

# 响应面法优化丹参叶总酚酸超声波辅助提取工艺

薛治浦, 李欣, 朱文学

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 对丹参叶总酚酸的超声提取工艺优化进行研究。在单因素试验基础上, 选择提取溶剂乙醇体积分数、提取时间、温度和液料比为自变量, 以丹参叶总酚酸得率为响应值, 采用 Box-Behnken 试验设计方法, 研究各自变量及其交互作用对丹参叶总酚酸提取率的影响。利用 Design Expert 软件得到回归方程的预测模型并进行响应面分析, 确定超声波辅助提取丹参叶总酚酸的最佳条件为乙醇体积分数 63.00%、浸提时间 43.00min、温度 50.00℃、液料比 33:1(mL/g), 在此条件下, 总酚酸提取率达到 7.78%。验证实验表明, 所得模型方程能较好地预测实验结果。

**关键词:** 丹参叶; 总酚酸; 超声波; 响应面

## Optimization of Ultrasound-assisted Extraction of Total Phenolic Acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Leaves Using Response Surface Analysis

XUE Zhi-pu, LI Xin, ZHU Wen-xue

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** Response surface methodology was used to optimize the ultrasound-assisted extraction of total phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Leaves. The extraction efficiency of total phenolic acids was investigated with respect to four variables including ethanol concentration, time, temperature and liquid-to-solid ratio. On the basis of a series of one-factor-at-a-time experiments, a polynomial regression model equation was fitted by the combined use of Box-Behnken experimental design and regression analysis. By analyzing the regression model using response surface analysis, the optimum extraction conditions of total phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* bunge. Leaves. were identified as follows: 63% ethanol concentration, 43 min extraction time, 50.00 °C extraction temperature and 33:1 (mL/g) liquid-to-solid ratio, and the extration efficiency of total phenolic acids was up to 7.78% under the optimized conditions. Confirmatory experiments indicated the good prediction ability of the established model.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge. leaves; total phenolics; ultrasound; response surface analysis

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)12-0034-05

唇形科鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge.)是我国传统医药学中应用最早而且最广泛的药物之一,也是我国卫生部公布的可用于保健食品的一种植物资源,在食品和医药领域有着重要的开发和应用价值。但是对丹参的研究利用,目前大都围绕根的药用价值和活性成分的提取研究和利用。丹参地上部分占全草的三分之二强,却被废弃。已有研究表明,丹参叶含有和根部水溶性活性成分相似的酚酸类有效成分<sup>[1-2]</sup>,总酚酸含量丰富,具有较强的抗氧化活性,其抗氧化活性和其所含的酚酸类成分有关<sup>[3-4]</sup>。酚酸类化合物具有较强的抗氧化作用和清除自由基的能力,从而具有独特的生理功

能和药理活性,对预防疾病和促进人体健康具有非常积极的作用<sup>[5-8]</sup>。本实验室的前期工作中,以 VC 为对照,对丹参根、茎、叶的抗氧化性进行比较,发现丹参叶的抗氧化活性高于丹参根和 VC(1mg/mL),且与其总酚酸含量成显著的线性正相关,因此可作为天然抗氧化剂的来源。为了充分利用丹参叶的丰富资源,提取丹参叶总酚酸,开发总酚酸产品,用于保健品和生物医药方面,为丹参资源的综合利用和提高产品附加值提供了一条有效的途径。

由于超声波辅助提取法具有方便、快速、简单、安全、易于实现工业化等优点,本实验主要探讨超声波对丹参叶总酚酸得率的影响,应用响应面法(response

收稿日期: 2010-09-20

基金项目: 河南科技大学科研创新能力培育基金项目(2009CZ0015)

作者简介: 薛治浦(1979—),女,硕士研究生,研究方向为天然产物活性。E-mail: 35717699@qq.com

surface methodology, RSM)对超声波提取工艺进行优化,为进一步研究丹参叶总酚酸和丹参叶的深度开发和综合利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

丹参叶,2009年9月采自河南孟县药材基地,自然阴干,粉碎,过40目筛,制成粉末样品,真空包装,阴凉干燥处保存备用;没食子酸对照品 中国药品生物制品检定所;福林试剂 上海荔达生物科技有限公司;无水乙醇、甲醇、丙酮等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

722N型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;HH-S6数显恒温水浴锅 金坛市医疗仪器厂;KQ-500DE型数控超声清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 丹参叶总酚酸超声辅助提取工艺

