

星点设计-响应面法优选藤梨根中总黄酮的提取工艺研究

滕坤¹, 阮洪生^{2*}, 武子敬¹, 赵竹青² (1.通化师范学院制药与食品科学系, 吉林 通化 134000; 2.黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 目的 优化藤梨根中总黄酮的提取工艺。方法 以微波功率、乙醇浓度、料液比、提取时间为自变量, 总黄酮含量为因变量, 通过对自变量各水平的多元线性回归及二项式拟合, 用星点设计-响应面法选取最佳工艺, 并进行预测分析。结果 最佳工艺条件为微波功率 203.56 W, 乙醇浓度 80.34 %, 料液比 1 : 13.28, 提取时间 9.78 min, 在此最佳条件下, 藤梨根中总黄酮含量的最大估计值为 103.152 mg·g⁻¹。实验结果与模型预测值相符。结论 本方法简便合理、稳定、可预测性较优。

关键词: 藤梨根; 总黄酮; 星点设计; 响应面法

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0610-05

Optimal Extraction of Total Flavone from Tengligen by Central Composite Design and Response Surface Methodology

TENG Kun¹, RUAN Hongsheng^{2*}, WU Zijing¹, ZHAO Zhuqing² (1.Department of Pharmacy and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua 134000, China; 2.Life Science and Technology College, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the extraction technology of total flavone extraction from Tengligen. **METHODS** The independent variables were microwave power, ethanol concentration, sample/solvent ratio and extraction time, the dependent variable was extraction rate of total flavone which was used to estimate the relationship between independent and dependent variables. Central composite design and response surface methodology were used to optimize the process of extraction. The prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. **RESULTS** The optimum technological parameters were as follows: microwave power 203.56 W, ethanol concentration 80.34%, sample/solvent ratio of 1 : 13.28 and extraction time 9.78 min. The highest extraction rate of total flavone was 103.152 mg·g⁻¹ which was coincided with model predictions. **CONCLUSION** The extraction technology is simple, reliable and highly predictive.

KEY WORDS: Tengligen; total flavone; central composite design; response surface methodology

藤梨根为猕猴桃科软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb.et Zucc.) Planch 的根^[1], 曾收载于 1987 年版中国药典。软枣猕猴桃又称软枣、洋枣, 始载于《开宝本草》, 主要分布于我国东北、华北及日本和朝鲜等国家^[2]。现代药理研究表明藤梨根提取物具有增强免疫功能、抗氧化、降血脂、抗突变、抗畸变和抗肿瘤等多种药理作用^[3], 并广泛应用于消化系统癌症、黄疸、消化不良、呕吐、腹泻等症治疗^[4-5]。关于软枣猕猴桃提取物中黄酮类化合物含量测定和提取工艺的研究已有报道^[3,6-8], 其提

取工艺采用的优化方法是正交设计法, 但是这种方法存在一定的不足, 主要体现在实验精度不高, 正交设计出的优方案只能限定在已定的水平上, 而不是一定试验范围内的最优方案。星点设计-响应面法作为优选工艺的方法之一, 弥补了正交设计法的缺陷, 在国内广泛运用^[9-11]。

本实验以总黄酮的含量为指标, 采用超声-微波协同萃取法, 以 4 因素 5 水平的星点设计安排实验, 结合响应面法优选总黄酮的提取工艺, 为本课题的后期工作开展和提高藤梨根资源的应用

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31100254)

作者简介: 滕坤, 女, 硕士, 副教授 Tel: 13500951237 Email: tengkun1975999@163.com *通信作者: 阮洪生, 男, 博士生, 副教授, 硕士 Tel: 13936859781 Email: ruan_hongsheng@yahoo.com.cn

价值奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

CW-2000 型超声微波协同萃取仪(微波频率 2450 MHz, 超声波频率 40KHz, 功率 50W, 上海新拓微波溶样测试技术有限公司); TU-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试药

藤梨根药材购于吉林省通化市, 经黑龙江八一农垦大学孙跃春副教授鉴定为猕猴桃科软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb.et Zucc.) Planch 的干燥根; 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100080-200707, 供含量测定用); 95%乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等化学试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总黄酮测定方法^[12]

