

# 响应面法优化密蒙花总黄酮的超声提取工艺

郭 雷<sup>1</sup>, 王淑军<sup>1</sup>, 刘玮炜<sup>2</sup>

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

**摘 要:** 优化超声提取密蒙花总黄酮的工艺条件, 在单因素试验基础上, 考察乙醇体积分数、超声功率和提取温度 3 个因素对密蒙花总黄酮提取率的影响, 并通过 Box-Behnken 试验设计和响应面分析法确定超声提取密蒙花总黄酮的最佳工艺条件。结果表明: 最佳工艺条件为乙醇体积分数 62%、超声功率 410W、提取温度 77℃、液料比 50:1(mL/g)、提取时间 35min, 在此最佳提取条件下, 总黄酮提取率为 20.38%。

**关键词:** 密蒙花; 总黄酮; 超声提取; 响应面分析法

Response Surface Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Flavonoids from *Flos Buddlejae*

GUO Lei<sup>1</sup>, WANG Shu-jun<sup>1</sup>, LIU Wei-wei<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** This paper reports the optimization of conditions for the ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from *Flos Buddlejae*. One-factors-at-a-time experiments were carried out to investigate the effects of ethanol concentration, ultrasonic power and extraction temperature on extraction yield of total flavonoids. Further, the process parameters were optimized using a Box-Behnken experimental design coupled with response surface methodology. The optimal extraction conditions were determined as follows: ethanol concentration 62%, ultrasonic power 410 W, extraction temperature 77 °C, liquid/material ratio (mL/g) 50:1, and extraction time 35 min. Under the optimal conditions, the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae* was 20.38%.

**Key words:** *Flos Buddlejae*; total flavanoids; ultrasonic-assisted extraction; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0013-05

密蒙花(*Buddleja officinalis*)为马钱科(Loganiaceae)醉鱼草属(*Buddleja*)植物密蒙花的干燥花蕾及花序, 别名蒙花、黄饭花、小锦花、羊耳朵等<sup>[1]</sup>。密蒙花广泛分布于陕西、甘肃、西南、中南等地。密蒙花为药食同源植物, 其传统功效为清热养肝、明目退翳, 治疗目赤翳障等疾病<sup>[2]</sup>。现代药理作用表明其具有多种药理活性, 主要表现在治疗干眼症等眼部疾病、抗炎、降血糖、免疫调节、抗菌、抗氧化和抗肿瘤等作用<sup>[3-7]</sup>。对其化学成分的研究表明, 其主要活性成分为黄酮类化合物<sup>[8]</sup>。

超声提取技术为一种较新型的提取方法, 与传统的溶剂浸提方法相比, 其具有缩短提取时间、提高提取效率等优点, 已广泛应用于植物有效成分的提取中<sup>[9-10]</sup>。本实验应用响应面法对密蒙花总黄酮的超声提取工艺进行

优化, 以期获得较高的提取率, 为密蒙花在药品和食品领域的应用研究提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

密蒙花 安徽亳州中药饮片厂; 乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠均为分析纯; 芦丁对照品 上海生物工程有限公司。

Synergy HT 多功能酶标仪 美国 BioTek 公司; SK8210LHC 超声清洗仪 上海科导超声仪器厂; BS124S 电子分析天平 北京赛多利斯科学仪器有限公司; CR22G 型高速冷冻离心机 日本日立公司; QJ32W1000A 型高速万能粉碎机 天津泰斯特仪器有限公司。

收稿日期: 2011-02-27

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(10KJB350001); 江苏省海洋生物技术重点实验室基金项目(2010HS06)

作者简介: 郭雷(1977—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为生物资源开发与利用。E-mail: leiguoo@sina.com