准确称取1g丹参叶样品于三角瓶中,加一定量的提取溶剂,置于超声波清洗器中,使超声波清洗器中水面与试剂瓶中液面平齐,按设定条件进行超声波提取。提取液过滤,定容,取上清液测总酚酸含量,计算总酚酸得率。

#### 1.3.2 丹参叶总酚酸含量和得率测定

总酚酸含量的测定采用Folin-Ciocalteu法<sup>[9]</sup>,标准曲线为 $y=0.007x+0.027$ , $R^2=0.9982$ ,其中, $x$ 为总酚酸含量( $\mu\text{g/mL}$ ), $y$ 为吸光度。检测波长为765nm,以没食子酸来计算。

总酚酸得率( $Y$ )/%=(样品液中总酚酸的质量/初始丹参叶干粉质量) $\times 100$

#### 1.3.3 Box-Behnken 试验设计

考察乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间对丹参叶总酚酸提取效果的影响。在单因素试验的基础上进行响应面法中的Box-Behnken试验,对提取丹参叶总酚酸的影响因素进行更为深入的研究和条件优化,并做出响应面图,对响应受多个变量影响的问题建模及分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 乙醇体积分数对总酚酸得率的影响

固定超声温度40℃、超声波功率300W、料液比30:1(mL/g)、处理时间30min、提取次数2次,考察不同体积分数乙醇作为提取溶剂对总酚酸得率的影响,结果见图1。

由图1可以看出,随着乙醇体积分数的增加,总酚酸得率提高,但体积分数过高又会降低提取效率。在

60%乙醇溶液提取下获得最高总酚酸得率。因此选择乙醇体积分数为60%。

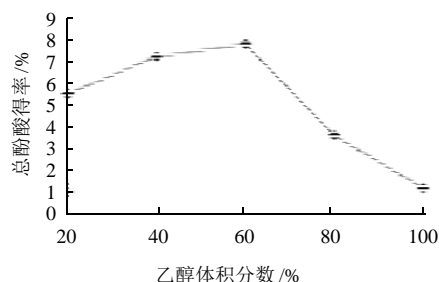


图1 不同乙醇体积分数对总酚得率的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on extraction efficiency of total phenolic acids from the leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

#### 2.1.2 超声时间对总酚酸得率的影响

以60%乙醇作为提取溶剂,固定超声温度40℃、超声波功率300W、料液比30:1(mL/g)、提取次数2次,考察不同超声时间对总酚酸得率的影响,结果见图2。

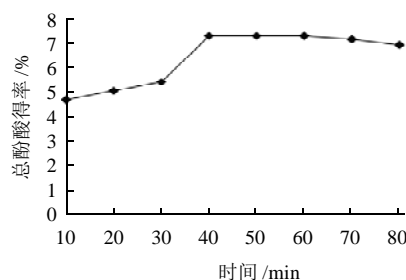


图2 不同提取时间对总酚酸得率的影响

Fig.2 Effects of ultrasound treatment time on extraction efficiency of total phenolic acids from the leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

由图2可看出,随着超声时间的延长,总酚酸得率先是快速上升,到了40min左右到达最高,之后反而有所下降。这可能是随着超声时间的延长,促进了某些反应,导致了多酚的氧化。因此超声时间以40min为宜。

#### 2.1.3 超声温度对总酚酸得率的影响

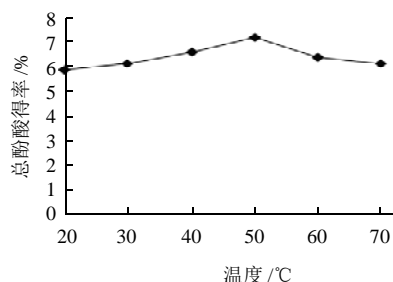


图3 超声温度对总酚酸得率的影响

Fig.3 Effect of temperature on extraction efficiency of total phenolic acids from the leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

以 60% 乙醇作为提取溶剂, 固定超声波功率 300W、液料比 30:1、提取次数 2 次, 超声时间 40min, 考察不同超声温度对总酚酸得率的影响, 结果见图 3。

由图 3 可知, 随着提取温度提高, 总酚酸得率逐渐增加, 50℃时得率最高, 之后随着温度的升高, 得率略有下降。一般来说, 提取温度的提高, 就会增加溶剂分子和溶质分子的运动, 促进扩散作用, 从而有利于提高提取率, 但温度过高会造成溶剂气化, 不利于溶剂与载体的充分接触, 还有可能破坏有效成分, 从而导致得率下降。所以总酚酸的最佳提取温度应控制在 50℃。

