

# 响应曲面法优化野生马兰头总黄酮的提取工艺

夏海涛, 刘玉芬, 董超男, 陈龙龙  
(淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

**摘要:**以连云港花果山野生马兰头地上部分为原料,研究马兰头黄酮的提取工艺。在单因素试验基础上,根据Box-Behnken试验设计原理,选取提取温度、提取时间、液料比和乙醇体积分数四因素三水平进行中心组合试验,建立黄酮提取率的二次回归方程,确定提取工艺的优化组合条件。结果表明:提取工艺条件为提取温度71℃、提取时间105min、液料比26.5:1(mL/g)、乙醇体积分数63%,黄酮提取率达到最大值。该条件下黄酮提取率预测值为1.65%,验证值为1.62%。

**关键词:**马兰头;总黄酮;提取;响应曲面法

## Optimization of Extraction Process for Total Flavonoids from Wild *Kalimeris indica* L. by Response Surface Methodology

XIA Hai-tao, LIU Yu-fen, DONG Chao-nan, CHEN Long-long  
(College of Chemical Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

**Abstract:** The extraction of total flavonoids from the aboveground parts of *Kalimeris indica* L. wildly grown in Huaguoshan Mountain, Lianyungang was optimized. Based on one-factor-at-a-time experiments, a 4-variable, 3-level central composite design was carried out to establish a quadratic regression model for the extraction efficiency of total flavonoids as a function of temperature, time, liquid-to-solid ratio and ethanol concentration. The model was analyzed by response surface methodology to find optimal conditions for the extraction of total flavonoids. The highest extraction efficiency of total flavonoids, of which the predicted and experimental values were 1.65% and 1.62%, respectively, was achieved after 105 min of extraction at 71 °C using 63% aqueous ethanol as the extraction solvent at a liquid-to-solid ratio of 26.5:1 (mL/g).

**Key words:** *Kalimeris indica* L.; total flavonoids; extraction; response surface methodology (RSM)

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0191-05

马兰头(*Kalimeris indica* L.)又名马兰、鸡儿肠、路边菊等,属菊科,大多生长在山坡荒野上。近年来,利用人工栽培使马兰头四季皆有<sup>[1-3]</sup>。马兰头清香可口,是人们喜爱的一种野菜。其嫩茎、叶中营养丰富,含有氨基酸、黄酮、多糖、脂肪、碳水化合物、维生素、矿物质等多种营养成分<sup>[4-9]</sup>,是一种优质的天然绿色食品。马兰头全草可入药,具有清热解毒、凉血止血、利尿消肿、抗菌等作用<sup>[10-14]</sup>。天然黄酮是一种生物活性物质,具有预防和治疗高血压及动脉硬化、抗菌、抗炎、抗氧化及抗病毒等作用<sup>[15-21]</sup>,也可作为食品添加剂在食品工业中广泛应用<sup>[22]</sup>。响应曲面法是一种采用更为合理的试验设计,以最经济方式寻求最优工艺

的有效方法。它与正交试验设计法不同,具有试验周期短,求得的回归方程精度高,能研究几种因素间交互作用等优点<sup>[23-24]</sup>。本实验以黄酮提取率为考察指标,在单因素试验基础上,利用响应曲面法对马兰头黄酮提取工艺条件进行优化,以获得提取马兰头黄酮的最佳工艺条件,为马兰头中黄酮成分的提取提供参考,为我市野生植物资源的综合开发利用与深加工提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

马兰头地上部分采自连云港市花果山,洗净在60℃于电热恒温鼓风干燥箱中烘干至质量恒定,粉碎过60目

收稿日期: 2011-08-02

作者简介: 夏海涛(1960—),男,教授,硕士,主要从事应用化学及分析化学研究。E-mail: xht161006@hhit.edu.cn

筛。用石油醚浸泡去色,重复3次,余下的固体粉末挥发干备用。

95%乙醇、石油醚(均为分析纯) 国药集团(上海)化学试剂有限公司;芦丁标准品 中国药品生物制品鉴定所。

## 1.2 仪器与设备

UV-2550型紫外分光光度计 日本岛津公司; RE-5285A型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; KDM型控温电热套 浙江舟山海源仪器厂; TDL-4型台式离心机 上海安亭科学仪器厂; XA-1型固体粉碎机 金坛市科兴仪器厂。