## 1.2 方法

### 1.2.1 总黄酮含量测定

精密称取 105℃ 干燥至质量恒定的芦丁 10mg 置于 50mL 容量瓶中, 加 60% 乙醇溶液溶解并稀释至刻度摇匀, 得 0.2mg/mL 标准溶液。准确吸取芦丁标准溶液 0、0.5、1.0、1.25、1.5、2.0mL, 并用 60% 乙醇溶液相应补足 2.0mL, 移入 10mL 刻度比色管中, 加 5g/100mL 亚硝酸钠溶液 0.2mL, 振摇后放置 6min; 加入 10g/100mL 硝酸铝溶液 0.2mL 摇匀后放置 6min; 加 1.0mol/L 氢氧化钠溶液 2mL, 摇匀, 放置 15min。于 510nm 波长处测定吸光度, 以芦丁含量(mg)为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 得到标准曲线回归方程为  $y = 1.4526x + 0.0427$ , 相关系数  $R^2 = 0.9993^{[1]}$ 。

### 1.2.2 单因素试验

准确称取密蒙花粉末 0.5g 若干份, 以一定体积分数的乙醇溶液为提取溶剂, 分别在不同的超声功率、提取温度、提取时间和液料比下于超声清洗仪(40kHz)中进行超声辅助提取。提取液于 5000r/min 离心 10min, 取 0.5mL 上清液稀释至 10mL, 取稀释液 2mL 测定黄酮含量。考察乙醇体积分数、超声功率、提取温度、提取时间、液料比对提取结果的影响, 单因素试验因素及水平见表 1。

表 1 单因素试验因素与水平

Table 1 One-factors-at-a-time experiment protocols

水平	乙醇体积分数/%	超声功率/W	液料比(mL/g)	提取温度/℃	提取时间/min
1	40	200	30	40	10
2	50	300	40	50	20
3	60	400	50	60	30
4	70	500	60	70	35
5	80		70	80	40

### 1.2.3 黄酮提取率的计算

根据标准工作曲线, 求出相当于样品吸光度的芦丁含量, 按下式求出总黄酮含量:

$$Y/\% = \frac{m_1 \times V_2}{m \times V_1 \times 10^3} \times 100$$

式中:  $Y$  为样品中总黄酮提取率/%;  $m_1$  为根据标准曲线计算出待测液中黄酮的量/mg;  $m$  为样品质量/g;  $V_1$  为样品提取液测定用体积/mL;  $V_2$  为样品提取液总体积/mL。

### 1.2.4 Box-Behnken 试验设计

根据单因素试验结果, 固定液料比 50:1(mL/g)、提取时间 35min, 采用 Box-Behnken 设计方法<sup>[12]</sup>, 以乙醇体积分数、超声功率和提取温度作为响应变量, 分别以  $A$ 、 $B$  和  $C$  表示, 并以 -1、0、1 分别代表变量的

水平, 以密蒙花总黄酮提取率( $Y$ )为响应值, 通过响应曲面分析进行制备条件的优化, 从而得到最优制备条件。Box-Behnken 设计试验因素和水平见表 2, 采用 Design Expert 软件对试验数据进行回归分析。

表 2 Box-Behnken 设计试验因素与水平  
Table 2 Factors and levels in Box-Behnken design

编码水平	因素		
	A 乙醇体积分数/%	B 超声功率/W	C 提取温度/℃
-1	50	300	60
0	60	400	70
1	70	500	80

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 乙醇体积分数对密蒙花总黄酮提取率的影响

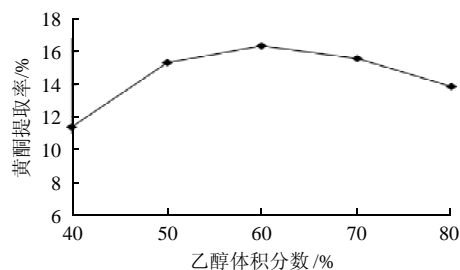


图 1 乙醇体积分数对密蒙花总黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae*

在固定超声功率 400W、液料比 30:1、提取温度 40℃、提取时间 10min 条件下, 不同乙醇体积分数对密蒙花总黄酮提取率的影响如图 1 所示。通过试验可发现, 黄酮提取率随乙醇体积分数的增大而增加, 当乙醇体积分数达到 60% 时, 黄酮提取率最高, 当乙醇体积分数再增加时, 提取率开始下降。因此选择 50%、60%、70% 为优化时乙醇体积分数的 3 个水平。