2.1.1 标准曲线绘制 精密称取无水芦丁对照品适量, 加 95%乙醇制成每毫升含 0.250 2 mg 的溶液, 精密吸取该溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 至于 25 mL 量瓶中, 加 5%亚硝酸钠溶液 1.0 mL, 摇匀放置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 放置 6 min 后, 加 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL, 加 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min 后, 以相应试剂为空白, 按紫外可见分光光度法(2010 版药典附录 VA), 在 500 nm 处测定吸光度。以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=0.015\ 2A-0.001\ 4$, $r=0.999\ 1$, 表明黄酮含量在 10~50 μg·mL⁻¹ 之间浓度与吸光度呈良好的线性关系。

2.1.2 样品溶液的制备 准确称量已通过 3 号筛的藤梨根粉末 10 g, 置于锥形瓶中, 按照星点试验设计的要求安排实验获得样品溶液。精确移取各样品溶液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 依次加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 摇匀, 静置 6 min, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min, 加 1.0 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL, 加 95%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 放置 15 min 后, 在 500 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算出样品中总黄酮含量(mg·g⁻¹)。

2.2 星点试验设计

根据预试验结果, 在超声波工作的状态下, 选择微波功率(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)和提取时

间(D)4 个因素为自变量, 每个因素确定 5 个水平, 共 29 个试验点(5 个中心点), 以总黄酮含量作为因变量考察指标, 采用星点设计提取工艺条件, 运用响应面分析法分析以寻求最优工艺参数, 因素水平编码见表 1, 试验安排和结果见表 2。

表 1 提取工艺因素水平编码

Tab 1 Factors and levels of response surface methodology test

编码水平	因 素			
	微波功率 (A)/W	乙醇浓度 (B)/%	料液比 (C)	提取时间 (D)/min
-1.682	150	50	1 : 8	4
-1	170.27	59.12	1 : 9.6	5.62
0	200	75	1 : 12	8
+1	229.7	81.88	1 : 14.4	10.38
+1.682	250	95	1 : 16	12

表 2 星点试验设计与结果(n=3)

Tab 2 Results of response surface methodology test(n=3)

试验号	编码水平				总黄酮含量/mg·g ⁻¹	
	A	B	C	D	试验值	理论值
1	-1	1	-1	-1	74.1	76.151
2	1	-1	1	-1	88.95	87.402
3	0	0	0	0	101.7	101.58
4	0	0	-1.68	0	81.37	81.616
5	-1	1	-1	1	88.35	86.416
6	1	1	1	1	102.7	99.811
7	1	1	-1	-1	88.2	83.999
8	0	0	0	-1.68	81.49	82.964
9	-1	-1	-1	-1	68.6	68.008
10	0	0	0	0	101.8	101.58
11	0	0	0	0	101.9	101.58
12	1	-1	-1	1	88.23	84.091
13	1.68	0	0	0	98.4	99.14
14	0	0	0	0	101.6	101.58
15	-1	-1	-1	1	73.5	74.218
16	0	0	0	1.68	95.7	94.469
17	1	-1	-1	-1	71.3	72.645
18	0	0	1.68	0	98.77	98.767
19	-1	1	1	-1	89.23	89.888
20	-1.68	0	0	0	89.5	89.003
21	-1	1	1	1	90.3	92.268
22	0	0	0	0	101.2	101.58
23	-1	-1	1	-1	91.2	88.305
24	1	1	1	-1	89.6	92.196
25	-1	-1	1	1	85.91	86.63
26	1	-1	1	1	89.7	90.962
27	0	1.68	0	0	99.4	96.642
28	1	1	-1	1	93.29	99.499
29	0	-1.68	0	0	79.5	82.501

2.3 数据分析

应用 Design-Expert7.0 软件对表 2 中的数据进行二次多元回归拟合, 得到为微波功率(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)及提取时间(D)与总黄酮含量之间的二次多项回归方程, 回归方程为:

$$Y=101.58+3.05A+4.25B+5.15C+3.46D+0.8AB-1.38AC+1.31AD-1.64BC+1.01BD-1.97CD-2.71A^2-4.33B^2-4.11C^2-4.64D^2$$

回归方程系数 $r=0.9745$ ，说明模型能解释 97.45% 响应值的变化，表明该回归模型的拟合情况良好，回归方程的代表性较好，能准确的预测实际情况。其校正决定系数($\text{adj-}R^2$)为 $r=0.9484$ ，表明此模型能解释 94.84% 效应值变化，因此该模型拟合程度良好。