## 1.3 方法

### 1.3.1 黄酮提取工艺流程

马兰头干粉→乙醇溶液提取→离心→滤液→减压浓缩→提取液定容→测定总黄酮含量

### 1.3.2 黄酮含量测定

以芦丁为标样,按文献[25]方法测定黄酮含量。标准曲线回归方程为 $A = 0.026 + 0.0287x$ ( $x$ 为芦丁质量浓度,范围为5.0~32mg/L,  $A$ 为吸光度),  $R = 0.9980$ 。根据方程可计算黄酮含量。

$$\text{马兰头黄酮提取率/\%} = \frac{\text{提取液中黄酮含量}}{\text{原料质量}} \times 100$$

### 1.3.3 单因素试验

分别以不同的乙醇体积分数、液料比、提取温度、提取时间以及提取次数为单因素进行试验,考察其对马兰头中黄酮提取率的影响。

### 1.3.4 Box-Behnken 试验设计

在单因素试验基础上,确定Box-Behnken设计的自变量,以马兰头总黄酮提取率为响应值,通过响应面分析对提取条件进行优化。试验因素水平编码设计见表1。数据处理采用Design Expert 8.05统计软件分析。

表1 响应面优化试验因素水平表  
Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

水平	因素			
	A 提取 时间/min	B 提取 温度/℃	C 液料 比(mL/g)	D 乙醇 体积分数/%
-1	60	60	20	50
0	90	70	25	60
1	120	80	30	70

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

#### 2.1.1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

在提取温度70℃、提取时间90min、提取次数1次、液料比25:1的条件下,加入不同体积分数的乙醇溶液提取黄酮,所得结果见图1。如图1所示,随乙醇体积分数的增大,黄酮提取率开始增大,在乙醇体积分数为60%时,黄酮提取率最高,但随后下降。这是因为当溶液中乙醇体积分数高时,一些醇溶性杂质和脂溶性物质的溶出量增多,这些成分与黄酮类化合物竞争,与乙醇-水分子体系结合<sup>[26]</sup>,影响黄酮的溶出,从而导致黄酮提取率下降。

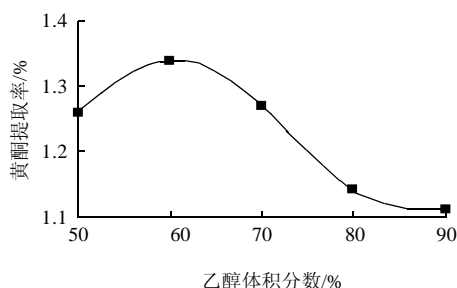


图1 乙醇体积分数对黄酮提取率的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on the yield of total flavonoids

#### 2.1.2 提取时间对黄酮提取率的影响

在乙醇体积分数为60%,提取次数、提取温度和液料比同2.1.1节条件下,考察不同提取时间对黄酮提取率的影响,结果见图2。如图2所示,随着提取时间的延长,黄酮提取率增大,90min达到最大值,继续延长提取时间,黄酮提取率下降。在一定范围内延长提取时间可以增加原料与提取液的接触时间,提高黄酮类物质在乙醇中的溶解度,增大提取率。但提取时间过长,原料中的其他醇溶性物质也会被溶解提取出来,使黄酮提取率下降。

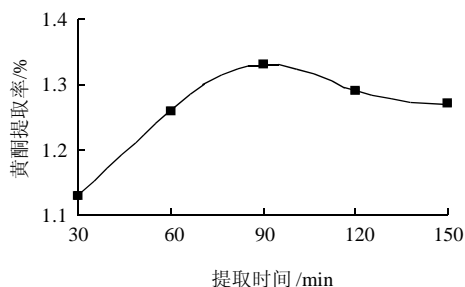


图2 提取时间对黄酮提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the yield of total flavonoids