#### 2.1.2 超声功率对密蒙花总黄酮提取率的影响

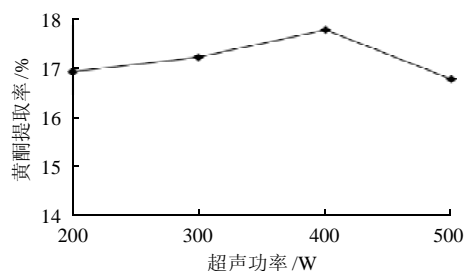


图 2 超声功率对密蒙花总黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic power on the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae*

在固定乙醇体积分数 60%、液料比 30:1、提取温度 40℃、提取时间 10min 条件下,不同超声功率对密蒙花总黄酮提取率的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,黄酮提取率随超声功率的增大而增加,当超声功率大于 400 W 后,黄酮提取率有所降低,因此选择 300、400、500 W 为优化时超声功率的 3 个水平。

### 2.1.3 液料比对密蒙花总黄酮提取率的影响

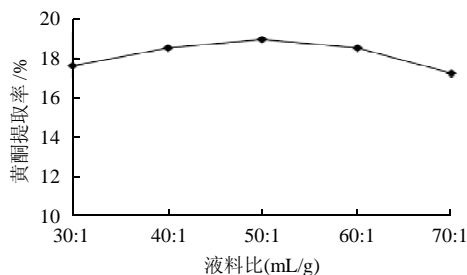


图 3 液料比对密蒙花总黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid/material ratio on the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae*

在固定乙醇体积分数 60%、超声功率 400W、提取温度 40℃、提取时间 10min 条件下,不同液料比对密蒙花总黄酮提取率的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,在液料比 50:1 时,总黄酮提取率最高,当液料比大于 50:1 后,总黄酮提取率开始下降。从减少溶剂用量和提取效果等方面综合考虑,用量不宜过大,因此本试验中将液料比确定在 50:1(mL/g)。

### 2.1.4 提取温度对密蒙花总黄酮提取率的影响

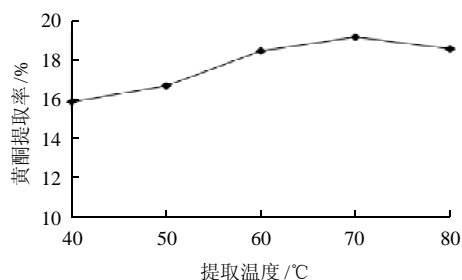


图 4 提取温度对密蒙花总黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae*

在固定乙醇体积分数 60%、超声功率 400W、液料比 50:1(mL/g)、提取时间 10min 条件下,不同超声提取温度对密蒙花总黄酮提取率的影响如图 4 所示。可以看出,随着超声提取温度的升高,密蒙花总黄酮提取率相应增大,70℃时黄酮提取率最大,80℃时黄酮提取率与 70℃时差别不大。温度增加能够降低提取溶剂的黏度,从而促进介质传递。但温度过高,一方面可能破

坏其中的活性成分,另一方面也会造成溶剂的损失。因此选择 60、70、80℃为优化时提取温度的 3 个水平。

### 2.1.5 提取时间对密蒙花总黄酮提取率的影响

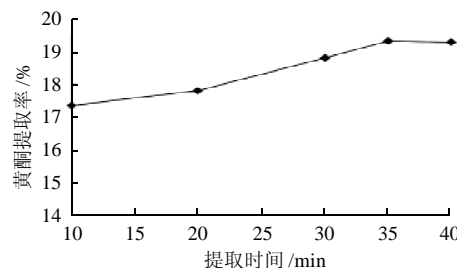


图 5 提取时间对密蒙花总黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction yield of total flavonoids from *Flos Buddlejae*

在固定乙醇体积分数 60%、超声功率 400W、液料比 50:1(mL/g)、提取温度 70℃条件下,不同超声提取时间对密蒙花总黄酮提取率的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出,随着提取时间的延长,总黄酮提取率显著提高,但提取时间超过 30min 后,总黄酮提取率增长缓慢,到 35min 时达到最大值。因此本试验中将提取时间确定为 35min。