对上述回归模型进行显著性检验，结果见表 3。表 3 回归方程显著性检验 $P<0.0001$ ，回归方差显著性检验表明，一次项乙醇浓度和料液比及二次项中乙醇浓度和提取时间对总黄酮含量的线性效应极显著($P<0.001$)；一次项微波功率和提取时间及二次项中微波功率和料液比对总黄酮含量的曲面效应高度显著($P<0.01$)；交互项中只有料液比和提取时间对总黄酮含量的线性效应显著($P<0.05$)，其他 5 个交互作用的 P 值均 >0.05 ，说明各因素间的交互作用不具有统计学意义。

表 3 回归模型方差分析($n=3$)

Tab 3 Variance analysis results of total flavone yield rate of tengligen($n=3$)

方差来源	平方和	F	均方和	F 值	P 值
A	199.74	1	199.74	20.31	0.000 5 ²⁾
B	388.69	1	388.69	39.52	0.000 1 ¹⁾
C	571.79	1	571.79	58.13	0.000 1 ¹⁾
D	257.33	1	257.33	26.16	0.000 2 ²⁾
AB	10.30	1	10.30	1.05	0.323 4
AC	30.69	1	30.69	3.12	0.099 1
AD	27.41	1	27.41	2.79	0.117 3 ³⁾
BC	43.03	1	43.03	4.38	0.055 2
BD	16.44	1	16.44	1.67	0.217
CD	62.17	1	62.17	6.32	0.024 8 ³⁾
A ²	112.77	1	112.77	11.46	0.004 4 ²⁾
B ²	288.43	1	288.43	29.32	0.000 1 ¹⁾
C ²	259.42	1	259.42	26.37	0.000 2 ²⁾
D ²	330.96	1	330.96	33.65	0.000 1 ¹⁾
模型	2 599.18	14	185.66	18.87	0.000 1 ¹⁾
残差	137.71	14	9.84		
失拟项	137.41	10	13.74	188.24	0.000 3 ²⁾
误差	0.29	4	0.073		
总离差	2 736.88	28			
R ²	0.949 7		Pred. R ²	0.680 8	
Adj-R ²	0.899 4		Adeq-P	14.884	

注：¹⁾表示差异极显著($P<0.001$)；²⁾表示差异高度显著($P<0.01$)；³⁾表示差异显著($P<0.05$)

Note: ¹⁾indicates extremely significant difference($P<0.001$)；²⁾indicates highly significant difference($P<0.001$)；³⁾indicates significant difference($P<0.05$)

2.4 响应面分析及最优提取条件的确定

依据回归方程，在保持 2 个因素编码值为 0 时，借助 Design-Expert7.0 软件绘制其它 2 个因素与响应值关系的三维响应面图，结果见图 1 至图 6。由图可以看出微波功率(A)、乙醇浓度(B)、料液比(C)及提取时间(D)4 个因素中任意两个因素之间对总黄酮含量的提取影响均较为显著，且响应曲面陡峭。

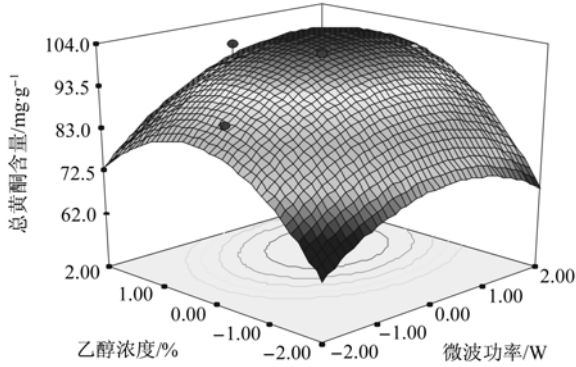


图 1 微波功率和乙醇浓度对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 1 Response surface plots for the effects of microwave power and ethanol concentration on the total flavone yield