#### 2.1.4 液料比对总酚酸得率的影响

以 60% 乙醇作为提取溶剂, 固定超声波功率 300W、超声时间 40min、超声温度 50℃、提取次数 2 次, 考察不同液料比对总酚酸得率的影响, 结果见图 4。

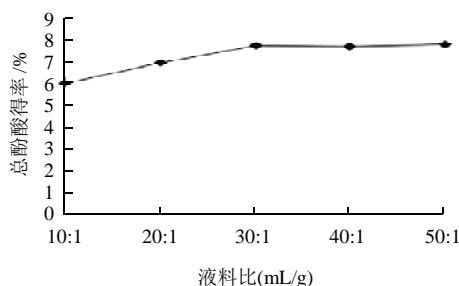


图 4 液料比对总酚酸得率的影响

Fig.4 Effect of liquid-to-solid ratio on extraction efficiency of total phenolic acids from the leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

由图 4 可见, 液料比对总酚酸得率有很大的影响, 随溶剂量增加总酚酸得率也增加, 当液料比达 30:1 (mL/g) 后几乎不再增加。基于经济方面的考虑液料比以 30:1 (mL/g) 为宜。

## 2.2 响应面法优化总酚酸提取工艺

### 2.2.1 响应面分析因素水平的选取

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理<sup>[10-11]</sup>, 结合单因素试验结果, 选取乙醇体积分数、提取时间、提取温度、液料比 4 个因素, 采用四因素三水平的响应面分析方法求取优化的工艺参数, 零点试验重复 3 次, 用来估计试验误差, 试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels in the Box-Behnken experimental design

因素	代码		编码值与真实值 换算公式	水平		
	编码值	真实值		-1	0	1
溶剂体积分数/%	A	a	$A=(a-60)/20$	40	60	80
时间/min	B	b	$B=(b-40)/10$	30	40	50
温度/℃	C	c	$C=(c-50)/10$	40	50	60
液料比(mL/g)	D	d	$D=(d-30)/10$	20	30	40

### 2.2.2 响应面分析方案及试验结果

表 2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	-1	0	0	6.16
2	-1	1	0	0	6.93
3	1	-1	0	0	6.63
4	1	1	0	0	6.96
5	0	0	-1	-1	7.06
6	0	0	-1	1	7.31
7	0	0	1	-1	7.18
8	0	0	1	1	7.13
9	-1	0	0	-1	6.79
10	-1	0	0	1	6.84
11	1	0	0	-1	6.73
12	1	0	0	1	7.26
13	0	-1	-1	0	6.29
14	0	-1	1	0	7.07
15	0	1	-1	0	7.41
16	0	1	1	0	6.98
17	-1	0	-1	0	6.24
18	-1	0	1	0	6.68
19	1	0	-1	0	6.69
20	1	0	1	0	7.26
21	0	-1	0	-1	6.55
22	0	-1	0	1	6.92
23	0	1	0	-1	7.21
24	0	1	0	1	7.56
25	0	0	0	0	7.81
26	0	0	0	0	7.75
27	0	0	0	0	7.70

表 2 为响应面分析方案及试验结果, 采用 Design Expert 7.0 软件对所得数据进行回归分析, 回归分析结果见表 3。对响应值与各因素进行回归拟合后, 模型表达式如式(1)所示。

表 3 响应曲面结果的方差分析

Table 3 Analysis of variance of the fitted regression model

来源	自由度	均方	F 值	P 值
模型	14	0.34	15.29	< 0.0001**
A	1	0.30	13.45	0.0032**
B	1	0.98	44.28	< 0.0001**
C	1	0.14	6.36	0.0268*
D	1	0.19	8.47	0.0131*
AB	1	0.048	2.19	0.1650
AC	1	$4.225 \times 10^{-3}$	0.19	0.6700
AD	1	0.058	2.60	0.1327
BC	1	0.37	16.53	0.0016**
BD	1	$1.000 \times 10^{-4}$	$1.517 \times 10^{-3}$	0.9475
CD	1	0.022	1.02	0.3333
A <sup>2</sup>	1	2.19	98.80	< 0.0001**
B <sup>2</sup>	1	1.09	49.42	< 0.0001**
C <sup>2</sup>	1	0.75	33.73	< 0.0001**
D <sup>2</sup>	1	0.26	11.57	0.0053**
失拟检验	10	0.026	8.56	0.1091