#### 2.1.3 提取温度对黄酮提取率的影响

在其他条件与上述相同情况下,考察不同提取温度

对黄酮提取率的影响,结果见图3。如图3所示,温度对黄酮提取率影响较大,提取温度低于70℃时,随着提取温度的上升,黄酮提取率也随之增加,高于70℃后,黄酮提取率略有下降。在高温环境下,黄酮类物质易于氧化,结构受到破坏,同时温度过高,杂质的溶出量也会增加,从而阻碍黄酮类物质的溶出,导致提取率下降,故温度以70℃为宜。

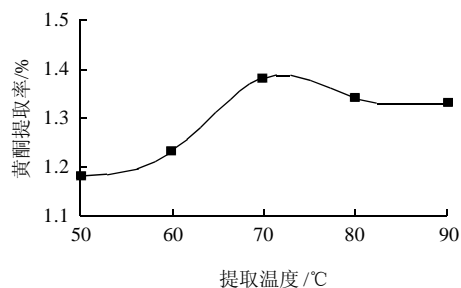


图3 提取温度对黄酮提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on the yield of total flavonoids

#### 2.1.4 液料比对黄酮提取率的影响

其他条件不变,考察不同液料比对黄酮提取率的影响,结果见图4。如图4所示,黄酮提取率随着液料比的增大而上升,在液料比超过25:1后,黄酮提取率下降。在一定范围内,增加溶剂用量有利于黄酮类物质的溶出。溶剂用量少,黄酮溶出量小,提取不完全,溶剂用量过大,不但成本增加,同时在有限时间内黄酮也会提取不完全<sup>[27]</sup>。综合考虑经济因素和后续工艺的简化,液料比25:1为宜。

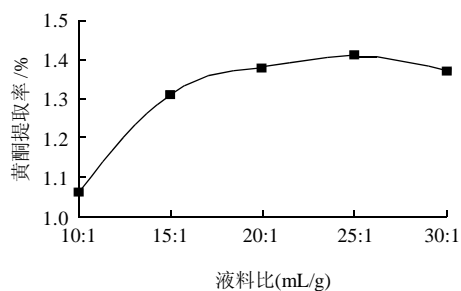


图4 液料比对黄酮提取率的影响

Fig.4 Effect of liquid-to-material ratio on the yield of total flavonoids

#### 2.1.5 提取次数对黄酮提取率的影响

在提取条件相同下,考察重复提取次数对黄酮提取率的影响,结果见图5。随提取次数的增加,黄酮提取率明显下降,说明马兰头中残留的黄酮类物质已经很少,再增加提取次数已无意义,因此,从减少操作环节,节约成本考虑,黄酮重复提取2次为宜。

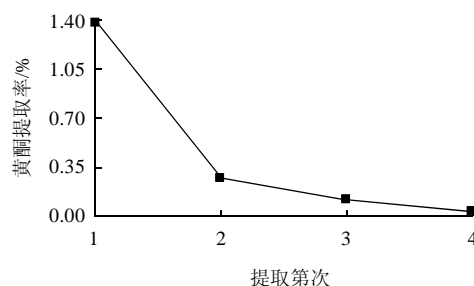


图5 提取次数对黄酮提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction number on the yield of total flavonoids

## 2.2 响应曲面优化试验

表2 黄酮提取响应面分析方案及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A 时间 / min	B 温度 /℃	C 液料比 / (mL/g)	D 乙醇体积分数 /%	黄酮提取率 /%
1	0	1	0	-1	1.21
2	1	-1	0	0	1.39
3	0	-1	0	1	1.32
4	0	-1	0	-1	1.08
5	-1	1	0	0	1.28
6	0	-1	1	0	1.23
7	0	-1	-1	0	1.19
8	0	0	0	0	1.59
9	0	0	-1	1	1.19
10	0	1	-1	0	1.08
11	0	1	0	1	1.34
12	1	0	-1	0	1.28
13	0	0	-1	1	1.18
14	-1	0	1	0	1.14
15	1	1	0	0	1.41
16	1	0	0	-1	1.31
17	-1	0	0	1	1.23
18	1	0	1	0	1.53
19	-1	0	-1	0	1.12
20	-1	0	0	-1	1.09
21	0	0	1	1	1.43
22	0	0	0	0	1.61
23	0	0	0	0	1.59
24	-1	-1	0	0	1.08
25	0	1	1	0	1.39
26	0	0	-1	-1	1.09
27	1	0	0	1	1.49