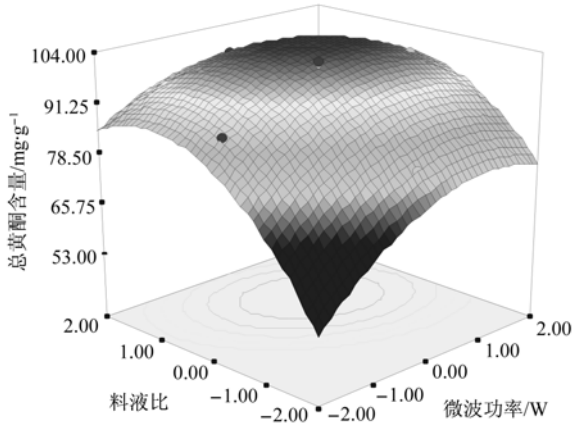


图 2 微波功率和料液比对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 2 Response surface plots for the effects of microwave power and sample/solvent ratio on the total flavone yield

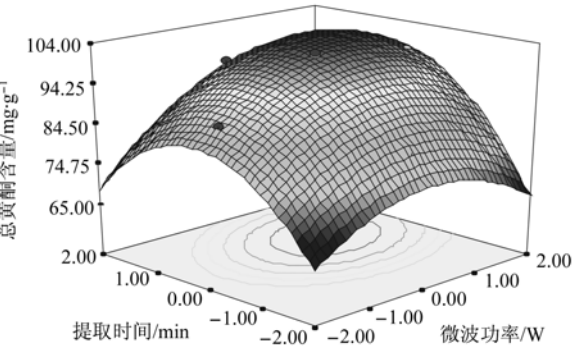


图 3 微波功率和提取时间对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 3 Response surface plots for the effects of microwave power and extraction time on the total flavone yield

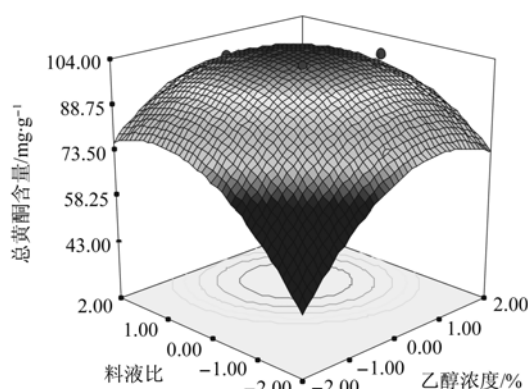


图4 乙醇浓度和料液比对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 4 Response surface plots for the effects of ethanol concentration and sample/solvent ratio on the total flavone yield

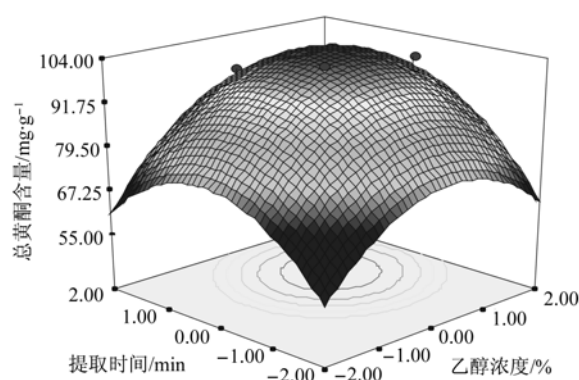


图5 乙醇浓度和提取时间对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 5 Response surface plots for the effects of ethanol concentration and extraction time on the total flavone yield

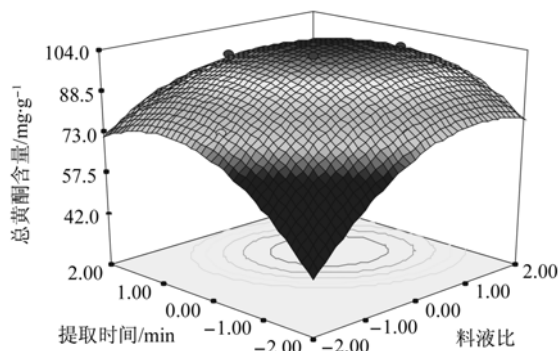


图6 料液比和提取时间对总黄酮含量影响的响应面图
Fig 6 Response surface plots for the effects of sample/solvent ratio and extraction time on the total flavone yield

