0.962 6	
D ²	0.433	1	0.43	0.12	0.734 9	
残差 Residual	50.69	14	3.62			
失拟项 Lack of fit	30.82	10	3.08	0.62	0.754 3	不显著
绝对误差 Pure error	19.88	4	4.97			
总和 Cor total	587.18	28				

$R^2 = 0.913 7$ $R^2_{Adj} = 0.827 3$

注: ** 表示极显著性差异, $P < 0.01$; * 表示显著性差异, $P < 0.05$ 。

Note: ** Very significant difference, $P < 0.01$; * Significant difference, $P < 0.05$.

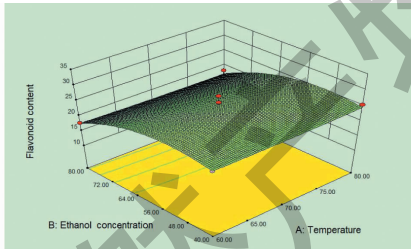


图 5 提取温度与乙醇浓度响应面图

Fig. 5 Response surface of extraction temperature and ethanol concentration

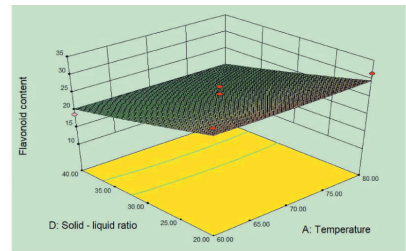


图 7 提取温度与料液比响应面图

Fig. 7 Response surface of extraction temperature and solid-liquid ratio

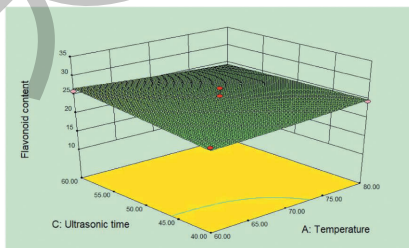


图 6 提取温度与超声时间响应面图

Fig. 6 Response surface of extraction temperature and ultrasonic time

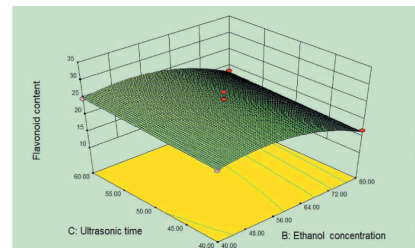


图 8 乙醇浓度与超声时间响应面图

Fig. 8 Response surface of ethanol concentration and ultrasonic time

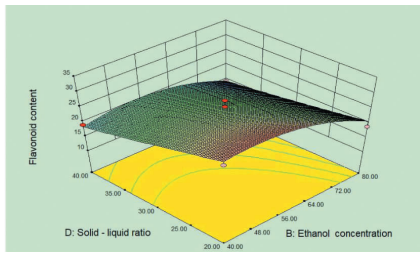


图9 乙醇浓度与料液比响应面图

Fig. 9 Response surface diagram of ethanol concentration and solid-liquid ratio

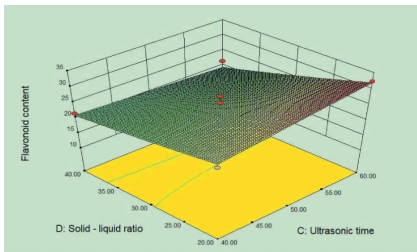


图10 超声时间与料液比响应面图

Fig. 10 Response surface diagram of ultrasonic time and solid-liquid ratio

2.3 柠条锦鸡儿花中总黄酮提取含量的测定

在最佳提取工艺条件下测得柠条锦鸡儿花中总黄酮的含量为:31.38 mg/g。

3 结论

本研究通过单因素试验和 Design-Expert 8.0.6.1 软件进行了 Box-Behnken 相应曲面设计,根据响应曲面模型得出最佳提取工艺条件:提取温度 80 ℃,乙醇浓度 50%,超声时间 60 min,料液比 1:20,在此条件下总黄酮平均提取含量为 31.38 mg/g,本试验建立的模型合理、可靠,为进一步利用柠条锦鸡儿花提供良好的理论参考。

参考文献

- 1 Song P, Chang F, Diao QX. Investigation and research on *Caragana* resources in Qinghai [J]. Yunnan Univ Tradit Chin Med (云南中医学院学报), 2008(5):42-46.
- 2 Niu XW. *Caragana* research (柠条研究) [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- 3 Health bureau of Inner Mongolia revolutionary committee. Inner Mongolia Chinese Herbal Medicine (内蒙古中草药) [M]. Huhehaote: Inner Mongolia People's Publishing House, 1972:301.
- 4 Niu XW. Collected papers on *Caragana* research (柠条研究论文集) [M]. Shanxi: Shanxi Science and Technology Press, 2003.
- 5 Zeng Z, Ji ZY, Hu N, Chen SS, et al. Synchronous determination with double-wavelength by RP-HPLC-UV and optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic acids from *Caragana* species using response surface methodology [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 140:182-189.
- 6 Luan GX, Tie FF, Yuan ZZ, et al. Hypaphorine, an indole alkaloid isolated from *Caragana korshinskii* Kom., inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation and improves insulin sensitivity *in vitro* [J]. Chem Biodivers, 2017, 14:e1700038.
- 7 Jin GL. Study on chemical composition and biological activity of *Caragana korshinskii* [D]. Shanghai: The Second Military Medical University (第二军医大学), 2011.
- 8 Cui YL, Mu Q, Hu CQ. Studies on the phenylpropanoids from *Caragana rosea* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2003, 15:277-283.
- 9 Sun ZH. Study on the separation and activity of sesquiterpenoids in *Caragana intermedia* [D]. Shanghai: Fudan University (复旦大学), 2004.