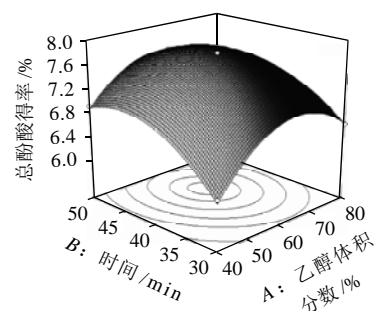
注: \*\*.P < 0.01, 差异极显著; \*.P < 0.05, 差异显著。

$$Y(\text{总酚酸得率}) = 7.75 + 0.16A + 0.29B - 0.11C + 0.12D - 0.11AB + 0.032AC + 0.12AD - 0.30BC - 0.005BD - 0.075CD - 0.64A^2 - 0.45B^2 - 0.37C^2 - 0.22D^2 \quad (1)$$

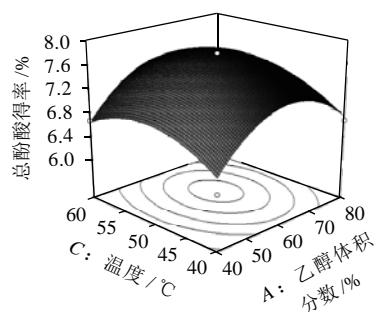
对该模型采用二次型进行变异分析(analysis of variance, ANOVA), 该方程的相关系数  $R^2 = 0.9469$ 。从表3可以看出, 整体模型达极显著水平( $P < 0.0001$ ), 表明该二次方程模型高度显著, 模型的失拟项( $P = 0.1091 > 0.1000$ )不显著, 说明该方程对试验拟合较好, 模型建立的回归方程能代替试验真实点解释响应结果。另外, 该模型的变异系数(CV)为2.12%, 在可接受范围内。变异系数是衡量每个平均值偏离情况的参数, 其值越小, 重复性越好。

各项系数的  $P$  值小于0.05时, 它所对应的条件对响应值的作用是显著的, 由表3可知,  $A$ 、 $B$ 、 $BC$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $D^2$  影响极显著,  $C$ 、 $D$  影响显著。各因素对总酚酸得率影响大小为超声时间、提取溶剂体积分数、液料比和提取温度。交互项  $BC$  极显著( $P < 0.01$ ), 表明超声时间和温度之间存在极显著交互作用, 各影响因素对于总酚酸得率的作用不是简单的线性关系。

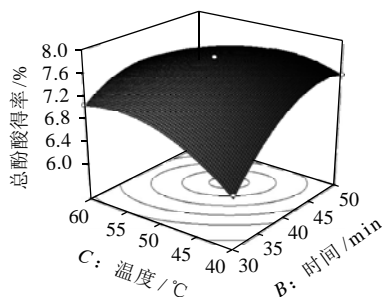
### 2.2.3 响应面分析



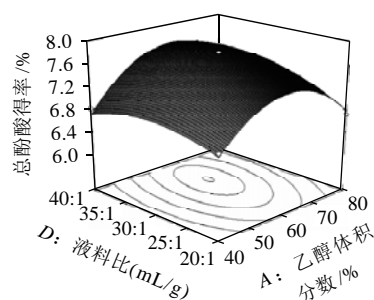
a. 乙醇体积分数和提取时间



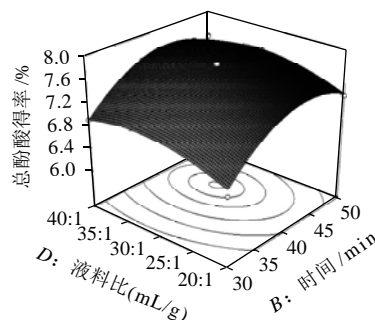
b. 提取温度和乙醇体积分数



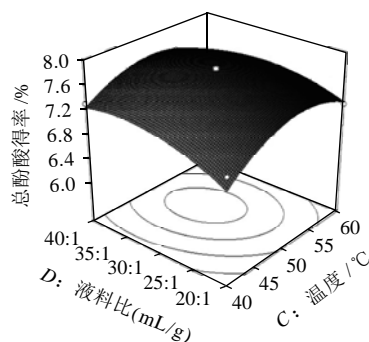
c. 提取温度和提取时间



d. 液料比和乙醇体积分数



e. 液料比和提取时间



f. 液料比和提取温度

图5 各因素交互作用对总酚酸得率的影响

Fig.5 Response surface plots showing the pairwise interaction effects of each of ethanol concentration, liquid-to-solid ratio, extraction temperature and extraction time on extraction efficiency of total phenolic acids from the leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