## 2.2 Box-Behnken 试验设计

### 2.2.1 模型的建立与显著性检验

表 3 响应面分析试验方案与结果

Table 3 Box-Behnken experimental design and experimental results for response surface analysis

试验号	A	B	C	Y 总黄酮提取率/%
1	-1	-1	0	16.54
2	1	-1	0	17.43
3	-1	1	0	17.90
4	1	1	0	17.94
5	-1	0	-1	18.64
6	1	0	-1	18.80
7	-1	0	1	19.71
8	1	0	1	20.35
9	0	-1	-1	17.20
10	0	1	-1	18.05
11	0	-1	1	18.75
12	0	1	1	18.88
13	0	0	0	19.79
14	0	0	0	20.02
15	0	0	0	19.58
16	0	0	0	20.15
17	0	0	0	19.69

综合单因素试验,选择对总黄酮提取率影响显著的乙醇体积分数、超声功率、提取温度 3 个因素,通过三因素三水平的 Box-Behnken 试验设计和响应面分析方

法, 确定密蒙花总黄酮超声提取的最佳工艺条件, 结果见表3。以密蒙花总黄酮提取率( $Y$ )为响应值, 应用 Design Expert 软件进行多元回归拟合分析, 各试验因素对响应值的影响可用如下多元二次回归方程表示:

$$Y = 19.85 + 0.22A + 0.36B + 0.63C - 0.21AB + 0.12AC - 0.18BC - 0.62A^2 - 1.77B^2 + 0.15C^2$$

对表3中试验结果进行统计分析, 得到的方差分析结果如表4所示。由表4可知, 乙醇体积分数、超声功率和提取温度3个因素在试验过程中均起主要作用, 对黄酮提取率的影响顺序为: 提取温度>超声功率>乙醇体积分数。经方差分析得到:  $B$ 、 $C$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 项极显著,  $A$ 项显著。因此各种因素和提取率的关系为二次曲线关系, 但各种因素的交互作用的影响均不显著, 说明各因素之间的交互作用很小。

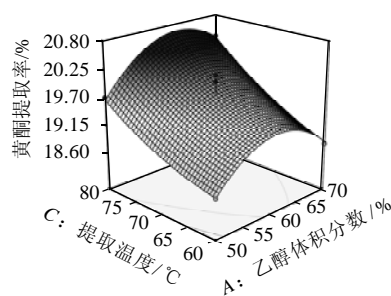
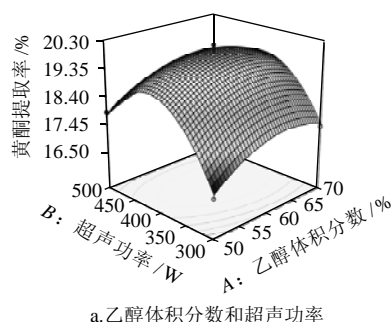
表4 响应面分析试验方差分析结果

Table 4 Analysis of variance for the developed regression model

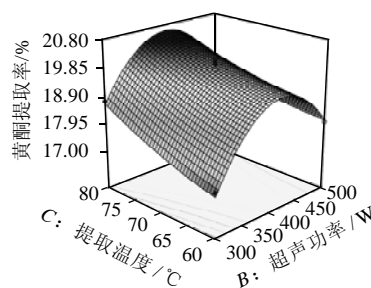
来源	平方和	自由度	均方	$F$ 值	$P$ 值	显著性
模型	20.28	9	2.25	47.91	< 0.0001	**
$A$	0.37	1	0.37	7.95	0.0258	*
$B$	1.02	1	1.02	21.59	0.0024	**
$C$	3.13	1	3.13	66.44	< 0.0001	**
$AB$	0.18	1	0.18	3.84	0.0909	
$AC$	0.06	1	0.058	1.22	0.3050	
$BC$	0.13	1	0.13	2.76	0.1409	
$A^2$	1.61	1	1.61	34.33	0.0006	**
$B^2$	13.25	1	13.25	281.80	< 0.0001	**
$C^2$	0.09	1	0.093	1.97	0.2035	
残差	0.33	7	0.047			
失拟项	0.11	3	0.036	0.65	0.6213	
纯误差	0.22	4	0.055			
总差	20.61	16				