在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,选择提取温度、提取时间、液料比、乙醇体积分数进行四因素三水平的响应面分析方法,确定黄酮最佳提取条件,结果见表2。将所得的试验数据采用 Design Expert 软件进行多元回归拟合,得到黄酮提取率对提取时间(A)、提取温度(B)、液料比(C)和乙醇体积分数(D)的二次多项回归方程:

$$\text{黄酮提取率}/\% = 1.60 + 0.12A + 0.035B + 0.081C + 0.085D - 0.045AB + 0.058AC + 0.067BC - 0.027BD + 0.038CD - 0.13A^2 - 0.18B^2 - 0.20C^2 - 0.18D^2$$

表3 回归模型方差分析

Table 3 Variance analysis for the established regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	0.7403	14	0.0529	90.7630	< 0.0001
A	0.1801	1	0.1801	309.0679	< 0.0001
B	0.0147	1	0.0147	25.2300	0.0002
C	0.0784	1	0.0784	134.5745	< 0.0001
D	0.0867	1	0.0867	148.8057	< 0.0001
AB	0.0081	1	0.0081	13.9025	0.0023
AC	0.0132	1	0.0529	22.6985	0.0003
AD	0.0004	1	0.0004	0.6865	0.4235
BC	0.0182	1	0.0182	31.2801	< 0.0001
BD	0.0031	1	0.0030	5.1919	0.0382
CD	0.0056	1	0.0056	9.6544	0.0077
A <sup>2</sup>	0.0942	1	0.0942	161.7179	< 0.0001
B <sup>2</sup>	0.1665	1	0.1665	285.6988	< 0.0001
C <sup>2</sup>	0.2037	1	0.2037	349.5606	< 0.0001
D <sup>2</sup>	0.1760	1	0.1760	302.0993	< 0.0001
残差	0.0070	12	0.0006		
失拟项	0.0067	10	0.0007	4.8580	0.1830
纯误差	0.0003	2	0.0001		
总变异	0.7473	26			

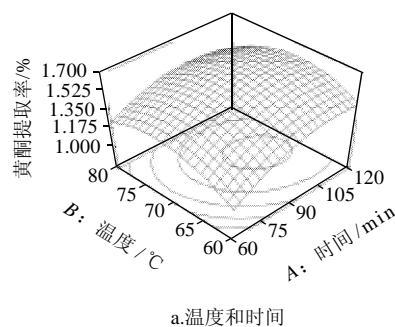
 $R^2=0.9901$   $R^2_{Adj}=0.9802$   $CV=1.85\%$ 

注:  $P < 0.05$ , 差异显著;  $P < 0.01$ , 差异极显著。

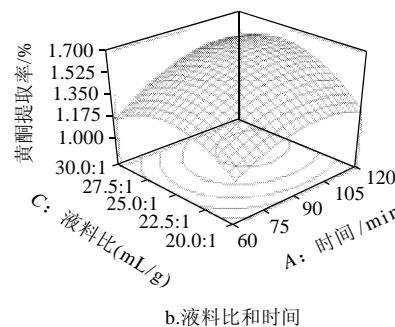
对该回归模型进行方差分析, 结果见表3。由表3可知, 模型  $P < 0.0001$ , 表明响应回归模型达到了极显著水平, 失拟项  $P = 0.1830 > 0.05$ , 不显著, 模型的校正确定系数  $R^2 = 0.9901$ , 说明该模型拟合程度良好<sup>[28]</sup>。模型的修正相关系数  $R^2_{Adj} = 0.9802$ , 表明该方程较好地反映了提取时间、提取温度、液料比和乙醇体积分数与马兰头黄酮提取率的关系, 总变异中只有 1.98% 不能用此方程解释, 因此可用此模型对马兰头总黄酮的提取进行分析和预测。由回归模型的方差分析结果知, 方程一次项 A、B、C、D 和二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>、D<sup>2</sup> 对黄酮提取率的影响均达极显著水平, 交互项 AD 不显著, BD 显著, AB、AC、BC、CD 极显著。