为确定这 3 个影响因素的最佳取值, 通过 Design-Expert7.0 软件分析, 得出回归模型存在最大值点, 影响因素的代码值分别为 0.12, 0.87, 0.54, 0.75, 与之对应的实测值微波功率为 203.56 W, 乙醇浓度为 80.34 %, 料液比为 1 : 13.28, 提取时间为 9.78 min, 此时藤梨根中总黄酮含量的最大估计

值为 103.152 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.5 模型的验证

为了验证此提取模型方程的适用性, 在微波功率、乙醇浓度、料液比、提取时间最优的水平上, 重复试验 3 次, 提取物总含量为 102.254 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为 0.78%), 与预测值 103.152 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 吻合极好, 说明用此模型指导实践具有非常好的效果。

3 讨论

由于星点设计-响应面优化法采用非线性模型拟合, 在中心点进行重复性实验的次数越多, 可以提高实验的精确度, 预测值越更接近真实值, 所以本实验采用 5 次重复试验。实验方法简便合理、稳定, 可预测性较优。

本试验采用的超声-微波协同萃取方法, 既克服了普通溶剂法加热时间长、能耗较高、产率较低的缺点, 又弥补了超声波萃取和微波萃取方法之不足, 保留了超声波萃取或微波萃取方法的优点, 提取效率高, 极大地缩短了提取周期, 明显优于文献报道的方法, 为藤梨根总黄酮的提取方法及其工业化生产提供了新手段。

REFERENCES

- [1] Editorial Committee of Chinese Materia Medica in State Administration of TCM of the People's Republic of China. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999: 536-537.
- [2] Institute Traditional Chinese Medicine of Jilin Province. Medicinal Plants of Changbaishan [M]. Changchun: People's Publishing House of Jilin, 1986: 733-734.
- [3] BAI Y, CHEN J Q, SHEN Y, et al. Study on optimization of extraction technology of flavones in radix *Actinidia arguta* (Sieb.et Zucc.) Planch [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2009, 18(21): 2-3.
- [4] Compiling Group of Traditional Chinese Medicine in Nanjing College of Pharmacy. Traditional Chinese Medicine(中草药学) [M]. Nanjing: People's Publishing House of Jiangsu, 1976: 662-623.
- [5] CHEN G C. *Actinidia chinensis* Planch [J]. J Chin Med Materials Sci(中药材科技), 1981, 4(1): 30-31.
- [6] ZHANG L J, GU H, SUI X H. Determination of the total content of flavones in *Actinidia arguta* (Sieb.et Zucc.) Planch [J]. Chin Wild Plant Resources(中国野生植物资源), 2005, 24(4): 49-51.
- [7] Wang X P, BAI J Q, CHENG F Z. A study on content of total flavones from the roots of *Actinidia chinensis* in different areas [J]. J Shang Luo Univ(商洛学院学报), 2007, 21(2): 51-53.
- [8] WANG X P, BAI J Q. The extracting method and content assay of total flavones in Radix *Actinidine Argutae* [J]. J Shaanxi Coll Tradit Chin Med(陕西中医学院学报), 2008, 31(5): 65-66.
- [9] XU J L, ZHANG H M, XU X Q. Optimization of the extraction technology of total flavonoids from *Paeonia*

- suffruticosa* by response surface methodology [J]. J Chin Pharm(中国药房), 2011, 22(27): 2536-2538.
- [10] WU X T, LIU L, HUO L R, et al. Optimized preparation of butoconazole nitrate sustained-release cream by central composite design and response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(13): 1337-1340.
- [11] XU J L, ZHANG H M, XU X Q. Optimization of extracting total phenolic compounds from Cortex Moutan by response surface methodology [J]. J Anhui Agricultural Sci(安徽农业科学), 2010, 38 (34): 19295-19297.
- [12] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 30.

收稿日期: 2012-01-16