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

整体模型的  $P < 0.0001$ , 表明该二次方程模型达到极显著水平, 并且失拟项不显著, 说明该方程对试验拟合较好。相关系数  $R^2 = 0.9840$ , 表明 98.40% 的数据可以用此方程来解释。



b. 乙醇体积分数和提取温度



c. 超声功率和提取温度

图6 各两因素交互作用对密蒙花总黄酮提取率影响的响应面图  
Fig.6 Response surface plots showing the interactive effects of various extraction conditions on the extraction yield of total flavonoids

根据回归方程, 做出响应曲面, 考察拟合响应曲面的形状, 分析乙醇体积分数、超声功率和提取温度对密蒙花总黄酮提取率的影响, 见图6。在考察的变量水平范围内, 随着提取温度的升高, 密蒙花总黄酮提取率逐渐增大; 同样, 密蒙花总黄酮提取率在一定范围内随乙醇体积分数和超声功率的增大而增大, 当其水平越过一定值后, 黄酮提取率随之降低。

## 2.2.2 最佳工艺条件的预测与检验

通过回归模型的预测, 得到超声提取密蒙花总黄酮的最佳工艺条件为乙醇体积分数 62%、超声功率 408W、提取温度 77℃、液料比 50:1(mL/g)、提取时间 35min, 预测响应值为 20.43%。为检验 RSM 的可靠性, 将超声功率调整为 410W, 其他条件同上, 进行验证实验, 得实际值为 20.38%, 验证值与理论值间的相对误差为 0.24%, 说明得到的二次回归方程与实践情况拟合较好。

## 3 结论

通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计以及响应面分析法, 对超声提取密蒙花总黄酮的工艺进行优化, 得出的最佳工艺条件为乙醇体积分数 62%、超声功率 410W、提取温度 77℃、液料比 50:1(mL/g)、提取时间 35min, 测得的实际提取率为 20.38%。并得到密蒙花总

黄酮提取率与超声处理各因素变量的二次回归方程模型, 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] 许龙, 姚小磊, 贺晓华, 等. HPLC 法测定密蒙花中 3 种黄酮类成分的含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(5): 21-23.
- [2] 张小曼, 彭永芳, 马银海. 正交法微波辐射提取密蒙花黄色素[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 91-93.
- [3] 王方, 彭清华, 姚小磊, 等. 密蒙花总黄酮对去势导致干眼症雄鼠泪腺 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达的影响[J]. 眼科新进展, 2010, 30(3): 201-206.
- [4] LEE Y J, MOON M K, HWANG S M, et al. Anti-Inflammatory effect of *Buddleja officinalis* on vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells[J]. Am J Chin Med, 2010, 38(3): 585-598.
- [5] LEE Y J, KIM J S, KANG D G, et al. *Buddleja officinalis* suppresses high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation: role of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and matrix metalloproteinases[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010, 235(2): 247-255.
- [6] 王方, 彭清华, 姚小磊, 等. 密蒙花总黄酮含药血浆干预干眼症细胞凋亡模型 STAT1 磷酸化蛋白表达[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(1): 5-8.
- [7] 陈佳文, 彭清华, 姚小磊, 等. 密蒙花总黄酮对去势雄鼠干眼症泪腺 TGF- $\beta_1$  及其基因表达的影响[J]. 眼科研究, 2010, 28(4): 311-314.
- [8] 李教社, 赵玉英, 王邠, 等. 密蒙花黄酮类化合物的分离与鉴定[J]. 药学报, 1996, 31(11): 849-854.
- [9] HEMWIMOL S, PAVASANT P, SHOTIPRUK A. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(6): 543-548.
- [10] ZHANG Qing'an, ZHANG Zhiqi, YUE Xuanfeng, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder[J]. Food Chemistry, 2009, 116(2): 513-518.
- [11] 张玉香, 屈慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 33-37.
- [12] BA D, BOYACI H. Modeling and optimization. I Usability of response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 836-845.