根据回归方程, 作出响应面和等高线图<sup>[12-14]</sup>, 考察拟合响应曲面的形状, 分析各因素对响应值的影响及其之间的相互作用, 并从中确定最佳因素水平范围。如图5所示。研究表明, 等高线的形状反映出交互效应的强弱, 越趋向椭圆表明交互作用越强, 越趋向圆形则相反, 表明交互作用越弱<sup>[15]</sup>。采用超声波辅助提取的应用是基于超声波可加速介质质点运动、超声波的空化作用和振动匀化作用的原理, 以加速有效成分的浸出提取, 而提高温度也可以加速介质质点的运动速度, 因此, 超声提取时间与提取温度对总酚酸得率存在着较强的交互作用可能与此有关。

图5直观地反映了各因素对响应值的影响, 由等高

线图可以看出存在极值的条件应该在圆心处。比较6组图可知:提取时间(B)和提取溶剂体积分数(A)对超声波辅助提取丹参叶总酚酸的影响最为显著,表现为曲面较陡。由于超声波可加速介质质点运动,具有空化作用和振动匀化作用,可加速提取,因此超声提取时间对总酚酸得率的影响显著。提取溶剂体积分数对总酚酸得率的影响可能与不同溶剂体积分数的极性不同有关,当提取溶剂的极性合适时,更有利于酚酸类物质进入提取溶剂。

#### 2.2.4 回归模型的验证实验

根据所建立的数学模型进行参数最优化分析,最优工艺条件为乙醇体积分数62.80%、浸提时间42.17min、温度50.74℃、液料比33.21mL/g,在此工艺下丹参叶总酚酸得率预测值7.82%。

为了检测试验结果是否与真实情况相一致,根据以上试验结果进行近似验证实验,考虑到实际操作的便利,将最佳工艺条件修正为乙醇体积分数63.00%、浸提时间43.00min、温度50.00℃和液料比33:1(mL/g),在此条件下进行3次平行试验,实际测得的平均得率为7.78%,与理论预测值相比,其相对误差约为0.53%,因此,采用响应面法优化得到的提取条件准确可靠,具有使用价值。

### 3 结 论

采用超声波辅助提取技术提取丹参叶总酚酸,通过单因素试验和Box-Behnken试验设计以及响应面分析对提取工艺进行优化,得出较优工艺条件为乙醇体积分数63.00%、浸提时间43.00min、温度50.00℃和液料比33:1(mL/g),在较优的提取条件下,丹参叶总酚酸得率可达到7.78%。并得到丹参叶总酚酸得率与超声波处理各因素变量的二次方程模型,该模型回归极显著,对试验

拟合较好,有一定应用价值。

#### 参考文献:

- [1] 王新胜, 吴艳芳, 赵瑞娜. 丹参地上部分活性成分 TLC 分析[J]. 海峡药学, 2007, 19(12): 46-47.
- [2] 倪学斌, 苏静. 丹参地上部分有效成分的初步分析[J]. 中国药学杂志, 1995, 30(6): 336-338.
- [3] 杭亮, 王俊儒, 杨东风, 等. 紫花丹参和白花丹参不同部位有效成分的分布特征[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(12): 218-221.
- [4] ZHANG Yuan, LI Xing, WANG Zhezhi. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(10): 2656-2662.
- [5] LU Y, YEAP FOO L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia o. cinalis*) [J]. Food Chemistry, 2001, 75(2): 197-202.
- [6] IVANOVA D, GEROVA D, CHERVERKOV T, et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96(1): 145-150.
- [7] SKERGET M, KOTNIK P, HADOLIN M, et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2005, 89(2): 191-198.
- [8] SOONG Y Y, PHILIP J B. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds [J]. Food Chemistry, 2004, 88(3): 411-417.
- [9] SINGLETON V L, ROSSI J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1965(16): 144-158.
- [10] BOXG E P, HUNTER W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building [M]. New York: John Wiley and Sons Inc., 1978.
- [11] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
- [12] 易军鹏, 朱文学, 马海乐. 牡丹籽油超声波辅助提取工艺的响应面法优化 [J]. 农业机械学报, 2007, 40(6): 103-108.
- [13] 王军, 王敏, 于智峰, 等. 基于响应曲面法的苦荞鼓皮总黄酮提取工艺优化 [J]. 农业机械学报, 2007, 38(7): 205-208.
- [14] 李亚娜, 林永成, 余志刚. 响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 28-32.
- [15] 国蓉, 李剑君, 国亮, 等. 采用响应曲面法优化甘草饮片中甘草酸的超声提取工艺 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(9): 187-192.