回归模型的响应曲面见图6。由图6a可以看出, 随提取时间和温度的增加黄酮提取率呈上升趋势, 当提取时间和温度达到某一水平时, 黄酮提取率达到最大值, 此后没有进一步提高而是有所下降, 可能是由于时间长、温度高使黄酮分解<sup>[26]</sup>。由等高线可知, 沿提取时间轴向等高线相对密集, 说明提取时间对黄酮提取率的影响比温度大。图6b表明, 黄酮提取率随提取时间的增加和液料比的提高快速增加, 在液料比 26.5:1(mL/g)、时间 105.5min 附近可以达到响应值最高点。等高线呈椭圆形, 说明两因素有明显的交互作用, 影响显著<sup>[29]</sup>。图6c表明, 黄酮提取率随液料比和温度的增加先增大后减小, 当提取温度比较低时, 液料比对黄酮提取率的影响比较显著, 表现为曲线较陡。等高线图表明, 液

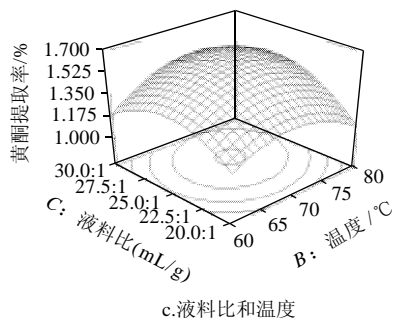
料比对响应值的影响比温度影响显著, 两因素的交互作用较强, 影响显著。图6d表明, 在乙醇体积分数 62.5%、温度 70.3℃ 附近可以达到响应值最高点。等高线图表明, 乙醇体积分数对响应值的影响比温度影响显著, 两因素对黄酮提取率的交互影响类似于图6b。图6e显示在乙醇体积分数 62.4%、料液比 26.2:1 附近可以达到响应值最高点。两因素对黄酮提取率的交互影响类似于图6b。



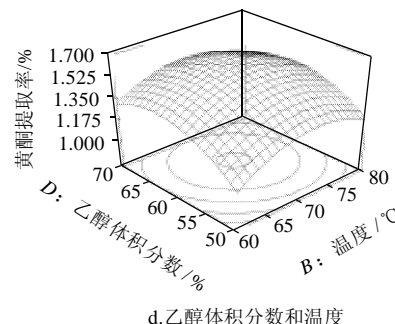
a. 温度和时间



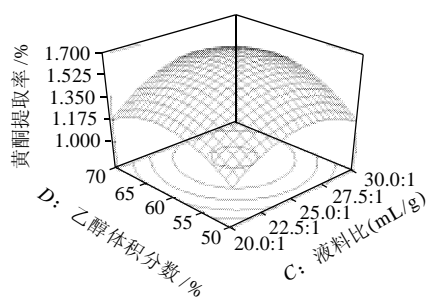
b. 液料比和时间



c. 液料比和温度



d. 乙醇体积分数和温度



e. 液料比和乙醇体积分数  
各响应面固定水平都为零水平。

图6 各两因素交互作用对黄酮提取率影响的响应曲面

Fig.6 Response surface plots showing the effects of pairwise interactions of the factors on the yield of total flavonoids

通过软件 Design-Expert 求解回归方程, 得到马兰头总黄酮的最佳提取工艺条件为提取时间 105.50min、提取温度 70.74℃、液料比 26.61:1(mL/g)、乙醇体积分数 62.61%, 总黄酮提取率的预测值为 1.65%。考虑实际操作, 将实验条件修改为提取时间 105min、提取温度 71℃、液料比 26.5:1(mL/g)、乙醇体积分数 63%。

### 2.3 马兰头总黄酮最佳提取条件验证实验

在 2.2 节所得最佳条件下重复提取 3 次, 测定实际提取率为 1.62%, 与预测值基本吻合, 偏差较小。说明得到的回归模型与实际情况拟合很好, 进一步验证了该模型的可行性。

## 3 结 论

在单因素试验基础上, 利用响应曲面法建立了马兰头中总黄酮提取率与时间、温度、液料比、乙醇体积分数之间关系的二次多项回归模型, 经验证该模型拟合程度高, 准确有效。优化得到的最佳提取工艺修正条件为提取时间 105min、提取温度 71℃、液料比 26.5:1、乙醇体积分数 63%, 在此条件下得到的实际黄酮提取率与预测值基本吻合, 说明 Box-Behnken 设计法用于马兰头中总黄酮提取工艺的优化筛选可行。

### 参考文献:

- [1] 童妙君. 野生蔬菜马兰头及其栽培要点[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(4): 72-74.
- [2] 庄卫红. 马兰的价值及栽培[J]. 上海蔬菜, 2009(1): 38-39.
- [3] 李林. 野生蔬菜马兰人工栽培技术[J]. 西北园艺, 2009(4): 25-26.
- [4] 李志豪, 刘跃钧, 徐启献. 不同季节中马兰 10 个类型的主要营养成分分析[J]. 江西林业科技, 2008(5): 43-46.

- [5] 许文清, 龚小见, 周欣, 等. 马兰化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1056-1060.
- [6] 雷学仿, 彭珊珊, 张奇凤, 等. 马兰菜中的营养元素[J]. 广东微量元素科学, 1999, 6(10): 64-65.
- [7] 马英姿, 蒋道松. 马兰挥发性成分研究[J]. 经济林研究, 2002, 20(2): 69-70.
- [8] 许泳吉. 野生植物马兰的营养成分[J]. 山东化工, 2006, 35(3): 42-45.
- [9] 郑和权, 周守标, 朱肖锋, 等. 超声波辅助法提取马兰总黄酮的研究[J]. 中国林副特产, 2008(4): 14-16.
- [10] 吕丽爽, 谢天飞, 樊玉洁. 马兰提取物抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 122-126.
- [11] 许文清, 龚小见, 周欣, 等. 马兰化学成分及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3172-3174.
- [12] 徐庆荣, 张保功, 刘娟, 等. 全叶马兰的抗炎镇痛作用研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(3): 199-201.
- [13] 姜显光, 侯冬岩, 回瑞华. 马兰叶中黄酮的不同提取方法比较[J]. 现代农业科技, 2010(16): 21-27.
- [14] FAN Gaojun, KIM S H, HAN B H, et al. Glyceroglycolipids, a novel class of platelet-activating factor antagonists from *Kalimeris indica*[J]. Phytochemistry Letters, 2008, 1(4): 207-210.
- [15] 周俊, 周德生. 天然黄酮类化合物对心脑血管的药理研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(6): 725-727.
- [16] ZHANG Guowen, HE Li, HU Mingming. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities *in vitro*[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(1): 18-25.
- [17] LIU Jun, LIN Songyi, WANG Zuozhao, et al. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Maydis stigma* and its nitrite-scavenging ability [J]. Food and Bioproducts Processing, 2011, 89(4): 333-339.
- [18] 刘蕊. 黄酮类化合物的药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2): 234-236.
- [19] HUANG Wen, XUE An, NIU Hai, et al. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 1147-1154.
- [20] CANDIRACCI M, CITTERIO B, PIATTI E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*[J]. Food Chemistry, 2012, 131(2): 493-499.
- [21] DONG Lili, FU Yujie, ZU Yuangang, et al. Negative pressure cavitation accelerated processing for extraction of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2011, 50(8): 780-789.
- [22] 陈晓慧, 徐雅琴. 黄酮类化合物生物活性及在食品中的应用研究[J]. 食品工程, 2006(3): 12-14.
- [23] 熊子文, 罗丽萍, 张丽丽. 响应面法优化野艾蒿总黄酮的超声波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 38-42.
- [24] 孔娟, 刘晓宇, 王蕊霞, 等. 葛根多糖和黄酮综合提取工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 43-47.
- [25] 刘玉芬, 夏海涛, 杨树平. 紫外分光光度法测定剑麻花中总黄酮的含量[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 418-419.
- [26] 朱珠, 冷进松. 响应面分析法优化仙人掌黄酮提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 185-189.
- [27] 甘露露, 邓泽元. 响应曲面法优化醇提荷叶复方物超临界萃取残渣中黄酮的工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(18): 26-30.
- [28] 欧阳辉, 余佑, 张永康. 纤维素酶提取湘西椴柑皮中总黄酮的工艺优化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 67-70.
- [29] 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.